

1. Einleitung.....	1
2. Aufgabenstellung.....	9
3. Abkürzungsverzeichnis.....	10
4. Material und Methoden.....	11
4.1. Material.....	11
4.1.1. Geräte.....	11
4.1.2. Chemikalien.....	12
4.1.3. Enzyme.....	15
4.1.4. Kits.....	15
4.1.5. DNA-Oligonukleotide.....	16
4.1.6. Antiseren.....	16
4.1.7. Transfektionsreagenzien.....	17
4.1.8. Ausgangsvektoren.....	17
4.1.9. Zellkultur.....	18
4.1.10. Sonstige Materialien.....	20
4.2. Versuchsdurchführung.....	20
4.2.1. RT-PCR.....	20
4.2.2. Immunhistochemie.....	21
4.2.3. Wachstumskurven.....	21
4.2.4. Transfektionsschemata.....	22
4.2.5. Klonierung.....	24
4.2.6. Immunfluoreszenz.....	25
4.2.7. FACS-Analysen.....	25
4.2.8. Statistik.....	26
5.1. Nestinexpression in Ins-1, HiB5 und hMSC-TERT.....	27
5.2. Zellspezifische Wachstumscharakteristika.....	29
5.3. Optimale Transfektionsbedingungen.....	32
5.4. Vektorkonstruktion.....	36
5.5. Spezifität der Vektoren.....	39
5.5.1. Immunfluoreszenz.....	39
5.5.2. FACS-Analysen.....	41
6. Diskussion.....	44
7. Zusammenfassung.....	47
8. Literaturverzeichnis.....	49

Inhaltsverzeichnis

---

9. Anhang ..... |

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - <i>Potentielle Quellen für b-Zellen zur Zelltherapie des Diabetes mellitus....</i>	4
Tabelle 2 - <i>Eigenschaften von Stammzellen unterschiedlicher Herkunft im Hinblick auf die Nutzbarkeit für die Entwicklung zelltherapeutischer Strategien. ....</i>	6
Tabelle 3 - <i>Inkubationstemperaturen und Bezugsquellen verwendeter Restriktasen sowie deren Aktivität.....</i>	15
Tabelle 4 - <i>Primersequenzen, Produktgröße, primerspezifische PCR-Bedingungen</i>	16
Tabelle 5 - <i>Darstellung des Effectene<sup>TM</sup> - Pipettierschemas zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen.....</i>	22
Tabelle 6 - <i>Darstellung des FuGENE - Pipettierschemas zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen. ....</i>	23
Tabelle 7 - <i>Darstellung des LipofectAMINE<sup>TM</sup> - Pipettierschemas zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen.....</i>	23
Tabelle 8 - <i>Darstellung des Metafectene<sup>TM</sup> - Pipettierschemas zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen.....</i>	23
Tabelle 9 - <i>Schematische Darstellung der konstruierten Vektoren. ....</i>	36

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - <i>Nachweis von Nestin auf Proteinebene in einer humanen Langerhans'schen Insel.....</i>	8
Abbildung 2 - <i>Restriction Maps und Multiple Cloning Sites von pEGFP-1, pEGFP-C1, pnes1852tk/lacZ und p401ZgII .....</i>	18
Abbildung 3 – <i>Erläuterung der FACS-Analysen.....</i>	26
Abbildung 4 - <i>Nestin-mRNA-Nachweis in Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen.....</i>	28
Abbildung 5 - <i>Nachweis von Nestin auf Proteinebene in Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen .....</i>	29
Abbildung 6 - <i>Zellspezifische Wachstumscharakteristika von Ins-1- HiB5- und hMSC-TERT-Zellen .....</i>	31
Abbildung 7 - <i>Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen für Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen mittels FACS-Analysen .....</i>	35
Abbildung 8 - <i>Vektorkonstrukte, die Nestin-positive Zellen nach Transfektion selektiv zur Expression von EGFP anregen sollten.....</i>	38
Abbildung 9 - <i>Phasenkontrastaufnahmen von Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen sowie deren Immunfluoreszenzaufnahmen mit Expression von EGFP .....</i>	40
Abbildung 10 - <i>FACS-Analysen der selektiven Vektorkonstrukte bei Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen unter den jeweils optimalen Transfektionsbedingungen.....</i>	42
Abbildung 11 - <i>Gesamtprojektskizze von der Explantation bis zur Transplantation beim Menschen .....</i>	47

## 1. Einleitung

Der Diabetes mellitus gehört in den Industrienationen zu den bedeutendsten Volkskrankheiten. Bis zum Jahr 2010 werden über 350 Mio. Diabetiker weltweit erwartet [1]. In Deutschland leben derzeit etwa 5 Mio. Patienten mit Diabetes mellitus. Die Prävalenz der Erkrankung ist ansteigend. Die durch die Erkrankung entstehenden Kosten für das gesetzliche Gesundheitssystem sind enorm und wurden in der 1998 durchgeführten CODE-2-Studie auf jährlich 18,5 Mrd. DM geschätzt. Ein Patient mit diabetischen Folgeerkrankungen verursachte vierfach höhere Kosten als ein Patient ohne Komplikationen [2]. Dabei liegt die kumulative Inzidenz für Folgeerkrankungen sowohl bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 als auch Typ 2 bei etwa 50% und ist somit vergleichbar [3].

Bei beiden Typen spielt die Reduktion Insulin produzierender Zellen eine entscheidende Rolle[4-6]. Dem Diabetes mellitus Typ 2 liegt pathophysiologisch im wesentlichen eine Kombination aus genetisch determinierter Insulinresistenz und begleitender Insulinsekretionsstörung zu Grunde. Dagegen entsteht der Typ-1-Diabetes auf dem Boden einer autoimmunen, T-Zell-vermittelten Zerstörung der Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen im endokrinen Pankreas, was zu einem absoluten Insulinmangel führt. Daher können Typ 2 Diabetiker noch lange Zeit mit diätetischen Maßnahmen und oralen Antidiabetika behandelt werden, während Typ 1 Diabetiker von Anfang an auf eine lebenslange exogene Insulinsubstitution angewiesen sind.

So ist ein enger Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und mikrovaskulären Erkrankungen, wie Retinopathie und Nephropathie, sowie neuropathischen Beschwerden, studienübergreifend anerkannt [3].

Trotz Einführung der intensivierten Insulintherapie und stetig neu erscheinender, verbesserter Insulinpräparate /-präparationen lässt sich eine physiologische endogene Insulinsekretion durch eine exogene Substitution nur unzureichend imitieren. Des weiteren gelingt im Tagesverlauf und abhängig von der *Compliance* der Patienten eine kontinuierliche Kontrolle der Blutzuckerspiegel nur bedingt. So entwickeln etwa 50% der Patienten Langzeit-Probleme [7]. Wie wichtig die glykämische Kontrolle zur Reduktion von Folgeerkrankungen ist, wird in der DCCT (Diabetes Control and Complications Trial), der Kumamoto-Studie oder der UKPDS (UK Prospective Diabetes Study) betont [8-10]. Als bekannte Beispiele sind

die diabetische Polyneuropathie sowie mikro- und makrovaskuläre Komplikationen wie die koronare Herzkrankheit, der ischämische Insult, die periphere arterielle Verschlusskrankheit, die chronische Niereninsuffizienz oder die diabetische Retinopathie zu nennen.

In Zusammenhang mit der unzureichenden Imitation der endogenen physiologischen Insulinsekretion wird momentan weltweit nach Alternativen zur exogenen Insulinsubstitution gesucht. So wird seit einigen Jahren an den Möglichkeiten der Zelltherapie mit Transplantation funktioneller, Insulin produzierender  $\beta$ -Zellen, Langerhans'sche Inseln oder ganzer Pankreata geforscht.

Klinisch bereits eingeführt ist die allogene Transplantation ganzer Pankreata. So fanden allein im Jahr 1997 etwa 10000 Pankreastransplantationen statt. Aufgrund der hohen Komplikationsrate mit einer peri- und postoperativen Mortalität von bis zu 10%, werden diese jedoch nur bei dialysepflichtigen Typ-1-Diabetikern mit präterminaler Niereninsuffizienz durchgeführt. In 88% der Fälle wurde daher simultan eine Niere übertragen wurde. Die Insulinunabhängigkeit bei Transplantatüberleben überstieg bei simultanen Nieren-/Pankreastransplantationen 80% respektive 70% bei sequentiellen Transplantationen bzw. 65% bei reinen Pankreastransplantationen. Für Misserfolge innerhalb des ersten Jahres sind in einem Drittel der Fälle Transplantatabstoßungen ursächlich. Um das Risiko von Abstoßungsreaktionen zu verringern, wird *post transplantationem* eine immunsuppressive Therapie in Form einer 4-fach-Kombination aus Cyclosporin, Azathioprin, Steroiden und polyklonalem anti-T-Zell-Immunglobulin durchgeführt [11, 12].

Alternativ zur aufwändigen Operation steht seit einigen Jahren die Injektion Langerhans'scher Inseln in die Portalvene zur Verfügung. Bereits 1991 stellte man fest, dass in Leberparenchym eine große Anzahl Inseln implantiert werden kann, sofern dieses adäquat vaskularisiert ist, zumal das Umfeld dem des Pankreas gleicht und Insulin in den portalen Fluss sezerniert werden kann. Die Übertragung aufgereinigter Inseln erfolgt mittels perkutaner transhepatischer Punktion und Injektion der Inseln in die Portalvene unter Lokalanästhesie [13, 14]. Als Vorteile im Vergleich zum operativen Vorgehen sind der minimalinvasive Aufwand, die damit verbundene geringere Mortalität, die Übertragung nur geringer Zellmassen und damit einhergehende moderatere Immunsuppression zu nennen. Diese Inseltransplantationen wurden unabhängig von Geschlecht, Alter, Anzahl der

Spender und Reinheit der Inseln durchgeführt. Allerdings erreichten bei Injektion der Inseln über die Portalvene nur knapp 10% der Empfänger eine Insulinunabhängigkeit von über einem Jahr, im Gegensatz zu 65-80% insulinunabhängiger Patienten nach funktionstüchtig transplantierte Pankreata [11, 15]. Als Hauptursache werden  $\beta$ -Zellschädigende Auswirkungen bei der aufwändigen Aufreinigung der Inseln aus den Spenderorganen angenommen sowie die diabetogenen Wirkungen der steroidalen Immunsuppression.

Vor diesem Hintergrund wurde eine Studie durchgeführt, die als „*Edmonton-Protokoll*“ bekannt geworden ist. Hier wurden Typ-1-Diabetikern mit vorausgehenden Hypoglykämien Inseln über die Portalvene injiziert. Die Transplantation erfolgte ungeachtet des HLA-Typs aber unter Berücksichtigung der ABO-Kompatibilität. Die darauffolgende Immunsuppression war steroidfrei und mit nur minimalen Mengen von Calcineurin Inhibitoren, um eine Diabetogenität zu vermeiden. Nach perkutaner Injektion in die Portalvene wurden alle an dieser Studie teilnehmenden Patienten für mindestens 1 Monat insulinunabhängig. 80% blieben dies noch nach einem Jahr, einige waren es über 2 Jahre. Bei keinem der Teilnehmer trat erneut ein diabetisches Koma auf, alle erreichten positive C-Peptid-Spiegel, die Blutzuckerspiegel waren *post injectionem* stabiler als zuvor und der HbA1c verbesserte sich durchschnittlich von 8,3% (*prae injectionem*) auf 5,8% (*post injectionem*). Lebensbedrohliche Komplikationen traten nicht auf. Schlimmstenfalls kam es vereinzelt zu einer Blutung oder einer Portalvenenthrombose, so dass über 90% der Patienten innerhalb von 12-24h nach dem Eingriff wieder aus der Klinik entlassen werden konnten [16-18].

Obwohl diese Studie international großen Anklang fand und viele Inseltransplantationszentren das Protokoll übernahmen, konnten bislang nur wenige Inseltransplantationen durchgeführt werden. Ursache ist der vorliegende Mangel an Spenderorganen [19]. Erschwerend kommt hinzu, dass Empfänger etwa 12000 Inseln / kg Körpergewicht erhalten sollten, jedoch maximal 350000 Inseln pro Spender und Aufreinigung gewonnen werden können. Entsprechend sind mindestens 2 Pankreata pro erfolgreicher Injektion von Pankreasinseln erforderlich[17].

Auf Grund dieses Mangels wird derzeit intensiv nach Möglichkeiten zur Generierung eines unlimitierten Zellpools an  $\beta$ -Zellen gesucht. Humane Inselzellen, Xenogene Inselzellen, *in vitro* generierte Insulin-produzierende Zellen und

Stammzellen sind Gegenstand der Forschung [eine detaillierte Übersicht ist in Tabelle 1 dargestellt].

Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Entwicklung einer neuen Strategie zur Isolation, Expansion und Differenzierung adulter Stammzellen aus humanen Inseln des Pankreas. So wird in den folgenden Ausführungen zunächst über den Stand der aktuellen Stammzellforschung berichtet.

---

### **Humane Inselzellen**

Inselzellen aus Spenderpankreatata (derzeit bei der Pankreasinseltransplantation gebräuchlich)

*Ex vivo* expandierte humane Pankreasinseln

---

### **Xenogene Inselzellen**

---

#### ***In vitro* generierte Insulin-produzierende Zellen**

Transformierte  $\beta$ -Zelllinien aus Nagern

Transformierte  $\beta$ -Zelllinien vom Menschen

Neuroendokrine transformierte Zellen

Somatische Zellen

-mit  $\beta$ -Zelleigenschaften (Leberzellen, intestinale K-Zellen)

-ohne  $\beta$ -Zelleigenschaften (Fibroblasten, Muskelzellen)

---

### **Stammzellen**

Embryonale Stammzellen

Adulte Stammzellen

-Aus dem Pankreas

-Extrapankreatisch

---

### **Tabelle 1 - Potentielle Quellen für $\beta$ -Zellen zur Zelltherapie des Diabetes mellitus [20].**

Stammzellen kommen sind in nahezu jedem Gewebe nachgewiesen. Ihre Hauptmerkmale bestehen in einer hohen Selbsterneuerungsrate sowie ihrer Möglichkeit, sich in verschiedene Körperzellen zu differenzieren. Unterscheiden muss man zwischen adulten bzw. gewebspezifischen und embryonalen Stammzellen [vgl. Tabelle 2].

Letztere konnten aus Blastozysten gewonnen und über mehr als 50 Passagen bzw. einen Zeitraum von 4-5 Monaten *in vitro* kultiviert werden, ohne ihre pluripotenten Eigenschaften einzubüßen [21-23]. Darüber hinaus konnte bei

embryonalen Stammzellen der Maus [24-30], des Affen [31] und des Menschen [32, 33] *in vitro* sowohl durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren als auch spontan eine Differenzierung in Insulin-produzierende Zellen beobachtet werden. Aus diesem Grund sind humane embryonale Stammzellen als mögliche Basis einer  $\beta$ -Zellersatztherapie ins Gespräch gekommen. Es gestaltet sich jedoch schwierig, die Differenzierung gezielt in Richtung  $\beta$ -Zelle zu steuern. Bislang wurde kein Wachstumsfaktor gefunden, der die Differenzierung ausschließlich in einen bestimmten Zelltyp fördert [34]. Dennoch wurden bereits Insulin-produzierende Zellklone aus embryonalen Stammzellen gewonnen. Nachdem man diese in die Milz Streptozotocin-induzierter diabetischer Mäuse transplantiert hatte, wurden hyperglykämie Zustände innerhalb einer Woche ausgeglichen und eine erhöhte Steigerung der Insulinproduktion beobachtet [35]. Durch den Einsatz spezifischer Transkriptionsfaktoren konnte die initial geringe Ausbeute von  $\beta$ -Zell-Phänotypen noch deutlich gesteigert werden [26]. Der große Nachteil embryonaler Zellen im undifferenzierten Zustand ist jedoch die unkontrollierbare Entwicklung von Teratomen und Teratokarzinomen [36, 37]. Dieses tumorgene Potential ist auf die hohe Plastizität der embryonalen Stammzellen zurückzuführen. So sind viele Signalübertragungswege in embryonalen Stammzellen aktiviert, die auch bei malignen Tumoren des Menschen aktiviert vorkommen [38-41]. Eine Nutzung embryonaler Stammzellen ist daher erst gefahrlos möglich, wenn der Entwicklungsprozess bis hin zur  $\beta$ -Zelle vollständig verstanden wird und die Tumorgenität kontrolliert werden kann. Eine exakte Nachahmung der  $\beta$ -Zell-Neogenese muss *in vitro* möglich sein, um ein geeignetes Selektionsverfahren entwickeln zu können.

Selbst wenn dies gelingen sollte, bestehen jedoch gegenüber der Gewinnung embryonaler Stammzellen und Keimbahnzellen und deren klinischer Nutzung auf Grund ihrer Herkunft aus der inneren Zellmasse der Blastozyste schwere ethische Bedenken [42]. Deshalb ist die Gewinnung neuer embryonaler Stammzelllinien in Deutschland seit dem Jahr 2002 (Stichtagregelung) untersagt. Lediglich embryonale Stammzellen, die zuvor gewonnen wurden, dürfen in der Forschung verwendet werden. International, bsp. in Südkorea, gibt es keine gesetzlichen Einschränkungen. Im Vergleich zum Ausland ist die deutsche Forschung an embryonalen Stammzellen daher ins Hintertreffen geraten. Trotz aller Erfolge in der jüngeren Vergangenheit auf

dem Gebiet der embryonalen Stammzellforschung liegt ein generierter, unlimitierter, transplantabler  $\beta$ -Zellpool noch in weiter Ferne.

