

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

***Wachstumsverhalten und Expansionskapazität
humaner mesenchymaler Stammzellen aus Pankreas und Knochenmark***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Veit Rothhammer
aus München

Würzburg, März 2008

Referent: Prof. Dr. med. J. Seufert

Koreferent: Prof. Dr. med. F. Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2008

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.2	Zelltherapie des Diabetes mellitus – Pankreas- und Inseltransplantation	2
1.3	Alternative Quellen insulinproduzierender Zellen	4
1.4	Bisherige Einschränkungen der Stammzelltherapie	6
1.5	Das Protein p8	7
1.6	Fragestellung	10
2.	Material und Methoden	11
2.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	11
2.2	Chemikalien und weitere Reagentien	11
2.3	Enzyme	12
2.4	Reagentsätze (Kits)	12
2.5	Antikörper	13
2.5.1	Primärantikörper	13
2.5.2	Sekundärantikörper	13
2.6	Protein- und Größenstandards	13
2.7	Oligonukleotid-Primer	13
2.8	Plasmide	14
2.9	Medien und Nährböden	14
2.10	Zelllinien und Zellkulturmedien	15
2.11	Polymerase-Kettenreaktion	17
2.12	TAE-Agarose-Gelelektrophorese	18
2.13	Konzentrationsmessung im Photometer	18
2.14	Methoden zum Klonieren eines Plasmids	19
2.14.1	Verdau von Vektor und Insert mit Restriktionsenzymen	19
2.14.2	Natrium-Acetat-Fällung	20
2.14.3	Auffüllen von DNA-Überhängen mit Klenow-Polymerase	21
2.14.4	Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase	21
2.14.5	Extraktion von DNA aus einem Agarose-Gel	22
2.14.6	Ligation von Vektor und Insert	22
2.14.7	Transformation von Plasmiden in E. coli	23
2.14.8	Ausplattieren und Picken von Bakterien	24
2.14.9	Mini-DNA-Präparation	25
2.14.10	Überprüfen des Klonierungserfolgs	25
2.14.10.1	Differential Digest	25
2.14.10.2	Sequenzierung	26
2.14.11	Midi-Prep	28
2.15	Klonierung des Plasmids pCMV-hp8-IRES-hrGFP-1a	28
2.16	Klonierung des Plasmids pCMV-hp8-IRES-hrGFP-Puro	30
2.17	Klonierung des Plasmids pIRES-hrGFP-Puro	31
2.18	Zellkultur und Zelllinien	32
2.18.1	Konservieren von Zellen	33
2.18.2	Transfektion von Zellen	33

2.19	Durchflusszytometrie (FACS)	34
2.20	Proliferationsanalyse mittels BrdU-Assay	35
2.21	Immunhistochemie	36
2.22	Analyse zellulärer RNA mittels RT-PCR	37
2.22.1	RNA-Extraktion mittels TRIZOL	37
2.22.2	DNase1-Verdau	38
2.22.3	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	38
2.22.4	PCR	39
2.22.5	TAE-Agarose-Gelelektrophorese und semiquantitative Auswertung	39
2.23	Caspase-Assay	39
2.24	Proteinchemie	40
2.24.1	Herstellung von Ganzzellextrakten	40
2.24.2	Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford	40
2.24.3	Western-Blot	41
3.	Ergebnisse	44
3.1	Wachstumsverhalten aus humanen Pankreasinseln auswachsender Zellen	44
3.2	hMSC-TERT als Modell Nestin-positiver Vorläuferzellen	48
3.3	Transiente p8-Überexpression in hMSC-TERT-Zellen	50
3.4	Erstellen stabiler p8-überexprimierender hMSC-TERT-Zelllinien	52
3.5	Wachstumsverhalten der stabilen Zelllinien	53
3.6	Proliferation der stabilen Zelllinien	56
3.7	Apoptose der stabilen Zelllinien	57
4.	Diskussion	59
4.1	Wachstumsverhalten Nestin-positiver Zellen aus humanen Pankreasinseln	59
4.2	hMSC-TERT als Modell Nestin-positiver Vorläuferzellen	60
4.3	Einfluss einer transienten p8-Überexpression auf die Expansion von hMSC-TERT-Zellen	63
4.4	Generierung von hMSC-TERT-Zellen mit stabiler p8-Überexpression	64
4.5	Proliferation und Expansion von hMSC-TERT-Zellen mit stabiler p8-Überexpression	64
4.6	Apoptose von hMSC-TERT-Zellen mit stabiler p8-Überexpression	66
4.7	p8 – ein Onkogen?	68
5.	Ausblick	69
6.	Zusammenfassung	70
7.	Literaturverzeichnis	71
8.	Danksagung	85
9.	Lebenslauf	86
10.	Veröffentlichungen	89

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine chronische Krankheit, bei der eine erbliche oder erworbene Insulinsekretionsstörung und / oder eine Insulinresistenz peripherer Gewebe zu dauerhaft erhöhten Blutglukosespiegeln führt.

Neben selteneren Formen wird der meist im Jugendalter klinisch manifest werdende, durch autoimmunologische Zerstörung der pankreatischen β -Zell-Masse und darauf folgenden absoluten Insulinmangel gekennzeichnete Typ 1 Diabetes vom Typ 2 Diabetes unterschieden. Letzterer entsteht durch eine Insulinsekretionsstörung in Kombination mit Insulinresistenz peripherer Gewebe und tritt zumeist im höheren Alter auf (1).

Der Diabetes mellitus hat in Deutschland eine Prävalenz von etwa 7%, was etwa 6 Millionen Diabetikern entspricht. Die Diabetesprävalenz steigt jedoch in Deutschland seit 1960, als sie noch bei etwa 0,6% lag, kontinuierlich an. Neben genetischen Faktoren ist dies auf den durch Bewegungsmangel und Überernährung gekennzeichneten modernen Lebensstil zurückzuführen. Diese Entwicklung stellt auch für die Sozialsysteme eine enorme Bürde dar: im Jahr 2001 betragen die jährlichen Kosten für den Diabetes mellitus in Deutschland über 22 Milliarden Euro (2), wobei ein Patient mit diabetischen Komplikationen etwa viermal höhere Kosten als ein Diabetiker ohne Folgeerkrankungen verursacht. Der Diabetes mellitus ist damit eine aus medizinischer und volkswirtschaftlicher Sicht immer bedeutender werdende Erkrankung.

Von den 6 Millionen deutschen Diabetikern wird derzeit etwa ein Viertel mit Insulin behandelt. Dies stellt beim Diabetes den für die Mehrzahl der Patienten am besten geeigneten und ätiologisch kausalen Therapieansatz dar, besonders wenn der absolute oder relative Insulinmangel im Vordergrund stehen (2). Immer häufiger wird deshalb auch beim Typ 2 Diabetes neben der Umstellung der Lebensgewohnheiten und dem Einsatz oraler Antidiabetika nach einem frühzeitigen Beginn der Insulintherapie verlangt (3, 4), die jedoch möglicherweise mit gravierenden Nebenwirkungen wie Lipohyper- und -atrophie, allergischen Reaktionen sowie pontenziell letalen Hypoglykämien verbunden ist (5, 6). Nicht allein deshalb bedarf das Gesamttherapieregime des Diabetes mellitus genauso wie die Insulintherapie einer

guten Schulung und Compliance des Patienten sowie dessen gemeinschaftlicher Zusammenarbeit mit dem Therapeuten (7-9).

Diese hohen Anforderungen an eine optimale Therapie des Diabetes sind nicht in allen Fällen zu erfüllen, so dass gefürchtete Langzeitkomplikationen des Diabetes wie diabetische Nephro-, Retino- oder Neuropathie trotz Therapie häufig nicht zu verhindern sind.

Aus medizinischer Sicht ist es deshalb mehr als sinnvoll, nach Alternativen zur Insulinsubstitutionstherapie Ausschau zu halten. Eine klinisch bereits eingeführte Alternativtherapie ist die Zelltherapie des Diabetes mellitus bzw. Transplantation ganzer Pankreata bzw. Langerhansscher Inseln.

1.2 Zelltherapie des Diabetes mellitus – Pankreas- und Inseltransplantation

Bei der Zelltherapie des Diabetes mellitus wird die funktionell inaktive oder zerstörte β -Zellmasse des Pankreas durch Transplantation gesamter Spenderpankreata oder isolierter Langerhans'scher Inseln ersetzt. Seit der ersten Pankreastransplantation 1966 (10) wurden bis zum Jahr 2004 bereits mehr als 23.000 Pankreastransplantationen weltweit durchgeführt (11). Grundsätzlich verlangt die Transplantation eines kompletten Organs eine dementsprechende Immunsuppression, die ihrerseits eine hohe Belastung für den Patienten darstellt. Deshalb erfolgen die Pankreastransplantationen fast ausschließlich in Kombination mit der Transplantation anderer Organe. Langjährige Diabetiker mit Nierenversagen aufgrund diabetischer Nephropathie sind daher die größte Patientengruppe, wobei Niere und Pankreas entweder simultan (SPK, ca. 78% der Eingriffe) oder sequentiell, erst die Niere, dann das Pankreas (PAK, ca. 14% der Eingriffe), transplantiert werden. Nur in seltenen und besonders ausgewählten Fällen wird ein Spenderpankreas allein transplantiert (PTA, 6%) (11, 12). Das Einjahrespatientenüberleben liegt für alle drei Verfahren über 95%, nach einem Jahr sind 76-85% der Patienten insulinunabhängig und normoglykämisch (11). Ebenso lassen sich eine Normalisierung des metabolischen und kardiovaskulären Risikoprofils feststellen (13-17). Die Pankreastransplantation stellt jedoch grundsätzlich einen großen und risikobehafteten operativen Eingriff dar. Darüber hinaus ist für das Überleben des Transplantats eine lebenslange Immunsuppression mit ihren Nebenwirkungen vonnöten (13, 15). Aus diesen Gründen ist die Pankreastransplantation bei ansonsten gesunden

Typ 1-Diabetikern keine Alternative zur Insulintherapie.

Um die Vorteile von transplantierten Insulin produzierenden β -Zellen aus dem endokrinen Pankreas in einer breiteren Anwendung zu nutzen, versucht man seit langem, eine risikoärmere und besser verträgliche Therapieoption zu finden. Bei der sogenannten Inseltransplantation werden isolierte Pankreasinseln in die Pfortader injiziert, damit diese nach der Implantation in die Leber glukoseabhängig Insulin sezernieren. Bis zum Jahr 1999 waren die Erfolge dieser Methode gering, da nur etwa 8% der behandelten Patienten nach einem Jahr noch insulinunabhängig waren (18). Als Ursachen werden eine inadäquat niedrige Zahl transplanteder Inseln, hohe Abstoßungsraten, vermehrte Apoptose und Auswirkungen der Immunsuppression diskutiert (19). Vor diesem Hintergrund testete eine als "Edmonton-Protokoll" bekannt gewordene Studie einen neuartigen Ansatz, bei dem Typ 1 Diabetiker mehrfach große Mengen ABO-kompatibler Inseln ohne Beachtung des HLA-Typs erhielten (20-22). Abweichend von den üblichen Protokollen wurden die Inseln in Kulturmedien ohne Fremdproteine aufbereitet und die Patienten erhielten zur Minimierung diabetogener Effekte eine steroidfreie Immunsuppression mit nur geringen Mengen an Calcineurininhibitoren. Es wurden vielversprechende Resultate erzielt: sieben transplantierten Patienten waren nach zwölf Monaten noch insulinunabhängig (20), es wurde eine Normalisierung des HbA_{1c} erzielt und das Auftreten lebensbedrohlicher Hypoglykämien konnte verhindert werden (20, 21). Diese ersten Erfolge wurden von anderen Transplantationszentren zumindest teilweise reproduziert und in einer weltweiten Datenbank aller Transplantationszentren zur weiteren Untersuchung festgehalten (22, 23). Das Zentrum in Edmonton erzielt nach mittlerweile fünfjähriger Erfahrung mit 65 Patienten Insulinunabhängigkeitsraten von 70% nach einem Jahr, 40% nach 2 Jahren und noch 7,5% nach 5 Jahren. Bei allen transplantierten Patienten verbesserten sich Hypoglykämiehäufigkeit, Instabilität des Blutglukoseniveaus und HbA_{1c} über den gesamten Beobachtungszeitraum deutlich (24). Da bei diesem klinischen Therapieverfahren der Eingriff unkompliziert ist und die Immunsuppression hinsichtlich der im Vergleich zum Gesamtpankreas geringeren immunogenen Oberfläche der transplantierten Inseln sehr moderat ausfallen kann, scheint dies der am meisten zukunftsweisende Weg in der Zelltherapie des Diabetes mellitus zu sein.

Allerdings ist auch hier eine breite Anwendung zur Zeit noch nicht denkbar, da der Einsatz dieser Methode insbesondere durch die geringe Verfügbarkeit von Spenderorganen limitiert wird.

1.3 Alternative Quellen insulinproduzierender Zellen für die β -Zell-Ersatztherapie

Die Suche nach alternativen Quellen von Pankreasinseln und β -Zellen ist somit angesichts des Mangels an geeigneten Spenderorganen von zunehmender Relevanz. Neben der Verwendung von Inselzellen aus Schweinen (Xenotransplantation), die ungelöste Probleme wie die immunologische Abstoßungsreaktion (88, 89) und die Übertragung artfremder Pathogene (90-92) aufweist, hat sich die Differenzierung von Insulin produzierenden Zellen aus embryonalen und adulten Stammzellen zu einem bedeutendem und vielversprechendem Forschungsgebiet entwickelt.

Embryonale Stammzellen

Embryonale und adulte Stammzellen als omni- bzw. multipotente Zellen erscheinen aufgrund ihrer erhaltenen Plastizität als gut geeignete Ressource. Bei den embryonalen Stammzellen konnte in humanen und murinen Kulturen von einigen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass durch Veränderung von Kulturmedien, forcierte Expression von Vorläufergenen und andere gentechnische Manipulationen Insulin produzierende Zellen generiert werden können, die nach Transplantation bei diabetischen Mäusen zur Normalisierung der Blutglukose führen (25-32). In einem wegweisenden Experiment wurde der für die β -Zellentwicklung notwendige Transkriptionsfaktor Pax-4 in embryonalen Stammzellen, die positiv für das als im ZNS als Progenitorzellmarker bekannte Zytoskelettelement Nestin (95) waren, überexprimiert (32): bei hoher Ausbeute an Insulin-positiven Zellen konnten diese nach Transplantation in diabetische Mäuse die Blutglukosespiegel effektiv senken. Jedoch ergeben sich bei der Verwendung und Beeinflussung embryonaler Stammzellen nicht allein ethische und juristische Fragestellungen (93). Diese Zellen induzieren nämlich im undifferenzierten Zustand stets Teratome (27, 94) und sind nicht in ausreichendem Maße zu glukosesensitiver Insulinsekretion befähigt (32, 94). Eine optimale Differenzierung und Selektion sind somit von entscheidender Bedeutung. Bis *dato* existieren aber weder geeignete Differenzierungs- und Selektionsverfahren, noch ist der Entwicklungsprozess

embryonaler Stammzellen zur β -Zelle ausreichend verstanden, als dass die Nachahmung der natürlichen embryonalen β -Zellgenese mit ausreichender Sicherheit nachvollzogen werden könnte.

Adulte Stamm-/Vorläuferzellen aus dem Pankreas

Selbsterneuerungsrate und Differenzierungsfähigkeit sind bei den multipotenten adulten Stammzellen verglichen mit embryonalen Stammzellen begrenzt. Es sind jedoch innerhalb des Pankreas Zellen mit Stammzellcharakter vorhanden, insbesondere aus Zellen in exokrinen Pankreasdukten und azinärem Gewebe (26, 40-45) sowie innerhalb der Langerhansschen Inseln (25, 46-48) konnten *in vitro* Insulin sezernierende Zellen generiert werden.

Das Filamentprotein Nestin, ursprünglich ein Charakteristikum für ZNS-Stammzellen, wird auch als Marker für adulte Stammzellen des Pankreas diskutiert (47, 96). Nestin-positive Zellen konnten erstmals von Hunziker *et al.* sowie im Weiteren von Zulewski *et al.* (47, 138) innerhalb humaner Langerhans'scher Inseln und dem Pankreasduktepithel nachgewiesen werden. Nach der Isolation aus Langerhans'schen Inseln konnten *in vitro* aus Nestin-positiven Zellen durch spezifische Differenzierungsstimuli neben hepatischen und pankreatisch-exokrinen Phänotypen auch β -Zellphänotypen generiert werden, die in begrenztem Maß glukoseabhängig Insulin zu sezernieren vermochten (47).

Dies unterstreicht die Plastizität Nestin-positiver Vorläuferzellen, die, wie bei der Maus bereits nachgewiesen, mesenchymaler Herkunft zu sein scheinen (97). Man geht jedoch heute davon aus, dass nur Subpopulationen der Nestin-positiven Inselzellen im Pankreas für die *in vitro* Differenzierung geeignet sind (47, 106). Zur Zeit rücken daher die mesenchymalen Vorläuferzellen mehr in den Focus des wissenschaftlichen Interesses. Von mesenchymalen Knochenmarksstammzellen ist bekannt, dass sie sich unter geeigneten Stimuli in beinahe alle somatischen Zelltypen differenzieren können (34). Diese bemerkenswerten Eigenschaften belegen eindrucksvoll das Potenzial mesenchymaler Vorläuferzellen, was auch das momentane breite wissenschaftliche Interesse an diesem Zelltypus begründet.

Extrapankreatische adulte Stamm-/Vorläuferzellen

Das Prinzip, nach dem sich adulte Stammzellen ausschließlich in Zellen ihres Herkunftsgewebes differenzieren können, ist heute widerlegt. So konnten auch in extrapancreatischen Geweben wie in Leber (49, 50, 98), Intestinum (99), Milz (51) und sogar im Nabelschnurblut (100, 101) differenzierbare Stammzellpools nachgewiesen werden. Eine der vielleicht vielversprechendsten Quellen stellt aber, wie oben bereits angedeutet, das Knochenmarksstroma dar. So sind Knochenmarksstammzellen in frühen Stadien von autoimmun vermitteltem Diabetes befähigt, durch weitgehend unbekannte Mechanismen Immuntoleranz gegenüber noch existierenden β -Zellen zu induzieren (37-39). Auch β -zellähnliche Phänotypen mit begrenzter glukoseresponsiver Insulinsekretion konnten aus mesenchymalen Knochenmarksstammzellen generiert werden (25, 26, 33-36). Die multipotente Plastizität dieses Stammzelltypus wird weiterhin durch ihre Differenzierbarkeit in osteoblastäre, chondrogene, adipogene, myoblastäre, neurogene und endotheliale Phänotypen unterstrichen (34, 102-104).

Es wird somit unmittelbar deutlich, dass besonders dieses Forschungsgebiet vielversprechende Ansätze zur kurativen Therapie des Diabetes liefert und die Generierung funktionstüchtiger und transplantierbarer β -Zellen beinahe nur noch eine Frage der Zeit scheint.

1.4 Bisherige Einschränkungen der Stammzelltherapie

Trotz all dieser freudigen Euphorie bleibt jedoch festzuhalten, dass insbesondere die sichere und stabile Differenzierung der Vorläuferzellen sowie die langanhaltende glukoseresponsive Insulinsekretion der differenzierten Zellen ungelöste Probleme darstellen. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass bis heute keine eindeutige und spezifische β -Vorläuferzelle charakterisiert werden konnte. Einige Autoren bestreiten sogar die Existenz eines solchen Zelltyps und führen die β -Zellneogenese auf die Selbstduplikation bereits präexistenter β -Zellen zurück (105). Weiter sind die derzeit existierenden Differenzierungsprotokolle mit dem Problem der insgesamt geringen Ausbeute differenzierter β -Zellen behaftet, die darüber hinaus nur in begrenztem Ausmaß zu glukoseresponsiver Insulinsekretion befähigt sind.

Eine der größten Schwierigkeiten bei der Forschung mit primären adulten Stammzellen

ist jedoch deren begrenztes Wachstum *in vitro*. Sie stehen dadurch weder zur notwendigen Erweiterung des grundlagenwissenschaftlichen Wissens noch zur späteren Differenzierung und definitiven Therapie des Diabetes mellitus in ausreichendem Umfang zur Verfügung.