<b>Embryonale Stammzellen</b>	<b>Adulte, gewebspezifische Stammzellen</b>
Pluripotent (alle Zelltypen möglich)	Multipotent (viele Zelltypen möglich)
Einfach Identifizierung	Schwere Identifizierung
Leichte Isolation	Schwere Isolation
Differenzierung nicht determiniert	Differenzierung determiniert
Ethische Bedenken	Keine ethischen Bedenken
Proliferation in vitro hoch	Proliferation in vitro eingeschränkt
Homing nicht vorgegeben	Homing vorgegeben
Herstellung großer Mengen möglich	Herstellung großer Mengen eingeschränkt
Gezielte Differenzierung eingeschränkt	Gezielte Differenzierung möglich
Wenig immunogen?	Wenig immunogen?
Tumorgenität hoch	Tumorgenität niedrig

**Tabelle 2 - Eigenschaften von Stammzellen unterschiedlicher Herkunft im Hinblick auf die Nutzbarkeit für die Entwicklung zelltherapeutischer Strategien [39].**

Bei der Nutzung adulter bzw. gewebspezifischer Stammzellen sind keinerlei ethische Bedenken vorhanden. Ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung ist im Vergleich zu embryonalen Stammzellen eher begrenzt. Die Annahme, sie könnten sich nur in Zellen ihres Ursprungsgewebes differenzieren, ist heute widerlegt. So konnten *in vitro* Zellen mit hepatischem Phänotyp aus adulten Stammzellen des endokrinen Pankreas [43] generiert werden bzw. Skelettmuskel [44], Leberparenchym [45], vaskuläres Endothel [46] und Astroglia [47] aus mesenchymalen Knochenmarksstammzellen [43, 48]. Mit Erfolg wurden auch hämatopoetische Zellen aus neuronalen [49] und muskulären [50] Vorläuferzellen generiert. Daher ist eine hohe Mobilität mittlerweile eine anerkannte Eigenschaft von Stammzellen [51]. Dennoch wurden Insulin-produzierende Zellen bislang ausschließlich aus duktalem [52] und intrainsulärem [43] Stammzellen gewonnen. Im Tierversuch konnten Epithelzellen aus Ausführungsgängen des Pankreas, die aus prädiabetischen

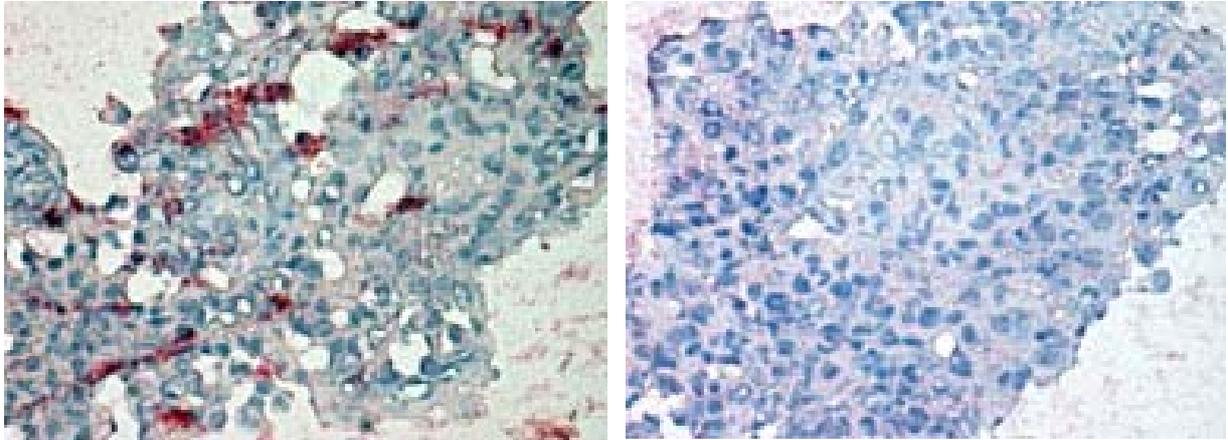
schlanken Mäusen isoliert wurden, dazu angeregt werden, funktionierende Inseln zu produzieren, die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Zellen enthielten [53]. Diese wurden nach Vermehrung *in vitro* unter die Nierenkapsel von NOD-(non-obese-diabetic)-Mäuse implantiert, worunter sich deren Blutzuckerspiegel normalisierten. Eine maligne Entartung der übertragenen Zellen oder eine Abstoßungsreaktion wurden nicht beobachtet. Die Transplantation humaner *in vitro* generierter Zellen wurde *in vivo* bislang noch nicht getestet.

Große Mengen Insulin-produzierender Zellen wären dazu nötig. Die Herstellung einer ausreichenden Zellzahl scheitert jedoch an der schweren Isolation und der eingeschränkten Proliferation adulter Stammzellen *in vitro*. Um adulte Stammzellen zur Proliferation und konsekutiv zur Differenzierung in  $\beta$ -Zellen anzuregen, sind daher neue Strategien nötig.

Der Schlüssel zur Lösung des Problems könnte Nestin sein, ein intermediäres Filamentprotein. Dieses wurde erstmals durch den monoklonalen Antikörper Rat.401 identifiziert [54] und im Verlauf als Stammzellmarker sich selbst erneuernder, adulter Vorläuferzellen des ZNS erkannt [55-57]. Interessanterweise korreliert die Expression von Nestin gut mit der Verteilung von ZNS-Vorläuferzellen *in vivo* sowohl auf mRNA-Ebene [55], wie auch auf Proteinebene [57]. Sobald sich diese Zellen jedoch in Astrozyten oder Oligodendrozyten differenzierten, ging die Nestin-Expression verloren [56, 58]. Des weiteren fand man ein 2nd Nestin Intron als Gewebsspezifität vermittelndes Element in ZNS-Vorläuferzellen [59-61]. Ferner entdeckte man Nestin auch im sich entwickelnden Skelettmuskel [62] sowie ein 1st Nestin Intron, welches als Kontrollelement für die Nestin Expression im Muskel verantwortlich ist [63].

So verfügen Nestin exprimierende Zellen über eine multipotentielle Kapazität, da sie sich in ZNS-, Skelettmuskel- und hämatopoetische Zellen *in vitro* zu differenzieren können [49, 64]. Zugleich teilen pankreatische und neuronale Zellen während der embryonalen Entwicklung viele phänotypische Eigenschaften [65-71]. Auch im Pankreas wurden Nestin exprimierende Zellen gefunden. Diese lagen zum einen in Langerhans'schen Inseln selbst, zum anderen in den Epithelien der Ausführungsgänge des Pankreas. In ihrem undifferenzierten Zustand waren sie negativ für die Expression von Insulin, Glukagon, Somatostatin sowie

pankreatischem Polypeptid und besaßen keine Marker vaskulärer Endothelien oder Neuronen [43, 72].



**Abbildung 1 - Nachweis von Nestin auf Proteinebene in einer humanen Langerhans'schen Insel:** Links: Immunhistochemische Färbung einer humanen Langerhans'schen Insel mit *Mouse Anti-Nestin Human specific Monoclonal Antibody* in 60x Vergrößerung. Rechts: Langerhans'sche Insel als Negativkontrolle ohne Antiserum.

So entstand die Hypothese, daß Strategien, die zur Generierung differenzierter neuronaler Zellen aus Nestin-positiven Vorläuferzellen des ZNS verwendet wurden, auch zur Entwicklung differenzierter Pankreaszellen aus Nestin-positiven duktalem und intra-insulärer Vorläuferzellen des Pankreas genutzt werden könnten.

## 2. Aufgabenstellung

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es daher, Nestin-positive Zellen durch Transfektion speziell klonierter Vektoren selektiv zur Expression eines Reportergens zu bringen. Sollte dies gelingen, dann bestünde nach diesem Prinzip die Möglichkeit, in weiteren Arbeitsschritten proliferationsinduzierende Sequenzen in Nestin-positive Vorläuferzellen des Pankreas zu transfizieren, um diese zu vermehren. In einem nächsten Schritt könnten diese vermehrten Zellen dann zur Differenzierung in Insulin produzierende  $\beta$ -Zellen angeregt werden, um einen unlimitierten Zellpool zu generieren.

Die aktuelle Arbeit sieht folgende Arbeitsschritte vor:

- Charakterisierung einer Nestin-negativen Zellkultur auf mRNA- und Proteinebene als Negativkontrolle
- Charakterisierung einer Nestin-positiven Zellkultur auf mRNA- und Proteinebene der Ratte
- Charakterisierung einer Nestin-positiven Zellkultur auf mRNA- und Proteinebene des Menschen
- Erfassung der spezifischen Wachstumscharakteristika der jeweiligen Zellkulturen zur Bestimmung des idealen Transfektionszeitpunkts
- Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen der jeweiligen Zellkultur
- Klonierung spezieller Vektoren, die Nestin-positive Vorläuferzellen selektiv zur Expression eines Reportergens bringen
- Kontrolle der gewebsspezifischen Eigenschaften des 2nd Nestin Intron
- Nachweis der Spezifität der Vektorkonstrukte im Immunfluoreszenzmikroskop und mittels *fluorescence activated cell sorter* (FACS)

### 3. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
CMV	Zytomegalie Virus
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HNI <sub>2</sub>	2nd Nestin Intron (Mensch)
HSV	Herpes simplex Virus
MCS	Multiple Cloning Site
mRNA	Messenger RNA
PBS	Physiologisch gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleinacid
RNAse	Ribonuklease
RNI <sub>2</sub>	2nd Nestin Intron (Ratte)
RNP	Rat Nestin Promoter
RT	Reverse Transkription
TK	Thymidine Kinase
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Geräte

##### **Artikel**

10mm Dishes

6mm Dishes

Absaugpumpe

Accu Jet®

Agarose-Gel-Elektrophorese-Kammer

Autoklav 23

Biofuge 28 RS

BioPhotometer 6131

Brutschrank: FUNCTION line

Digital-Kamera DXM 1200

FACScan

Falcon® Culture Slides

Falcon® MULTIWELL™ 6 well

Falcon® polystyrene conical tubes (15ml / 50ml)

Fluoreszenzmikroskop: Nikon ECLIPSE TE 1200-V

FugeOne®

Geldokumentationsanlage

Graduated Pipette Tips, RNase, DNase, DNA & Pyrogene FREE

Heizblock

Heizofen

Kunststoffküvetten

Laminar-Flow-Arbeitsbank

Magnetfish

##### **Firma:**

Hartenstein, Würzburg

Hartenstein, Würzburg

Hartenstein, Würzburg

Hartenstein, Würzburg

BioRad, Hercules CA

MELAG, Berlin

Heraeus, Sepatech GmbH, Osterode

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Sepatech GmbH, Osterode

Nikon

BD Biosciences, Heidelberg

Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ

Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ

Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ

Nikon

Hartenstein, Würzburg

Serva, Heidelberg

STAR LAB

Eppendorf, Engelsdorf

Heraeus Sepatech GmbH, Osterode

Hartenstein, Würzburg

Heraeus Sepatech GmbH, Osterode

Hartenstein, Würzburg

Mikroskop: WILOVERT S	hund, Wetzlar
Neubauer CE Zählkammer	Marienfeld Germany
pH-Meter digital	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Brand
Protein-Gel-Elektrophorese-Kammer	BioRad, Hercules CA
Reamix 2789	Hartenstein, Würzburg
Schüttelinkubator TH15 und TH25	Edmund Bühler
Thermo-cycler (GeneAmp PCR System 2400)	Perkin Elmer, Shelton CT
Thermo-cycler (GeneAmp PCR System 9700)	Perkin Elmer, Shelton CT
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
TOKAI HIT Thermoplate	Tokai Hit
Vortex genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY
Zentrifuge: Avanti™ J-25 Centrifuge	Beckman Coulter GmbH, Osterode
Zentrifuge: Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: MIKRO RAPID/K	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge: ROTANDA/RFC	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge: Ultracentrifuge L7-55	Beckman Coulter GmbH, Osterode

### 4.1.2. Chemikalien

#### **Artikel**

0,01% Poly-L-Ornithin  
10X Ex Taq™ Buffer  
2-Propanol  
5X First Strand Buffer  
Aceton  
Agarose, ultra select  
Aqua dest.  
Bacto agar  
Bacto tryptone

#### **Firma**

Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland  
Takara Biomedicals, Shiga, Japan  
Sigma, München  
GIBCO, Auckland, NZ  
Roth, Karlsruhe  
Roth, Karlsruhe  
Delta-Pharma, Pfullingen  
Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland  
Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland

## Material und Methoden

---

Bacto yeast extract	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Bromphenolblau	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley
BSA (1mg/µl)	Promega, Madison WI
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAKO Envision™ + System HRP Mouse	DAKO corporation, Carpinteria USA
DNA Ladder READY LOAD® 100 bp	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley
DNA Ladder READY LOAD® 1Kb	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley
dNTP Mix (10 mM)	Takara Biomedicals, Shiga, Japan
DTT (0,1 M)	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley
EDTA	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Ethanol (100 %)	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Fast Red Substrate System	DAKO corporation, Carpinteria USA
FBS (Foetal Bovine Serum) (hitzeinaktiviert)	GIBCO, Auckland, NZ
Fibronectin (1mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Hämatoxilin	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
HBSS	GIBCO, Auckland, NZ
HEPES-Buffer Sol (10mM)	GIBCO, Auckland, NZ
Hepes-Cl (0,1M)	
Isopropanol (100%)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
KCl (0.5M)	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
L-Glutamin für RPMI 1640	GIBCO, Auckland, NZ
Methanol 20%	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub> (15mM)	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
MOPS	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Na <sup>+</sup> -Acetat (3M)	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
NaCl (0,5M)	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
NaOH (12,5 N)	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Neurobasalmedium	GIBCO, Auckland, NZ
Oligo (dT) <sub>12-18</sub> (0,5 µg/µl)	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley
PBS Dulbecco's	GIBCO, Auckland, NZ

## Material und Methoden

---

Penicillin-Streptomycin (10000 IU)	GIBCO, Auckland, NZ
Phenol/Chloroform (3:1)	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Rhodamin Red anti-Mouse	Jackson ImmunoResearch
RPMI 1640 (without L-Glutamin, 11,1mM Glucose)	GIBCO, Auckland, NZ
SDS	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley
Sodium-Pyruvat MEM (100 mM)	GIBCO, Auckland, NZ
$\beta$ -Mercaptoethanol (50mM)	
TBS	
Tris Cl (pH8.3) (0,1M)	
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Trizol	Sigma-Aldrich, Steiheim, Deutschland
Trypsin-EDTA 1x	GIBCO, Auckland, NZ

#### 4.1.3. Enzyme

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment	Promega, Madison WI
DNAse I (10 U/μl)	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley
RNAse Inhibitor (40 U/μl)	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley
SUPER SCRIPT™II	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley
T4 DNA Polymerase	Promega, Madison WI
T4 DNA-Ligase	Promega, Madison WI
TaKaRa Ex Taq™ (5 units/μl)	Takara Biomedicals, Shiga, Japan

<b>Enzym</b>	<b>Aktivität</b>	<b>Inkubationstemperatur</b>	<b>Bezugsquelle</b>
EcoR I	(12U/μl)	37°C	Promega, Madison WI
Sal I	(10U/μl)	37°C	Promega, Madison WI
Not I	(10U/μl)	37°C	Promega, Madison WI
Hind III	(10U/μl)	37°C	Promega, Madison WI
Sma I	(10U/μl)	25°C	Promega, Madison WI
Xba I	(10U/μl)	37°C	Promega, Madison WI
Xho I	(10U/μl)	37°C	Promega, Madison WI

**Tabelle 3 - : Inkubationstemperaturen und Bezugsquellen verwendeter Restriktasen sowie deren Aktivität**

#### 4.1.4. Kits

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
QIAquick-Gel-Extraktion-Kit (RPM)™	QIAGEN, Hilden
Rapid-Pure-Miniprep-Kit (RPM)™	QIAGEN, Hilden
Rapid-Pure-Mini-Monsterprep (RPM4G)™	QIAGEN, Hilden
TRIZOL® Reagent	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley

#### 4.1.5. DNA-Oligonukleotide

Primer		Primersequenz	Produkt	Zyklen	Ta
rat- $\beta$ -Actin U1/D1	Up	5'-TCGTGCGTGACATTAAGAGAAGC-3'	276bp	30	58°C
	Down	5'-CAGCACTGTGTTGGCATAGAGGTC-3'			
hum- $\beta$ -Actin U1/D1	Up	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCC-3'	660bp	35	63°C
	Down	5'-TAGAAGCATTTGCGGTGGACGATG-3'			
rat-Nes-1/A	Up	5'-TCCCCCTTGCCTAATACCCTTGAGACTCCTGTGAC-3'	465bp	36	60°C
	Down	5'-TGTTTTCTGGGCTGAGCTGTTTTCTACTTTTACCT-3'			
hum-Nestin U2/D2	Up	5'-AGAGGGGAATTCCTGGAG-3'	495bp	35	58°C
	Down	5'-CTGAGGACCAGGACTCTCTA-3'			

**Tabelle 4 - Primersequenzen, Produktgröße, primerspezifische PCR-Bedingungen;** hum: human; Nes: Nestin; bp: Basenpaare; Ta: Annealingtemperature;

#### 4.1.6. Antiseren

Artikel	Firma
Mouse Anti-Nestin Human specific Monoclonal Antibody	Chemicon International, Temecula, CA, USA
Mouse Anti-Nestin Monoclonal Antibody	Chemicon International, Temecula, CA, USA

### 4.1.7. Transfektionsreagenzien

Artikel	Firma
Effectene™ Transfection Reagent	QIAGEN, Hilden
Enhancer (in Kombination mit Effectene™)	QIAGEN, Hilden
FuGENE 6 Reagent	Roche Molecular Biochemicals
LipofectAMINE™ Reagent (2mg/ml)	Invitrogen, Life Technolgies, Paisley
METAFFECTENE™	Biontex Laboratories GmbH

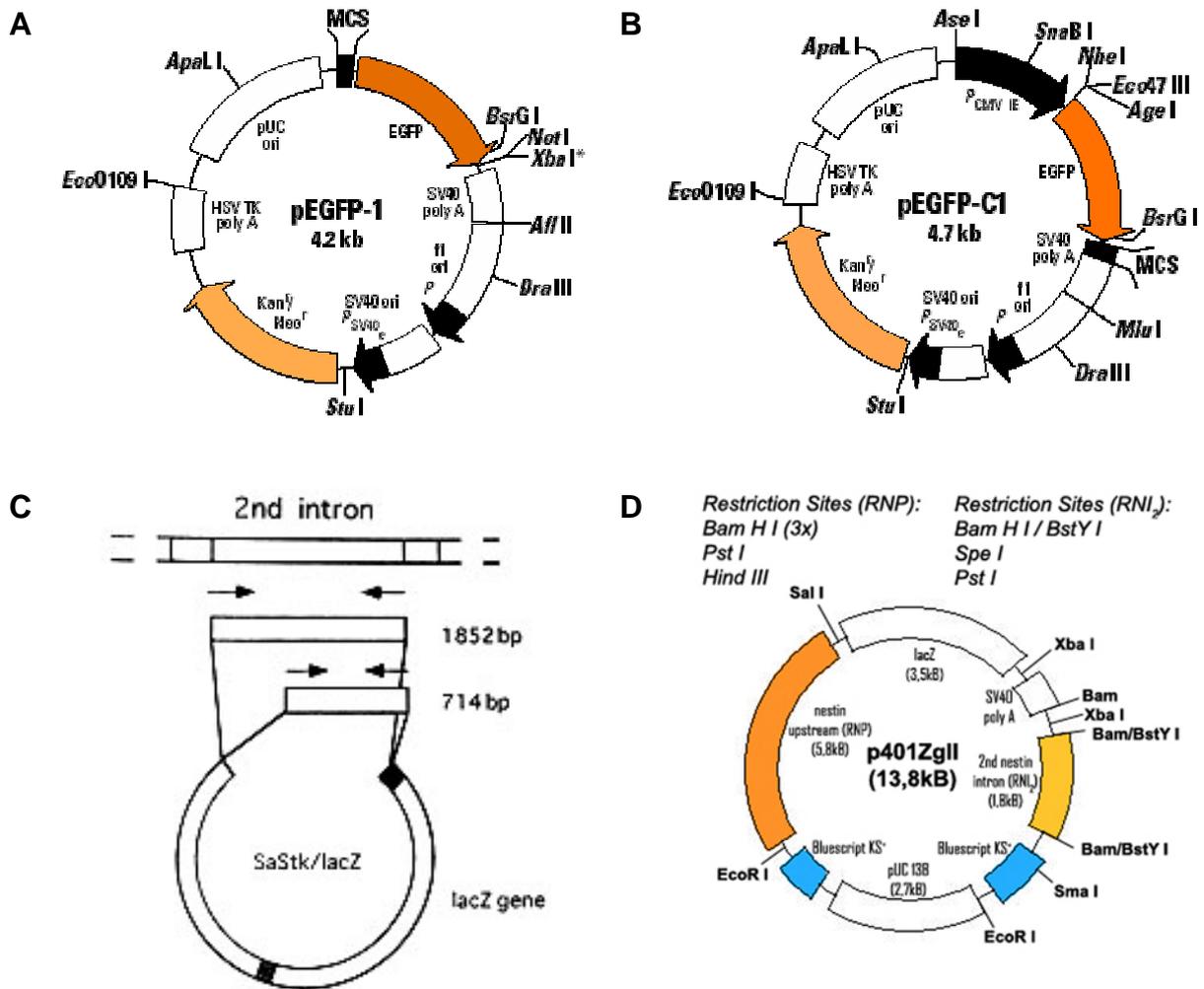
### 4.1.8. Ausgangsvektoren

Die in Abbildung 2 aufgeführten Plasmide wurden als Ausgangsvektoren für die Klonierung selektiver Nestinpromotor-Konstrukte verwendet.