Vor diesem Hintergrund wurde das Protein p8 als potenzieller Proliferationsinduktor identifiziert.

1.5 Das Protein p8

Die Arbeitsgruppe um Juan Lucio Iovanna hatte es sich in einer Veröffentlichung von 1997 zum Ziel gesetzt, auf molekularem Niveau das „Notfallprogramm“ des Pankreas im Rahmen der Pankreatitis zu charakterisieren. Hierzu wurde bei Ratten experimentell eine Pankreatitis induziert und eine cDNA-Bibliothek erstellt. Ein spezifischer cDNA-Klon wies hierbei ein interessantes und abundantes Expressionsmuster auf: die zugrundeliegende RNA war schon 3 Stunden nach Pankreatitisinduktion in hohem Maße nachweisbar, erreichte ihr maximales Niveau zwischen 6 und 12 Stunden und sank nach 24 bis 48 Stunden wieder auf ihr niedriges Initialniveau ab (52). Das zugehörige Protein wurde als p8 bezeichnet.

Struktur von p8 und gewebsspezifische Expression

Humanes p8 ist ein monomeres Protein, das aus 82 Aminosäuren aufgebaut ist und 75%ige Homologie mit seinen aus jeweils 80 Aminosäuren bestehenden Ratten- und Maus-Äquivalenten aufweist (54, 61, 64). Das p8-Gen ist auf Chromosom 16 (p11.2) lokalisiert (54) und besteht aus 3 Exons, die durch je ein Intron unterbrochen werden (54, 61). In wässriger Lösung ist p8 partiell ungefaltet (64), besitzt ein putatives basisches Helix-Loop-Helix-ähnliches Motiv (52, 64) und an seinem C-terminalen Ende ein „Nukleäres Lokalisationssignal“ (54, 68); p8 bindet DNA schwach, nach Phosphorylierung, etwa durch Proteinkinase A, besitzt es jedoch einen höheren Grad an Sekundärstruktur und stärkere DNA-Bindungsfähigkeit (64). Trotz geringer Sequenzhomologie (35%) besitzt p8 nicht nur auf Grund der vorgenannten Eigenschaften große Ähnlichkeit mit High mobility group-Proteinen (HMG-I/Y), die zusammen mit Histonen die bedeutendsten Komponenten in der Zusammensetzung regulatorischer Nukleoproteinkomplexe darstellen und essentiell für die Transkription

vieler Gene sind (83, 84). Deshalb wurde p8 als „HMG-I/Y-like protein“ charakterisiert (64).

Transkripte von p8 fanden sich bei der Ratte in einer Vielzahl von Geweben, so in Speicheldrüsen, Magen, Kolon, exokrinem Pankreas, Leber, Niere, Lunge, Herz und Dünndarm, wohingegen keine Expression in Hirn, Milz, Hoden, Thymus und Skelettmuskel nachgewiesen werden konnte (52). Beim Menschen hingegen war eine p8-Expression mit unterschiedlicher Expressionsstärke zusätzlich in endokrinem Pankreas (56), Ovar, Schilddrüse, Rückenmark, Trachea, Nebennierenmark, Plazenta, Lymphknoten, aber auch in Hirn, Milz, Hoden, Thymus, Knochenmark und Skelettmuskel vorhanden (54). Auch in der Fetalzeit konnten in Pankreas und Leber der Ratte hohe p8-Level, die postnatal auf niedrigere Werte absanken, nachgewiesen werden (52), bei *Xenopus laevis* ist p8 im Larvenstadium besonders im Zentralnervensystem exprimiert (68). Diese Befunde weisen p8 als beinahe ubiquitäres Protein aus, das auch während Entwicklung und Organogenese eine wichtige Rolle innehat.

Protektive Effekte von p8 bei Pankreatitis

Viele Ergebnisse weisen p8 als wichtigen protektiven Faktor im Rahmen der Pankreatitis aus: Im Tierexperiment fand sich wie bereits erwähnt bei Ratten unter den pathologischen Bedingungen einer experimentell induzierten akuten Pankreatitis eine verstärkte pankreatische Expression von p8, die nach 12 Stunden ihr Maximum erreichte, danach stetig abfiel und auf die Azinuszellen beschränkt blieb (52, 53, 63). In *vitro* konnte in der AR42-J Tumorzelllinie aus dem exokrinen Pankreas der Ratte, die ein Modell für Azinuszellen darstellt, durch unterschiedliche proinflammatorische oder -apoptische Stimuli eine expositionszeit- und dosisabhängige Erhöhung der p8-Expression nachgewiesen werden (52, 63). p8-Knockout-Mäuse hingegen wiesen nach Pankreatitisinduktion höhere Werte für Amylase, Lipase, Myeloperoxidase und TNF α als Marker für Gewebedestruktion und Neutrophileninvasion sowie eine erhöhte Mortalitätsrate auf; ebenso zeigten p8-defiziente Tiere eine Erniedrigung des antiinflammatorischen, in Abhängigkeit von p8 induzierten Pankreatitis-assoziierten Proteins PAPI bei der akuten Pankreatitis (62, 65). Auch im Tiermodell der chronischen Pankreatitis war eine p8-Erhöhung nach Pankreatitisinduktion nachweisbar (53), unter

Behandlung mit den Verlauf der Pankreatitis günstig beeinflussenden Substanzen waren p8, PAPI, TGF- β_1 , IL-6 und andere entzündungsspezifische Marker in geringerem Ausmaß vorhanden (66, 67). Diese Befunde bescheinigen p8 protektive Effekte bei vielen Formen zellulären Stresses.

Wachstumsfördernde Effekte von p8

Um die zellulären Funktionen von p8 weiter zu ergründen, wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die sich auf Grund des Expressionsmusters von p8 im Rahmen entzündlicher und reparativer Prozesse auf die Einflüsse von p8 auf Wachstum, Proliferation und Apoptose konzentrierten. Bei stabiler Überexpression von p8 *in vitro* in AR42-J-, COS-7- und HELA-Zellen zeigt sich eine signifikante Steigerung der Wachstums- und Proliferationsraten dieser Zelllinien (52, 54). Auch im Rahmen der diabetischen, durch Endothelin induzierten Nephropathie, die durch Hypertrophie und Hyperplasie der Mesangiumzellen gekennzeichnet ist, ist p8 notwendiger Mediator der Mesangialzellhypertrophie (69). Ebenso wird Glukose-induziertes β -Zell-Wachstum von einem zellulären p8-Anstieg begleitet (56). Hinsichtlich seines proliferativen Charakters nicht unerwartet wird p8 auch in schnellwachsenden Tumorgeweben in verstärktem Maße exprimiert (54, 55, 57, 60, 70-74). Weiterhin korreliert die p8 Expression in Pankreaskarzinomen mit einer Verminderung der Apoptoserate (55).

Diese Befunde charakterisieren p8 als wichtigen und potenziell nutzbaren Mediator von Wachstum und Proliferation mit antiapoptotischen Eigenschaften. p8 mit seinen zytoprotektiven, wachstums- und proliferationsfördernden Eigenschaften soll in dieser Arbeit als molekulares Werkzeug zur Förderung des begrenzten Wachstums differenzierbarer Stammzellen eingesetzt werden.

1.6 Fragestellung

Die kurative Therapie des Diabetes mellitus mittels Transplantation von β -Zellen ist durch den Mangel an transplantierbarem Material begrenzt. Adulte Stammzellen, insbesondere Nestin-positive Vorläuferzellen aus Langerhansschen Inseln des Pankreas und mesenchymale Knochenmarksstammzellen, welche die prinzipielle Fähigkeit zur Differenzierung in Insulin produzierende Zellen haben, sind eine derzeit intensiv untersuchte alternative Quelle für Spenderorgane. Allerdings sind beide primären zellulären Ressourcen hinsichtlich ihres Wachstumspotenzials *in vitro* limitiert, wodurch die Entwicklung effizienter und sicherer Differenzierungsprotokolle sehr erschwert ist. p8 ist ein mit Proliferation assoziiertes Protein mit anti-apoptotischen und regenerativen Eigenschaften bei Gewebestress (Verletzung/Entzündung). Vor diesem Hintergrund testet die vorliegende Arbeit die prinzipielle Eignung von p8, das Wachstum und Überleben von adulten Stammzellen *in vitro* zu verbessern anhand folgender Untersuchungsziele und Fragestellungen:

1. Charakterisierung der *in vitro* Replikationsfähigkeit Nestin-positiver Vorläuferzellen aus primären Langerhansschen Inseln (hIZ), die entsprechend dem Selektionsprotokoll von Zulewski *et al.* gewonnen wurden (47).

Trotz intensiver Bemühungen ist es innerhalb der Arbeitsgruppe nicht gelungen, primäre hIZ mit nicht adenoviralen Techniken gentechnisch zu verändern. Aus diesem Grund und hinsichtlich des mesenchymalen Phänotyps der hIZ wurden die proliferativen und anti-apoptotischen Eigenschaften von p8 in dem durch Telomerase-Überexpression immortalisierten Zellkulturmodell der mesenchymalen hMSC-TERT Knochenmarksstammzellen näher untersucht:

2. Exprimieren hMSC-TERT Knochenmarksstammzellen Nestin?
3. Welche Auswirkungen haben akute (transiente Transfektion) und chronische (stabile Transfektion) Überexpression von p8 auf die Proliferation und Expansion von hMSC-TERT Knochenmarksstammzellen?
4. Beeinflusst die stabile Überexpression von p8 die Apoptoserate von hMSC-TERT Knochenmarksstammzellen?

2. Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Sämtliche Glas- und Plastikartikel wurden von den Firmen Eppendorf, Falcon, Greiner, Marienfeld, Sarsted, Becton Dickinson und Hartenstein bezogen.

Es wurden handelsübliche labortechnische Geräte der Firmen Beckmann, Bio Rad, Eppendorf, Haereus, Hettich, Höfer, Hartenstein, Amersham Pharmacia Biotech und Perkin Elmer benutzt. Spezielle Geräte sind im Folgenden aufgelistet:

- Carl Zeiss, Göttingen, BRD: Fluoreszenzmikroskop Axioskop20
- Kodak, Stuttgart, BRD: Digitalkamera
- Dynatech, Denkendorf, BRD: Mikrotiter®-Platten-Photometer
- Liebisch, Bielefeld, BRD: Heizblock
- Melag, Berlin, BRD: Autoklav
- Becton Dickinson, USA: FACScan 34071071
- Perkin Elmer, USA: Sequencer ABI 310

2.2 Chemikalien und weitere Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den hier aufgelisteten Firmen bezogen.

- | | |
|---------------------------------------|---------------------|
| • AMERSHAM | Buckinghamshire, UK |
| • BECTON DICKINSON | Heidelberg, BRD |
| • GIBCO™ INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES | Karlsruhe, BRD |
| • J. T. BAKER | Deventer, Holland |
| • MERCK | Darmstadt, BRD |
| • PHARMACIA UP JOHN | Erlangen, BRD |
| • ROTH | Karlsruhe, BRD |
| • SIGMA | St. Louis, USA |

2.3 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen mit den dazugehörigen Puffern wurden von den Firmen NEB (New England Biolabs, Frankfurt am Main, BRD) und Promega (Mannheim, BRD) bezogen.

Spezielle Enzyme sind unten aufgeführt.

- Calf intestine alkaline Phosphatase (CIAP) Promega, Mannheim, BRD
- DNase I Promega, Mannheim, BRD
- ExTaqTM-Polymerase Takara, Shiga, Japan
- RNase-Inhibitor Promega, Mannheim, BRD
- SUPER SCRIPTTM II Gibco, Karlsruhe, BRD
- T4-Ligase Promega, Mannheim, BRD

2.4 Reagenziensätze (Kits)

- Big-Dye-Mix PE Applied Biosystems/ABI Prism, Forster City, USA
- CaspGlow Red Multi Caspase Staining Kit BioVision, Mountain View, USA
- ECL Western Blotting Detection Kit Amersham, Little Chalfont, UK
- Fast Plasmid Mini Kit Eppendorf, Hamburg, Germany
- HiSpeed Plasmid Midi Kit Qiagen, Valencia, USA
- QIAquick-Gel-Extraktion-Kit Qiagen, Valencia, USA
- TOPOTMTA Cloning Kit Invitrogen, Karlsruhe, BRD
- Rapid-Pure-Miniprep-Kit (RPM)TM BIO101, Spicewood, USA
- Rapid-Pure-Mini-MonsterPrep (RPM 4G)TM BIO101, Spicewood, USA
- SpartalabsTM BrdU-Kit for Flow Cytometry BIOCARTA US, Carlsbad, USA

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

- Mouse Anti-Human Nestin Monoclonal Antibody, Fluorescein Conjugated (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- Rabbit Anti-Human p8 Antibody, Unconjugated (ABR-Affinity BioReagents, Golden, USA)
- PE-conjugated Mouse Anti-BrdU Monoclonal Antibody (Becton Dickinson, USA)

2.5.2 Sekundärantikörper

- Donkey anti-Rabbit Cy3 (Jackson Immuno Research Laboratories, Cambridgeshire, UK)
- Donkey anti-Mouse Cy3 (Jackson Immuno Research Laboratories, Cambridgeshire, UK)

2.6 DNA- und Protein-Größenstandards (Gibco)

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| • 100 bp DNA-Marker (0,1 µg/µl) | Fragmentgröße 100 bp-2072 bp |
| • 1 kbp DNA-Marker (0,1 µg/µl) | Fragmentgröße 201 bp-12216 bp |
| • Low-Range Proteinmarker (1 mg/ml) | Fragmentgröße 14,3 kDA-200 kDA |

2.7 Oligonukleotid-Primer

Alle Primer wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK bezogen.

Primer zum Nachweis von humanem Nestin

- FORWARD: 5' - AGAGGGGAATTCCTGGAG- 3'
- REVERSE: 5' - CTGAGGACCAGGACTCTCTA- 3'

Primer zum Nachweis von humanem p8

- FORWARD: 5' – CCAGGCACGATGGCCACCTTCCACCAG – 3'
- REVERSE: 5' – GCCTCATCTCCAGCTCTGTCTCAGCGCC – 3'

Primer zur Sequenzierung

- M13 (reverse Primer) 5' – CAGGAAACAGCTATGAC – 3'
- T7 (forward Primer) 5' – CCCTATAGTGAGTCGTATTA – 3'

2.8 Plasmide

- pIRES-hrGFP-1a Stratagene®, La Jolla, USA
- php8-topo2.1 Labor von Prof. Dr. J. Seufert
- php8-IRES-hrGFP Klonierung siehe Methoden
- php8-IRES-hrGFP-Puro Klonierung siehe Methoden
- pIRES-hrGFP-Puro Klonierung siehe Methoden

2.9 Medien und Nährböden

LB-Medium (pH 7,5)

- 10 g Bacto Tryptone
- 5 g Bacto Yeast Extract
- 10 g Bacto Yeast
- ad 1 l H₂O

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 12 g/l Agar zugesetzt. Die Platten sind nach dem Aushärten bei 4°C aufzubewahren.

Antibiotikazusätze für Medien und Agarplatten

Zur Antibiotikaselektion spezifischer Bakterienklone wurden die entsprechenden Antibiotika nach Abkühlen des Mediums auf 45°C zugegeben.

Antibiotikum	Konzentration µg/ml	Lösungsmittel
Ampicillin	40, 100	H ₂ O
Kanamycin	10	H ₂ O
Puromycin	50	Ethanol, 70%

2.10 Zelllinien und Zellkulturmedien

2.10.1 Die Zelllinie hMSC-TERT

hMSC-TERT ist eine humane mesenchymale Knochenmarksstammzelllinie, die durch Überexpression der humanen Telomerase-Reverse Transkriptase immortalisiert wurde (82). Sie besitzt neben ihrer mesenchymalen Herkunft einen mesenchymalen Phänotyp (108) und günstige technische Eigenschaften wie gute Transfizierbarkeit mit hoher Effizienz sowie unbegrenzte Wachstumsdauer. Diese Zelllinie wächst adhärent als Monolayerkultur. Die Zellen wurde im Gewebebrutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Sie ist eine freundliche Leihgabe von Prof. Dr. M. Kassem (Laboratory for Molecular Endocrinology (KMEB), Department of Endocrinology and Metabolism, University Hospital of Odense, Odense, Denmark).

Zellkulturmedium

RPMI 1640, 10% hitzeinaktiviertes, fetales Rinderserum (FBS), 1% Penicillin-Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1% Na-Pyruvat, 1% HEPES-Puffer, 0,1% β-Mercaptoethanol

Einfrriermedium

Kulturmedium mit 10% FBS und 5% DMSO.

2.10.2 Aus humanen Langerhans-Inseln auswachsende Zellen (hIZ)

Aus humanen Langerhans-Inseln, die der Arbeitsgruppe durch eine Kooperation mit dem Inseltransplantationszentrum in Gießen unter Leitung von Prof. Dr. R. Bretzel zur Verfügung standen, wächst nach kurzer Zeit ein adhärenter Zellrasen aus. Die Differenzierbarkeit dieser Zellen unter spezifischen Stimuli wurde 2001 durch Zulewski et al. (47) gezeigt.

Die zunächst aus der Pankreasinsel auswachsenden Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und als hIZ bezeichnet.

Zellkulturmedium

RPMI 1640, 10% hitzeinaktiviertes, fetales Rinderserum (FBS), 1% Penicillin-Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1 % Na-Pyruvat, 1% HEPES-Puffer, 20 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor), 20 ng/ml EGF (epidermal growth factor)

Einfrriermedium

Kulturmedium mit 10% FBS und 5% DMSO.

2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung und zum Nachweis genau definierter DNA-Abschnitte dar. Unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase und für das zu vervielfältigende DNA-Stück geeigneter, aus Oligonukleotiden bestehender Primer kann jedes beliebige DNA-Stück amplifiziert und anschließend nachgewiesen und weiter verarbeitet werden.

Soweit nicht anders angegeben wurde jeweils folgender PCR-Ansatz gewählt:

- 5 µl 10 x Ex-Taq™-Puffer
- 4 µl dNTP (2,5 mM)
- 1 µl Primer „sense“
- 1 µl Primer „antisense“
- 1 µl Ex-Taq™-Polymerase
- DNA
- H₂O ad 50 µl

Folgende Zyklusbedingungen wurden verwendet:

	96°C	2 min	
32 x	{	96°C	45 sec (Denaturierung)
		50-65°C	45 sec (Annealing)
		72°C	1 min (Amplifikation)
	72°C	2 min	
	4°C	∞	

2.12. TAE-Agarose-Gel-Elektrophorese

Die TAE-Agarose-Gel-Elektrophorese ist eine analytische Methode der Molekularbiologie, mit deren Hilfe verschiedene Arten von Molekülen in Abhängigkeit von Größe und Ladung über ein Agarose-Gel im elektrischen Feld getrennt werden können. So wandern beispielsweise kleine DNA-Stücke auf Grund des ähnlichen Größen-Ladungsverhältnisses der DNA im elektrischen Feld zwischen Kathode und Anode schneller als große Fragmente, was zu einer Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe führt.

Wird gleichzeitig ein DNA-Marker mit aufgetrennt, kann nach Färbung der DNA durch den Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht eine Größenordnung der jeweiligen DNA-Fragmente vorgenommen werden.

Hierzu wurde die DNA mit DNA-Loading-Puffer versetzt und in 1%igen TAE-Agarose-Gelen mit 0.005% Ethidiumbromid, TAE als Tankpuffer und 120 V angelegter Spannung aufgetrennt.

2.13 Konzentrationsmessung im Photometer

Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz kann durch die Absorption monochromatischen Lichts durch eine Probe auf die Konzentration eines gelösten Inhaltsstoffs geschlossen werden.

Die Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm ist hierbei zur Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen in wässriger Lösung geeignet und kann mittels Photometer bestimmt werden.