Mit einer Größe von 13,8 kB (Kilobasenpaare), enthielt p 401ZgII dabei einen für uns interessanten *rat nestin promoter* (RNP) von 5,8kB, der *upstream* einer pUC13B-Sequenz liegt. Zusätzlich ist *downstream* von *lacZ/pA* ein *2nd nestin intron* der Ratte (RNI<sub>2</sub>) von 1,8kB gelegen. Sowohl RNP, als auch RNI<sub>2</sub> sind von einer *Bluescript KS+* mit zahlreichen Schnittstellen für Restriktasen umgeben.

Bei pnes1852tk/lacZ handelt es sich um einen humanen Nestin-Promotor-Vektor, der das humane *2nd nestin intron* (1852bp) gefolgt von einem 160bp langen *HSV tk promoter* (160bp), einem *lacZ gene* und einer *SV40 poly A* Sequenz enthält [63].

pEGFP-1 (4,2kB) und pEGFP-C<sub>1</sub> (4,7kB) [CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA] wurden als Vektoren ausgewählt, um in deren *Multiple Cloning Sites* (MCS) gezielt Nestin Promotoren und 2nd Nestin Introns einzubauen [siehe Abbildung 2]. Beide besitzen *Enhanced Green Fluorescence Protein* (EGFP) und ein Gen, welches die Resistenz gegenüber Neomycin und Kanamycin vermittelt. pEGFP-C<sub>1</sub> besitzt zusätzlich einen Zytomegalie Virus (CMV) Promotor.



**Abbildung 2 - Restriction Maps und Multiple Cloning Sites von pEGFP-1, pEGFP-C1, pnes1852tk/lacZ und p401ZgII.** A+B: pEGFP-1 und pEGFP-C<sub>1</sub> mit fett gedruckter Angabe der einmalig vorhandenen Schnittstellen für Restriktasen und der Lage der MCS [CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA]. C: pnes1852tk/lacZ von Lothian et al., 1997 [63]. D: p401ZgII mit nestin upstream (RNP), lacZ/pA, 2<sup>nd</sup> nestin intron (RNI<sub>2</sub>) downstream, pUC 13B, Bluescript KS<sup>+</sup>.

#### 4.1.9. Zellkultur

##### INS-1:

INS-1-Zellen sind insulinproduzierende, glukoseresponsive Beta-Zellen der Ratte. Etabliert wurde diese Zelllinie von Maryam Asfari, nachdem sie aus einem mit Röntgenstrahlen induziertem Insulinom gewonnen wurden [73].

### HiB5:

Bei HiB5-Zellen handelt es sich um eine embryonale neuronale Vorläuferzelllinie aus dem Hippocampus der Ratte, die durch das temperatursensitive Allel tsA58 immortalisiert wurde. Erstmals beschrieben wurden diese Zellen 1991 von Patricia J. Renfranz et al., als Nestin-positive Zellkultur [74].

### hMSC-TERT:

hMSC-TERT stammen ursprünglich von einer humanen mesenchymalen Stammzelllinie aus dem Knochenmark (hMSC) ab und wurden durch humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) immortalisiert. Über drei Jahre hinweg behielten diese Zellen *in vitro* ihre Fähigkeit bei, sich in multiple mesodermale Zelllinien differenzieren zu können. Wie im November 2004 von Moustapha Kassem et al. erstmals beschrieben, wurden drei unterschiedliche Zelllinien hMSC-TERT entwickelt [75]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hMSC-TERT4 verwendet.

Sämtliche Zellkulturen wurden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% (vol/vol) CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Medienwechsel erfolgten alle 2-3 Tage. Passagiert wurden die Zelllinien ein bis zwei Tage vor Erreichen ihrer maximalen Konfluenz [vgl. Abbildung 6].

Für Ins-1-Zellen [73] wurden 500 ml RPMI 1640 (No. 31870-025), 50 ml hitzeinaktiviertes FBS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin-Streptomycin, 5,6 ml Na-Pyruvat, 5,6 ml HEPES-Buffer (10mM) und 0,56 ml β-Mercaptoethanol (50mM) zugesetzt.

Den HiB5-Zellen diente als Standardmedium 500ml Neurobasalmedium, dem 50 ml hitzeinaktiviertes FBS, 5 ml L-Glutamin und 5 ml Penicillin-Streptomycin zugegeben wurden [74]. Vor der Aussaat der HiB5-Zellen mussten die Zellkulturschalen jedoch zunächst für 8 Stunden mit 0.01%igen Poly-L-Ornithin und darauf weitere 8 Stunden mit Fibronectin beschichtet werden.

Für hMSC-TERT-Zellen [75] wurden 500 ml RPMI 1640 (No. 31870-025) mit 50 ml hitzeinaktiviertem FBS versetzt.

### 4.1.10. Sonstige Materialien

Agarosegele, SOC-Medien, LB-Kanamycin-Medien und LB-Kanamycin-Platten wurden selbst hergestellt. Eine Auflistung der dazu nötigen Chemikalien sowie die Anleitung zu deren Herstellung finden sich im Anhang dieser Arbeit.

## 4.2. Versuchsdurchführung

### 4.2.1. RT-PCR

Nachdem das jeweilige Zellkulturmedium aus den Petrischalen abgesaugt war, wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Es folgte die Homogenisierung der Zellen mit 1ml Trizol<sup>®</sup> nach Protokoll des Herstellers. Danach konnte die RNA durch Auftrennung des Zelllysats mit Chloroform in RNA-, DNA- und Proteinphase durch Isopropanol- und Ethanol-Fällung gewonnen werden. Die extrahierte RNA wurde in 30µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und deren Menge im Photometer bestimmt.

Nach RNA-Extraktion wurde die Probe mittels DNase I [Invitrogen, Life Technologies, Paisley] von DNA-Kontamination befreit und RNAsen mittels RNase Inhibitor [Invitrogen, Life Technologies, Paisley] inhibiert. Nach Phenolchloroformfällung wurde die RNA erneut in 20µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Es folgte eine Kontroll-PCR mit humanem β-Actin bzw. β-Actin der Ratte [vgl. Tabelle 4 für die primerspezifische PCR-Bedingungen], um eine DNA-Kontamination nach Gelelektrophorese auszuschließen. Danach wurde die RNA bei – 80°C aufbewahrt.

Als Ausgangsmaterial für die reverse Transkription diente die DNase-verdaute RNA. Die cDNA-Synthese erfolgte mit und nach dem Protokoll von SUPER SCRIPT II<sup>™</sup> [Invitrogen, Life Technologies, Paisley].

Zur Amplifikation der aus RNA synthetisierten cDNA erfolgte die PCR mit TaKaRa Ex Taq<sup>™</sup> [Takara Biomedicals, Shiga, Japan] nach dem Protokoll des Herstellers. Als Primer dienten - je nach Zelltyp - rat-Nes-1/A bzw. hum-Nes U2/D2 [vgl. Tabelle 4 für die primerspezifische PCR-Bedingungen]. Abschließend wurden die amplifizierten cDNA-Sequenzen in der Gelelektrophorese auf ihre zu erwartenden Größen überprüft und in einer Geldokumentationkammer fotografiert.

### 4.2.2. Immunhistochemie

Als Antiseren wurden für hMSC-TERT-Zellen *Mouse Anti-Nestin Human specific Monoclonal Antibody* und *Mouse Anti-Nestin Monoclonal Antibody* [Chemicon International, Temecula, CA, USA] für HiB5- und INS-1-Zellen verwendet.

Die genannten Zellkulturen wurden auf gekammerten Objektträgern - Falcon® Culture Slides [Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ] –kultiviert und nach 30 min Trocknung für 20min in Aceton/Methanol 20% bei –20°C fixiert. Zwischen den folgenden Arbeitsschritten wurden die Zellen jeweils zweifach mit TBS-Puffer gewaschen. Zunächst wurden die Zellen für 5 min in 0,5%igem Triton X 100 bei Raumtemperatur permeabilisiert. Als nächstes wurde der Primärantikörper in der jeweils benötigten Verdünnung aufgebracht. Die Antikörper wurden dabei mit dem Dako Ab Diluent [DAKO corporation, Carpinteria USA] verdünnt. Anschließend wurde Envision AP [DAKO corporation, Carpinteria USA] aufgebracht und über 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf erfolgte die Anfärbung mit Fast Red Substrate System [DAKO corporation, Carpinteria USA] über 25 min. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger eine Minute lang in Hämatoxylin getaucht und nach Zugabe von Glyceringelatine eingedeckelt.

### 4.2.3. Wachstumskurven

Zur Ermittlung der spezifischen Wachstumscharakteristika einer Zellkultur wurden Wachstumskurven erstellt. Dabei wurden zum Passagewechsel auf 7-12 Petrischalen (je nach Zellkultur) die gleiche Anzahl Zellen ausgesät. Medienwechsel erfolgten alle 48h. Jeweils 24h nach Aussaat wurden die Zellen einer Petrischalen geerntet, indem zunächst das Medium abgesaugt und dann die Zellen mit PBS gewaschen und schließlich mit Trypsin-EDTA [GIBCO, Auckland, NZ] abgelöst wurden. Da Trypsin-EDTA zytotoxisch wirkt, wurde erneut Zellkulturmedium hinzugefügt, die Zellen bei 1200g abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen resuspendiert. Zur Zählung wurden diese dann in einem Eppendorfcap® mit 0,5% Trypanblau 1:1 versetzt. Apoptotische Zellen färbten sich damit blau und konnten von vitalen Zellen differenziert werden. Die Auszählung erfolgte nach Zugabe von 10µl suspensierter Zellen in eine Neubauer-Zählkammer [Marienfeld

Germany] unter dem Mikroskop. Die Anzahl der Zellen berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} / \text{ml Resuspensionsvolumen}$$

Um n=3 zu erreichen wurde dies insgesamt 3 mal durchgeführt.

#### 4.2.4. Transfektionsschemata

Zur Transfektion ausgewählter Vektoren in Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen wurden Effectene™ [QIAGEN, Hilden], LipofectAMINE™ [Invitrogen, Life Technologies, Paisley], FuGENE 6 Reagent [Roche Molecular Biochemicals] und METAAFFECTENE™ [Biontex Laboratories GmbH] eingesetzt. Die in Tabellen XYZ aufgeführten Schemata wurden zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen verwendet. E0-E9, L0-L6, F0-F6 und M0-M11 beschreiben dabei die unterschiedlichen Konzentrationen von DNA und Transfektionsmedien. Bei der Auswahl der jeweiligen Konzentrationen wurden die Empfehlungen der Hersteller berücksichtigt und die Transfektionen nach Protokoll durchgeführt.

		1 : 10		1 : 25		1 : 50	
<b>E1</b>	0,2 µg DNA	<b>E2</b>	0,2 µg DNA	<b>E3</b>	0,2 µg DNA		
	1,6 µl Enhancer		1,6 µl Enhancer		1,6 µl Enhancer		
	2 µl Effectene™		5 µl Effectene™		10 µl Effectene™		
<b>E4</b>	0,4 µg DNA	<b>E5</b>	0,4 µg DNA	<b>E6</b>	0,4 µg DNA	<b>E0</b>	0 µg DNA
	3,2 µl Enhancer		3,2 µl Enhancer		3,2 µl Enhancer		3,2 µl Enhancer
	4 µl Effectene™		10 µl Effectene™		20 µl Effectene™		10 µl Effectene™
<b>E7</b>	0,8 µg DNA	<b>E8</b>	0,8 µg DNA	<b>E9</b>	0,8 µg DNA		
	6,4 µl Enhancer		6,4 µl Enhancer		6,4 µl Enhancer		
	8 µl Effectene™		20 µl Effectene™		40 µl Effectene™		

**Tabelle 5 - Darstellung des Effectene™ - Pipettierschemas zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen:** E0 enthält keine DNA und entspricht der Negativkontrolle. Von E1-E3 zu E4-E6 und E7-E9 wurde der DNA-Gehalt jeweils verdoppelt. Das Verhältnis von DNA zu Effectene™ mit 1:10, 1:25 bzw. 1:50 wurde immer beibehalten wurde.

		1 : 6		1 : 6		1 : 6	
<b>F1</b>	0,5 µg DNA	<b>F2</b>	1 µg DNA	<b>F3</b>	2 µg DNA	<b>F0</b>	0 µg DNA
	3 µl FuGENE		6 µl FuGENE		12 µl FuGENE		12 µl FuGENE
		1 : 3		1 : 3			
<b>F4</b>	0,5 µg DNA	<b>F5</b>	1 µg DNA	<b>F6</b>	2 µg DNA		
	1,5 µl FuGENE		3 µl FuGENE		6 µl FuGENE		

**Tabelle 6 - : Darstellung des FuGENE - Pipettierschemas zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen:** F0 enthält keine DNA und entspricht der Negativkontrolle. Von F1 bis F3 beträgt das Verhältnis von DNA zum FuGENE-Reagenz 1:6, von F4 bis F6 hingegen 1:3.

<b>L1</b>	0,5 µg DNA	<b>L2</b>	1,5 µg DNA	<b>L3</b>	2,5µg DNA	<b>L0</b>	0 µg DNA
	8 µl Lipofect-AMINE™		8 µl Lipofect-AMINE™		8 µl Lipofect-AMINE™		12 µl Lipofect-AMINE™
<b>L4</b>	0,5 µg DNA	<b>L5</b>	1,5 µg DNA	<b>L6</b>	2,5 µg DNA		
	16 µl Lipofect-AMINE™		16 µl Lipofect-AMINE™		16 µl Lipofect-AMINE™		

**Tabelle 7 - Darstellung des LipofectAMINE™ - Pipettierschemas zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen:** L0 enthält keine DNA und entspricht der Negativkontrolle. Von L1-L3 zu L4-L6 wurde die Menge an LipofectAMINE™ verdoppelt.

<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>
1 µg DNA	1 µg DNA	1 µg DNA	1 µg DNA
2,5 µl Metafectene™	5 µl Metafectene™	10 µl Metafectene™	15 µl Metafectene™
<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>	<b>M8</b>
2,5 µg DNA	2,5 µg DNA	2,5 µg DNA	2,5 µg DNA
5 µl Metafectene™	10 µl Metafectene™	20 µl Metafectene™	30 µl Metafectene™
<b>M9</b>	<b>M10</b>	<b>M11</b>	<b>M0</b>
5 µg DNA	5 µg DNA	5 µg DNA	0 µg DNA
10 µl Metafectene™	20 µl Metafectene™	30 µl Metafectene™	10 µl Metafectene™

**Tabelle 8 - Darstellung des Metafectene™ - Pipettierschemas zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen:** M0 enthält keine DNA und entspricht der Negativkontrolle. Von M1-M4 (1µg DNA), M5-M8 (2,5µg DNA) bzw M9-M11 (5µg DNA) wurde die Metafectene™-Konzentration jeweils verdoppelt.

### 4.2.5. Klonierung

Neue Plasmide wurden aus den bereits in Kapitel 4.1.8. beschriebenen Ausgangsvektoren (p401 ZgII, pnes1852tk/lacZ, pEGFP-1, pEGFP-C<sub>1</sub>) kloniert. Um die nötigen Sequenzen aus den Plasmiden auszuschneiden, waren unterschiedliche Restriktasen mit ihren jeweiligen Puffern nötig. Eine Auflistung der verwendeten Enzyme findet sich in Tabelle 3. Vor jedem weiteren Restriktionsverdau des selben Plasmids wurde das Enzym des vorangegangenen Verdau hitzeinaktiviert (10min bei 70°C im Wärmeblock) und eine Phenolchloroformfällung durchgeführt. Bei bestimmten Restriktionsverdau waren die Schnittstellen der Doppelstrang-DNA (dsDNA) für eine Ligation nicht komplementär zueinander und machten diese unmöglich. In diesen Fällen konnten die zu ligierenden Enden vor Ligation mit DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment [Promega, Madison WI] in 3' – 5' – Richtung abgestumpft und überhängende Enden der dsDNA abgetrennt oder aber mittels T4 DNA Polymerase [Promega, Madison WI] und dNTP's [Promega, Madison WI] in 5' – 3' – Richtung aufgefüllt werden.

Mittels Gelelektrophorese wurden die in zwei oder mehrere unterschiedlich große Fragmente verdauten Plasmide aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Mit Hilfe aufgetragener und definierter DNA Ladders READY LOAD<sup>®</sup> 100 bp und DNA Ladder READY LOAD<sup>®</sup> 1Kb [Invitrogen, Life Technologies, Paisley] konnten die Fragmente identifiziert und darauf mit einem Skalpel ausgeschnitten werden. Die Gelaufreinigung erfolgte mit dem QIAquick-Gel-Extraktion-Kit (RPM)<sup>™</sup> [QIAGEN, Hilden].

Die Ligation von Inserts in Vektoren erfolgte mit Hilfe der T4 DNA-Ligase [Promega, Madison WI] und nach Protokoll des Herstellers.

Darauf wurden in der folgenden Hitzeschock Transformation 5µl des neu konstruierten Plasmids aus dem Ligationsansatz mit 100µl ultrakompetenter Bakterien (DH5α) vorsichtig vermischt, 30min auf Eis inkubiert und danach für 90 Sekunden bei 42°C im Thermomixer geschockt, bevor sie erneut für 2min auf Eis inkubiert wurden. Nach Zugabe von 200µl vorgewärmten SOC-Mediums [Herstellung und Zusammensetzung siehe im Anhang] wurden die Tubes für 30min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Bakterien mit den aufgenommenen Plasmiden auf vorgewärmten LB-Kanamycin-Platten [Zusammensetzung und Herstellung siehe Anhang] ausplattiert und über 24h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die über Nacht

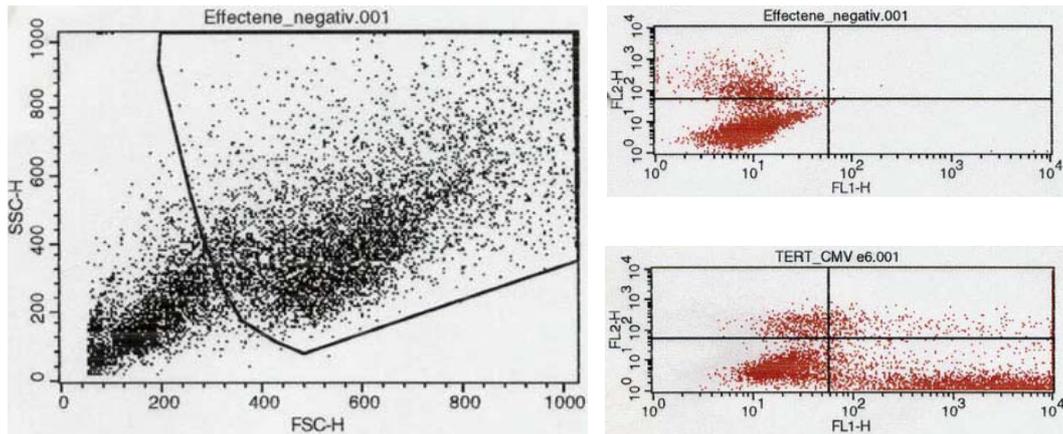
gewachsenen weißen Kolonien wurden gepickt und in behandeltem, flüssigem LB-Kanamycin Kulturmedium [Herstellung und Zusammensetzung siehe im Anhang] vermehrt. Mittels MINI-, MIDI- oder MAXI-Prep [Qiagen, Hilden] konnten nun die Plasmide aus den Bakterien extrahiert werden. Die Einzelklone wurden darauf nochmals durch einen Kontrollverdau auf ihre Größe überprüft. Die korrekten Plasmide wurden entweder für Transfektionen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder aber mit Glycerol 1:1 vermengt bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einem Kryoröhrchen gelagert.

### 4.2.6. Immunfluoreszenz

Um die Transfektion der zur Expression von EGFP angeregten Zellkulturen qualitativ zu dokumentieren, wurde den Zellen 48-60h Stunden *post transfectionem* das Medium abgesaugt und stattdessen PBS hinzugegeben. Hierauf konnten sie unter dem Fluoreszenzmikroskop angeschaut und mit der Digitalkamera fotografiert werden.

### 4.2.7. FACS-Analysen

Um die Transfektion der zur Expression von EGFP angeregten Zellkulturen quantitativ zu dokumentieren, wurden die Zellen 48 – 60h *post transfectionem* im *fluorescence activated cell sorter* (FACS) untersucht. Dazu wurden die Zellen aus ihren Petrischalen mit Trypsin-EDTA abgelöst, nach Zugabe von Zellkulturmedium bei 1200g abzentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in PBS resuspendiert. Zur weiteren Analyse wurden aus dieser Suspension exakt 10000 Zellen vom FACS-Gerät abgesogen. Um Zellen, die für die weitere Auswertung in Frage kamen wurden ein *Gate* gesetzt. Anhand der Negativkontrolle wurden daraufhin die Quadranten zur quantitativen Analyse weiterer Proben festgelegt [vgl. Abbildung 3]. Demnach befanden sich im linken unteren Quadranten alle nicht grün fluoreszierenden vitalen Zellen und im oberen linken Quadranten alle nicht grün fluoreszierenden apoptotischen Zellen. In beiden rechten Quadranten zeigten sich hingegen alle erfolgreich zur Expression von EGFP angeregten grün fluoreszierenden Zellen, wobei nur die vitalen im unteren Quadranten für die statistische Auswertung berücksichtigt wurden.



**Abbildung 3 – Erläuterung der FACS-Analysen:** Als Beispiel dienen hMSC-TERT nach Transfektion von pEGFP-C1 mit Effectene™. **Links:** Setzen des Gates zur weiteren FACS-Analyse. **Rechts oben:** Festlegung der Quadranten anhand der Negativkontrolle. **Rechts unten:** Rechter unterer Quadrant gibt quantitativ (prozentual) alle grün fluoreszierenden Zellen wieder. Linker oberer Quadrant zeigt quantitativ alle apoptotischen Zellen auf.

Auf diese Weise wurde mit Hilfe des FACS-Geräts die Anzahl der erfolgreich zur Expression von EGFP angeregten Zellen ermittelt und deren prozentualer Anteil auf 10000 Zellen bestimmt. Diese FACS-Analysen wurden drei Mal (n=3) zur Ermittlung der optimalen Transfektion von pEGFP-C<sub>1</sub> unter Verwendung von Effectene™, LipofectAMINE™, FuGENE und Metafectene™ für Ins-1-Zellen, HiB5-Zellen und hMSC-TERT-Zellen durchgeführt. Nach Bestimmung der für jede Zellkultur idealen Konzentrationen von DNA und Transfektionsreagenz wurden weitere FACS-Analysen (ebenfalls n=3) unter Verwendung von pRNP-EGFP, pRNP-RNI2-EGFP und pRNP-EGFP-RNI2 durchgeführt

#### 4.2.8. Statistik

Die Ergebnisse der FACS-Analysen wurden mit SPSS (Version 11.5.1) mittels eines *t Test für unabhängige Stichproben* analysiert. Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) < 0,05 sind signifikant und Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) < 0,01 hochsignifikant. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt [siehe Tabellen im Anhang]. Die graphische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software von GraphPad Prism 4 (Version 4.01).

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Nestinexpression in Ins-1, HiB5 und hMSC-TERT

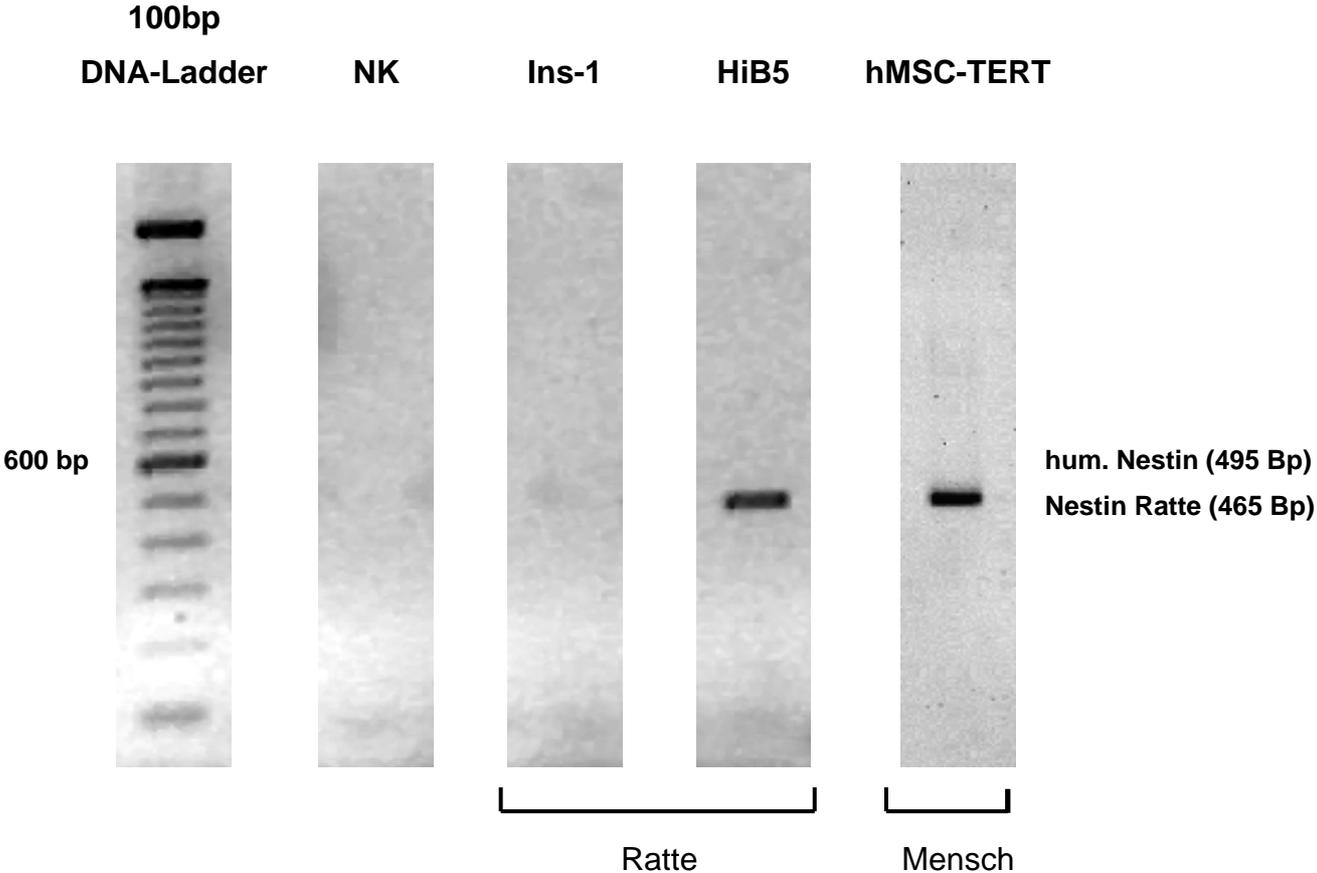
Wie bereits in der Aufgabenstellung formuliert, ist das Hauptziel dieser Arbeit, einen Weg zur selektiven Expression von Genen oder eines Reportergens in Stammzellen zu finden. In diesem Zusammenhang kam Nestin, welches als Stammzellmarker neuronaler Vorläuferzellen wie auch Vorläuferzellen des Pankreas bekannt geworden ist als möglicher „Schlüssel“ ins Spiel.

Bevor jedoch der Bau von Vektoren begonnen wurde, die selektiv in Nestin-positiven Zellen ein Reportergen zur Expression anregen, galt es zunächst unterschiedliche Zellkulturen auszuwählen, die Nestin-negativ oder Nestin-positiv sind. Wir entschieden uns zum einen für Ins-1 [73], einer Insulinomzelllinie der Ratte, die auf Grund ihrer Ausdifferenzierung als Nestin-negativ erwartet wurde, zum anderen für HiB5 [74], einer Vorläuferzelllinie aus dem Hippocampus der Ratte, die sich wegen ihres neuronalen Ursprungs als Nestin-positiv darstellen sollte. Darüber hinaus standen mit hMSC-TERT [75] mit Telomerase überexpressierte humane mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zur Verfügung, die ebenfalls auf ihre Nestinexpression getestet werden sollten.

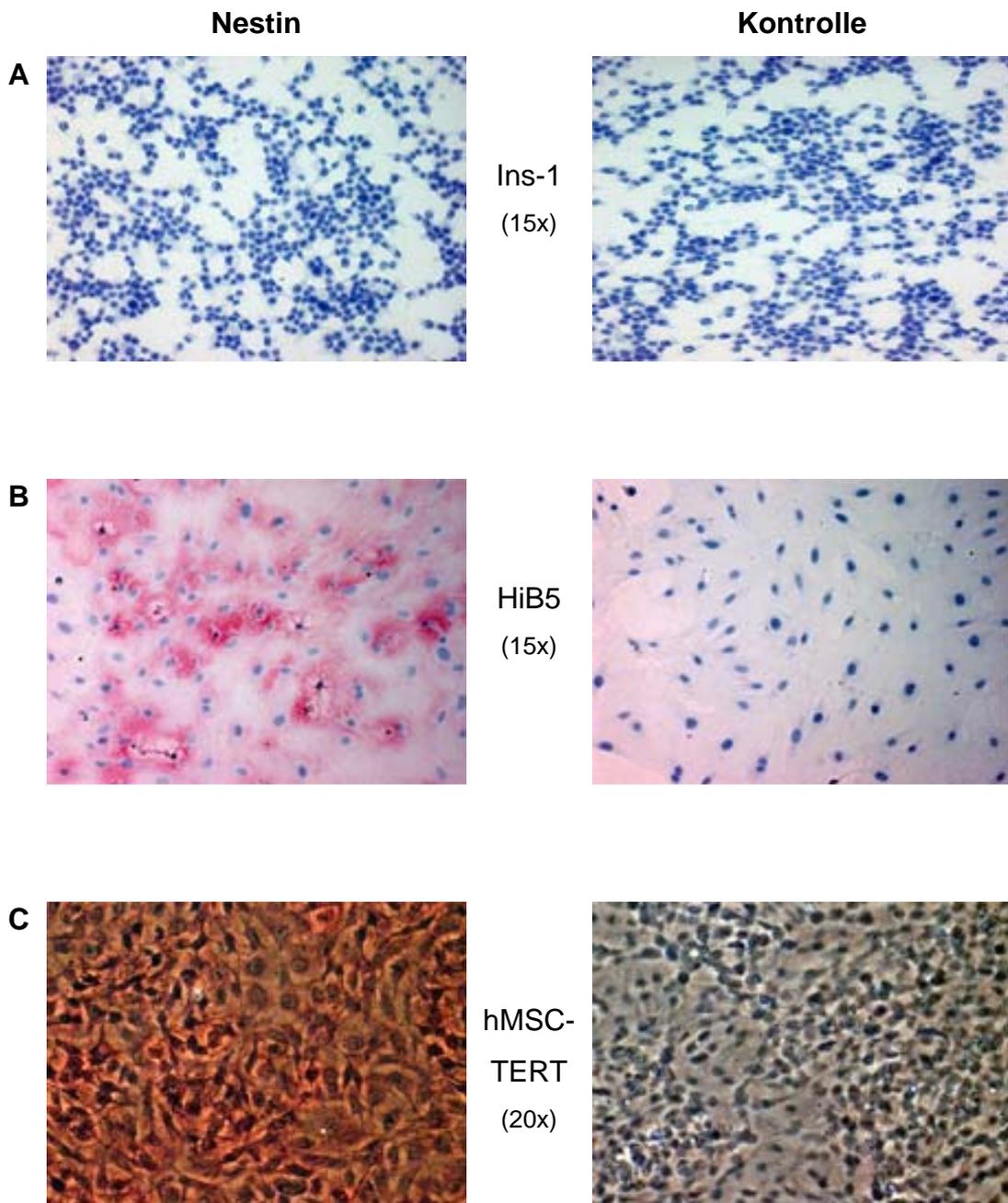
Zur Bestätigung der vermuteten Nestin-Positivität / -Negativität wurde aus den jeweiligen Zelllinien die totale RNA extrahiert, RNAsen inhibiert, cDNA synthetisiert und danach eine RT-PCR nach Nestin-mRNA durchgeführt. Nach Gelelektrophorese lieferte diese Banden erwarteter Größen von 495 Basenpaare (Bp) für humanes Nestin und 465 Bp für Nestin der Ratte [vgl. Abbildung 4].

Um die mRNA-Expression von Nestin bei HiB5- und hMSC-TERT-Zellen auf Proteinebene zu bestätigen, wurden immunhistochemische Färbungen aller Zelllinien angefertigt. Bei HiB5-Zellen und der Zelllinie der hMSC-TERT ließ sich mittels *Mouse Anti-Nestin Monoclonal Antibody* bzw. *Mouse Anti-Nestin Human specific Monoclonal Antibody* das intermediäre Filamentprotein Nestin nachweisen, während dies bei Ins-1-Zellen nicht gelang [vgl. Abbildung 5].

Die Nestinexpression von HiB5 und hMSC-TERT konnte auf diese Weise gesichert werden. Ins-1 erwiesen sich als Nestin-negativ und empfahlen sich damit als geeignete Negativkontrolle für weitere Versuche.



**Abbildung 4 - Nestin-mRNA-Nachweis in Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen:** RT-PCR von Ins-1, HiB5 und hMSC-TERT; Humanes Nestin mit der Größe von 495 Bp; Nestin der Ratte von 465 Bp. Negativkontrolle (NK).



**Abbildung 5 - Nachweis von Nestin auf Proteinebene in Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen: Immunhistochemische Färbungen von Ins-1, HiB5 und hMSC-TERT:** In der linken Spalte immunhistochemische Färbungen mittels *Mouse Anti-Nestin Monoclonal Antibody* bzw. *Mouse Anti-Nestin Human specific Monoclonal Antibody*; in der rechten Spalte Nativaufnahmen als Negativkontrolle. **A:** Ins-1, Insulinomzelllinie der Ratte in 15x Vergrößerung. **B:** HiB5, neuronale Vorläuferzellen in 15x Vergrößerung. **C:** hMSC-TERT, humane mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in 20x Vergrößerung.