2.14 Methoden zum Klonieren eines Plasmids

Der Begriff Klonierung bezeichnet in der Molekularbiologie eine Methode, mit deren Hilfe ein beliebiges DNA-Fragment, das als Insert bezeichnet wird, in ein bakterielles Plasmid, den sogenannten Vektor, integriert werden kann. Das neu entstandene Plasmid wird anschließend durch Transformation in Bakterien, meist einen *Escherichia coli*-Stamm, eingebracht und von diesen vermehrt.

Hierzu bedarf es mehrerer Teilschritte, die im Folgenden dargestellt werden.

2.14.1 Verdau von Vektor und Insert mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme oder Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA an einer für sie spezifischen DNA-Basensequenz erkennen und schneiden können. Die entstehenden Schnittenden können entweder einen bestimmten, je nach Enzym variablen Überhang, sticky end, oder ein gerades Ende ohne Überhang, blunt end, aufweisen. Dieser DNA-Überhang kann, falls nötig, durch eine Klenow-Polymerase aufgefüllt und somit in ein gerades Ende ohne Überhang umgewandelt werden.

In einem ersten Schritt wird das Insert aus einem bereits bestehenden Plasmid mit Hilfe von Restriktionsenzymen ausgeschnitten, der Vektor wird an geeigneten Schnittstellen enzymatisch linearisiert.

Soweit nicht anders beschrieben, wurde hierzu folgender Standard-Verdau mit einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet:

- DNA, Gesamtmenge 10 µg
- 1 µl BSA (1 µg/µl)
- 2 µl 10 x Puffer
- 1 µl Restriktionsenzym (10 U/µl)
- H₂O ad 20 µl

Dieser Ansatz wurde jeweils 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Wird sowohl beim Ausschneiden des Inserts als auch bei der Linearisierung des Vektor nur ein einziges gleiches Restriktionsenzym verwendet, so kann direkt nach Verdau und Aufreinigung die Ligation der beiden DNA-Stücke erfolgen. Diese Art des Verdau wird als Single-Digest bezeichnet. Problematisch ist jedoch, dass sich hierbei bei der Ligation zwei mögliche Ligationsrichtungen ergeben, von denen nur eine erwünscht ist. Häufig ist es deshalb auf Grund technischer Überlegungen bei der Ligation notwendig und sinnvoll, sowohl Insert als auch Vektor mit zwei unterschiedlichen Enzymen zu verdauen, um bei der Ligation eine einzige Ligationsrichtung vorzugeben (sogenanntes directional cloning). Unterscheiden sich hierbei die Bedingungen für die optimale Aktivität der beiden Restriktionsenzyme (z. B. durch unterschiedliche Puffer oder Temperaturoptima), erfolgt erst der Verdau mit dem ersten Enzym, hierauf wird eine Natrium-Acetat-Fällung vorgenommen und anschließend mit dem zweiten Enzym nochmals verdaut.

2.14.2 Natrium-Acetat-Fällung

Die Natrium-Acetat-Fällung des Verdau wurde wie folgt durchgeführt: nach Zugabe von Natrium-Acetat (0,1 x Verdauvolumen), 100% Ethanol (2 x Verdauvolumen) und H₂O (ad 100 µl) wurde der Ansatz für 30 min bei -80°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach nochmaliger Zentrifugation getrocknet und in z. B. 10 µl H₂O wiederaufgenommen.

In bestimmten Fällen ist es jedoch nicht möglich, geeignete Schnittstellen innerhalb der Plasmide ausfindig zu machen, weswegen nach Ausschneiden der jeweiligen Fragmente die entstandenen sticky ends mittels Klenow-Polymerase vor der Ligation in blunt ends überführt werden müssen.

2.14.3 Auffüllen von DNA-Überhängen mit Klenow-Polymerase

Um 3' und 5'-Überhänge nach dem Restriktionsverdau der DNA in blunt ends umzuwandeln, wurde eine Klenow-Polymerase zum Auffüllen der Überhänge gemäß folgendem Ansatz benutzt:

- 20 µl Restriktionsverdau
- 4 µl BSA (1 µg/µl)
- 6 µl 10x Klenow-Puffer
- 2 µl dNTP (10 mM)
- 2 µl Klenow-Polymerase
- H₂O ad 60 µl

Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; danach wurde die Reaktion durch eine 10minütige Inkubation bei 75°C gestoppt.

2.14.4 Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase

Wird ein Vektor vor der Ligation im Sinne eines Single-Digest nur mit einem Restriktionsenzym eröffnet, so religiert er mit einer höheren Wahrscheinlichkeit, als er sich mit dem Insert zu dem gewünschten neuen Plasmid verbindet. Um diese Religation bei Zugabe einer T4-Ligase zu verhindern, können die Phosphatgruppen am Ende eines aufgeschnittenen Plasmids, die für eine Religation nötig sind, abgespalten werden. Hierzu wurde als Enzym die Alkalische Phosphatase in einem 80 µl-Ansatz benutzt:

- 20 µl Linearisiertes Plasmid
- 8 µl 10x CIAP-Puffer
- 2 µl Alkalische Phosphatase
- H₂O ad 80 µl

In einem ersten Reaktionsschritt wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, daraufhin die Reaktion bei 56°C über 10 Minuten hinweg inaktiviert. Nach nochmaliger Zugabe von 2 µl Alkalischer Phosphatase wurde dieser Zyklus noch mal durchlaufen, wodurch der Prozentsatz dephosphorylierter Plasmidenden maximiert werden konnte.

2.14.5 Extraktion von DNA aus einem Agarose-Gel

Im Weiteren mussten die durch Verdau und Folgeschritte gewonnenen DNA-Fragmente von Nebenprodukten des Verdau und ungeschnittener DNA gereinigt werden, bevor Vektor und Insert miteinander verbunden werden können. Hierzu wurden die jeweiligen Proben auf ein TAE-Agarose-Gel geladen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Nach Färbung der Gele mit Ethidium-Bromid wurden die erwünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel exzidiert und mittels QIAquick-Gel-Extraction-Kit® herausgelöst und in H₂O resuspendiert.

2.14.6 Ligation von Insert und Vektor

Um das erwünschte Plasmid zu generieren, mussten nun Insert und Vektor über das Enzym T4-Ligase miteinander verbunden werden. Grundsätzlich ist hierbei das Verhältnis von Vektor und Insert für den Erfolg der Ligation von entscheidender Bedeutung. Deshalb wurden jeweils drei Ansätze in den Vektor-Insert-Verhältnissen 1:1, 1:3 und 1:5 hergestellt; als Religationskontrolle diente ein Ansatz, dem nur der Vektor zugegeben wurde.

Die für ein 1:1-Verhältnis nötige Insert-Menge wurde bei Vorgabe von 100 ng Vektor nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{100\text{ng Vektor} \times \text{Insertgröße in kb}}{\text{Vektorgröße in kb}} = x \text{ ng Insert}$$

Hierauf wurde die Ligation im folgenden Ansatz durchgeführt:

- x μl (100 ng) Vektor
- y μl Errechnete Insertmenge (im Verhältnis 1:1, 1:3, 1:5)
- 1 μl T4-DNA-Ligase
- 1 μl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer
- H₂O ad 10 μl

Dieser Reaktionsansatz wurde entweder bei Raumtemperatur für 3 Stunden oder bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.14.7 Transformation von Plasmiden in *Escherichia coli*

Die im Ligationsansatz neu entstandenen Plasmide mussten nun zur weiteren Verwendung zunächst vermehrt werden. Hierzu muss bestenfalls jeweils ein Plasmid von einem Bakterium aufgenommen werden, was durch unterschiedliche Methoden erzielt werden kann. Neben der Elektroporation wurde hierzu die Hitzeschocktransformation verwendet.

2.14.7.1 Transformation durch Elektroporation

Bei der Elektroporation wird durch Anlegen eines Spannungspulses an eine beidseits metallbeschichtete Küvette, in der ein DNA-Bakterien-Gemisch enthalten ist, ein elektrisches Feld erzeugt; in diesem Feld können unter bestimmten physikalischen Bedingungen Poren in der bakteriellen Zellmembran erzeugt werden. Diese Poren stellen wiederum Eintrittspforten für die einzubringende DNA dar.

Hierzu wurden sogenannte elektrokompetente Bakterien verwendet. Diese wurden dadurch hergestellt, dass zunächst 1 Liter LB-Medium mit Bakterien beimpft und anschließend über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler angezchtet wurde. Dann wurde das LB-Medium durch Abzentrifugation der Bakterien entfernt und diese mehrfach mit

destilliertem Wasser gewaschen. So konnten bei der Elektroporation schädliche, da bei Anlegen einer Spannung Stromfluss erzeugende Salze entfernt werden. Abschließend wurden die nun elektrokompenten Bakterien aliquotiert und im Glycerolstock bei -80°C eingefroren.

Bei der Transformation wurde ein Aliquot des Bakterienglycerolstocks (etwa $40\ \mu\text{l}$) zusammen mit $1\ \mu\text{l}$ des Ligationsansatzes gemeinsam in eine Elektroporationsküvette eingebracht. An die Küvette wurde dann in einem E.coli-Pulser (z. B. Firma BioRad) für wenige Millisekunden eine Spannung von $2,5\ \text{kV}$ angelegt und so die Bakterienmembran permeabilisiert. Plasmide konnten nun in die Bakterien eintreten, das Membranleck verschließt sich nach einiger Zeit.

2.14.7.2 Transformation durch Hitzeschock

Zur Transformation wurde wieder $1\ \mu\text{l}$ des Ligationsansatzes zu $250\ \mu\text{l}$ hitzekompetenter E.coli gegeben. Für 30 Minuten wurde dieses Gemisch auf Eis inkubiert und anschließend für 90 Sekunden auf 42°C erhitzt. Nach 2 Minuten Inkubation auf Eis wurden $500\ \mu\text{l}$ vorgewärmten SOC-Mediums zum Transformationsansatz gegeben.

2.14.8 Ausplattieren und Picken von Bakterien

Nach Zugabe von SOC-Medium wurden die Bakterien je nach im Plasmid kodierter Antibiotikaresistenz (Kanamycin: 30 min, Ampicillin: 1 h) im Bakterienrüttler bei 37°C inkubiert. Dies war nötig, damit das Protein, das die Bakterien gegen das jeweilige Antibiotikum resistent macht, exprimiert werden kann.

Nun wurden etwa $100\ \mu\text{l}$ des inkubierten Gemisches auf vorbereitete, mit Antibiotikum versetzte LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert. Nach dieser Zeit waren auf den Ligationsplatten zahlreiche, auf der Religations- oder Negativkontrolle bestenfalls nur wenige Bakterienkolonien gewachsen.

Von den Ligationsplatten wurden mit je einer sterilen Pipettenspitze mehrere Kolonien gepickt und in je ein 15ml-Reagiergefäß mit 10 ml antibiotikumhaltigen LB-Medium eingebracht.

Diese Reagiergefäße wurden wiederum über Nacht im Bakterienrüttler bei 37°C inkubiert, so dass sich die jeweiligen Bakterienklone vermehren konnten. Hierauf folgte die Extraktion der Plasmid-DNA aus den Bakterien.

2.14.9 Mini-DNA-Präparation

Mit Hilfe des FastPlasmid Mini-Kit® der Firma Eppendorf wurde nun gemäß Herstellerprotokoll aus jedem vermehrten Bakterienklon die Plasmid-DNA extrahiert und zur weiteren Verarbeitung in H₂O aufgenommen.

2.14.10 Überprüfen des Klonierungserfolgs

Es war nun von größter Wichtigkeit zu untersuchen, ob das neu klonierte Plasmid die erwartete Struktur aufwies. Hierzu gibt es prinzipiell unterschiedliche Methoden, von denen hier knapp der Differential Digest und die Sequenzierung erläutert seien.

2.14.10.1 Differential Digest

Der Differential Digest ist vor allem dann zur Überprüfung des Klonierungserfolgs geeignet, wenn zwei Ligationsrichtungen, etwa durch eine Klonierung mit blunt ends, möglich sind. Das Plasmid wird mit zwei Restriktionsenzymen verdaut. Die Schnittstellen der beiden Enzyme sind hierbei so gewählt, dass das eine innerhalb des Vektors und möglichst nahe der Einfügungsstelle des Inserts, das andere hingegen innerhalb des Inserts an einem seiner Enden schneidet. Somit sind zwei Ergebnisse dieses Verdaus möglich: bei der einen der beiden Einbaurichtungen entsteht ein sehr kleines und ein etwa dem Gesamtplasmid ähnlich langes Fragment, bei der anderen Einbaurichtung hingegen ein etwa der Insertlänge und ein etwa der Vektorlänge entsprechendes Fragment. Diese

Fragmente werden anschließend auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und sichtbar gemacht.

Somit sind die beiden Einbauvarianten sicher von einander zu unterscheiden, die Plasmide mit der erwünschten Einbaurichtung können weiter verarbeitet werden.

2.14.10.2 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung wird die Basenabfolge eines beliebigen DNA-Fragments technisch bestimmt. Somit kann bei Kenntnis der Basenabfolge von Vektor und Insert durch Sequenzierung der Einbaustelle auf Einbaurichtung und Intaktheit des Inserts geschlossen werden.

2.14.10.2.1 Sequenzierungs-PCR

Ähnlich einer herkömmlichen Amplifizierungs-PCR wird auch bei der Sequenzierungs-PCR DNA mittels DNA-Polymerase vervielfältigt. Es gibt jedoch einige grundlegende Unterschiede. Zum einen werden neben herkömmlichen Desoxyribonukleotiden (dNTPs) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) verwendet; werden diese in den neuen DNA-Strang eingebaut, so entsteht ein Kettenabbruch. Die ddNTPs sind darüber hinaus fluoreszenzmarkiert, jede der vier Basen (Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin) emittiert bei Bestrahlung mit Laserlicht eine eigene Wellenlänge und ist somit von den anderen dreien sicher zu unterscheiden.

Darüber hinaus wird nur ein Primer verwendet, wodurch die Extension nur von einer Stelle aus und in einer Richtung erfolgen kann.

Nach 25 Zyklen der PCR entstehen somit unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die jeweils an einem Ende eine fluoreszenzmarkierte Base enthalten.

Folgender Ansatz wurde hierbei gewählt:

- 4 μl Big Dye-Mix (bestehend aus dNTP, fluoreszierenden ddNTPS, Puffer und Polymerase)
- 1 μl Plasmid-DNA (Konzentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- 1 μl Primer (Konzentration 3,3 $\text{pmol}/\mu\text{l}$)
- 14 μl H_2O

Die Zyklusbedingungen waren folgendermaßen gestaltet:

	96°C	2 min
15 x {	96°C	30 sec
	50°C	15 sec
	60°C	5 min
	4°C	∞

Anschließend wurden die DNA mittels der vorbeschriebenen Na-Acetat-Fällung gefällt und in 20 μl H_2O resuspendiert.

2.14.10.2.2 Sequenzierung

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurden 12 μl HiDi-Formamide (highly deionized formamide zur elektrokinetischen Injektion in Kapillarelektrophoresesystemen) in Sequenzierungsgefäßen vorgelegt und 8 μl der gefällten Sequenz-PCR hinzugegeben. Nach einem 2minütigem Hitzeschock bei 94°C wurden die Proben noch 5 Minuten auf Eis gelagert, bevor sie in den automatischen Sequenzierer ABI 310 gegeben wurden.

Im Sequenzierer durchlaufen die Proben ein Kapillar-Elektrophorese-Gel und werden somit nach ihrer Länge aufgetrennt. Nun wird durch Abtastung mit einem Laserstrahl das jeweils letzte Nukleotid anhand seiner Fluoreszenz erkannt; somit kann durch Zusammenschau aller PCR-Produkte die Gesamtbasenabfolge des sequenzierten Teilstücks ermittelt werden.

Mit dieser Methode können DNA-Stücke von 200-400 Basen Länge untersucht werden.

2.14.11 Midi-Prep

Um ein neues, korrekt kloniertes und abschließend kontrolliertes Plasmid in ausreichender Menge herzustellen, wurde der sogenannten Midi-Prep verwendet: 1 Liter LB-Medium wurde mit den das gewünschte Plasmid enthaltenden Bakterien beimpft, wodurch eine größere Bakterien- und somit Plasmidkopienzahl erzielt wurde. Die Plasmide wurden dann wiederum mittels des HiSpeed Plasmid Midi-Kits (QIAGEN®) aus den Bakterien extrahiert, in H₂O resuspendiert und zur weiteren Verwendung bei -20°C konserviert.

Darüber hinaus wurde noch ein Glycerolstock mit den plasmidtragenden Bakterien angelegt, um zu späteren Zeitpunkten die Bakterien wieder klonal vermehren und Plasmid extrahieren zu können.

2.15 Klonierung des Plasmids pCMV-hp8-IRES-hrGFP-1a

Um den Einfluss einer Überexpression des proliferationsassoziierten Proteins p8 in mesenchymalen Stammzellen genauer untersuchen zu können, wurde ein Plasmid kloniert, in dem hp8 unter Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promoters exprimiert wurde. Außerdem sollte eine transfizierte Zelle an der Expression eines fluoreszenten Proteins, in diesem Falle hrGFP, erkennbar sein; dass hierbei die Expression des Markerproteins hrGFP keinen wahrscheinlichen Einfluss auf die Funktion und die Interaktion des Proteins p8 innerhalb der Zelle hatte, wurde durch die genetische Trennung der beiden Gene durch eine Internal ribosomal entry site (IRES) gewährleistet.

Als Basisvektor wurde hierfür das Plasmid pIRES-hrGFP-1a von Stratagene® verwendet.

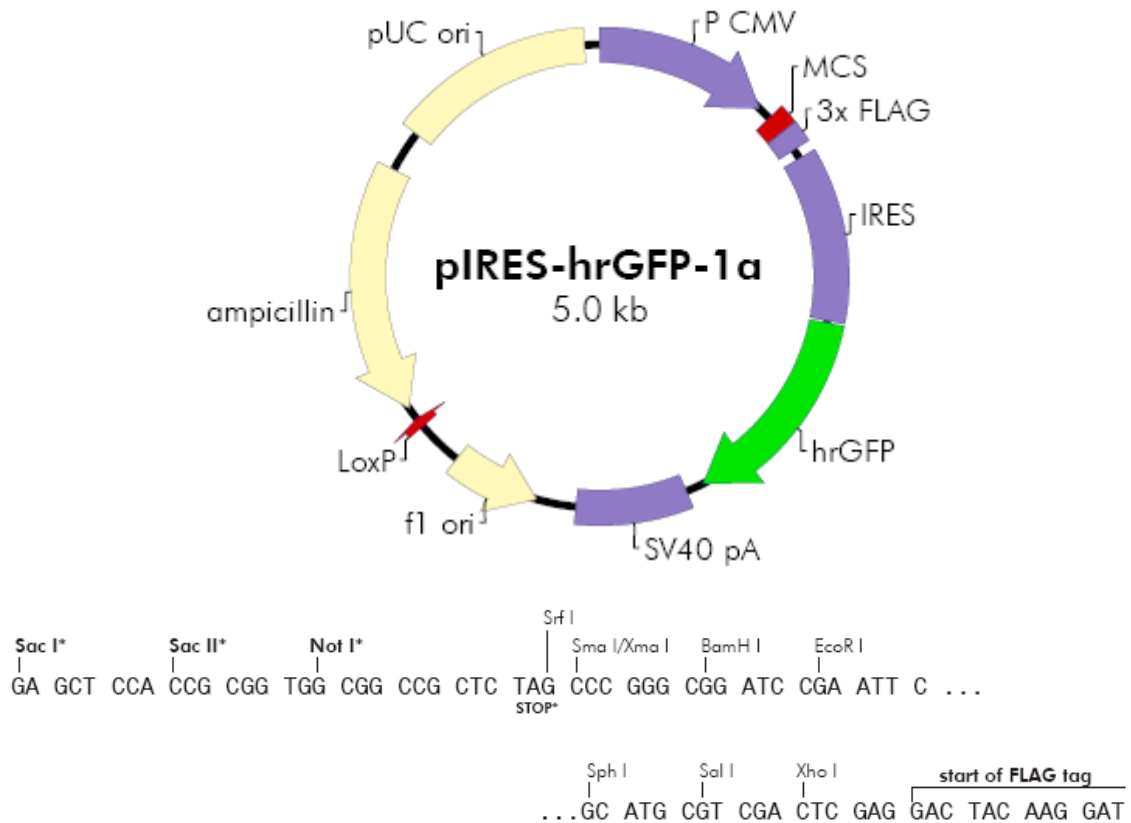


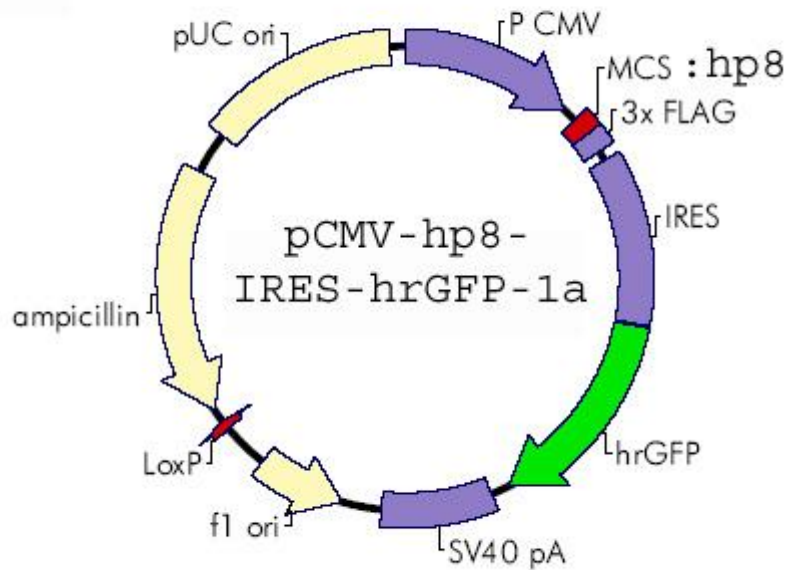
Abb. 1) pIRES-hrGFP-1a mit MCS. Das Plasmid pIRES-hrGFP-1a wurde zur Klonierung aller weiteren Plasmide als Ausgangsvektor benutzt.