### 5.2. Zellspezifische Wachstumscharakteristika

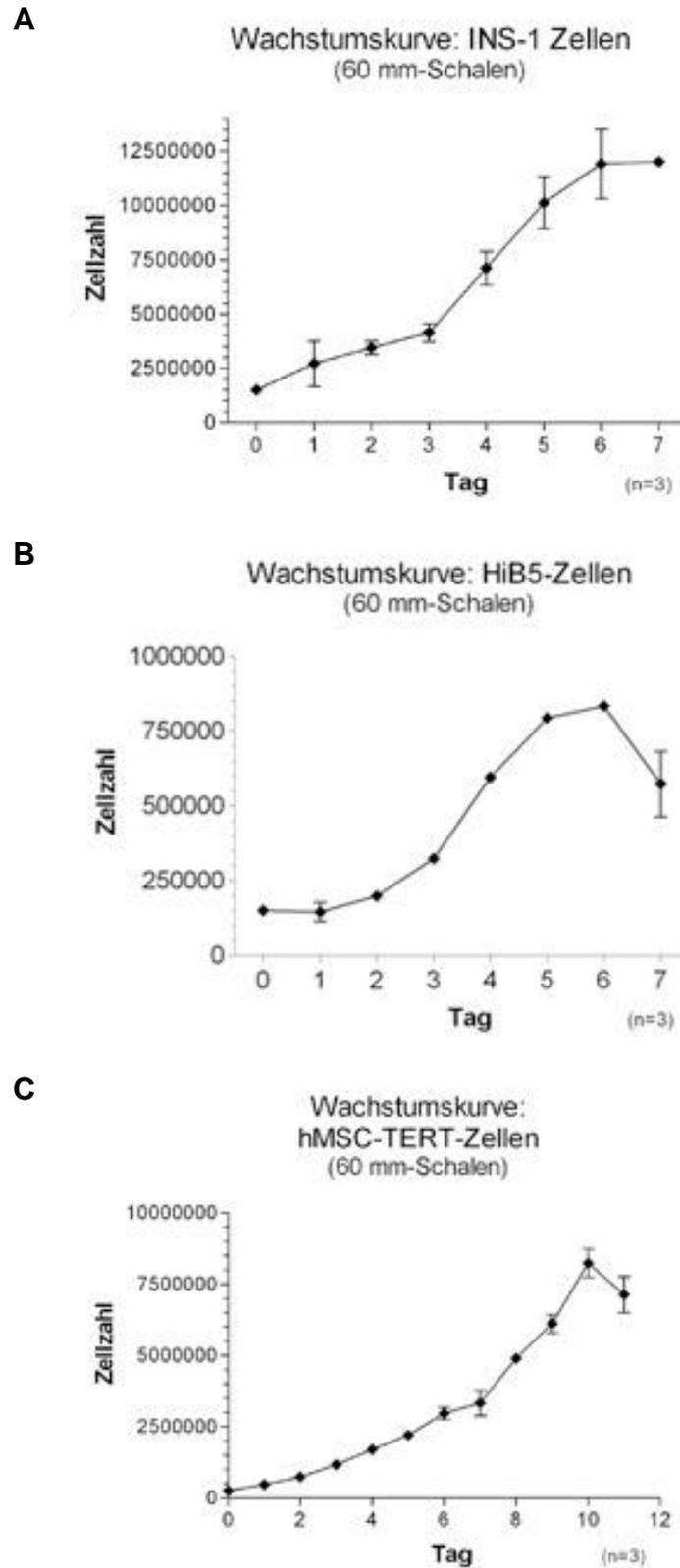
Nach Charakterisierung der ausgewählten Zellkulturen wurden Wachstumskurven zum Nachweis der individuellen Zellzahl für eine optimale Konfluenz von etwa 30-50% erstellt, was dem idealen Zeitpunkt einer Transfizierung entspricht [vgl. Metafectene<sup>TM</sup>-Transfektions-Protokoll - Biontex].

1,5 Mio. ausgesäte Ins-1-Zellen wurden schnell adherent, so dass bereits nach 24 Stunden ein erstes Wachstum zu verzeichnen war [vgl. Abb. 4A]. Mit dem dritten Tag steigerte sich bei Erreichen von circa 4 Mio. Zellen pro Petrischale, die Wachstumsrate. Am 6. Tag waren die Zellen mit circa 12,5 Mio. Zellen pro Schale maximal konfluent.

Aufgrund ihrer großen Morphologie wurden bei den neuronalen Vorläuferzellen (HiB5) nur 150000 Zellen pro Schale ausgesät. Diese benötigten die ersten 24 Stunden um adherent zu werden, bevor sie eine langsam steigende Wachstumsrate erreichten [vgl. Abb. 4B]. 6 Tage nach Aussaat präsentierten sich HiB5-Zellen mit 800000 Zellen auf 60mm-Schalen maximal konfluent. Eine Kultivierung über den 6. Tag hinaus ging mit Haufenformierung der Zellen und einer steigenden Apoptoserate einher.

Ähnlich den Ins-1-Zellen benötigen hMSC-TERT-Zellen keine 24 Stunden um adherent zu werden und zu proliferieren [vgl. Abb. 4C]. Ein deutlicher Wachstumsanstieg konnte ab etwa 3 Mio. Zellen auf 60mm durchmessenden Petrischalen verzeichnet werden. Die maximale Konfluenz wurde am 10. Tag mit etwa 8 Mio. Zellen erreicht.

Um die empfohlene 30-50%ige Konfluenz zu erreichen, empfiehlt es sich, bei einer Transfizierung von HiB5-Zellen in 60mm durchmessenden Petrischalen zwischen 250000 und 300000 Zellen pro Schale auszusähen. Ins-1-Zellen sollten hingegen mit 3-4 Mio. Zellen und hMSC-TERT-Zellen mit 2,5-3 Mio. Zellen ausgesät werden. Die Wachstumsfläche berücksichtigend, wurden bei späteren Transfizierungen analog auf 35 mm durchmessenden 6-Well-Platten jeweils 100000 HiB5- bzw. 1,2 Mio. Ins-1- und 1 Mio. hMSC-TERT-Zellen ausgesät.



**Abbildung 6 - Zellspezifische Wachstumscharakteristika von Ins-1- HiB5- und hMSC-TERT-Zellen:** Jeweils Aussaat in 60mm-Schalen bei n=3. **A:** Wachstumskurve von Ins-1-Zellen nach Aussaat von 1,5 Mio. Zellen. **B:** Wachstumskurve von HiB5-Zellen nach initialer Aussaat von 150000 Zellen. **C:** Wachstumskurve von hMSC-TERT nach Aussaat von 110000 Zellen am Tag 0.

### 5.3. Optimale Transfektionsbedingungen

Zur Etablierung der effizientesten Transfektionsmethode für die jeweilige Zellkultur wurden Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT in unterschiedlichen pEGFP-C<sub>1</sub>-Konzentrationen und verschiedenen Mengen Effectene™, Lipofectamine™, Metafectene™ und FuGENE transfiziert. [vgl. Tabellen 5 – 8]

Ins-1-Zellen, denen pEGFP-C<sub>1</sub> mit Effectene™, Lipofectamine™ und FuGENE transfiziert wurde, neigten nur in geringem Masse zur Expression von EGFP nach 48 Stunden. Lediglich die Verwendung von größeren Mengen Lipofectamine™, kombiniert mit höheren DNA-Konzentrationen erreichten Transfektionsraten mit einer EGFP-Expression von bis zu 7,5% [vgl. Abbildung 4A]. Allen drei genannten Reagenzien überlegen war der Einsatz von Metafectene™. Je weniger Metafectene™ und je größer die Plasmidmenge, desto effizienter die Transfektion.

Die Toxizität betreffend erwiesen sich Insulinomzellen als 'robust'. Lediglich bei 40 µl Effectene™ konnte eine Apoptoserate von 15% beobachtet werden [vgl. Abbildung 4A].

Bei Transfektion der neuronalen Vorläuferzellen mit Effectene™ erwiesen sich mittlere DNA-/Effectene™-Konzentrationen günstig [vgl. Abbildung 4B]. Hier exprimierten im Mittel 31,84% der HiB5-Zellen EGFP. Bei FuGENE wirkten sich hohe DNA-Konzentrationen besonders günstig aus. Wie bei Effectene™ konnten dabei über 30% der Zellen zur Expression von EGFP angeregt werden. Lipofectamine™ erwies sich im Gegensatz zu Effectene™ mit maximal 8,3% im Mittel als weniger effektiv. Die höchsten Transfektionsraten konnten mit den niedrigsten DNA-Konzentrationen pEGFP-C<sub>1</sub> erreicht werden. Je höher die Lipofectamine™ / DNA-Konzentration war, desto schlechter war die Effektivität. Ähnlich verhielt sich dies bei Metafectene™. Niedrige Metafectene™- und DNA-Mengen lieferten mit etwa 8,1% Effizienz die höchsten Werte.

Eine Erklärung findet sich, wenn man die Toxizität der Transfektionsreagenzien auf HiB5-Zellen betrachtet. FuGENE ist unabhängig von der Höhe der verabreichten Konzentration für die neuronalen Vorläuferzellen gut verträglich. Bei Effectene regten erst Konzentrationen ab 20µl zur Apoptose an. Auffällig waren jedoch die deutlich toxischen Wirkungen von Metafectene™ ab 5-10µl und Lipofectamine™ [vgl. Abbildung 4B].

Wie bei den Insulinomzellen und neuronalen Vorläuferzellen der Ratte, wurde bei den humanen mesenchymalen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (hMSC-TERT) nach dem gleichen Schema das beste Transfektionsschema ermittelt. Hohe DNA- kombiniert mit hohen Effectene<sup>TM</sup>- bzw. Lipofectamine<sup>TM</sup>-Konzentrationen erwiesen sich als überlegen [vgl. Abbildung 4C]. Über 50% bzw. 55% der hMSC-TERT-Zellen konnten im Schnitt zur Expression von EGFP angeregt werden, während FuGENE und Metafectene<sup>TM</sup> Prozentsätze von bis zu 43% erreichten. Letztere Werte wurden bei höheren DNA-Konzentrationen, unabhängig der FuGENE-Menge, erreicht. Anders bei Metafectene<sup>TM</sup>. Hier erwiesen sich hohe Metafectene<sup>TM</sup>- und niedrige DNA-Konzentrationen als empfehlenswert.

Ähnlich den Ins-1-Zellen können hMSC-TERT als 'robuste' Zelllinie bezeichnet werden. Lediglich höhere Metafectene<sup>TM</sup>-Konzentrationen regten zu einer verstärkten Apoptoserate an [vgl. Abbildung 4C].

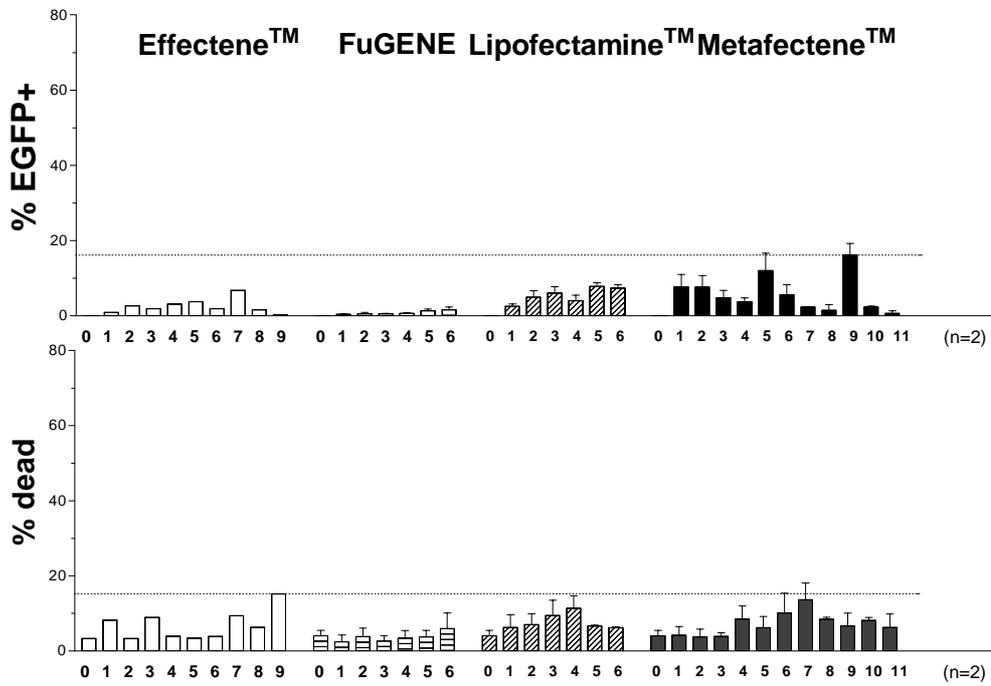
Zusammenfassend empfahlen sich analog der Pipetierschema [vgl.Tab. 5 – 8]

- für die Insulinomzelllinie Metafectene<sup>TM</sup> (M1, M5 und M9),
- für die neuronalen Vorläuferzellen FuGENE sowie Effectene<sup>TM</sup> (F3, F6 und E5)
- für die mesenchymale Vorläuferzelllinie hMSC-TERT Effectene<sup>TM</sup> (E6, E8, E9) und Lipofectamine<sup>TM</sup> (L2, L5, L6)

aufgrund der höchsten Effizienz und der niedrigsten Toxizität für weitere Transfektionen.

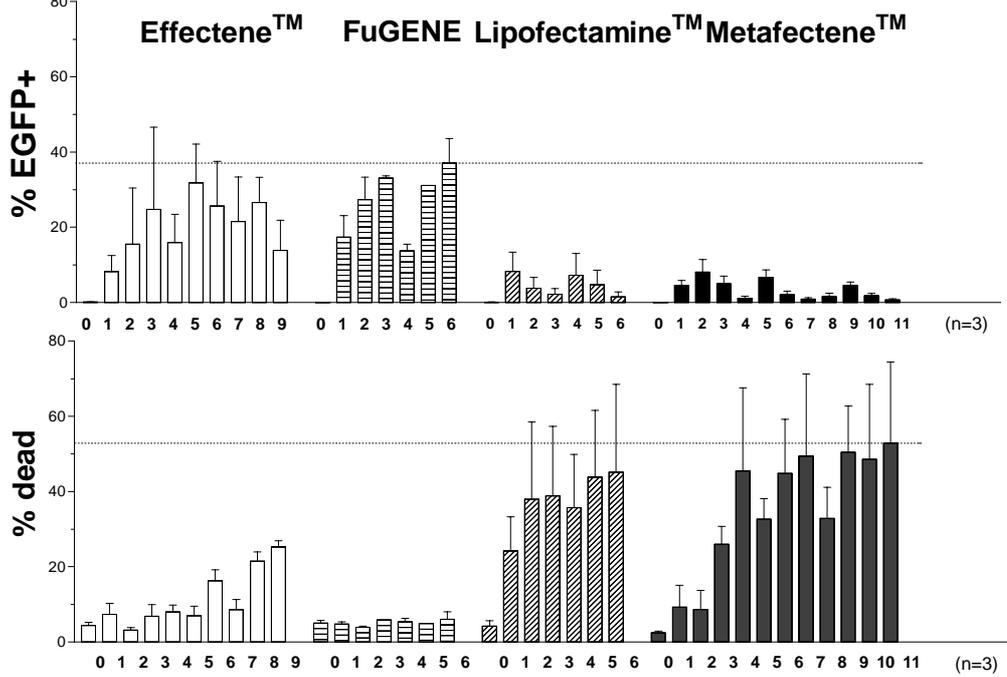
A

### INS-1 (gated)



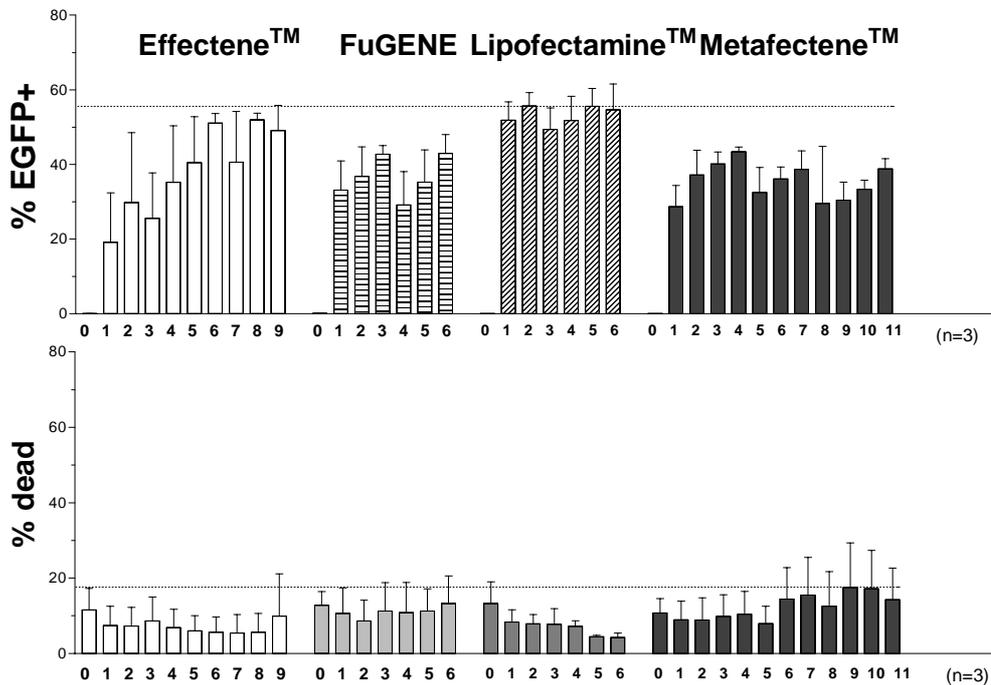
B

### HiB5 (gated)



C

## hMSC-TERT (gated)

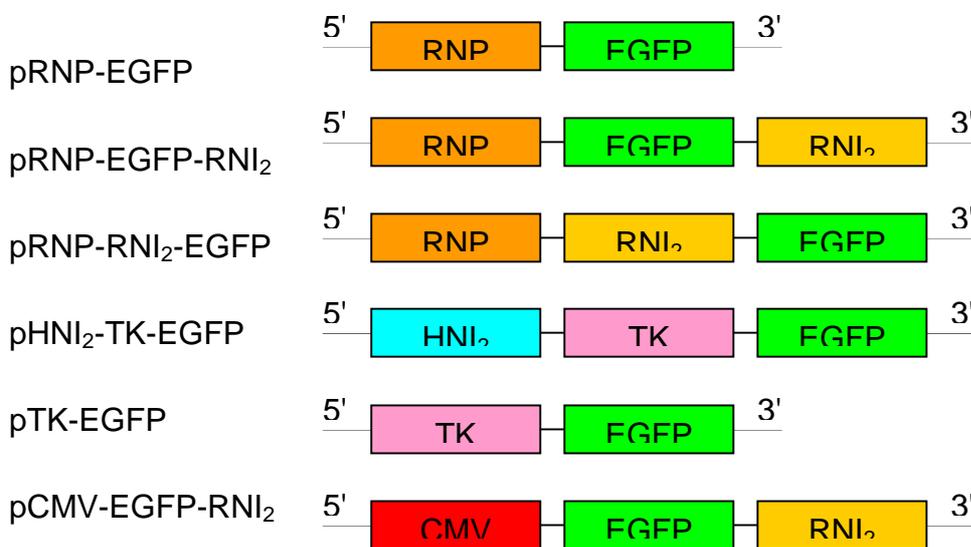


**Abbildung 7 - Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen für Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen mittels FACS-Analysen:** Den Zellkulturen wurde jeweils pEGFP-C1 transfiziert und nach 48h im FACS ausgewertet. Verwendet wurden hierzu die jeweils unterschiedlichen Medien Effectene™, FuGENE, Lipofectamine™ und Metafectene™ in unterschiedlichen Reagenz- und DNA-Konzentrationen (vgl. Pipetierschema im Material und Methodenteil.) Oben jeweils aufgeführt der prozentuale Anteil EGFP-exprimierender Zellen, unten der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen. **A:** Ins-1-Zellen; n=2; **B:** HiB5-Zellen; n=3; **C:** hMSC-TERT-Zellen; n=3.

## 5.4. Vektorkonstruktion

Nach Bestimmung der optimalen Transfektionsbedingungen der oben genannten Zellkulturen galt es nun, Vektoren zu konstruieren, die selektiv Gene in Nestin-positiven Zellen zur Expression bringen. Als Ausgangsvektoren standen p401 Zg II, pEGFP-1, pEGFP-C<sub>1</sub> und pnes1852tk/lacZ [63] zur Verfügung. Diese beinhalten RNP, RNI<sub>2</sub>, HNI<sub>2</sub>, sowie EGFP, welches als Reporter gen den Erfolg folgender Transfektionen dokumentieren soll.

Aus diesen Ausgangsplasmiden entstanden folgende Vektoren [vgl. Tab. 9]:



**Tabelle 9 - Schematische Darstellung der konstruierten Vektoren:** Aufgelistet sind die relevanten Sequenzen in 5'-3'-Richtung. RNP=Ratten-Nestin-Promotor; EGFP=Enhanced Green Fluorescence Protein; RNI<sub>2</sub>=Ratten-Nestin-Second-Intron; HNI<sub>2</sub>=Humanes-Nestin-Second-Intron; TK=Thymidin-Kinase-Promotor; CMV=Zytomegalievirus-Promotor.

### pRNP-EGFP [vgl. Abb. 5A]:

Aus dem paternalen Vektor p401 Zg II (13,8 kB) wurde zunächst mittels Restriktionsverdau von EcoRI und Sal I der 5,8 kB grosse Ratten Nestin Upstream Promoter (RNP) ausgeschnitten. Nach Linearisierung von pEGFP-1 (4,2 kB) durch EcoRI und Sal I folgte die Ligation des RNP in die Multi-Cloning-Site (MCS) des pEGFP-1.

### pRNP-RNI<sub>2</sub>-EGFP [vgl. Abb. 5B]:

Als Ausgangsplasmide für pRNP-EGFP-RNI<sub>2</sub> wurden das zuvor konstruierte pRNP-EGFP (10kB) und p401 Zg II (13,8 kB) verwendet. Dabei wurde das 1,8 kB große

Ratten Nestin 2nd Intron (RNI<sub>2</sub>) aus p401 Zg II durch Sma I und Xba I ausgeschnitten und nach Linearisierung von pRNP-EGFP mittels Sma I, RNI<sub>2</sub> in die MCS vor die EGFP-Sequenz eingefügt.

### pRNP-EGFP-RNI<sub>2</sub> [vgl. Abb. 5C]:

Wie beim vorangegangenen Vektor wurden pRNP-EGFP und p401Zg II als Ausgangsvektoren gewählt und RNI<sub>2</sub> aus p401 Zg II gewonnen. Die Linearisierung von pRNP-EGFP erfolgte jedoch mittels Not I, so dass RNI<sub>2</sub> diesmal im Anschluss an die EGFP-Sequenz eingefügt wurde.

### pHNI<sub>2</sub>-TK-EGFP [vgl. Abb. 5D]:

Das humane Nestin 2nd Intron (HNI<sub>2</sub>), gefolgt von einem 160 Bp grossen Thymidinkinase-Promotor (TK), wurde aus dem pnes1852tk/lacZ [63] nach Restriktionsverdau mit Not I, Klenow Blunt, Phenol-Chloroformfällung und erneutem Restriktionsverdau mit Hind III gewonnen. Dieses ca. 2 kB große Fragment wurde im Anschluss in die MCS des pEGFP-1 zwischen den Schnittstellen von Hind III und Sma I in 5'-3' Richtung eingefügt.

### pTK-EGFP [vgl. Abb. 5E]:

Paternaler Vektor für dieses Konstrukt war das zuvor gebaute pHNI<sub>2</sub>-TK-EGFP. Durch Entfernung des HNI<sub>2</sub> mittels Restriktionsverdau von Sal I und Religation konnte ein Plasmid mit dem TK-Promotor vor der EGFP-Sequenz gewonnen werden.

### pCMV-EGFP-RNI<sub>2</sub> [vgl. Abb. 5F]:

Anders als bei den vorangegangenen Konstrukten wurde in diesem Fall als Ausgangsvektor pEGFP-C<sub>1</sub> verwendet, welcher vor der EGFP-Sequenz bereits einen CMV-Promotor (Cytomegalie-Virus) besitzt. Als Insert diente RNI<sub>2</sub>, welches nach Restriktionsverdau von Sma I, Xba I aus p401 Zg II ausgeschnitten wurde. Nach Linearisierung des pEGFP-C<sub>1</sub> durch Xho I konnte dieses Insert in die MCS eingebaut werden, nachdem Insert und Vektor einem Klenow Blunt unterzogen wurden.

Allen konstruierten Vektoren ist das Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) als Reporter gen, sowie eine Kanamycin/Neomycin Sequenz gemein, die eine Resistenz gegenüber diese Antibiotika vermittelt.

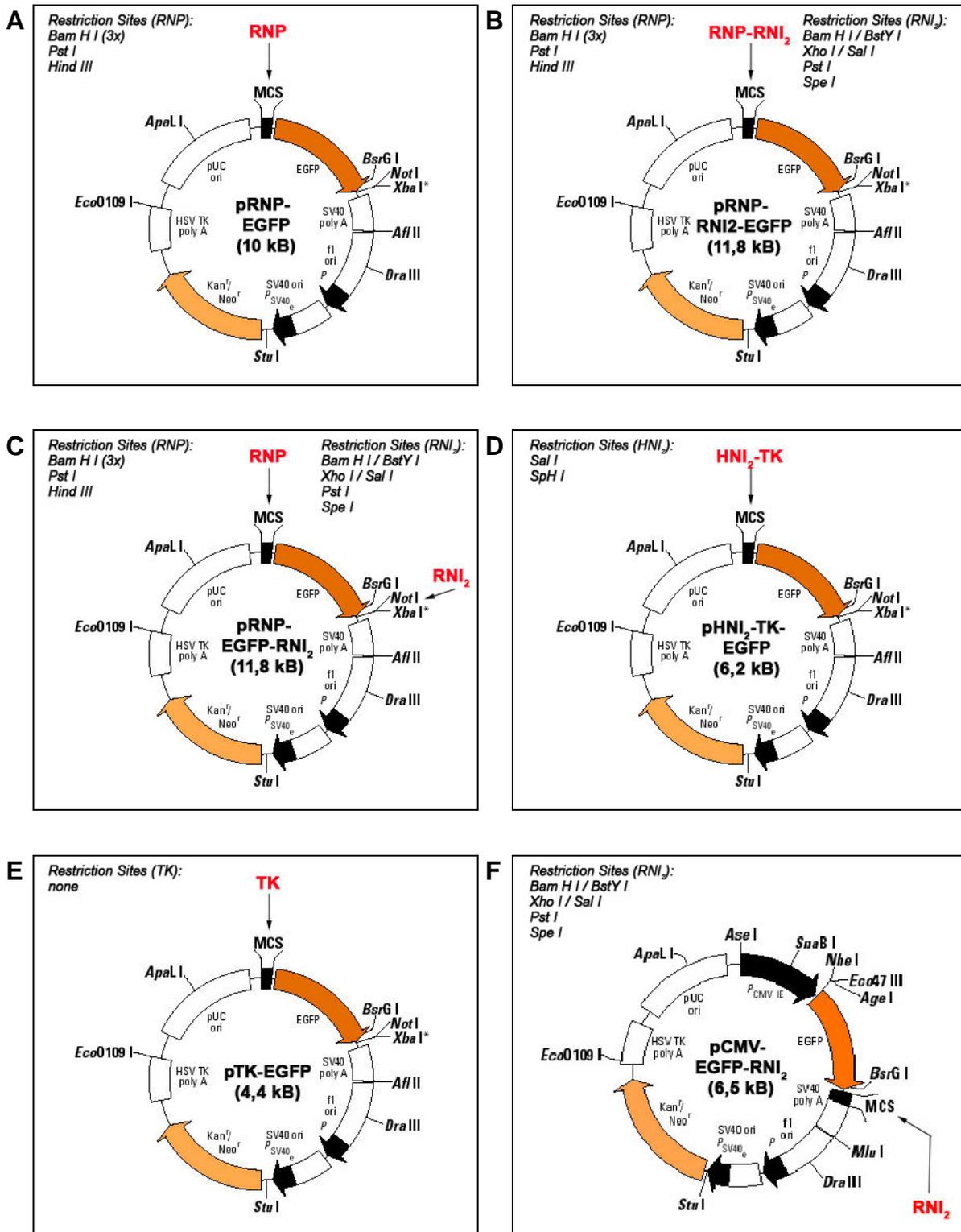


Abbildung 8 - Vektorkonstrukte, die Nestin-positive Zellen nach Transfektion selektiv zur Expression von EGFP anregen sollten: Rot dargestellt ist das jeweils durch Klonierung integrierte Fragment an der mit dem Pfeil markierten Stelle. Unter "restriction sites" sind die jeweiligen Schnittstellen des Fragments angegeben.

### 5.5. Spezifität der Vektoren

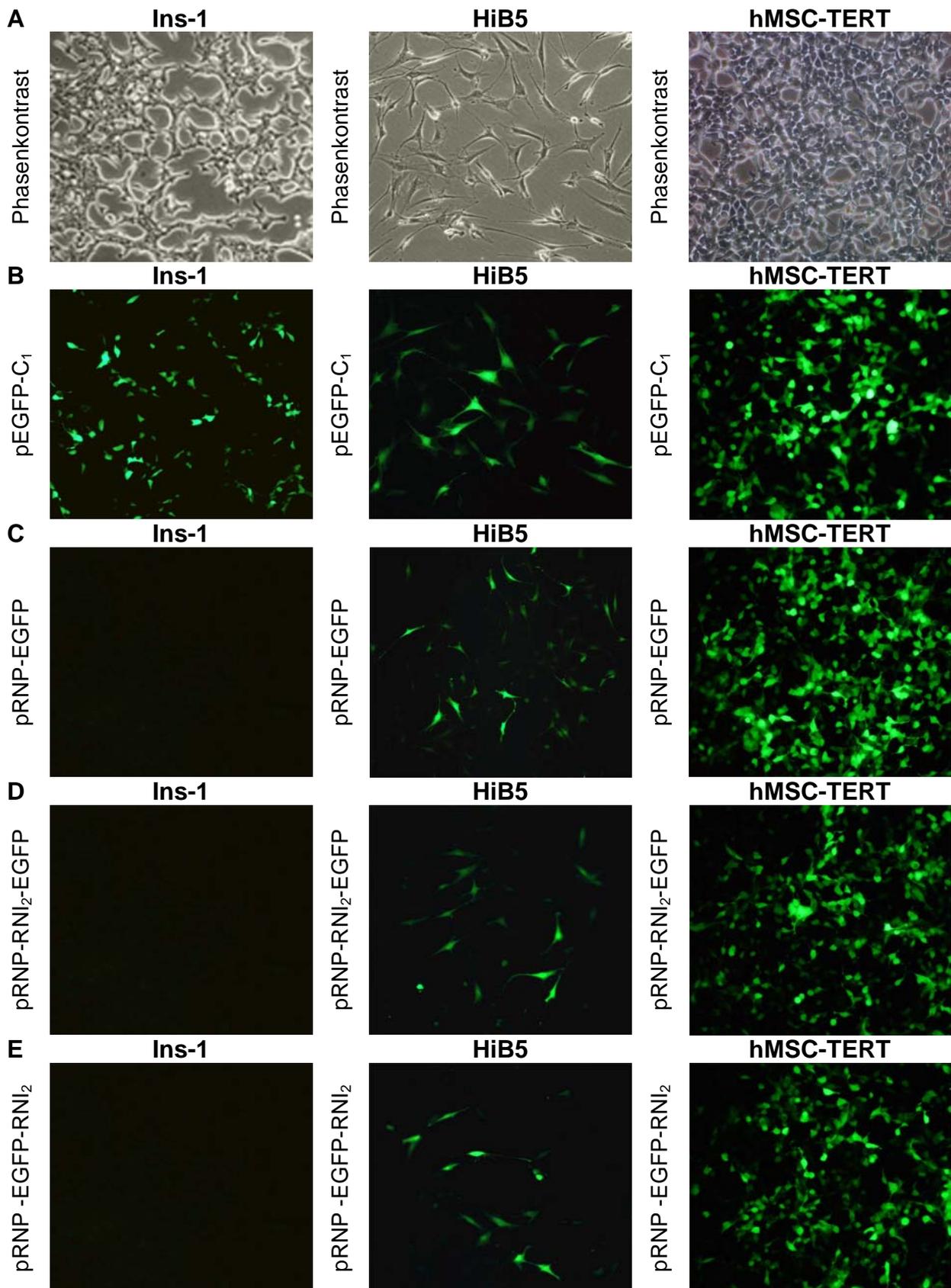
#### 5.5.1. Immunfluoreszenz

Nach Bestimmung der optimalen Transfektionsbedingungen wurden die genannten Vektorkonstrukte anhand der ausgewählten und charakterisierten Zellkulturen auf ihre selektive Expression des EGFP überprüft. Mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen konnten erfolgreich transfizierte Plasmide durch die Expression des EGFP dokumentiert werden.

Nach ersten Transfektionen wurde bei pHNI<sub>2</sub>-TK-EGFP, pTK-EGFP und pCMV-EGFP-RNI<sub>2</sub> offensichtlich, daß diese EGFP unspezifisch in Nestin-positiven (HiB5 und hMSC-TERT) und Nestin-negativen (Ins-1) Zellkulturen zur Expression brachten. Hierbei stellte sich die Expression bei Plasmiden, die die CMV-Promotor-Sequenz enthielten, deutlicher dar als bei Konstrukten, die den TK-Promotor besaßen. Durch die Präsenz von 2nd Nestin Intron der Ratte (pCMV-RNI<sub>2</sub>) bzw. des Menschen (pHNI<sub>2</sub>-TK-EGFP) konnte bei den Promotoren keine Gewebsspezifität vermittelt werden.

Anders verhielt sich der Sachverhalt bei den Plasmiden pRNP-EGFP [vgl. Abb. 5A], pRNP-RNI<sub>2</sub>-EGFP [vgl. Abb. 5B] und pRNP-EGFP-RNI<sub>2</sub> [vgl. Abb. 5C]. Hier konnte die Vermutung der Selektivität von Nestin Promotoren gezeigt werden [vgl. Abb. 6]: Im Gegensatz zu Thymidinkinase- und Cytomegalie-Virus-Promotoren wurde nach Transfektion von RNP-Konstrukten bei den Nestin-negativen Ins-1-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop keine Expression von EGFP festgestellt. Bei den Nestin-positiven HiB5- und hMSC-TERT-Zellen war jedoch eine deutliche Expression von EGFP zu sehen [vgl. Abb. 6 C, 6D, 6E]. Konstrukte, die neben dem RNP zusätzlich das RNI<sub>2</sub> enthielten, machten unter dem Fluoreszenzmikroskop den Eindruck, die Expression des EGFP zu fördern. Dies äußerte sich subjektiv zum einen durch eine verstärkte Fluoreszenzintensität, zum anderen durch mehr erfolgreich zur Expression von EGFP angeregte HiB5-Zellen.

Die selektive Expression von EGFP als Reporter gen in Nestin-positiven Vorläuferzellen nach Transfektion von RNP enthaltenden Vektoren ist folglich möglich.



**Abbildung 9 -** Phasenkontrastaufnahmen von Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen (A), sowie deren Immunfluoreszenzaufnahmen mit Expression von EGFP nach Transfektion mit B: pEGFP-C<sub>1</sub> (Positivkontrolle); C: pRNP-EGFP; D: pRNP-RNI<sub>2</sub>-EGFP; E: pRNP-EGFP-RNI<sub>2</sub>; Alle Aufnahmen jeweils unter 20x Vergrößerung.