Dieses Plasmid wurde mit den beiden Restriktionsenzymen *SacI* und *XhoI* geschnitten und der Vektorbackbone durch Gelelektrophorese mit anschließender Aufreinigung wiedergewonnen.

Ebenso wurde das Plasmid *php8-topo2.1* (Seufert-Lab) mit den beiden Enzymen *SacI* und *XhoI* verdaut und das frei gewordene *hp8* als Insert aufgereinigt.

Mittels T4-Ligase konnten die beiden DNA-Stücke nun so miteinander verbunden werden, dass *hp8* nur in einer möglichen Richtung in die Multiple Cloning Site des Ursprungsvektors integriert werden konnte.

Nach Kontrolle des über die beschriebenen Teilschritte klonierten Plasmids *pCMV-hp8-IRES-hrGFP-1a* wurde von diesem ein Maxi-Prep angefertigt sowie ein Glycerolstock angelegt.



MCS: - *SacI* – **hp8** – *XhoI* - start of FLAG tag

Abb. 2) pCMV-hp8-IRES-hrGFP-1a mit MCS.

2.16 Klonierung des Plasmids pCMV-hp8-IRES-hrGFP-Puro

Zur Selektion transfizierter Zellen bei stabiler Transfektion ist es nötig, dass eine in eukaryoten Zellen exprimierbare Antibiotikaresistenz im transfizierten Plasmid kodiert ist. Deshalb wurde für weitere Experimente ein EC-Puro-Mudol mittels Cre-Rekombinase (beides Stratagene®) gemäß Herstellerangaben in das neu generierte Plasmid pCMV-hp8-IRES-hrGFP eingefügt. Somit wurde das neue Plasmid pCMV-hp8-IRES-hrGFP-Puro gewonnen.

Nach Kontrolle des Klonierungserfolges des Plasmids pCMV-hp8-IRES-hrGFP-Puro wurde von diesem ein Maxi-Prep angefertigt sowie ein Glycerolstock angelegt.

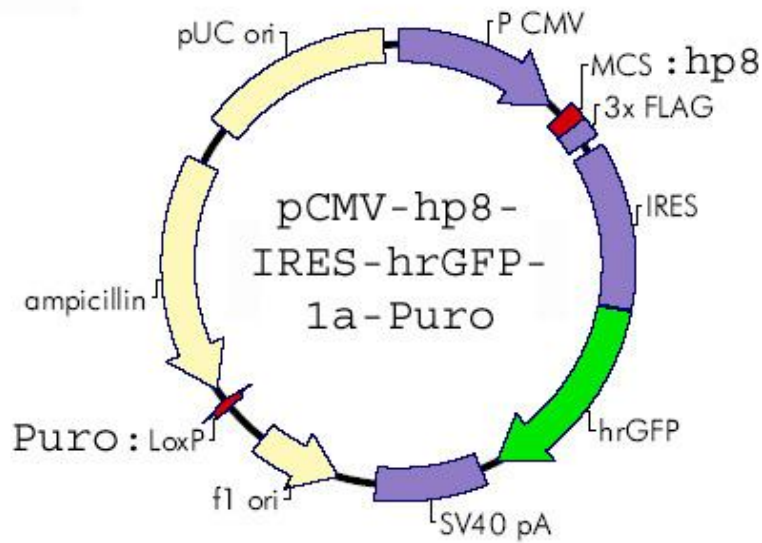


Abb. 3) pCMV-hp8-IRES-hrGFP-Puro.

2.17 Klonierung des Plasmids pIRES-hrGFP-Puro

Zur Generierung einer Kontrollzelllinie für die stabil p8-überexprimierende Zelllinie (stabile Transfektion mit pCMV-hp8-IRES-hrGFP-Puro) wurde weiterhin das Plasmid pIRES-hrGFP-Puro kloniert. Hierzu wurde ein EC-Puro-Mudol mittels Cre-Rekombinase (beides Stratagene®) gemäß Herstellerangaben in das Plasmid pIRES-hrGFP-1a eingefügt. Somit wurde das neue Plasmid pIRES-hrGFP-Puro gewonnen.

Nach Kontrolle des Klonierungserfolges wurde von dem neu gewonnenen Plasmid ein Maxi-Prep angefertigt sowie ein Glycerolstock angelegt.

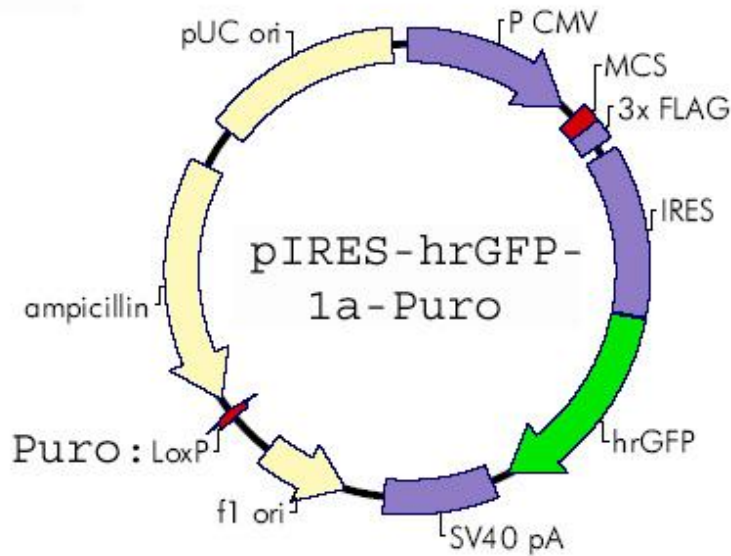


Abb. 4) p-IRES-hrGFP-Puro.

2.18 Zellkultur und Zelllinien

Als Modell für humane mesenchymale nestinpositive Zellen wurde hMSC-TERT verwendet, die bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank mit einem Kulturmedium bestehend aus RPMI 1640 mit Zusatz von FCS, L-Glutamin, HEPES, Natrium-Pyruvat, Penicillin-Streptomycin und β-Mercapto-Ethanol kultiviert wurden.

Weiterhin wurden aus menschlichen Spenderpankreatata isolierte primäre Pankreasinseln in einem Kulturmedium aus RPMI 1640 mit Zusatz von FCS, L-Glutamin, HEPES, Natrium-Pyruvat, Penicillin-Streptomycin, β-Mercapto-Ethanol und bei einer Glukosekonzentration von 5,6 mM gehalten. Dem Medium wurden weiterhin die beiden Wachstumsfaktoren hEGF und bFGF zugegeben. Nach wenigen Tagen adhärirten die Inseln an die Kulturflasche und ein Zellrasen begann auszuwachsen (weiteres Vorgehen s. Ergebnisse).

Beide Zellarten wurden jeweils in 75 cm² oder 175 cm²-Zellkulturflaschen gehalten und bei Konfluenz mittels Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst und nach Zellzählung

mittels einer Neubauer-Zählkammer in einer Anzahl von 300.000 bzw. 1.000.000 Zellen wieder auf eine neue Flasche ausgesät.

2.18.1 Konservieren von Zellen

Um auf Zellen zu einem späteren Zeitpunkt wieder zurückgreifen zu können, können diese eingefroren werden. Hierzu wurden die Zellen nach Trypsinierung und Abzentrifugation in ein Einfriermedium, das aus FCS mit 10% DMSO bestand, überführt. Daraufhin wurden die Zellen langsam eingefroren (optimal ist 1°C Abkühlung pro Minute) und bei -80°C oder im Stickstofftank gelagert.

Zu jedem späteren Zeitpunkt konnten die Zellen dann, diesmal jedoch möglichst schnell, wieder aufgetaut und ausgesät werden.

2.18.2 Transfektion von Zellen

hMSC-TERT wurden zu den verschiedenen Experimenten sowohl transient als auch stabil mit Metafectene® (Biontex) transfiziert. Bei der transienten Transfektion wird das Plasmid in Ringform in das Zytoplasma der Zelle eingebracht und von dort nach Transkription der jeweilig kodierten Gene nach einiger Zeit unverändert wieder nach extrazellulär ausgeschieden. Nur ein geringer Anteil der Plasmide wird an zufälliger Stelle enzymatisch eröffnet und an beliebigem Ort in das Genom integriert. Im Gegensatz hierzu wird bei der stabilen Transkription das Plasmid vorher durch Restriktionsverdau linearisiert, dann transfiziert und im Weiteren zu einem höheren Prozentsatz und mit geringerem zufälligen intrazellulären Verdau in die genomische DNA integriert. Derart im Genom angelangte DNA wird dann von der Zelle bei jeder Mitose mitvermehrt und ist somit fester Bestandteil des Genoms der Einzelzelle. Die beiden Plasmide pCMV-hp8-IRES-hrGFP-Puro und pIRES-hrGFP-Puro wurden wie beschrieben mit dem Restriktionsenzym *SacI* linearisiert und anschließend wie folgt transfiziert.

Zur Transfektion wurden jeweils zwei Ansätze bereitet: Ansatz A enthielt 50 µl RPMI 1640 ohne weitere Zusätze und 3 µl Metafectene, Ansatz B 50 µl RPMI 1640 und 1 µg

der jeweils zu transfizierenden DNA. Nach Vermischung der beiden Ansätze und 20minütiger Inkubation, die zur Bildung der DNA-Liposomen-Partikel führte, wurde die gesamte Lösung auf die am Vortag in 6-Well-Platten in einer Zahl von 250.000 Zellen/Well ausgesäten Zellen geträufelt. Diese Zellen wurden hierbei jeweils in Normalmedium ohne Antibiotikazusatz gehalten.

Nach 48 Stunden Inkubation erfolgten ein Mediumwechsel und die weitere experimentelle Verarbeitung.

Bei der stabilen Transfektion wurde nun nach weiteren 48 Stunden Selektionsmedium zugegeben, das bei p8-hMSC-TERT bzw. Mock-hMSC-TERT aus Kulturmedium mit einer Konzentration von 0,6 µg/ml Puromycin bestand. Dieses Selektionsmedium hatte sich in Toxizitätsuntersuchungen für untransfizierte Zellen nach zwei Tagen als letal erwiesen (s. Ergebnisse).

Nach einer Woche Inkubation in diesem Selektionsmedium wurden aus den verbliebenen Zellen mittels Limited Dilution Einzelzellklone herangezüchtet: die Zellsuspension wurde nach Trypsinierung und Zellzählung soweit verdünnt, dass in einem Quantum der Suspension, etwa 100 µl, rechnerisch nur noch eine Einzelzelle enthalten war. Diese Menge wurde dann in je ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurde überprüft, in welchem der Wells tatsächlich nur eine Einzelzelle enthalten war. Aus einigen dieser Wells konnten dann durch Auswachsenlassen Einzelzellklone generiert werden, bei denen weiterhin jeweils auf mRNA- und Proteinebene der Erfolg der stabilen Transfektion verifiziert werden konnte.

2.19 Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, die häufiger mit einem Markennamen als FACS (Abkürzung für „Fluorescence activated cell sorting“ der Firma Becton Dickinson) bezeichnet wird, beruht auf der Emission optischer Signale einer Einzelzelle bei Passage eines Laserstrahls. In einem Kapillarsystem wird eine Zellsuspension angesaugt und durch einen Laserstrahl geleitet. Bei der Passage des Laserstrahls kommt es in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Zelle zu einer Ablenkung des Lichts. Diese kann dann als Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC als Maß für die Zellgröße) und Seitwärtsstreuung

(Side Scatter, SSC als Maß für die Zellgranularität) gemessen werden, wodurch eine morphologische Einordnung jeder Zelle möglich wird. Werden die Zellen zusätzlich mit gegen bestimmte Antigene gerichteten und fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt, kann anhand des bei Passage des Lasers emittierten Lichts eine Sortierung nach den jeweils gefärbten Antigenen vorgenommen werden.

Mit Hilfe einer Computeranalyse, z.B. einem Punkt-Plot (hier mittels CellQuest), können dann Aussagen über spezifische Eigenschaften und die Zusammensetzung einer Zellpopulation gemacht werden.

Diese Methode wurde bei den transienten und stabilen Transfektionsexperimenten sowie bei BrdU- und Caspase-Assay verwendet.

2.20 Proliferationsanalyse mittels BrdU-Assay

Die Proliferationsrate von Zelllinien kann mittels eines BrdU-Inkorporationsassays gemessen werden. Hierbei wurde der BrdU-Kit der Firma Spartalabs® mit einigen Abweichungen vom Herstellerprotokoll verwendet.

Am Vortag des Hauptexperiments wurden 250.000 Zellen der jeweiligen Zelllinie in je ein Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde zu jedem Well nach einem Medienwechsel mit Zugabe von 1 ml Zellkulturmedium 20 µl einer 1mM BrdU-Lösung gegeben, wodurch eine Konzentration von 20 µM BrdU im Kulturmedium erreicht wurde. Innerhalb der nun folgenden 1,5stündigen Inkubation proliferierten die Zellen weiter und bauten auch BrdU in die genomische DNA ein, und zwar proportional zum Ausmaß ihrer DNA-Replikation (S-Phase), also ihrer Proliferationsrate. Danach wurden die Zellen abgelöst und gemäß Herstellerprotokoll weiter verarbeitet. Nach zum BrdU-Nachweis notwendiger partieller Photolyse des BrdU unter UV-B-Licht und Crosslink-Fixierung der Zellen wurde die immunologische Färbung des inkorporierten BrdU begonnen. Zum im Kit mitgelieferten Puffer wurden vom Protokoll abweichend pro Ansatz 10 µl eines anti-BrdU-Antikörpers gegeben, der mit Phycoerythrin (PE) konjugiert war (PE labeled anti-human BrdU, BD). Dies war notwendig, da eine FITC-Fluoreszenz in den ohnehin durch hrGFP grün fluoreszierenden stabil transfizierten Zelllinien im FACS nicht sicher detektierbar gewesen wäre. Nach einer Stunde Inkuba-

tion im Färbepuffer erfolgte die Analyse der Fluoreszenz der Zellen mittels Durchflusszytometrie. Eine stark PE-positive Zelle konnte hierbei wegen ihrer ausgeprägten BrdU-Inkorporation einer hohen Proliferationsrate zugeordnet werden.

2.21 Immunhistochemie

Mit der Methode der Immunhistochemie können bestimmte Antigene und deren zelluläre Lokalisation im Gewebe oder bei Einzelzellen durch eine Antikörperreaktion mit anschließender Färbereaktion dargestellt werden.

Im vorliegenden Fall sollten hMSC-TERT auf das Vorliegen des Zytoskelettelements Nestin untersucht werden. Dazu wurden zunächst 4-Kammer-Glasobjektträger über Nacht mit 0,1% Fibronectin (Sigma®, 1:1000 in PBS) beschichtet, um den Zellen eine Matrix zum Anwachsen bereitzustellen. Danach wurden pro Kammer jeweils 10.000 hMSC-TERT-Zellen auf die Objektträger ausgesät und über zwei Tage bis kurz vor Konfluenz kultiviert. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Objektträger dann im Luftstrom der Sterilbank getrocknet und entweder bei -20°C konserviert oder unmittelbar weiterverarbeitet.

Um das intrazelluläre Nestin darstellen zu können, musste zunächst die Zellmembran durch 5minütige Inkubation in 0,5% Triton X 100 in TBS aufgebrochen werden. Nach mehreren Waschschritten in TBS wurden dann die Einzelfelder mit Fettstift umrandet und hierauf 30 Minuten in 3% Normalserum der Spezies des 2. Antikörper zur Blockung unspezifischer Bindungen inkubiert. Hierauf wurde der 1. Antikörper, in diesem Fall ein Maus-gegen-humanes-Nestin-Antikörper in der Verdünnung (DAKO, Antibody Diluent with Background reducing components) 1:100 auf drei der vier Kammern aufgebracht. Die letzte Kammer blieb als Negativkontrolle ohne 1. Antikörper. Bei der nun folgenden Inkubation über 24 Stunden bei 4°C band der 1. Antikörper an das intrazelluläre Nestin. Nach mehrfacher Waschung in TBS wurde am nächsten Tag der 2. Antikörper 1:1000 verdünnt und für 60 Minuten diesmal auf alle Kammern gegeben. Der 2. Antikörper band nun spezifisch an den 1. Antikörper, überschüssige Antikörperkomplexe aus 1. und 2. Antikörper ohne Verbindung zu einem Nestinmolekül wurden durch mehrfaches Waschen entfernt. Die Zellkerne wurden schließlich noch mit DAPI gegen-

gefärbt, indem eine DAPI-Lösung der Konzentration 1 µg/ml für 1 Minute auf die vier Kammern gegeben wurde. Abschließend konnte der Objektträger nach Waschen in TBS mit Immunomount with anti-Fading-Medium (DAKO) und einem Deckgläschen eingedeckt werden.

Zum Schluss wurde das Ergebnis der Färbung sowie das Fehlen einer Färbung bei der Negativkontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop mit spezifischen Wellenlängen (blau für DAPI, rot für PE) dargestellt und fotografiert.

2.22 Analyse zellulärer RNA mittels RT-PCR

2.22.1 RNA-Extraktion mit TRIZOL-Methode

Um die zu einem Zeitpunkt in einem Zellpool vorhandene RNA genauer untersuchen zu können, muss diese zunächst aus den Zellen extrahiert werden.

Hierzu wurden 10cm-Zellkulturschalen bis kurz vor Konfluenz kultiviert. Zur RNA-Extraktion wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend 1 ml Trizol auf die Kulturschale gegeben. Mit einem Zellschaber konnten die Zellen von der Schale gelöst werden.

Nun wurden 200 µl Chloroform zugegeben. Durch Zentrifugation konnte eine Phasentrennung erreicht werden: die untere Phase enthielt zelluläre Restbestandteile, die obere Phase hingegen die gewünschte RNA. Deshalb wurde die Oberphase in ein neues Gefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol präzipitiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig entfernt. Als Waschschrift wurde nun 1 ml 75% eiskalten Ethanol zugegeben. Die abschließende Zentrifugation führte nach Entfernen des Überstands zu einem RNA-Pellet, das getrocknet und in 30 µl H₂O wieder aufgenommen werden konnte.