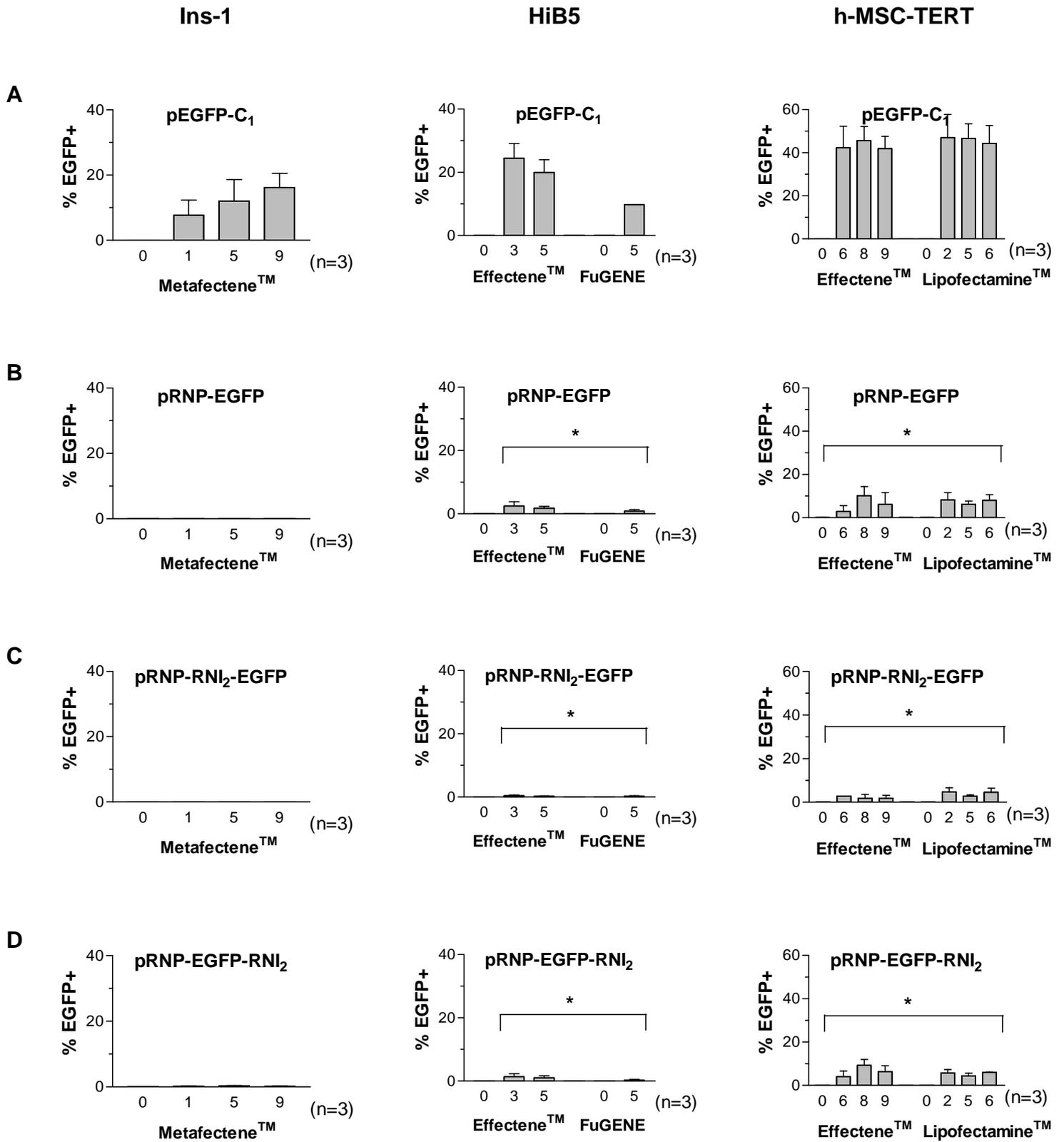
### 5.5.2. FACS-Analysen

Um die Selektivität der transfizierten Plasmide zu objektivieren und zu klären, ob  $RNI_2$  eine gewebsspezifische Funktion innehat, wurden quantitative Analysen im *fluorescence activated cell sorter* (FACS) durchgeführt. Daher transfizierten wir die charakterisierten Zellkulturen nochmals unter ihren jeweils ermittelten optimalen Bedingungen (M1, M5, M9 für Ins-1-Zellen; F3, F5, E5 für HiB5-Zellen; E6, E8, E9, L2, L5, L6 für hMSC-TERT-Zellen; M0, F0, E0, L0 als Negativkontrollen) mit pRNP-EGFP, pRNP- $RNI_2$ -EGFP und pRNP-EGFP- $RNI_2$ , sowie pEGFP- $C_1$ , als Positivkontrolle.

Wie zuvor im Fluoreszenzmikroskop gesehen, wurden mit pEGFP- $C_1$  versehene Ins-1-Zellen zur Expression von EGFP angeregt, während die Expression bei pRNP-EGFP, pRNP- $RNI_2$ -EGFP und pRNP-EGFP- $RNI_2$  ausblieb [vgl. Abb. 7].

Teilweise konnten die fluoreszenzmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse bei den neuronalen Vorläuferzellen bestätigt werden. Die Nestin-positiven HiB5-Zellen wurden sowohl durch pEGFP- $C_1$ , als auch durch Applikation der RNP-Konstrukte zur Expression des EGFP's angeregt. Am besten gelang dies mit pRNP-EGFP bei etwa 3% transfizierter Zellen. Entgegengesetzt der Erwartung,  $RNI_2$  würde die Expression von EGFP gewebsspezifisch fördern, stellte sich durch FACS-Analysen eine niedrigere Effizienz von knapp 2% bei pRNP-EGFP- $RNI_2$  und weniger als 1% bei pRNP- $RNI_2$ -EGFP heraus [vgl. Abb. 7].

Analog verhielten sich die Resultate der Transfektion von RNP-Konstrukten bei hMSC-TERT-Zellen. pRNP-EGFP brachte EGFP im günstigsten Fall durchschnittlich 10,2% aller Zellen zur Expression von EGFP. Geringer fiel dies unter dem Einfluss von pRNP-EGFP- $RNI_2$  (max. 9,3%) bzw. 4,6% bei pRNP- $RNI_2$ -EGFP aus. Dem 2nd Nestin Intron konnte somit keine gewebsspezifische Funktion nachgewiesen werden.



**Abbildung 10 - FACS-Analysen der selektiven Vektorkonstrukte bei Ins-1-, HiB5- und hMSC-TERT-Zellen unter den jeweils optimalen Transfektionsbedingungen: A:** FACS-Analyse von pEGFP-C<sub>1</sub> (Positivkontrolle); **B:** FACS-Analyse von pRNP-EGFP; **C:** FACS-Analyse von pRNP-RNI<sub>2</sub>-EGFP; **D:** FACS-Analyse von pRNP-EGFP-RNI<sub>2</sub>; \* entspricht (hoch-)signifikanter Unterschied im Vgl. zur Expression von Ins-1-Zellen.

Trotz der niedrigen Prozentsätze nach Transfektion der RNP-Konstrukte unterscheiden sich die Nestin-positiven Zellkulturen (HiB5 und hMSC-TERT) von der Nestin-negativen Zellkultur (Ins-1) hochsignifikant in der Expression von EGFP.

So unterscheidet sich Ins-1 ( $M=0.02$ ;  $SD=0.03$ ) von HiB5 ( $M=1.70$ ;  $SD=1.04$ ) und von hMSC-TERT ( $M=7.25$ ;  $SD=3.53$ ) jeweils hochsignifikant ( $p<0.00$ ) in der Expression von EGFP nach Transfektion des pRNP-EGFP.

Der Unterschied zwischen Ins-1 ( $M=0.00$ ;  $SD=0.00$ ) und HiB5 ( $M=0.28$ ;  $SD=0.2$ ) bzw. hMSC-TERT ( $M=3.19$ ;  $SD=1.76$ ) in der Expression von EGFP nach Transfektion von pRNP-RNI2-EGFP ist ebenfalls jeweils hochsignifikant ( $p<0.01$ ).

Nach Transfektion des pRNP-EGFP-RNI2 unterscheidet sich Ins-1 ( $M=0.25$ ;  $SD=0,09$ ) von HiB5 ( $M=0.89$ ;  $SD=0.76$ ) signifikant ( $p<0.05$ ) und von hMSC-TERT ( $M=5.93$ ;  $SD=2.46$ ) hochsignifikant ( $p<0.00$ ) in der Expression von EGFP.

## 6. Diskussion

Vor dem Hintergrund des anfangs geschilderten Mangels transplantabler Pankreata und Langerhans'scher Inseln versucht diese Arbeit die Grundlage eines neuen Ansatzes zur Generierung eines unlimitierten Zellpools zu liefern. Den Schlüssel zu diesem Ansatz stellt dabei das intermediäre Filamentprotein Nestin dar.

Zunächst wurden daher HiB5-Zellen der Ratte und hMSC-TERT des Menschen auf mRNA- und Proteinebene als Nestin-positive sowie Ins-1-Zellen der Ratte als Nestin-negative Zellkulturen charakterisiert. Nach Ermittlung ihres jeweiligen Wachstumsverhaltens konnten die optimalen Transfektionbedingungen bestimmt werden. Parallel wurden aus unterschiedlichen Ausgangsvektoren (p401 Zg II, pEGFP-C<sub>1</sub>, pNes 1852) neue Plasmide (pRNP-EGFP, pRNP-RNI<sub>2</sub>-EGFP, pRNP-EGFP-RNI<sub>2</sub>) kloniert, die nach Transfektion in der Lage waren, Nestin-positive Zellen (HiB5 und hMSC-TERT) selektiv zur Expression des Reportergens EGFP zu bringen. Auf diese Art und Weise konnten die Nestin-positiven Vorläuferzellen markiert werden, so dass diese im Fluoreszenzlicht grün leuchteten. Nach Durchführung quantitativer FACS-Analysen konnte gezeigt werden, daß sich HiB5- und hMSC-TERT-Zellen im Vergleich zu Nestin-negativen Ins-1-Zellen (hoch-)signifikant häufiger zur Expression von EGFP anregen lassen. Entsprechend konnten Nestin-positive Zellen selektiv zur Expression von EGFP gebracht werden.

Neben der genannten Grünfluoreszenz wird mit EGFP zudem eine Neomycin- und Kanamycin-Sequenz zur Expression gebracht, mittels derer die Vorläuferzellen eine Resistenz gegenüber diese Antibiotika entwickeln. Durch vorsichtige Applikation von Neomycin oder Kanamycin könnten auf diese Weise sämtliche Nestin-negativen Zellen eliminiert werden. Somit besteht durch die selektiv vermittelte Expression von EGFP zum einen die Möglichkeit der Markierung Nestin-positiver Vorläuferzellen im Fluoreszenzlicht und zum anderen die Möglichkeit, diese dank ihrer neu erworbenen Resistenz aus ihrem Gewebe zu isolieren.

Der Schritt zur Isolation und damit zur Generierung einer reinen Zellkultur aus Nestin-positiven Vorläuferzellen blieb im Rahmen dieser Arbeit leider verwehrt. Grund sind die selbst unter optimalen Transfektionsbedingungen nur in geringen Prozentsätzen zur Expression von EGFP angeregten Vorläuferzellen [vgl. Abbildung 7].

Gäbe man nun die genannten Antibiotika hinzu, würde man durch die Eliminierung von >90% der umliegenden Zellen das Zellkulturmilieu dermaßen aus dem Gleichgewicht bringen, dass auch die Vorläuferzellen eingingen. Ferner würden die verbleibenden Vorläuferzellen selbst nach problemlosem Entfernen der apoptotischen Zellen in der Folge zu Grunde gehen, da ein Mindestmaß an Konfluenz der Zellen vorhanden sein muß, um deren Wachstum zu gewährleisten. Diese Beobachtung konnte bereits bei der Erstellung der Wachstumskurven gemacht werden, als Zellen in zu geringer Anzahl ausgesät wurden. Nach Gabe der Antibiotika überlebende resistente Zellen einzeln unter dem Fluoreszenzmikroskop zu picken, scheitert an der Labilität der Zellkulturen. Insbesondere HiB5-Zellen auf vorbeschichteten Petrischalen können nicht über einen längeren Zeitraum außerhalb des Brutschrankes aufbewahrt werden.

Die maximal 3% zur Expression von EGFP gebrachten Zellen scheint im Falle der HiB5 an deren geringem Anteil Nestin-positiver Vorläuferzellen zu liegen. Erste FACS-Analysen mit *Mouse Anti-Nestin Monoclonal Antibody* (Chemicon International) deuten bei einer Passagezahl von 7 auf lediglich 4% Vorläuferzellen hin. Zu späteren Zeitpunkten (Passage >40) besaßen nur noch 0,5% der Zellen Nestin-positiven Charakter. Bedenkt man nun, dass man im günstigsten Fall bis zu 3% aller HiB5-Zellen zur Expression von EGFP anregen konnte, dann wurden durch die Transfektion von pRNP-EGFP dennoch  $\frac{3}{4}$  aller Vorläuferzellen erfaßt. Betrachtet man die Expression von EGFP bei humanen hMSC-TERT-Zellen, so sind die erreichten ca. 10% umso erstaunlicher, wenn man die Zuhilfenahme eines Nestinpromotors von der Ratte bedenkt. Eine speziesübergreifende Funktion der konstruierten Vektoren konnte damit belegt werden.

Wie eingangs erwähnt, ist das 2nd Nestin Intron als Gewebsspezifität vermittelndes Element im ZNS bekannt geworden [59-61]. RNI2 konnte im Verlauf der Versuchsanordnungen weder universale Promotoren (TK-Promotor, CMV-Promotor) steuern und die Expression von EGFP bei Nestin-negativen Vektoren verhindern, noch konnte es die Expression von EGFP in Nestin-positiven Zellen unter Beisein des Ratten-Nestin-Promotors verstärken. Trotz der Ähnlichkeiten von neuronalen und pankreatischen Vorläuferzellen in der phänotypischen Entwicklung [65-71] konnte die vermutete Gewebsspezifität-vermittelnde Funktion des *2nd Nestin intron* nicht bestätigt werden.

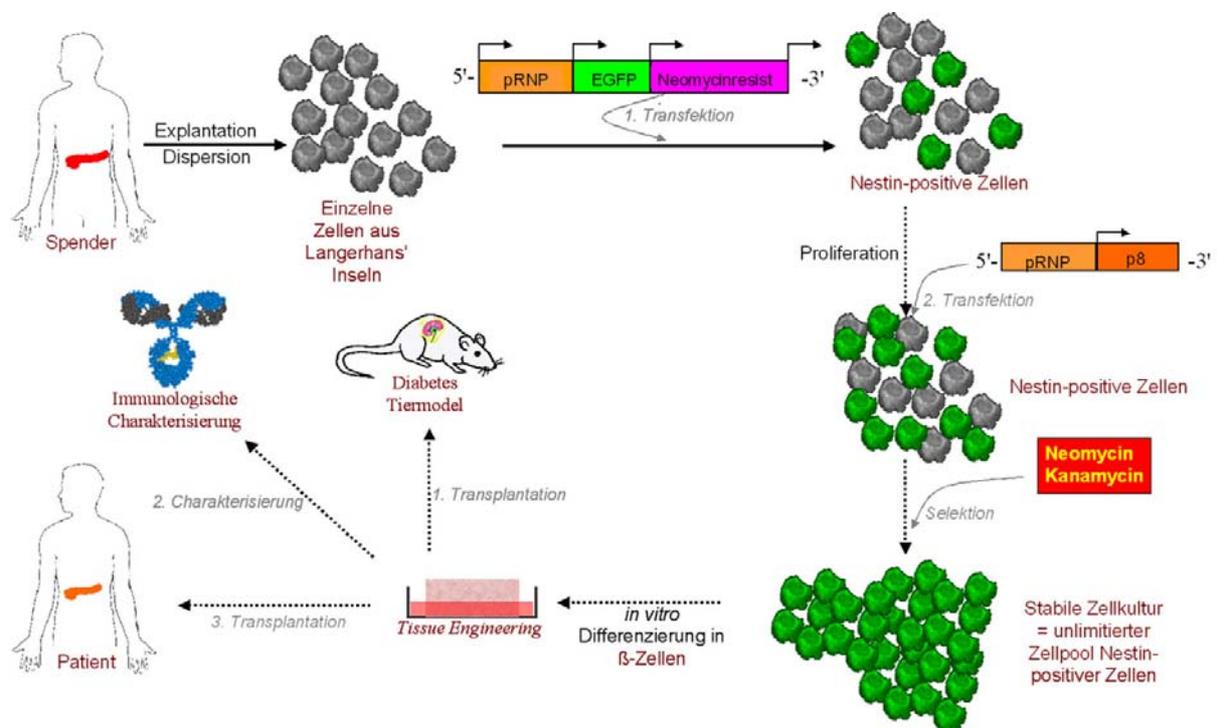
Unabhängig vom Grad der Expression läßt sich jedoch folgendes festhalten: Nestin-positive Vorläuferzellen können mittels Nestin-Promotor-Konstrukten selektiv zur Expression eines „*gene of interest*“ gebracht werden. Diese Tatsache kann als Grundlage weiterer Forschungen dienen und eröffnet kurzfristig wie auch langfristig neue Perspektiven in der Stammzellforschung [vgl. dazu Abbildung 11].

So könnte man in einem weiteren Schritt in den bereits bestehenden Vektor pRNP-EGFP zusätzlich eine proliferationsinduzierende Kasette klonieren, die unter dem Einfluß des Nestinpromotors steht. Das langsame Wachstum adulter gewebsspezifischer, Nestin-positiver Vorläuferzellen könnte so beschleunigt werden ohne die Multipotenz der Vorläuferzellen zu beeinflussen. Als proliferative Sequenzen würden sich *glucagon-like-peptide-1* (GLP-1) [76] oder *p8* anbieten. Letzteres wurde ursprünglich als Genprodukt identifiziert, welches in azinären Zellen des Pankreas im Falle akuter Pankreatitiden hochreguliert wird. Dies konnte in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe untersucht werden. So spielt p8 je nach Stimulus eine Rolle bei der Apoptose, der Tumorentwicklung, dem Wachstumsstop oder aber auch beim Zellwachstum [77]. Sollte sich nach erfolgreicher Transfektion eines solchen Konstrukts (pRNP-p8-EGFP) die Proliferationsrate erhöhen lassen, könnte man selbst einen geringen Anteil an Vorläuferzellen in einer Nestin-positiven Zellkultur vermehren. Vermehrt man die Vorläuferzellen dann derart, dass nach Applikation von Antibiotika (z.B. Neomycin, Kanamycin) und konsekutiver Elimination der übrigen Zellen eine ausreichende Konfluenz besteht, dann wäre man in der Lage eine reine Vorläuferzelllinie zu entwickeln. Unter Vermeidung der Differenzierung dieser Zellen wäre man angesichts ihres Proliferationsvermögens dann auch in der Lage, einen unlimitierten Zellpool Nestin-positiver Zellen zu generieren. Dieser Pool könnte der „heilge Gral“ sein, nach dem in der Forschung seit längerem gesucht wird.