2.22.2 DNase 1-Verdau

Nach der Aufreinigung der zellulären Gesamt-RNA muss die Probe nun von DNA-Kontaminationen gereinigt werden, da diese bei der später erfolgenden PCR das Ergebnis verfälschen würden.

Es wurde folgender Ansatz gewählt:

- 50 µg Gesamt-RNA
- 1 µl DNase I (10 U/µl)
- 0,5 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
- 1 µl 0,1 M DTT
- 5 µl 0,1 M TrisCl
- 5 µl 0,5 M KCl
- 5 µl 15 mM MgCl₂
- H₂O ad 76 µl

Dieser Ansatz wurde zum Umschreibung der RNA 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nun wurde durch Zugabe von 224 µl H₂O und 200 µl Phenol-Chloroform 3:1 und durch anschließende Zentrifugation eine Phasentrennung initiiert, wodurch die von DNase freie Oberphase mit der RNA abgenommen werden konnte. Die RNA wurde nun mit 25 µl 3 M Natrium-Acetat und 725 µl 100% Ethanol gefällt und das nach Zentrifugation erhaltene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Abschließend wurde das Pellet getrocknet und die RNA in 30 µl H₂O resuspendiert.

2.22.3 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Von der derart aufgereinigten und von kontaminierender DNA befreiten zellulären Gesamt-RNA, bestehend aus mRNA, tRNA und rRNA, sollte nun lediglich die mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies konnte durch den Einsatz von Oligo(dT)-Primern, die spezifisch den nur bei der mRNA vorhandenen 3'-Poly-A-Schwanz erkennt, erreicht werden. Nach dem Protokoll für die SuperScript II Reverse Transkriptase von invitrogen® wurde hierauf die mRNA in cDNA umgeschrieben. Pro Probe wurden hierzu je zwei Ansätze angesetzt, von denen nur zu einem reverse Transkriptase gegeben wurde (RT+). Der andere (RT-) diente bei der nachfolgenden PCR-Reaktion als interne Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen.

2.22.4 PCR

Mit der auf diese Weise gewonnenen cDNA (RT+ und RT-) wurde dann wie beschrieben eine PCR durchgeführt, wobei für p8 und β -Aktin spezifische Primer verwendet wurden. β -Aktin diente hierbei als Positivkontrolle und konnte als Strukturgen für den Vergleich der eingesetzten Menge an mRNA bei semiquantitativer Auswertung als Bezugspunkt herangezogen werden.

2.22.5 TAE-Agarose-Gelelektrophorese und semiquantitative Auswertung

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden nun elektrophoretisch aufgetrennt, nach Färbung mit Ethidiumbromid wurde computergestützt die Bandenstärke von β -Aktin in Probe 1 mit der Bandenstärke von β -Aktin in Probe 2 verglichen und die Stärke der beiden p8-Banden hierauf bezogen. Auf diese Weise waren vergleichende Aussagen der jeweils eingesetzten mRNA-Mengen möglich.

2.23 Caspase-Assay

Der phasenhafte Ablauf der Apoptose beginnt als eines der frühesten detektierbaren Vorgänge mit der Aktivierung einer intrazellulären Kaskade von Proteolyse mittels spezifischer Enzyme. Wesentlich an diesem Vorgang beteiligt sind die sogenannten Caspasen. Es ist möglich, mittels spezifischer, nach Umsetzung fluoreszenter Substrate der Caspasen deren Aktivität zu messen.

Hierzu wurde der Casp-GLOWTM Red Active Caspase Staining Kit der Firma Biovision® gemäß Herstellerangaben verwendet und die spezifische Rotfluoreszenz und somit der Anteil Caspase-positiver Zellen mittels FACS-Analyse ermittelt.

2.24 Proteinchemie

2.24.1 Herstellung von Ganzzellextrakten (Whole Cell Extracts, WCE)

Zur Untersuchung der zu einem gegebenen Zeitpunkt exprimierten Proteine einer Zellpopulation ist es notwendig, zunächst eine Aufreinigung dieser Proteine mittels eines Ganzzellextrakts vorzunehmen. Hierzu werden die Zellmembranen durch einen Lyse-puffer aufgebrochen und Proteine von größeren unlöslichen Zell- oder Zellmembranbestandteilen durch Zentrifugation isoliert.

Nach einmaligem Waschen der an der Zellkulturschale adhärennten Zellen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit RIPA-Puffer versetzt, mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgetrennt, in Eppendorfcaps transferiert und nach fünfminütiger Inkubation auf Eis für 15 Minuten bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand enthält die gewünschten Proteine und kann in ein neues Tube pipettiert und bei -80°C konserviert werden.

- RIPA-Puffer:
- 150 mM NaCl
 - 5 mM NaF
 - 20 mM Tris (pH 7,5)
 - 1 mM EDTA (pH 8,0)
 - 1% NP-40
 - 1% DOC
 - 0,1% SDS
 - H₂O ad 100 ml

Kurz vor Verwendung sind der Proteinaseinhibitor 1mM DTT und 1mM PMSF zu supplementieren.

2.24.2 Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford

Die Gesamtproteinmenge einer beliebigen Lösung wurde spektrometrisch mit dem BIO RAD Protein Assay nach Herstellerangaben bestimmt. Nach Erstellung einer Standard- und Eichkurve bei 595 nm mit BSA und dem jeweiligen Lösungspuffer (verwendete Konzentrationen 0,625 µg/µl, 1,25 µg/µl, 2,5 µg/µl, 5 µg/µl und 10 µg/µl) wurde die

Proteinkonzentration der zu bestimmenden Lösung errechnet. Die spektrometrische Messung wurde mittels eines Mikrotiter®-Platten-Photometers vorgenommen.

2.24.3 Western Blot

Der Western-Blot dient dem spezifischen Nachweis bestimmter Proteine innerhalb einer gemischten Proteinlösung. Die wie oben beschrieben gewonnenen Proteinextrakte werden durch denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese größenabhängig aufgetrennt, auf Polyvinylfluorid-Membranen übertragen (Blotting) und durch proteinspezifische Antikörper gebunden. An diese Antigen-Antikörperkomplexe bindet ein mit einem Markerenzym (z. B. HRP, horseradish-peroxidase) gekoppelter Zweitantikörper. Ein für das Markerenzym spezifisches Substrat (ECL-Reagenz) wird zugegeben und enzymatisch umgesetzt, wodurch eine detektierbare Lichtreaktion hervorgerufen wird (Chemilumineszenzreaktion).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels Vertikalgelelektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel wurden Trenngel zwischen 5 und 12% Polyacrylamidgehalt bei einem pH-Wert von 8,8 verwendet. Vor Auftrennung im Trenngel wurde das Proteingemisch zur Erhöhung der Auflösung in einem 4,5% Sammelgel (pH 6,8) auf eine schmale Startzone konzentriert. Der jeweilige SDS-Gehalt des Trenngels richtet sich nach der Größe des jeweils nachzuweisenden Proteins, wobei bei kleinerem Protein das höherprozentigere Trenngel zu wählen war. Trenn- und Sammelgel wurden zwischen zwei fettfreie Glasplatten in einem Giesstand einer BIO RAD Proteingelkammer gegossen.

Acrylamidgel	Trenngel (z. B. 12%)	Sammelgel (4,5%)
30 % Polyacrylamid	4 ml	750 µl
1,5 M Tris-Cl (pH 8,8)	2,5 ml	-
0,5 M Tris-Cl (pH 6,8)	-	1,25 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl
Temed	6 µl	3 µl
40% Ammoniumpersulfat	15 µl	7,5 µl
H ₂ O	ad 10 ml	ad 5 ml

Nach Auspolymerisation von Trenn- und Sammelgel wurde das Gel in die Elektrophoresekammer (BIO RAD) eingespannt und die Kammer mit Tank-Puffer befüllt.

Die Proteinproben wurde in 1x SDS-PAGE-Puffer 3 min bei 97°C denaturiert und anschließend neben einem Proteinstandard der Firma Sigma auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der SDS-komplexierten und somit negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld erfolgte bei kleinen Gelen stromkonstant bei 15 mA, bis die Bromphenolfront am unteren Gelende angekommen war.

10x Tank-Puffer:

- 30 g Tris-Base
- 144 g Glycin
- 100 ml 10 % SDS
- ad 1 l H₂O

SDS-PAGE-Probenpuffer:

- 20 ml 4% SDS
- 5 ml 100 mM Tris-Cl pH 6,8
- 10 ml 20% Glycerol
- 24 g 8 M Urea
- ad libitum Bromphenolblau

Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die getrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel senkrecht zur Trennrichtung auf eine proteinbindende Polyvinylfluorid-Membran transferiert. Hierzu wurde ein halbtrockenes Verfahren (Semi-Dry-Blot) mit Grafitplatten in der Blotvorrichtung verwendet. Der Semi-Dry-Blot wurde luftblasenfrei wie folgt aufgebaut: Grafitplatte der Anodenseite, 2 mit A1-Puffer getränkte Filterpapiere, 1 mit A2-Puffer getränktes Filterpapier, PVDF-Membran (zunächst in Methanol, dann in H₂O und abschließend in A2-Puffer geschwenkt), Gel, 3 mit CAPS-Puffer getränkte Filterpapiere, Grafitplatte der Kathode. Die Proteine wurden hierauf für 2 h stromkonstant bei 0,8 mA pro cm² Gelfläche auf die Nitrozellulose-Membran transferiert (geblottet).

Anodenpuffer 1 (A1-Puffer)	Anodenpuffer 2 (A2-Puffer)	Kathodenpuffer (CAPS-Puffer)
0,3 M Tris-Base	25 mM Tris-Base	70 mM CAPS
20 % Methanol	20% Methanol	20% Methanol
H ₂ O ad 1 l	H ₂ O ad 1 l	H ₂ O ad 1 l

Immunodetektion der Proteine

Die so auf der PVDF-Membran fixierten und aufgetrennten Proteine wurden nun mit spezifischen Antikörpern gebunden und anschließend sichtbar gemacht. Zur Verhinderung unspezifischer Proteinbindungen wurde die Membran nach Trocknung zunächst eine Stunde in Blocking-Puffer inkubiert, um überschüssige Proteinbindestellen der Membran abzusättigen. Hiernach wurde die Membran kurz durch den Waschpuffer gezogen und anschließend mit dem ersten Antikörper (p8-Antikörper in einer Verdünnung mit Waschpuffer von 1:1000) für ein bis zwei Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (jeweils 15 min mit Waschpuffer) wurde die Membran mit einem speziefremden, mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish-peroxidase) gekoppelten Zweitantikörper (1:10.000) für 40 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Membran für eine Minute mit ECL (ECL1: ECL2 wie 1:1) inkubiert, in Frischhaltefolie eingewickelt und in eine Expositionskassette verbracht. Zum Nachweis der Chemilumineszenz wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser abschließend im Filmentwickler entwickelt.

- PBS:
- 8g NaCl
 - 0,2 g KCl
 - 1,15 g Na₂HPO₄
 - 0,24 g KH₂PO₄
 - ad 1 l H₂O

Waschpuffer: 0,4 % Tween in PBS

Blocking-Puffer: 10% Magermilchpulver in Waschpuffer

3. Ergebnisse

3.1 Wachstumsverhalten aus humanen Pankreasinseln auswachsender Zellen

Die von Zuleswski *et al.* aus humanen Pankreasinseln subklonierten und zu β -Zellphänotypen differenzierbaren Nestin+ Vorläuferzellen (human nestin+ progenitors, hNIP; 47) standen unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung. Immunhistochemisch konnte nachgewiesen werden, dass diese monoklonalen hNIP durchweg Nestin-positiv sind (Abb. 5).



Abb. 5) Immunhistochemischer Nachweis der Nestin-Expression in hNIP. Immunhistochemische Nestin-Detektion mit humanem Nestin-Antikörper und sekundäre Anfärbung durch mit Alkalischer Phosphatase konjugiertem Zweitantikörper.

Allerdings stellten hNIP bereits nach wenigen Passagen ihr Wachstum ein und konnten daher nicht weiter untersucht werden.

Ein limitiertes Wachstum *in vitro* stellt aber ein generelles Problem von Primärzellen dar, das auch die weiteren Schritte zur Bereitstellung ausreichender Mengen differenzierbaren Zellmaterials einschränkt. Deshalb charakterisierten wir initial die Gesamtpopulation der aus Pankreasinseln auswachsenden Zellen, im Weiteren hIZ, hinsichtlich ihrer proliferativen Kapazität.

Bei vier unabhängigen Chargen von humanen Pankreasinseln wurde jeweils eine gleiche Zahl von Pankreasinseln ausgesät. Die Pankreasinseln adhärirten nach kurzer Zeit an die Matrix der Kulturflasche und mesenchymal anmutende Zellen begannen aus den einzelnen Inseln auszuwachsen (Passage 0, Abb. 6).

Nach Erreichen der Konfluenz wurden 1.000.000 hIZ in einer 175 cm²-Kulturflasche neu ausgesät (Passage 1) und im Weiteren im wöchentlichen Rhythmus abgelöst, gezählt und wiederum 1.000.000 hIZ weiter passagiert. (Abb. 6).

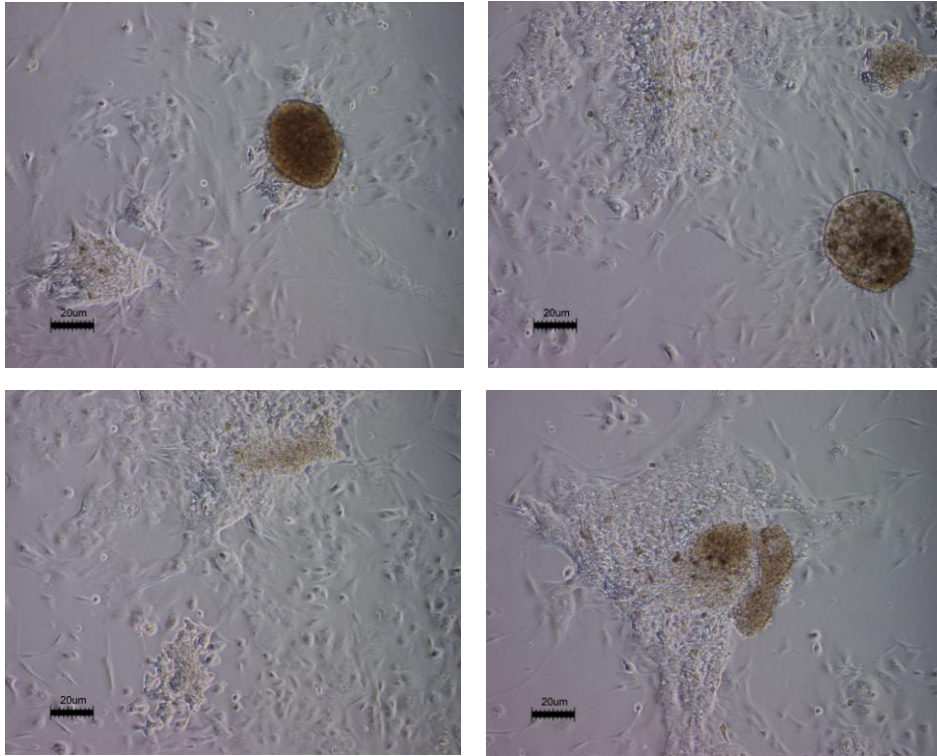


Abb. 6) Lichtmikroskopie des Auswachsens von hIZ aus Pankreasinseln. Im Uhrzeigersinn von links oben nach links unten ist das Auswachsen von Zellen aus einer Langerhans-Insel bis hin zur vollständigen Fragmentierung der Insel und der Entstehung eines homogenen Zellrasens gezeigt.

Auf diese Weise konnte das Wachstumsverhalten der humanen, aus Pankreasinseln ausgewachsenen Zellen analysiert werden (Abb. 7): Zu Beginn der Kulturzeit (Passagen 0-5) bestand ein stetig ansteigendes Wachstumspotenzial der hIZ, das bei Passage 5 sein Maximum mit im Mittel 8 Millionen neu ausgewachsener Zellen erreichte.

Bis zu Passage 10 blieb dann das Wachstum der hIZ auf einem stabilen Niveau mit im Mittel 7 Millionen neu ausgewachsener Zellen.

Während der darauf folgenden Kulturzeit verdoppelten sich die Zellen immer langsamer, so dass auch die jeweils am Ende einer Passage erreichte Zellzahl stetig abnahm. Um die 18. bis 22. Passage erreichte schließlich die Zellpopulation das Ende ihrer Rep-

roduktivität. Am Ende der jeweiligen Woche wurden immer nur noch die ausgesäte Zellzahl oder sogar weniger Zellen gezählt.

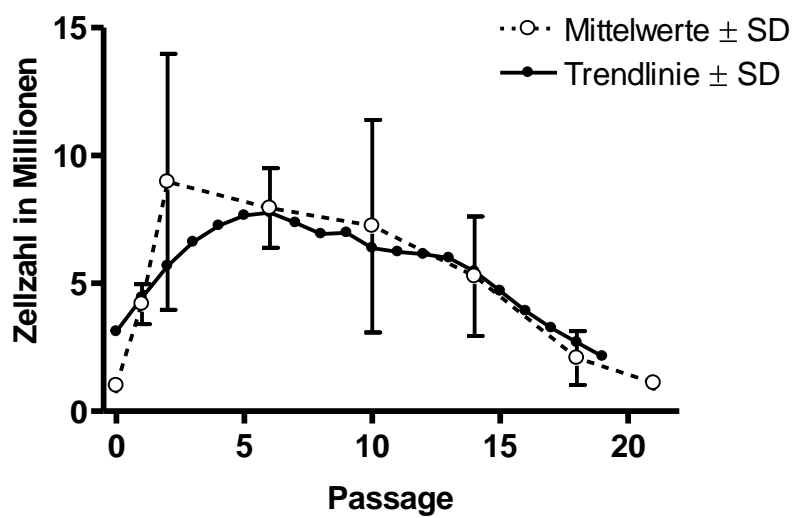


Abb. 7) Zellwachstum aus humanen Pankreasinseln auswachsender Zellen (hIZ). Insgesamt vier Kulturen von hIZ aus unterschiedlichen Spendern wurde wöchentlich passagiert. Dabei wurden die Zellen der alten Passage gezählt und eine Million der Zellen erneut ausgesät. Zu Beginn der Kulturzeit (Passagen 0-5) zeigte sich ein hohes und stetig ansteigendes Wachstumspotenzial. Dieses erreichte bis zur Passage 10 ein konstantes Niveau und fiel dann bis zum Wachstumsstopp bei Passage 20 kontinuierlich ab.

Das limitierte Wachstum *in vitro* zeigt sich besonders anschaulich in einer Kaplan-Meier-Kurve für das kumulative Überleben von insgesamt 6 Kulturen hIZ (Abb. 8). Während eine Kultur schon nach 12 Passagen das Ende ihres Wachstums erreicht hatte, zeigte sich bei den übrigen fünf Kulturen eine relativ dichte Lagerung des Wachstumsstopps zwischen 17 und 21 Passagen. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 19 Passagen.

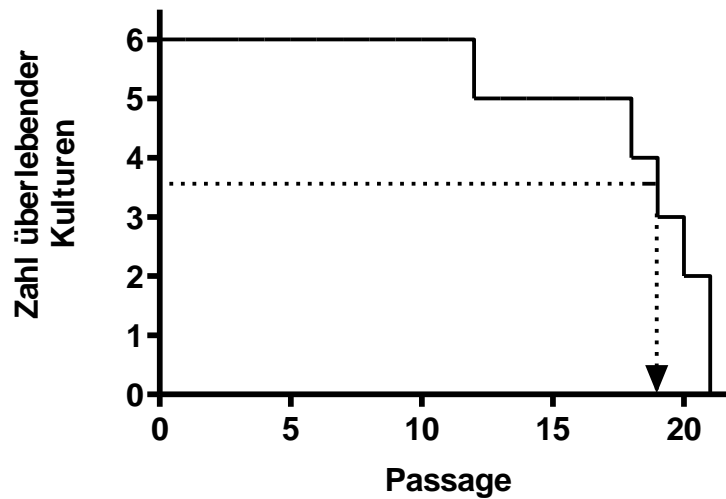


Abb. 8) Kumulatives Überleben von hIZ *in vitro*. Bei insgesamt 6 Kulturen von hIZ wurde hier die kumulative Überlebenszeit bis zum Wachstumsstopp in einer Kaplan-Meier-Kurve aufgetragen. Während eine Kultur schon nach 12 Passagen das Ende ihres reproduktiven Potenzials erreicht, lag das Wachstumsende der anderen 5 Kulturen relativ dicht zusammen (17-21 Passagen) mit einer mittleren Überlebenszeit von 19 Passagen.

3.2 hMSC-TERT als Modell Nestin-positiver Vorläuferzellen

Primäre hIZ zeigen somit ein begrenztes Wachstumspotenzial, haben eine kurze Lebensspanne und sind nicht-adenoviral schlecht transfizierbar (Daten nicht gezeigt). Dies sind für die Generierung transplantierbarer β -Zellen ungünstige Eigenschaften. Deshalb verwendeten wir im Weiteren eine Modellzelllinie für Nestin+ Progenitorzellen wie hIZ. Die durch Telomeraseüberexpression immortalisierte mesenchymale Stromazelllinie hMSC-TERT erwies sich auf Grund ihrer mesenchymalen Herkunft, ihres mesenchymalen, hIZ-ähnlichen Immunphänotyps (108) und günstiger technischer Eigenschaften (hohe Replikationsrate, gute Transfizierbarkeit) als für die weiteren Untersuchungen geeignet.

Zum Nachweis ihrer Nestin-Positivität wurde eine immunhistochemische Fluoreszenzfärbung gegen das Zytoskelettfilament Nestin vorgenommen. Wie bei hIZ zeigte sich in hMSC-TERT eine starke, alle Zellen umfassende und die Zellkerne aussparende Positivität für Nestin (rot), die in Abb. 9 rechts dargestellt ist. Links ist die Kerngegenfärbung mit DAPI (blau) abgebildet, Abb. 10 zeigt das Überlagerungsbild der beiden fluoreszenzmikroskopischen Bilder aus Abb. 9.

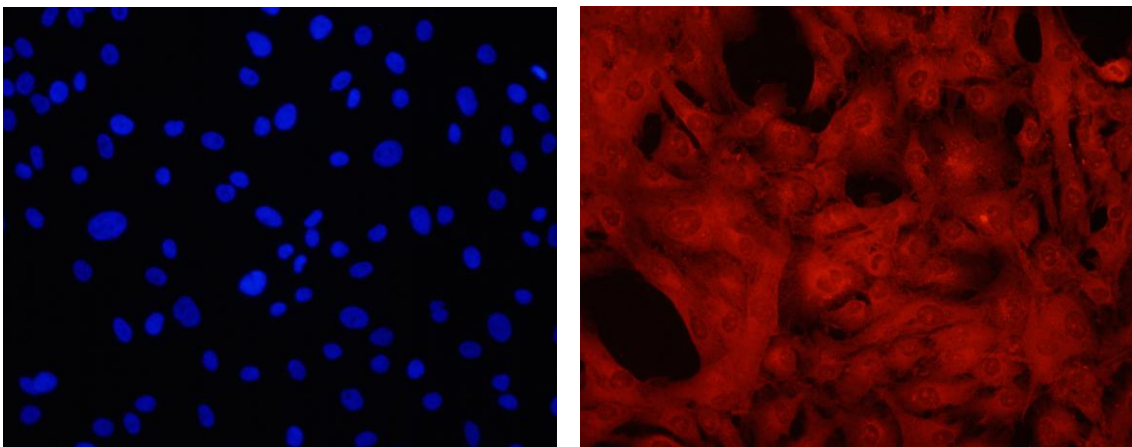


Abb. 9) Immunhistochemie von hMSC-TERT für Nestin. Links DAPI-Kernfärbung, rechts Nestinfärbung mit humanem Nestin-Antikörper und PE-konjugiertem Zweitantikörper.

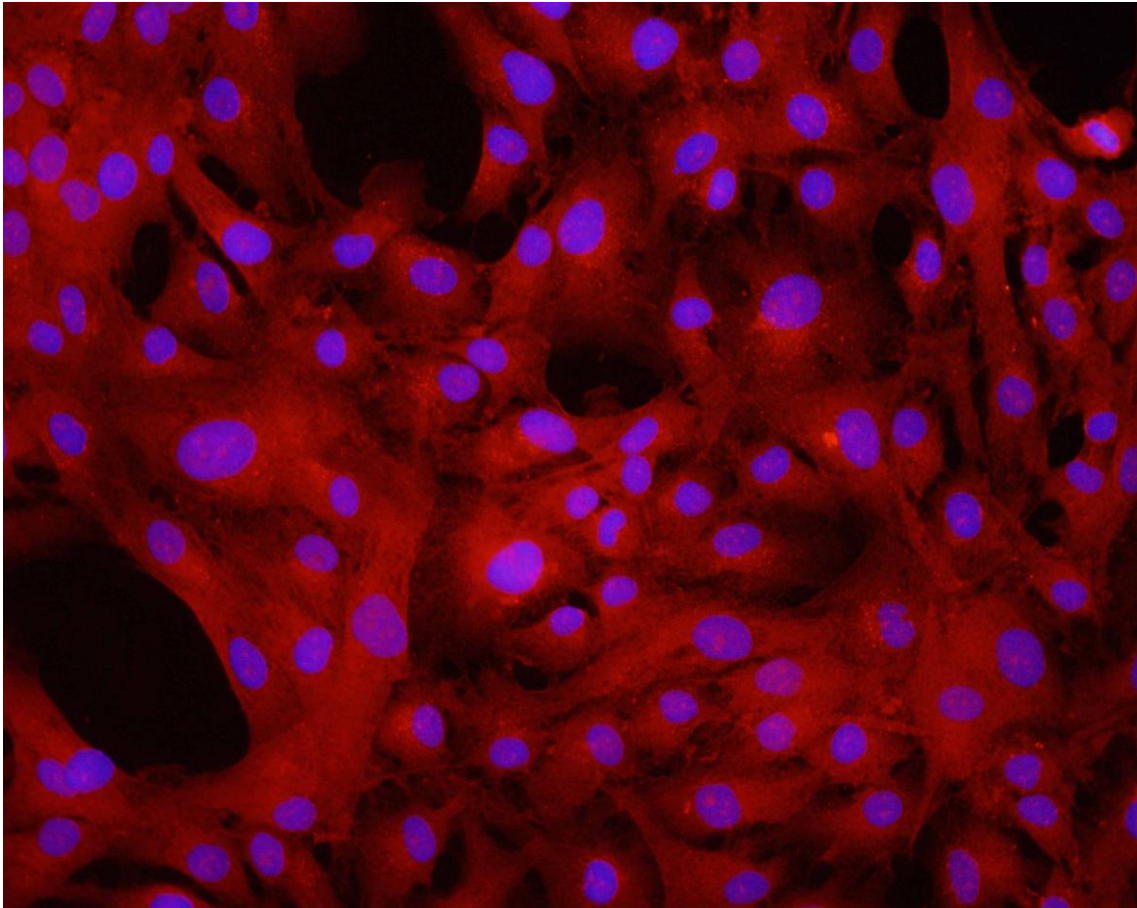


Abb. 10) Immunhistochemie von hMSC-TERT. Überlagerungsbild von Abb. 9. Auch hier zeigte sich die deutliche Nestinpositivität von hMSC-TERT.

3.3 Transiente p8-Überexpression in hMSC-TERT

Um die Beeinflussbarkeit des Wachstumsverhaltens von Stammzellen durch das proliferationsassoziierte Protein p8 zu untersuchen, wurden hMSC-TERT in vier unabhängigen Experimenten jeweils im Doppelansatz in 6 Stunden-Intervallen (12, 18, 24, 30, 36, 42 und 48 Stunden vor der Messung) transient mit dem p8-Überexpressionsplasmid pCMV-hp8-IRES-hrGFP bzw. mit der Leervektorkontrolle (pIRES-hrGFP, mock) transient transfiziert. Der Anteil GFP-positiver Zellen wurde jeweils mittels FACS-Analyse bestimmt (Abb. 11).

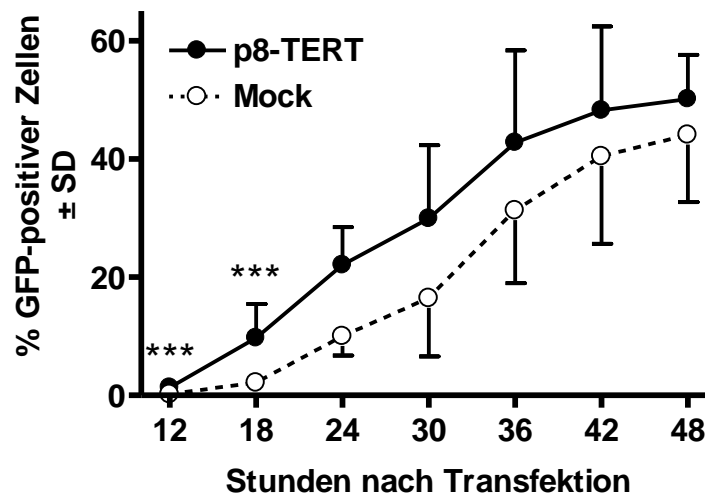


Abb. 11) Transiente Überexpression von p8 in hMSC-TERT. Nach transienter Überexpression von p8 in hMSC-TERT zeigte sich im Vergleich mit dem Leervektor (Mock) eine signifikant erhöhte Anzahl GFP-positiver Zellen (n=4, *** p<0,001).

Hierbei zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Prozentsatzes GFP-positiver Zellen unter p8-Überexpression verglichen mit dem Leervektor (Abb. 11). Dieser Effekt war zu den Zeitpunkten 12 und 18 Stunden statistisch signifikant, nahm im Zeitverlauf mit sigmoider Kinetik ab und war nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar.

Abbildung 12 zeigt diesen Effekt nochmals in anderer Darstellung: der Anteil GFP-positiver Zellen unter p8-Überexpression wurde jeweils als Vielfaches des Anteils GFP-positiver Zellen der entsprechenden Kontrolle aufgetragen. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung des Prozentsatzes GFP-positiver Zellen unter p8-Überexpression nach 12 und 18 Stunden.

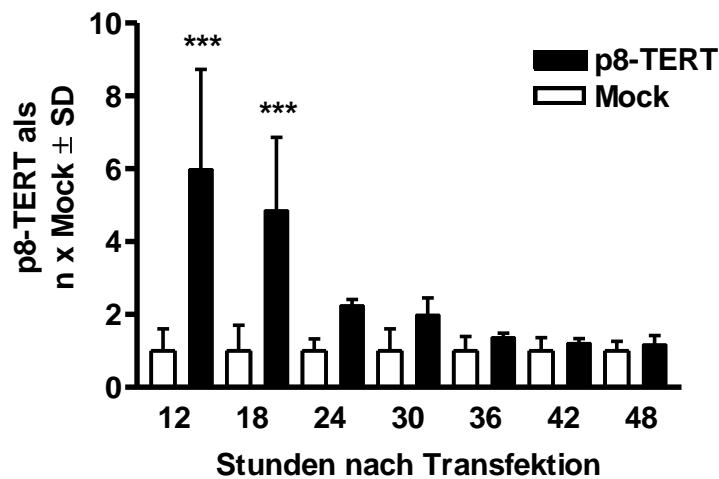


Abb. 12) Transiente Überexpression von p8 in hMSC-TERT. Hier ist der Anteil der p8-überexprimierenden GFP-positiven Zellen jeweils als Vielfaches des Anteils der GFP-positiven Zellen der Kontrolle dargestellt. In 4 unabhängigen Experimenten zeigt sich eine statistisch signifikante Erhöhung des Prozentsatzes GFP-positiver Zellen unter p8-Überexpression nach 12 und 18 Stunden (***) $p < 0,001$).

3.4 Erstellen stabil p8-überexprimierender hMSC-TERT-Zelllinien

Um den mitogenen Effekt von p8 genauer studieren zu können, wurden zwei stabile Zelllinien generiert: hMSC-TERT-Zellen wurden zum einen mit dem p8-Expressionsplasmid pCMV-hp8-IRES-hrGFP-Puro, zum anderen mit dem Kontrollvektor pIRES-hrGFP-Puro stabil transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurde ein Selektionsmedium mit 0,6 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin zu den transfizierten Zellen gegeben. Bei untransfizierten Zellen ist bereits eine Konzentration von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin im Zellkulturmedium nach 4 Tagen letal (Abb. 13).

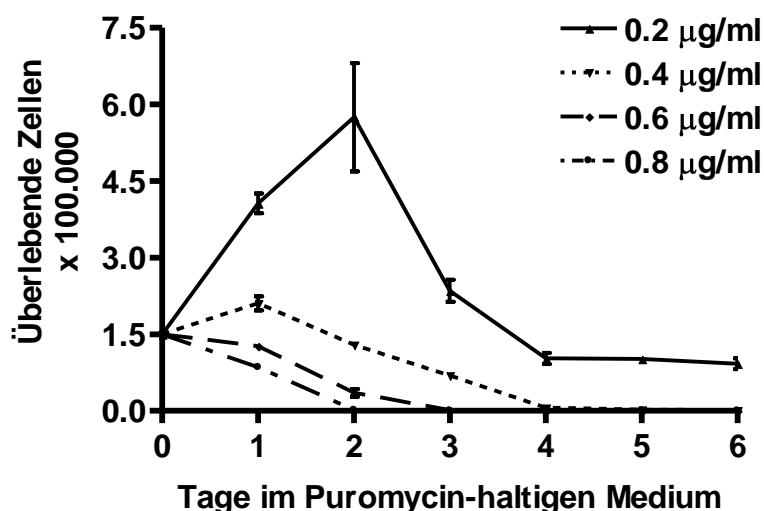


Abb. 13) Puromycin-Toxizität bei hMSC-TERT. Untransfizierte hMSC-TERT wurden an Tag 0 in je ein Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Dem Medium wurde die jeweils angegebene Endkonzentration Puromycin zugegeben und an jedem der folgenden Tage die Zahl überlebender Zellen mittels Zellzählung ermittelt. Bei 0,6 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin im Medium waren nach 3 Tagen alle Zellen abgestorben (n=2 in Duplikaten).

Im Anschluss an die Selektion wurden die überlebenden Zellen mittels *Limited Dilution* als Einzelzellen auf 96-Well-Platten ausgesät. Aus diesem Ansatz wurden insgesamt je 6 stabile Linien von Einzelzellklonen etabliert.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde die Linie mit der höchsten p8-mRNA-Expression und Proteinproduktion ermittelt und im Weiteren verwendet (Abb. 14). Die Zelllinien werden im Folgenden als p8-TERT bzw. Mock-TERT bezeichnet.

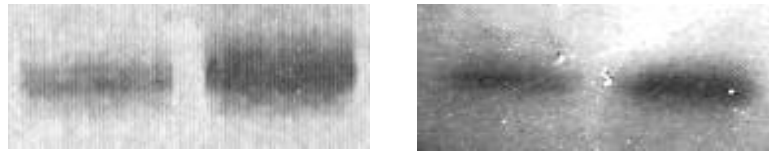


Abb. 14) Nachweis der p8-Expression in Mock-hMSC-TERT (jeweils links) und p8-hMSC-TERT (jeweils rechts). Links RT-PCR mit für humanes p8 spezifischen Primern, rechts p8 Western-Blot.

3.5 Wachstumsverhalten der stabilen Zelllinien

Zur genaueren Untersuchung des Einflusses der stabilen Überexpression von p8 auf das Wachstumsverhalten mesenchymaler Stammzellen wurden zunächst zeitabhängige Zellzählungen durchgeführt (Abb. 15).

Liegen die Mittelwerte der Zellzählungen am ersten und zweiten Tag noch nahe beieinander, trennen sich die beiden Kurven über den Zeitverlauf zusehends: bereits nach 3 Tagen hat sich die Zahl der p8-überexprimierenden Zellen gegenüber der Kontrollzelllinie mehr als verdoppelt; die Wachstumskurve der p8-überexprimierenden Zelllinie weist eine deutlich höhere Steigung auf.

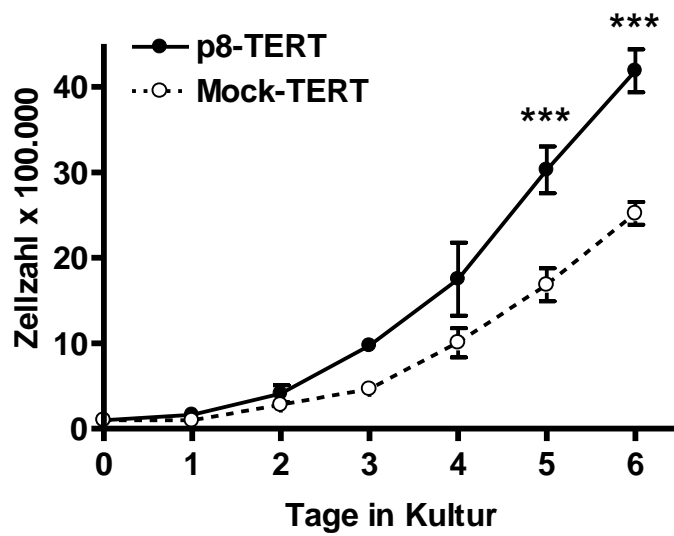


Abb. 15) Vermehrungsrate von hMSC-TERT-Zellen mit stabiler p8-Überexpression (p8-TERT). Nach stabiler Überexpression von p8 in hMSC-TERT wurde das Wachstumsverhalten über Zellzählung nach Aussäen von je 100.000 Zellen untersucht. Bereits nach 5 Tagen weisen p8-TERT im Vergleich zu den Kontrollzelllinie Mock-TERT eine signifikant erhöhte Zellzahl auf (n=3, Duplikate. *** $p < 0,001$).

Der proliferationsfördernde Effekt einer stabilen p8-Überexpression kann besonders gut nachvollzogen werden, wenn die jeweilige zelluläre Verdopplungszeit der Mock- und p8-Zelllinie rechnerisch ermittelt wird.

Es zeigt sich, dass Mock-TERT 1,3 Tage für eine Verdopplung benötigt, p8-TERT hingegen nur 1,1 Tage pro Verdopplung (Abb. 16).

Die Verdopplungszeit von p8-TERT liegt somit um beinahe 15 Prozent niedriger als die der Kontrollzelllinie, was wiederum den Wachstumsvorteil von p8-TERT erklärt.

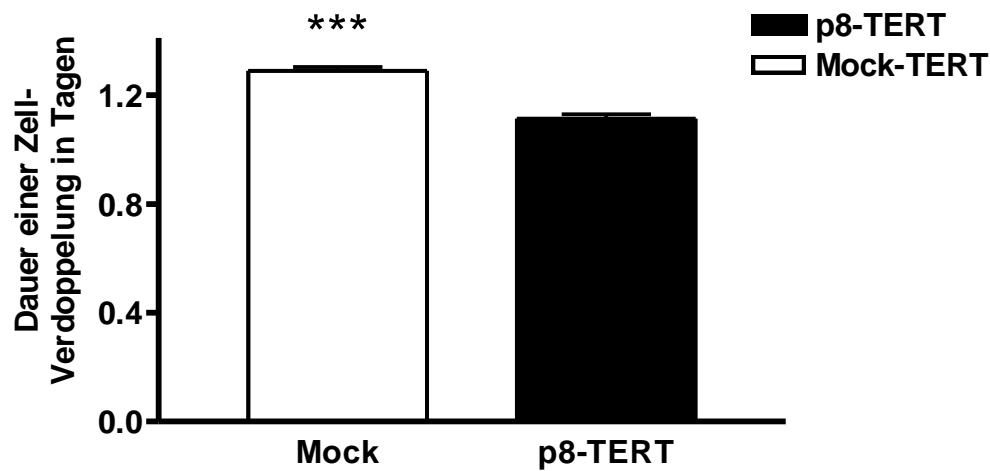


Abb. 16) Verdoppelungsdauer von Mock- und p8-TERT. Bei rechnerischer Ermittlung der jeweiligen Verdopplungsdauer zeigt sich, dass p8-TERT 1,1 Tage pro Verdopplung benötigte, die Kontrollzelllinie hingegen 1,3 Tage. Dies entspricht einer durch die stabile p8-Überexpression vermittelten Verkürzung der Verdopplungszeit um 15% (n=3, Duplikate, *** p<0,001).