Mittels die Differenzierung anregender Faktoren könnten aus diesem Pool in der Folge die  $\beta$ -Zellen generiert werden, die für eine Transplantation nötig wären. „Krönung“ der gesamten Strategie wäre ein über die Maßen günstiger Nebeneffekt des Nestins. Wie bereits in der Einleitung geschildert, wird Nestin bei der Differenzierung von der Vorläuferzelle zur  $\beta$ -Zelle mit zunehmender Differenzierung abgeschaltet [56, 58]. Da die proliferative Sequenz im pRNP-p8-EGFP an den Nestinpromotor gekoppelt ist, wird diese bei Differenzierung ebenfalls

herunterreguliert. Ein unkontrolliertes, tumorartiges Wachstum, wie wir es bei den embryonalen Stammzellen kennen, könnte somit vermieden werden.

Nach *tissue engineering* stünde einer Transplantation von  $\beta$ -Zell-Gewebe in diabetische Mäuse, begleitet von einer adäquaten steroidfreien Immunsuppression, nichts mehr im Wege. Normalisieren sich darauf Glukosespiegel, sinken erhöhte HbA1c-Werte, steigen C-Peptidspiegel an und ist eine vermehrte Insulinproduktion zu verzeichnen, wäre von einer erfolgreichen Transplantation auszugehen. In der Gegenprobe müßten die Werte nach Explantation des Transplantats wieder rückläufig sein. Sollte keine Transplantatabstoßung erfolgen und längerfristig kein tumorigenes Wachstum des Transplantats beobachtet werden, könnte die Versuchsreihe mit ethisch unbedenklichen adulten gewebsspezifischen Nestin-positiven, humanen Vorläuferzellen nochmals durchgeführt werden. Wie in dieser Arbeit belegt, könnte man dies mit bereits vorhandenen Nestin-Promotor-Konstrukten der Ratte versuchen. Um die Effektivität jedoch zu erhöhen, empfiehlt sich dann jedoch die Konstruktion neuer Vektoren mit einem humanen Nestinpromotor.



**Abbildung 11 - Gesamtprojektskizze von der Explantation bis zur Transplantation beim Menschen:** Die fett gedruckten Pfeile zeigen die momentan möglichen Arbeitsschritte auf. Die gestrichelten Pfeile geben noch ausstehende Arbeitsschritte wieder.

## 7. Zusammenfassung

Die Zelltherapie stellt einen neuen Ansatz zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 dar und ist eine Alternative zur exogenen Insulinsubstitution. Um diese Therapieoption zu etablieren und zu optimieren benötigt man jedoch ausreichend Material, was angesichts des Mangels an Spenderorganen problematisch ist. Als potentieller unlimitierter Zellpool sind embryonale und adulte Stammzellen in den Fokus der Forschung gerückt. Da gegenüber der Verwendung embryonaler Stammzellen in Deutschland ethische Bedenken bestehen und die Forschung an ihnen rechtlich untersagt ist, konzentriert sich diese Arbeit auf die Etablierung einer Strategie zur Expansion und Differenzierung gewebsspezifischer adulter Stammzellen. Nestin als Stammzellmarker spielt hierbei eine zentrale Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vektoren konstruiert, welche die zellspezifische Expression eines Reportergens in Nestin-positiven Zellen selektiv ermöglichen. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, daß im weiteren Schritte folgen könnten, um die Proliferation adulter Stammzellen voranzutreiben und somit einen unlimitierten Zellpool zu generieren. Nach dessen Differenzierung in Insulin produzierende  $\beta$ -Zellen und deren Präparation könnte der substantielle Mangel an Spenderorganen ausgeglichen und die Optimierung und Etablierung der  $\beta$ -Zell-Ersatztherapie entscheidend vorangebracht werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch wenig über die molekularen Mechanismen, welche die Expansion und Differenzierung von  $\beta$ -Zellen bzw. Stammzellen kontrollieren, bekannt. Ebenso unklar ist, ob die in Tiermodellen oder Zelllinien erarbeiteten Ergebnisse auf humane Zellen übertragbar sind. Dennoch geht man davon aus einen Punkt erreicht zu haben, an dem man mit Bestimmtheit davon ausgehen kann, in der Zukunft voll funktionelle Insulin produzierende  $\beta$ -Zellen generieren zu können. Vor der Einführung in die Klinik werden jedoch noch mehrere Jahre vergehen. Inzwischen ist es notwendig, die derzeit bereits vorhandenen Therapiemöglichkeiten des Diabetes mellitus auszubauen und zu verfeinern. Denn bereits jetzt ist absehbar, dass auf den Großteil der derzeit zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten - selbst bei der optimalen Entwicklung einer Stammzell-basierten Therapie - nicht verzichtet werden kann.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Serup, P., O.D. Madsen, and T. Mandrup-Poulsen, *Islet and stem cell transplantation for treating diabetes*. *Bmj*, 2001. **322**(7277): p. 29-32.
2. Liebl, A., et al., *[Costs of long-term complications in type 2 diabetes patients in Germany. Results of the CODE-2 Study]*. *Med Klin (Munich)*, 2002. **97**(12): p. 713-9.
3. Gaster, B. and I.B. Hirsch, *The effects of improved glycemic control on complications in type 2 diabetes*. *Arch Intern Med*, 1998. **158**(2): p. 134-40.
4. Bouwens, L. and I. Rooman, *Regulation of pancreatic beta-cell mass*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(4): p. 1255-70.
5. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. **52**(1): p. 102-10.
6. Devendra, D., E. Liu, and G.S. Eisenbarth, *Type 1 diabetes: recent developments*. *Bmj*, 2004. **328**(7442): p. 750-4.
7. Nathan, D.M., et al., *Long-term metabolic and quality of life results with pancreatic/renal transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus*. *Transplantation*, 1991. **52**(1): p. 85-91.
8. Group, T.D.C.a.C.T.R., *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(14): p. 977-86.
9. Ohkubo, Y., et al., *Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study*. *Diabetes Res Clin Pract*, 1995. **28**(2): p. 103-17.
10. Group, U.P.D.S., *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group*. *Lancet*, 1998. **352**(9131): p. 837-53.
11. Cretin, N., et al., *Human islet allotransplantation: world experience and current status*. *Dig Surg*, 1998. **15**(6): p. 656-62.
12. Stratta, R.J., *Review of immunosuppressive usage in pancreas transplantation*. *Clin Transplant*, 1999. **13**(1 Pt 1): p. 1-12.
13. Scharp, D.W., et al., *Results of our first nine intraportal islet allografts in type 1, insulin-dependent diabetic patients*. *Transplantation*, 1991. **51**(1): p. 76-85.
14. Secchi, A., et al., *Islet transplantation in IDDM patients*. *Diabetologia*, 1997. **40**(2): p. 225-31.

## Literaturverzeichnis

15. Sutherland, D.E., *Pancreas and islet cell transplantation: now and then*. Transplant Proc, 1996. **28**(4): p. 2131-3.
16. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 230-8.
17. Shapiro, A.M., E.A. Ryan, and J.R. Lakey, *Clinical islet transplant--state of the art*. Transplant Proc, 2001. **33**(7-8): p. 3502-3.
18. Ryan, E.A., et al., *Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol*. Diabetes, 2001. **50**(4): p. 710-9.
19. Weir, G.C. and S. Bonner-Weir, *Scientific and political impediments to successful islet transplantation*. Diabetes, 1997. **46**(8): p. 1247-56.
20. P ath, G., *(Stamm-)Zelltherapie des Diabetes mellitus: Aktuelle Aspekte*. Diabetes, Stoffwechsel und Herz, 2006. **1**(1): p. 65-74.
21. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
22. Reubinoff, B.E., et al., *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(4): p. 399-404.
23. Shamblo t, M.J., et al., *Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13726-31.
24. Blyszczuk, P., et al., *Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(10): p. 1095-104.
25. Hori, Y., et al., *Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16105-10.
26. Leon-Quinto, T., et al., *In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells*. Diabetologia, 2004. **47**(8): p. 1442-51.
27. Lumelsky, N., et al., *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets*. Science, 2001. **292**(5520): p. 1389-94. Epub 2001 Apr 26.
28. Miyazaki, S., E. Yamato, and J. Miyazaki, *Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells*. Diabetes, 2004. **53**(4): p. 1030-7.
29. Moritoh, Y., et al., *Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells*. Diabetes, 2003. **52**(5): p. 1163-8.

## Literaturverzeichnis

30. Sipione, S., et al., *Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells*. Diabetologia, 2004. **47**(3): p. 499-508.
31. Lester, L.B., et al., *Directed differentiation of rhesus monkey ES cells into pancreatic cell phenotypes*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**: p. 42.
32. Assady, S., et al., *Insulin production by human embryonic stem cells*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1691-7.
33. Segev, H., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters*. Stem Cells, 2004. **22**(3): p. 265-74.
34. Schuldiner, M., et al., *Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11307-12.
35. Soria, B., et al., *Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice*. Diabetes, 2000. **49**(2): p. 157-62.
36. Langa, F., et al., *Teratocarcinomas induced by embryonic stem (ES) cells lacking vimentin: an approach to study the role of vimentin in tumorigenesis*. J Cell Sci, 2000. **113**(Pt 19): p. 3463-72.
37. Soria, B., *In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells*. Differentiation, 2001. **68**(4-5): p. 205-19.
38. Gidekel, S., et al., *Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant*. Cancer Cell, 2003. **4**(5): p. 361-70.
39. Path, G., et al., *[Current status and perspectives of stem cell therapy for the treatment of diabetes mellitus]*. Med Klin (Munich), 2003. **98**(5): p. 277-82.
40. Newman, M.B., et al., *Tumorigenicity issues of embryonic carcinoma-derived stem cells: relevance to surgical trials using NT2 and hNT neural cells*. Stem Cells Dev, 2005. **14**(1): p. 29-43.
41. Rao, G., et al., *c-Myc enhances sonic hedgehog-induced medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice*. Neoplasia, 2003. **5**(3): p. 198-204.
42. Frankel, M.S., *In search of stem cell policy*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1397.
43. Zulewski, H., et al., *Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes*. Diabetes, 2001. **50**(3): p. 521-33.
44. Ferrari, G., et al., *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1528-30.
45. Petersen, B.E., et al., *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells*. Science, 1999. **284**(5417): p. 1168-70.

## Literaturverzeichnis

46. Shi, Q., et al., *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells*. Blood, 1998. **92**(2): p. 362-7.
47. Eglitis, M.A. and E. Mezey, *Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 4080-5.
48. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-9. Epub 2002 Jun 20.
49. Bjornson, C.R., et al., *Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo*. Science, 1999. **283**(5401): p. 534-7.
50. Jackson, K.A., T. Mi, and M.A. Goodell, *Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14482-6.
51. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
52. Bonner-Weir, S., et al., *In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7999-8004.
53. Ramiya, V.K., et al., *Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells*. Nat Med, 2000. **6**(3): p. 278-82.
54. Hockfield, S. and R.D. McKay, *Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system*. J Neurosci, 1985. **5**(12): p. 3310-28.
55. Lendahl, U., L.B. Zimmerman, and R.D. McKay, *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell, 1990. **60**(4): p. 585-95.
56. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
57. Frederiksen, K. and R.D. McKay, *Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo*. J Neurosci, 1988. **8**(4): p. 1144-51.
58. Dahlstrand, J., M. Lardelli, and U. Lendahl, *Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 1995. **84**(1): p. 109-29.
59. Josephson, R., et al., *POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes*. Development, 1998. **125**(16): p. 3087-100.
60. Lothian, C., et al., *Identification of both general and region-specific embryonic CNS enhancer elements in the nestin promoter*. Exp Cell Res, 1999. **248**(2): p. 509-19.

## Literaturverzeichnis

61. Zimmerman, L., et al., *Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors*. Neuron, 1994. **12**(1): p. 11-24.
  62. Sejersen, T. and U. Lendahl, *Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development*. J Cell Sci, 1993. **106**(Pt 4): p. 1291-300.
  63. Lothian, C. and U. Lendahl, *An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells*. Eur J Neurosci, 1997. **9**(3): p. 452-62.
  64. McKay, R.D., *Brain stem cells change their identity*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 261-2.
  65. Okabe, S., et al., *Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro*. Mech Dev, 1996. **59**(1): p. 89-102.
  66. Lee, S.H., et al., *Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(6): p. 675-9.
  67. Yamaoka, T. and M. Itakura, *Development of pancreatic islets (review)*. Int J Mol Med, 1999. **3**(3): p. 247-61.
  68. Habener, J.F. and D.A. Stoffers, *A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus*. Proc Assoc Am Physicians, 1998. **110**(1): p. 12-21.
  69. Sander, M. and M.S. German, *The beta cell transcription factors and development of the pancreas*. J Mol Med, 1997. **75**(5): p. 327-40.
  70. Madsen, O.D., et al., *Transcription factors contributing to the pancreatic beta-cell phenotype*. Horm Metab Res, 1997. **29**(6): p. 265-70.
  71. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell*. Dev Biol, 1996. **175**(1): p. 1-13.
  72. Hunziker, E., et al., *Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans*
- Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **271**(1): p. 116-9.
73. Asfari, M., et al., *Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines*. Endocrinology, 1992. **130**(1): p. 167-78.
  74. Renfranz, P.J., M.G. Cunningham, and R.D. McKay, *Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain*. Cell, 1991. **66**(4): p. 713-29.

## Literaturverzeichnis

75. Abdallah, B.M., et al., *Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **326**(3): p. 527-38.
76. Abraham, E.J., et al., *Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells*. *Endocrinology*, 2002. **143**(8): p. 3152-61.
77. Path, G., et al., *Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 1**: p. S82-5.

## 9. Anhang

### 50 x TAE (Tris-Azetat-EDTA):

242 g Tris Base

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen

### LB-Kanamycin-Medium / Liter

10 g Bacto tryptone

5 g Bacto Hefeextrakt

10 g NaCl

auffüllen auf 1 l mit H<sub>2</sub>O

einstellen auf pH 7,0

Autoklavieren

Zugabe von 50mg filtersterilisiertem

Kanamycin (Nach Abkühlen auf 55°C)

### Für LB-Agarplatten

15g/Liter Bacto agar ins Medium

hinzufügen und ca. 25ml/100mm-Schale

### SOC Medium

20 g bacto tryptone

5 g Bacto Hefeextrakt

0,5 g NaCl

10 ml KCl (250 mM)

einstellen auf pH 7,0

### Agarosegel

Agarose in TAE auflösen

- für <1000bp 1,5 - 2% Gel

- für >1000bp 1% Gel

Erhitzen auf 100°C

Zugabe von 5µl Ethidiumbromid

(Nach Abkühlung auf ca. 60°C)

Umfüllen in Gelkammer mit Kamm

Entfernung des Kamms nach

Polymerisierung

**Daten der SPSS-Auswertungen:**

Gruppenstatistiken:

pRNP-EGFP	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Ins-1	8	,0212	,02997	,01060
HiB5	9	1,6978	1,04344	,34781
hMSC-TERT	16	7,2519	3,53428	,88357

Test bei unabhängigen Stichproben:

pRNP-EGFP	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
	Ins-1 vs. HiB5	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
Varianzen sind gleich	20,630		,000	-4,526	15	,000	-1,6765	,37041	-2,46604	-,88702
Varianzen sind nicht gleich				-4,818	8,015	,001	-1,6765	,34798	-2,47870	-,87435

pRNP-EGFP	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
	Ins-1 vs. HMSC-TERT	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
Varianzen sind gleich	15,541		,001	-5,722	22	,000	-7,2306	1,26370	-9,85137	-4,60988
Varianzen sind nicht gleich				-8,183	15,00	,000	-7,2306	,88363	-9,11400	-5,34725

Gruppenstatistiken

pRNP-RNI2-EGFP	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Ins-1	6	,0017	,00408	,00167
HiB5	9	,2767	,20094	,06698
hMSC-TERT	16	3,1850	1,76353	,44088

Test bei unabhängigen Stichproben

pRNP-RNI2-EGFP	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
	Ins-1 vs. HiB5	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
Varianzen sind gleich	9,519		,009	-3,310	13	,006	-,2750	,08309	-,45450	-,09550
Varianzen sind nicht gleich				-4,105	8,010	,003	-,2750	,06700	-,42947	-,12053

pRNP-RNI2-EGFP	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
	Ins-1 vs. HMSC-TERT	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
Varianzen sind gleich	6,408		,020	-4,354	20	,000	-3,1833	,73112	-4,70842	-1,65824
Varianzen sind nicht gleich				-7,220	15,00	,000	-3,1833	,44088	-4,12305	-2,24361

Gruppenstatistiken

pRNP-EGFP-RNI2	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Ins-1	8	,2563	,08766	,03099
HiB5	9	,8933	,76200	,25400
hMSC-TERT	17	5,9300	2,46027	,59670

Test bei unabhängigen Stichproben

pRNP-EGFP-RNI2	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
	Ins-1 vs. HiB5	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
Varianzen sind gleich	53,776		,000	-2,343	15	,033	-,6371	,27197	-1,21677	-,05740
Varianzen sind nicht gleich				-2,490	8,238	,037	-,6371	,25589	-1,22420	-,04996

pRNP-EGFP-RNI2	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
	Ins-1 vs. HMSC-TERT	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
Varianzen sind gleich	9,562		,005	-6,447	23	,000	-5,6738	,88003	-7,49424	-3,85326
Varianzen sind nicht gleich				-9,496	16,08	,000	-5,6738	,59751	-6,93986	-4,40764

## Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Jochen Seufert, der mir diese Arbeit angeboten hat und in den vergangenen Jahren stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Er gab Anregungen und ermöglichte uns Doktoranden die Teilnahme an verschiedenen Kongressen. Gerade durch Letzteres und seine motivierenden Vorschläge gelang es ihm, in uns Studenten die Neugierde und das Interesse an der Forschung zu wecken.

Ein weiteres Dankeschön geht an Dr. Günter Päth, der anfangs in methodischen Fragen Hilfestellungen gab und später vor allem bei der Präsentation der Ergebnisse auf den einzelnen Kongressen zur Seite stand.

Ferner Dipl.-biol. Maria Lazariotou, die immer zur Stelle war, wenn bei Versuchen Fragen aufkamen.

Nicht vergessen möchte ich alle Medizinisch technischen Assistenten des Labors. Hervorzuheben sind hier Sven Rummel, Jeanette Roller und insbesondere Sandra Nixdorf, ohne deren anfänglicher praktischer Anleitung diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Ein persönliches Dankeschön geht an Dr. Hans-Joachim Till, ohne den ich meine Ehefrau nicht kennengelernt hätte.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Frau Martina, die mich die ganzen Jahre unterstützt und getragen haben. Ohne Euch wären diese Zeilen nicht möglich gewesen.

Die Arbeit wurde unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), die Deutsche Diabetes-Gesellschaft (DDG), die Deutsche Diabetes-Stiftung (DDS) und die Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF, USA).