3.6 Proliferation von Mock-TERT und p8-TERT

Um die Frage zu klären, auf welchem prinzipiellen Weg p8 Zellvermehrung vermittelt, wurde abschließend die Proliferationsrate der stabilen Zelllinien mittels BrdU-Inkorporationsassay verglichen (Abb. 17).

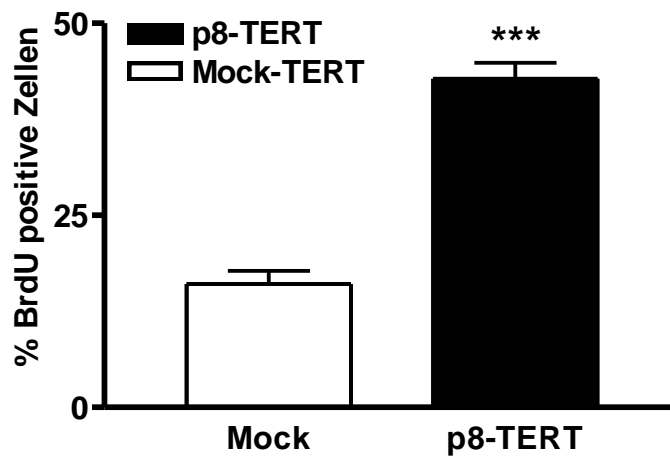


Abb. 17) Proliferationsanalyse der generierten Zelllinien. Mittels BrdU-Inkorporationstest wurde die Proliferationsrate der beiden Zelllinien ermittelt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied: während der mittlere Prozentsatz BrdU-positiver Zellen bei Mock-TERT bei 16,1% liegt, weisen p8-TERT einen bei 42,7% gelegenen Anteil BrdU-positiver Zellen auf. Dies entspricht einer Steigerung der Proliferationsrate um den Faktor 2,7 (n=3, Duplikate, *** p<0,001).

Es konnte ein hochsignifikanter Unterschied der Proliferationsraten zwischen den beiden Zelllinien nachgewiesen werden. In 3 unabhängigen und in Duplikaten durchgeführten Experimenten wurde jeweils die Proliferationsrate der beiden Zelllinien ermittelt. Während bei hMSC-TERT der Prozentsatz BrdU-positiver Zellen im Mittel bei 16,1% lag, wurde für p8-TERT ein Prozentsatz von 42,7% ermittelt. Dies entspricht einer statistisch hochsignifikanten Steigerung der Proliferationsrate um den Faktor 2,7.

3.7 Apoptose von Mock-TERT und p8-TERT

Um zu untersuchen, ob außerdem eine Alteration der Apoptoserate zur insgesamt erhöhten Wachstumsrate beitrug, wurde im Weiteren zur Bestimmung der basalen Apoptoserate ein Multi-Caspase-Assay durchgeführt (Abb. 18).

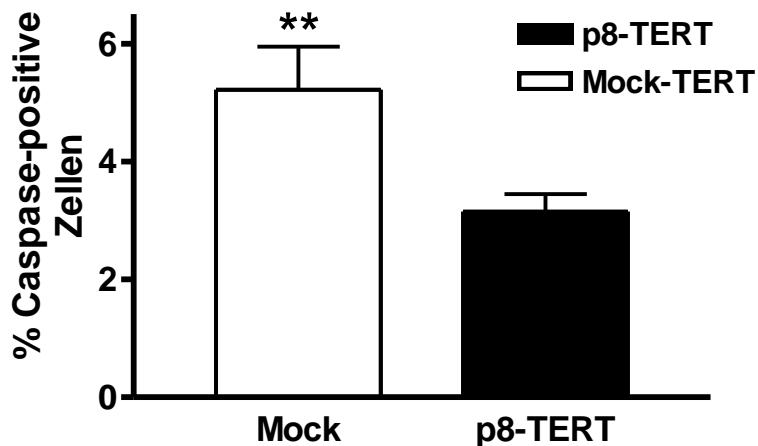


Abb. 18) Basale Apoptoserate von Mock-TERT und p8-TERT. Unter Verwendung eines Multi-Caspase-Assays wurde die basale Apoptoserate der Zelllinien ermittelt. Im Vergleich zu Mock-TERT ist der Anteil Caspase-positiver Zellen bei p8-TERT von 5,2% auf 3,1% verringert. Die p8-Überexpression vermittelt somit eine statistisch signifikante Reduktion der basalen Apoptoserate um etwa 40% (n=3, ** p<0,01).

Die basale Apoptoserate der Kontrollzelllinie Mock-TERT lag in drei unabhängigen Experimenten im Mittel bei 5,2%. p8-TERT hingegen wiesen eine Rate von 3,1% auf. Die Überexpression von p8 vermittelt somit eine signifikante Verringerung der Apoptoserate um etwa 40% (Abb. 18).

4. Diskussion

Primäre Nestin-positive adulte Stamm-/Vorläuferzellen, die aus menschlichen Langerhansschen Inseln isoliert wurden, besitzen einen mesenchymalen Charakter und das prinzipielle Potenzial zur *in vitro*-Differenzierung in Insulin produzierende Phänotypen. Allerdings ist die Entwicklung effektiver Differenzierungsstrategien bisher noch nicht gelungen. Dies ist auch durch das limitierte Wachstumsverhalten dieser Primärzellen in Kultur begründet, welches in dieser Arbeit eingehend charakterisiert wurde.

Weiterhin belegt diese Arbeit anhand des Nestin-positiven und mesenchymalen Zellmodells der menschlichen Knochenmarksstammzelllinie hMSC-TERT, dass sich eine gentechnisch-induzierte Überexpression des Proteins p8 positiv auf Wachstumsverhalten auswirkt. Dieser Effekt beruht auf der Steigerung der Proliferationsrate und der Verminderung der basalen Apoptoserate. Das Protein p8 konnte hier somit erstmals als molekularer Mediator des Wachstums und Überlebens mesenchymaler Nestin-positiver Vorläuferzellen charakterisiert werden.

4.1 Wachstumsverhalten Nestin-positiver Zellen aus humanen Pankreasinseln *in vitro*

Zulewski *et al.* konnten 2001 erstmals zeigen, dass subklonierte Nestin-positive Stamm-/Vorläuferzellen aus Pankreasinseln (hNIP) *in vitro* durch geeignete Stimuli in β -zellähnliche Phänotypen mit begrenzter, nur teilweise glukoseresponsiver Insulinsekretion differenziert werden können (47). Diese hNIP können jedoch in Kultur nur begrenzt expandiert werden (47, 107). In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob auch die Gesamtpopulation der aus der Insel auswachsenden heterogenen Nestin-positiven Zellpopulation (hIZ) einer derartigen Limitierung des Wachstumspotentials unterliegt.

Es zeigte sich, dass heterogene hIZ-Mischkulturen 11 bis 21 Passagen (Mittel bei 19 Passagen, ca. 5 Monate Kulturzeit) replikationsfähig bleiben. Die Schwankungen in der Passagenzahl bis zum Wachstumsstopp erklären sich durch die Herkunft der Pankreasinseln von unterschiedlichen Spendern, nicht beeinflussbare Ungleichheiten bei der Aufbereitung und dem konsekutivem Reinheitsgrad der Inselpräparationen sowie durch andere die Zellviabilität beeinflussende Faktoren. Interessanterweise expandierten die von der Gruppe Zulewski untersuchten Einzelklone über einen Zeitraum von etwa 8

Monaten bei nur 7 Passagen. Beide Befunde deuten darauf hin, dass die initiale Population Nestin-positiver Zellen eine heterogene Mischung verschiedener Zellpopulationen mit unterschiedlichen Wachstumseigenschaften ist. Da weiterhin auch in hNIP-Einzelklonkulturen nur sehr wenige Zellen in Insulin produzierende Zellen differenziert werden konnten, bleibt die Frage, ob dies nur durch die noch nicht ausgereiften Differenzierungsprotokolle bedingt ist, oder ob Nestin als Marker für endokrine Vorläuferzellen des Pankreas geeignet ist. Es ist hierbei wahrscheinlich, dass nur eine kleine und noch nicht näher charakterisierte Subpopulation Nestin-positiver Inselzellen das Potential zur Differenzierung in β -Zellen besitzt.

In diesem Zusammenhang konnte innerhalb der heterogenen Population Nestin-positiver Pankreasinseln eine für den ATP-binding cassette transporter (ABCG2) positive Subpopulation identifiziert werden (109). Bei hämatopoietischen Stammzellen stellt diese Unterpopulation den pluripotenten und differenzierungsfähigen Zelltypus dar. Es ist somit durchaus möglich, dass die eigentlich pluripotente pankreatische Vorläuferzelle noch nicht ausreichend definiert, aufgereinigt und bezüglich ihrer Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit untersucht wurde. Dies könnte erklären, warum bis heute Insulin produzierende Zellen nur zu einem sehr geringen Prozentsatz aus Nestin-positiven Zellen generiert werden konnten (109). So wird auf der Suche nach *der* β -Zellvorläuferzelle, falls sie überhaupt existiert (105), immer deutlicher, dass Nestin höchstwahrscheinlich notwendiger, aber für sich selbst noch nicht hinreichender Marker für den Stammzellcharakter von pankreatischen Vorläuferzellen ist.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die hier beschriebene heterogene Population primärer putativer Nestin-positiver Vorläuferzellen aus dem Pankreas des Menschen *in vitro* nur ein begrenztes Wachstums- und Selbsterneuerungspotenzial besitzt, das neben der auch von anderen Stammzellen bekannten Wachstumslimitierung (75-81) auf suboptimale Kulturbedingungen und bis *dato* ungenügende Definition und Isolation des Stammzellphänotyps zurückzuführen ist.

4.2 hMSC-TERT als Modell Nestin-positiver und mesenchymaler Vorläuferzellen

Das in 4.1 beschriebene begrenzte Wachstumspotenzial *in vitro* erschwert die Entwicklung von Protokollen für die Differenzierung Nestin-positiver Zellen in Insulin produzierende Phänotypen dramatisch. Hinzu kommt, dass innerhalb der Arbeitsgruppe keine

funktionelle nicht-adenovirale Transfektionsstrategie entwickelt werden konnte bzw. vereinzelt erfolgreich transfizierte Zellen entweder bei transienten Transfektionen wegen ihrer geringen Zahl nicht untersucht werden konnten oder bei stabiler Transfektion während der Selektionsphase mit Resistenzgiften die Proliferation einstellten und nicht expandiert werden konnten.

Um die in diesem Zusammenhang bedeutsamen wachstumsfördernden Eigenschaften von p8 in Nestin-positiven Vorläuferzellen grundsätzlich charakterisieren zu können, wurde die humane mesenchymale Knochenmarksstammzelllinie hMSC-TERT als Modell ausgewählt. hMSC-TERT Zellen sind durch retrovirale Überexpression des für den Aufbau der Telomeren zuständigen Enzyms Telomerase immortalisiert (82) und stehen somit unbegrenzt zur Verfügung. Sie besitzen darüber hinaus eine hohe Proliferationsrate und sind einfach und nicht-adenoviral effizient zu transfizieren.

Neben diesen Aspekten kann diese Zelllinie besonders gut als Äquivalent für Nestin-positive β -Zell-Vorläufer verwendet werden, da sie wie hIZ das Zytoskelettelement Nestin in hohem Ausmaß exprimiert. Weiterhin wurde in einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Seufert gezeigt, dass hMSC-TERT und hIZ den gleichen, für mesenchymale Zellen typischen Immunphänotyp besitzen: CD14, CD34, CD45 sind nicht exprimiert, wohingegen beide Zellarten positiv für SH3, SH2, CD29, CD44, CD54 und CD90 sind (108). Darüber hinaus konnte in unserer Arbeitsgruppe in bisher unveröffentlichten Daten gezeigt werden, dass durch Überexpression pankreatischer Regulatorproteine (Ngn3 und Pdx1) in hMSC-TERT eine Insulinproduktion und -sekretion initiiert werden kann. hMSC-TERT stellen somit ein hervorragendes Modell für humane mesenchymale Vorläuferzellen wie hIZ dar.

Grundsätzlich besitzen adulte Stamm-/Vorläuferzellen gegenüber embryonalen Stammzellen mehrere grundlegende Vorteile: Zum einen entfallen die kontrovers diskutierten ethischen Bedenken, zum anderen besteht nicht die gravierende Problematik der Teratombildung nach Transplantation undifferenzierter embryonaler Stammzellen. In diesem Zusammenhang stellen sich auch Differenzierung und Aufreinigung bei embryonalen Stammzellen zur Zeit noch sehr problematisch dar. Nicht zuletzt sind adulte Vorläuferzellen etwa im Rahmen einer Knochenmarksspende leicht verfügbar, wodurch die Möglichkeit der autologen Transplantation ohne Immunsuppression besteht.

Unter den adulten Stammzellen stehen insbesondere mesenchymale Stammzellen aus

dem Knochenmark (BMSC) zunehmend im Fokus der Forschung. Mesenchymale BMSC besitzen verglichen mit Progenitorzellen anderer Herkunft eine extrem hohe Plastizität und könnten daher im Rahmen zukünftiger Therapien autolog vom erkrankten Individuum gewonnen, *in vitro* differenziert und ohne Abstoßungsprobleme retransplantiert werden. Hinsichtlich ihrer Plastizität konnte bereits gezeigt werden, dass BMSC durch geeignete Stimuli zu adulten Zellen aller drei Keimblätter differenzierbar sind. Die Umwandlung zu Myo- (110-112) und Kardiomyozyten (113-115), Hepatozyten (116-118), Zellen der Haut (119) und des Gastrointestinaltrakts (120, 121), aber auch Pneumozyten (122, 123) und Zellen des Nervensystems (124, 125) konnte von vielen Forschergruppen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden.

Auch Phänotypen ähnlich pankreatischen β -Zellen konnten aus mesenchymalen Knochenmarksstammzellen bereits generiert werden (47, 126, 127). *In vitro* aus BMSC generierte und anschließend transplantierte Insulin produzierende Zellen vermochten in diabetischen Mäusen deren entgleiste Blutglukosenspiegel zu senken (126, 127). Es wird jedoch in diesem Zusammenhang kritisch diskutiert, inwieweit bei derartigen *in vivo* Experimenten echte Differenzierung oder eine Fusion der Knochenmarksstammzelle nach Transplantation mit einer bereits vorhandenen organspezifischen Zelle *in vivo* stattfindet (130). Bei Pankreaszellen sowie einer Reihe anderer Zellarten konnte jedoch bereits eine echte Differenzierung ohne Zellfusion nachgewiesen werden (126).

Die weitere Untersuchung dieser Fragestellungen wird hierbei jedoch auch bei mesenchymalen Knochenmarksstammzellen durch das Problem eines begrenzten Wachstumspotentials erschwert. Bei stark variierenden Literaturangaben scheint der Durchschnitt des replikativen Potentials bei etwa 50-70 Passagen zu liegen (128, 129). Diesem Problem begegnen viele Forschergruppen durch Immortalisierung dieser Zelllinien durch Telomeraseüberexpression (107). In einer jüngst veröffentlichten Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass hierdurch gerade bei Knochenmarksstammzellen osteozytäre Vorläufergene wie *Cbfa1/Runx2*, *Osterix* und *Osteocalcin* vermehrt exprimiert werden, wodurch potentiell die Differenzierungsfähigkeit dieser Zelllinien zu anderen Phänotypen eingeschränkt werden könnte (131). In diesem Zusammenhang ist die Untersuchung der wachstumsfördernden Effekte des Proteins p8 eine interessante Alternative. Zumindest bei kurzzeitiger Überexpression (4-8 Tage) zeigten INS-1 β -Zellen und menschliche Pankreasinselnzellen nämlich keine Alteration des funktionellen Phänotyps oder der

Genexpression β -Zell-spezifischer Gene (132).

4.3 Einfluss einer transienten p8-Überexpression auf die Expansion von hMSC-TERT-Zellen

Zur Untersuchung der wachstumsfördernden Effekte von p8 (52, 54) in hMSC-TERT Knochenmarksstammzellen wurden Plasmide kloniert, welche entweder p8 und GFP (pCMV-hp8-IRES-hrGFP) oder nur GFP (Mock-Kontrolle, pCMV-IRES-hrGFP) unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Cytomegalievirus-Promoters (im Weiteren CMV-Promoters) überexprimieren. Die Sequenzen von p8 und GFP waren innerhalb des Plasmids durch ein IRES-Element (*internal ribosomal entry site*) getrennt. Beide Proteine wurden daher einzeln und nicht als Fusionsprotein produziert. Veränderungen der biologischen Funktion von p8 durch die Expression als p8-GFP-Fusionsprotein sind damit eher unwahrscheinlich.

Für die Überprüfung der akuten Effekte einer p8-Überexpression wurden hMSC-TERT Zellen zunächst transient (ohne Selektion) mit pCMV-hp8-IRES-hrGFP und dem Kontrollplasmid pCMV-IRES-hrGFP transfiziert und der Prozentsatz hrGFP-positiver über die Zeit im FACS bestimmt. Nach 12 und 18 Stunden zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung GFP-positiver Zellen bei den p8-überexprimierenden Zellen. In sigmoidaler Kinetik wurde dieser Effekt im Verlauf von 48 Stunden wieder ausgeglichen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass bei konstanter transfizierter Gesamtplasmidzahl der Plasmidgehalt jeder Einzelzelle kontinuierlich im Rahmen der mitotischen Zellteilung verdünnt wird. Jede Zelle enthält somit am Anfang des Experiments den höchsten Anteil des transfizierten Plasmids und folglich auch die höchste Konzentration des überexprimierten Proteins. Im weiteren Zeitverlauf nehmen nicht nur der Plasmidgehalt jeder Einzelzelle, sondern auch die Konzentration von p8 ab und die beobachteten Effekte von p8 sinken dosisabhängig. Es darf angenommen werden, dass der schnelle Abbau von p8 über den Ubiquitin/Proteasom-Stoffwechselweg diesen Effekt verstärkt (133). Die Kinetik des p8-Effekts könnte jedoch nicht allein durch die zunehmende Plasmidverdünnung, sondern auch durch die Eigenschaften des Stressproteins p8 (52, 54, 59, 63) erklärbar sein. So könnte spekuliert werden, dass p8 unmittelbar nach dem zellulären Stressereignis der Transfektion eine Steigerung der Proliferation (52, 54) sowie eine Hemmung der Apoptose (55, 58) vermittelt, wodurch eine bessere Reagibili-

tät der p8-überexprimierenden Zellen auf das Stressereignis im Sinne eines vermehrten Wachstums besonders kurz nach dem Stressereignis erzielt werden könnte.

4.4 Generierung von hMSC-TERT-Zellen mit stabiler p8-Überexpression

Um die chronischen Effekte erhöhter intrazellulärer p8-Spiegel untersuchen zu können, wurden zwei Zelllinien mit stabiler p8/GFP- (p8-TERT) bzw. mock/GFP- (Mock-TERT) Überexpression generiert und Einzelzellklone expandiert. Da bei IRES-Vektorsysteme die kodierten Proteinsequenzen (p8 und GFP) unterschiedlich stark exprimiert sein können, wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen, dass die Proteinexpression von p8 in den stabilen p8/GFP-Zellen tatsächlich erhöht ist. Die mock/GFP-Zellen dienen als adäquate Kontrolle, da diese Zellen ebenso wie die p8/GFP-Zellen Plasmid-DNA enthalten, GFP exprimieren und einen Selektionsprozess durchlaufen haben. Alle diese Faktoren können die biologische Funktionen der Zelle beeinflussen, weshalb gentechnisch veränderte Zellen nur bedingt mit Wildtypzellen vergleichbar sind.

Weiterhin wäre die Verwendung eines induzierbaren Systems, in dem sowohl kurzfristig als auch über einen längeren Zeitraum eine Überexpression von p8 erzielt werden kann, sinnvoll gewesen, da die Zellen so nicht potentiell toxischen Effekten des dauerhaft überexprimierten Proteins ausgesetzt sind. Andererseits wird auch in den diesbezüglichen Arbeiten immer mit konstanter p8-Überexpression gearbeitet (52, 54). An Ins-1 β -Zellen wurde für die transiente sowie an humanen Langerhans-Inseln indirekt für die stabile p8-Überexpression gezeigt, dass hohe intrazelluläre p8-Level nicht zu einer Dedifferenzierung oder einem Funktionsverlust der Zellen führen (56, 132).

4.5 Proliferation und Expansion von hMSC-TERT-Zellen mit stabiler p8-Überexpression

Das Wachstumsverhalten der beiden generierten Zelllinien wurde mittels Zellzählung untersucht, wobei die p8-überexprimierende Linie deutlich stärker expandiert, da nach 6 Tagen Kulturzeit die Zellzahl um den Faktor 1,7 im Vergleich zu den mock-Kontrollzellen erhöht war, was einer Verkürzung der zellulären Verdopplungsdauer von 1,3 Tagen auf 1,1 Tage entspricht. Dieser Effekt kann durch die im BrdU-Inkorporationsassay nachgewiesene 2,7-fache Erhöhung der Proliferationsrate der stabil

p8-überexprimierenden Zelllinie untermauert und erklärt werden.

Diese Ergebnisse entsprechen den von Iovanna *et al.* für p8-überexprimierende COS-7-, AR4-2J- und HeLa-Zellen ermittelten Daten (52, 54). AR42-J-Zellen, die als Modell für duktale Vorläuferzellen aus dem exokrinen Pankreas angesehen werden (85, 86), weisen eine 1,5-fache Erhöhung der Expansionsrate nach 6 Tagen auf. COS-7- und HeLa-Zellen zeigen eine 1,6- bzw. 1,8-fache Steigerung der Proliferationsrate.

Die annähernd gleiche Erhöhung der Expansionsrate von AR42-J und hMSC-TERT (1,5- vs. 1,7-fach) unter p8-Überexpression könnte unter anderem damit zusammenhängen, dass bei beiden Vorläuferzellmodellen ein geringerer Differenzierungsgrad mit einer höheren Replikationsfähigkeit einhergeht. COS-7 und HeLa hingegen sind weiter terminal differenzierte Zelllinien, deren Wachstums- und Proliferationspotential bereits stärker eingeschränkt ist, was sich auch in den im Vergleich zu hMSC-TERT geringeren Proliferationsraten ausdrückt (1,6- bzw. 1,8-fach vs. 2,7-fach).

Im Gegensatz zu diesem proliferationsfördernden Effekt in unterschiedlichen Zellarten scheint p8 jedoch hinsichtlich Proliferation in bestimmten Zellmodellen auch gegensätzliche Effekte zu vermitteln. So expandieren murine embryonale Fibroblasten aus p8-/Mäusen sowie Panc-1 und BxPc-3 Pankreastumorzellen mit si-RNA *knockdown* von p8 stärker als ihre p8 exprimierenden Kontrollen (57, 58). Die Proliferationsraten dieser Zelllinien wurden nicht untersucht. Diese Experimente weisen jedoch einen grundsätzlich unterschiedlichen Ansatz auf, da die endogene p8-Expression in der Versuchszelllinie gänzlich unterdrückt wurde. Somit wird das vollständige Fehlen von p8 mit basaler p8-Expression verglichen, wohingegen unser Ansatz basale p8-Expression einer Überexpression gegenüberstellt. Zum anderen können unterschiedliche Effekte von p8 auf den Zellzyklus als mögliche Erklärung gesehen werden (132). Während die p8-Überexpression in HELA-Zellen eine Erhöhung der Wachstums- und Proliferationsrate über eine Zunahme der Zellen in S- und G₂/M-Phase bewirkt (54), führt 10⁻⁷ M Dihydroxy-Vitamin D₃ in humanen MCF7/LCC2-Brustkrebszellen nach einer Stimulation der p8-Expression zum Zellzyklusarrest in der G₁-Phase (74) und somit zum Wachstumsstop. In dieser Arbeit wird das Zellwachstum bemerkenswerterweise nur durch hohe Vitamin-D₃-Konzentrationen inhibiert, wohingegen es durch niedrigere Konzentrationen stimuliert wird.

Diese Befunde unterstreichen, dass p8 in Abhängigkeit von Zellart, jeweiligen Aus-

gangsbedingungen des Experiments und Art und Intensität des Stimulus auch gegensätzliche Effekte auf Zellzyklus, Wachstum und Proliferation vermitteln kann. p8 erscheint somit eher ein regulatorischer Mediator als ein ausschließlicher Stimulator von Proliferation und Expansion zu sein, was auch seiner Klassifizierung als HMG-I/Y-ähnlichem Protein entspricht.

4.6 Apoptose von hMSC-TERT-Zellen mit stabiler p8-Überexpression

Ausgehend von seiner verstärkten Expression im Rahmen der akuten und chronischen Pankreatitis, bei denen neben regenerativen auch starke proapoptotische Stimuli vorhanden sind, wurde vermutet, dass die Expression von p8 als Schutzfaktor durch apoptosefördernde Stimuli induziert wird und dass p8 somit neben seinem proliferationsinduzierenden einen möglichen antiapoptotischen Effekt besitzt (52-54).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein apoptoseinhibitorischer Effekt von p8 nachgewiesen werden: bei p8-TERT ist die basale Apoptoserate um etwa 60% niedriger als in der Mock-Kontrollzelllinie. Eine gleichsinnige Veränderung der Apoptoserate konnte bereits für Pankreaskarzinome gezeigt werden, bei denen eine p8-Überexpression mit einer Verminderung der Apoptoserate einhergeht (55). Im Tiermodell der chronischen Pankreatitis (WKN/Kob-Ratte) wurde zwar neben einer erhöhten p8-Expression eine Vermehrung der Apoptose in azinären Zellen nachgewiesen, jedoch wurde p8 gerade in den apoptotischen Zellen nicht exprimiert (53). Im entsprechenden Zellkulturmodell AR42-J zeigte sich nach Apoptoseinduktion zwar ein Anstieg der p8-Expression, diese ging jedoch schon deutlich vor Apoptosebeginn auf basale Werte zurück (53). In beiden Modellen scheint p8 somit in der Akutphase von Gewebestress vermehrt produziert zu werden. Auch die Tatsache, dass Zellen vor allem bei fehlenden oder geringen p8-Spiegeln Apoptose einleiten, spricht am ehesten für einen zytoprotektiven Effekt von p8. Stabil p8-überexprimierende HeLa-Zellen hingegen weisen keine Veränderung der Apoptoseinduzierbarkeit durch TNF- α und Cycloheximid auf (54), p8-defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEF) zeigen sich sogar resistenter gegenüber Adriamycin-induzierter Apoptose (58).

Zunehmend werden mögliche Mechanismen des apoptoseinhibitorischen Effektes von p8 identifiziert: bei experimentell induzierter akuter Pankreatitis ist die vermehrte Expression des protektiven Pankreatitis-assoziierten Proteins PAP-I p8-abhängig (65).

TNF α aktiviert ebenfalls p8-Überexpression über TNF-induziertes NF κ B, welches an eine spezifische NF κ B-Bindestelle innerhalb des p8-Promoters bindet (137). p8 interagiert weiterhin synergistisch mit dem antiapoptotisch wirksamen Protein Prothymosin α (ProT α). Es konnte gezeigt werden, dass bei Inhibition der Expression von entweder ProT α oder p8 die zelluläre Apoptoserate bei HeLa steigt, wohingegen nur bei Überexpression beider Proteine eine Verminderung des Anteils apoptotischer Zellen nachzuweisen ist (136).

Auch in dieser Arbeit wurde eine Veränderung der Apoptoseinduzierbarkeit durch stabile p8-Überexpression untersucht. Es konnte jedoch weder in der Kontrollzelllinie, noch bei den p8-überexprimierenden Zellen durch multiple proapoptotische Stimuli eine Steigerung der Apoptoserate erreicht werden. Diese Beobachtungen decken sich mit der von humanen mesenchymalen Knochenmarksstammzellen beschriebenen Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika wie Busulphan, Cyclophosphamid oder Methotrexat (134). Als potentieller Mechanismus dieser Resistenz ist ein Mangel an Caspase-9-Aktivität nach Apoptoseinduktion identifiziert worden. Ebenso wird nach Apoptosestimulus in hMSC zwar das proapoptotische Protein p53 vermehrt exprimiert, was jedoch nicht zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt (135). Auch die Expression von Rezeptoren für apoptosespezifische Liganden (Fas-Ligand, TNF- α) könnte in mesenchymalen Knochenmarksstammzellen auf Grund ihres undifferenzierbaren Charakters herabgesetzt sein. Folglich muss konstatiert werden, dass mit dem hier verwendeten Zellmodell die Frage nach einer Alteration der Apoptoseinduzierbarkeit durch p8-Überexpression nicht ausreichend beantwortet werden kann und hierzu weitere Untersuchungen an anderen Modellzelllinien nötig sind.

Zusammenfassend scheint es bei der Vielzahl und Unterschiedlichkeit der verwendeten Modelle und der in ihnen nachgewiesenen Effekte bislang unmöglich, die Beeinflussung von Apoptose durch p8 endgültig und abschließend zu beurteilen. Bei mesenchymalen Vorläuferzellen wie hMSC-TERT und hIZ, deren Vermehrung im Licht begrenzten Zellwachstums und somit eingeschränkter Ressourcen wünschenswert ist, kann die in den vorgelegten Daten nachgewiesene Senkung der basalen Apoptoserate durch p8 als günstiger und bislang unbeschriebener Effekt bewertet werden.

4.7 p8 – ein Onkogen?

Wie bereits eingangs beschrieben findet sich in Pankreas- und Mammakarzinomen, aber auch in Hypophysenadenomen eine vermehrte Expression von p8 (55, 57, 70-72). Ebenso verlieren murine embryonale Fibroblasten aus p8-defizienten Mäusen nach onkogener Transformation und somatolaktotrope Zellen (GH3) mit ausgeschalteter p8-Expression ihre Fähigkeit zur Tumorbildung in Nacktmäusen (60, 71). Diese Beobachtungen führten einige Autoren zu der Annahme, p8 könne eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung innehaben.

In allen genannten Arbeiten fehlt allerdings der Nachweis, dass p8 *per eum ipsum* Tumore induziert. Es wurde lediglich eine Assoziation von erhöhten p8-Spiegeln und erhöhter (tumorigener) Proliferation gezeigt. Vor diesem Hintergrund wurde von Päth *et al* belegt, dass erhöhte endogene p8-Protein-Level in proliferierenden INS-1 β -Zellen mit zunehmender Dichte des Zellrasens wieder absinken (56), die p8-Expression also durch Kontaktinhibition gegenreguliert wird. Dies wäre für ein Protein mit tumorigenen Eigenschaften außerordentlich untypisch. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch IPTG-induzierte p8-Überexpression in INS-1 β -Zellen keine Alteration der Glukose-induzierten Insulinsekretion hervorgerufen wird. Auch mit p8 transduzierte primäre menschliche Langerhansinseln senken die Blutglukoselevel diabetischer Mäuse effektiver als mock-transduzierte Kontrollen, was auf eine erhöhte Proliferation der β -Zellen *in vivo* zurückgeführt werden kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass hohe intrazelluläre p8-Level nicht zu einer Dedifferenzierung oder gar malignen Transformation der Zellen führen (132).

Wir vermuten somit, dass p8 als physiologischer stressinduzierter Mediator von Wachstumsregulation bzw. -förderung unspezifisch auch in Malignomen als Ausdruck ihrer erhöhten Proliferationsrate vermehrt exprimiert wird, ohne jedoch in pathogenetischem oder kausalem Zusammenhang mit der Tumorentstehung zu stehen.

Dementsprechend könnte dieses Protein bei weiterer kritischer Betrachtung des potentiellen, wenn auch unserer Ansicht nach geringen Risikos einer onkogenen Transformation zur Expansion von Zellen mit eingeschränkter Wachstums- und Proliferationskapazität eingesetzt werden.

5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass p8 durch Erhöhung der Proliferation bei gleichzeitiger Verminderung der Apoptoserate einen geeigneten potentiellen Mediator zur günstigen Beeinflussung der Wachstumseigenschaften primärer mesenchymaler Stammzellen darstellt. p8 könnte daher zur gentechnischen Manipulation primärer mesenchymaler Stammzellen oder auch bereits differenzierter β -Zellen eingesetzt werden und einen entscheidenden Beitrag leisten, das Problem der limitierten Verfügbarkeit primären Spendermaterials für zellbasierte Therapieansätze wie etwa die Inseltransplantation zu lösen.

Bis *dato* ist aber noch zu wenig über Interaktionspartner und die exakte molekulare Wirkungsweise von p8 bekannt, als dass die Frage der Auswirkungen einer Überexpression von p8 auf Zellphänotyp, -funktion und -tumorigenität ausreichend beantwortet werden könnte.

Nicht allein deshalb sind weitere Untersuchungen über das Protein p8 *in vitro* und *in vivo* notwendig, die die vor eine breite therapeutische Nutzbarkeit gesetzten noch offenen Fragen klären. Diese Befunde werden auch einen entscheidenden Beitrag zum besseren Verständnis des komplexen molekularen Netzwerks, das an der Regulation von Zellwachstum, Proliferation und Apoptose beteiligt ist, leisten können. Auch molekulare Mechanismen der Tumorigenese werden vielleicht auf dieser Grundlage besser zu verstehen sein, wodurch sich Hinweise auf mögliche neuartige Therapieschemata ergeben könnten.

6. Zusammenfassung

Primäre Nestin-positive adulte Stamm-/Vorläuferzellen aus menschlichen Langerhansschen Inseln besitzen einen mesenchymalen Charakter und das prinzipielle Potenzial zur *in vitro*-Differenzierung in Insulin produzierende Phänotypen (47). Allerdings ist die Entwicklung effektiver Differenzierungsstrategien bisher noch nicht gelungen. Dies ist unter anderem durch das limitierte Wachstumsverhalten dieser Primärzellen in Kultur begründet, das in der vorliegenden Arbeit ausführlich charakterisiert wurde. So besitzt die Gesamtpopulation aus pankreatischen humanen Langerhansschen Inseln auswachsender Zellen (hIZ) ein begrenztes Wachstumspotenzial von im Mittel 19 Passagen. Diese Tatsache limitiert zum einen die Entwicklung von Protokollen zur Differenzierung dieser Zellen und führt zum anderen zu einer Limitierung der Vision *in vitro* vermehrbaren und differenzierbaren Vorläuferzellmaterials, das nach Differenzierung transplantiert werden und *in vivo* die β -Zellfunktion ersetzen könnte.

Vor diesem Hintergrund zeigt die vorliegende Arbeit anhand des Nestin-positiven und mesenchymalen Zellmodells der menschlichen Knochenmarksstammzelllinie hMSC-TERT weiterhin, dass sich eine gentechnisch induzierte transiente und stabile Überexpression des wachstums- und proliferationsassoziierten Proteins p8 fördernd auf das Wachstumsverhalten dieser Zelllinie auswirkt. Dieser Effekt beruht, wie an stabil generierten p8-überexprimierenden Zelllinien gezeigt werden konnte, zum einen auf der Steigerung der Proliferationsrate. Zum anderen ist das verbesserte Wachstumsverhalten jedoch auch auf eine bis *dato* unbekannte Verminderung der basalen Apoptoserate von hMSC-TERT zurückzuführen.

Das Protein p8 konnte erstmals als molekularer Mediator des Wachstums und Überlebens mesenchymaler Nestin-positiver und zu β -Zellähnlichen Phänotypen differenzierbarer Vorläuferzellen charakterisiert werden. Es kann somit einen entscheidenden Beitrag zur Lösung des Problems begrenzten differenzierbaren Stammzellmaterials auf der Suche nach einer zellbasierten kurativen, breit und risikoarm einsetzbaren Therapiestrategie für den Diabetes mellitus leisten.

7. Literaturverzeichnis

- 1) WHO Fact sheet N°138 auf www.who.int.
- 2) Hauner H. Epidemiologie und Kostenaspekte des Diabetes in Deutschland. Dtsch Med Wochenschr 2005; 130:S64-S65.
- 3) Philips JC, Scheen AJ. Insulin therapy in type 2 diabetes. Rev Med Liege. 2005 May-Jun; 60(5-6):419-23.
- 4) Braunstein SN, White JR. Trends in the management of type 2 diabetes: an emerging role for insulin. J Manag Care Pharm. 2005 Feb; 11(1 Suppl B):S2-11; quiz S12-3.
- 5) Radermecker RP. Risk of hypoglycaemia: therapeutical implications. Rev Med Liege. 2005 May-Jun;60(5-6):461-5.
- 6) Dagogo-Jack S. Hypoglycemia in type 1 diabetes mellitus: pathophysiology and prevention. Treat Endocrinol. 2004;3(2):91-103.
- 7) Rachmani R, Slavacheski I, Berla M, Frommer-Shapira R, Ravid M. Treatment of high-risk patients with diabetes: motivation and teaching intervention: a randomized, prospective 8-year follow-up study. J Am Soc Nephrol. 2005 Mar;16 Suppl 1:S22-6.
- 8) Lerman I. Adherence to treatment: the key for avoiding long-term complications of diabetes. Arch Med Res. 2005 May-Jun;36(3):300-6.
- 9) Rhee MK, Slocum W, Ziemer DC, Culler SD, Cook CB, El-Kebbi IM, Gallina DL, Barnes C, Phillips LS. Patient adherence improves glycemic control. Diabetes Educ. 2005 Mar-Apr;31(2):240-50.
- 10) Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC: Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. Surgery 61:827-837, 1967.
- 11) Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. Clin Transplant. 2005 Aug;19(4):433-55.
- 12) International Pancreas Transplant Registry,
<http://www.iptr.umn.edu/IPTR/home.html>.

- 13) de Fijter JW. Diabetic nephropathy and beta-cell replacement therapy. *Neth J Med*. 2004 Mar;62(3):71-5.
- 14) Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DER, Goetz FC, Mauer M: Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med* 339:69-75, 1988.
- 15) Robertson RP, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland DE. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2000 Jan;23(1):112-6.
- 16) Navarro X, Sutherland DE, Kennedy WR. Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. *Ann Neurol*. 1997 Nov;42(5):727-36.
- 17) Katz HH, Nguyen TT, Velosa JA, Robertson RP, Rizza RA. Effects of systemic delivery of insulin on plasma lipids and lipoprotein concentrations in pancreas transplant recipients. *Mayo Clin Proc*. 1994 Mar;69(3):231-6.
- 18) Brendel M, Hering B, Schulz A, Bretzel R. International Islet Transplant Registry Report. Giessen, Germany: University of Giessen, 1999:1-20.
- 19) Gaglia JL, Shapiro AM, Weir GC. Islet transplantation: progress and challenge. *Arch Med Res*. 2005 May-Jun;36(3):273-80.
- 20) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000 Jul 27;343(4):230-8.
- 21) Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes*. 2001 Apr;50(4):710-9.
- 22) Shapiro AM, Ricordi C, Hering B. Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere. *Lancet*. 2003 Oct 11;362(9391):1242.
- 23) <http://spitfire.emmes.com/study/isl/reports/reports.htm>
- 24) Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):2060-9.
- 25) Hussain MA, Theise ND. Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):203-5.

- 26) Bonner-Weir S, Weir GC. New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol.* 2005 Jul;23(7):857-61.
- 27) Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes.* 2000 Feb;49(2):157-62.
- 28) Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes.* 2001 Aug;50(8):1691-7.
- 29) Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells.* 2004;22(3):265-74.
- 30) Kania G, Blyszczuk P, Czyz J, Navarrete-Santos A, Wobus AM. Differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic and hepatic cells. *Methods Enzymol.* 2003;365:287-303.
- 31) Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes.* 2004 Apr;53(4):1030-7.
- 32) Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus AM. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 4;100(3):998-1003. Epub 2003 Jan 13.
- 33) Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(6):843-50.
- 34) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002 Jul 4;418(6893):41-9. Epub 2002 Jun 20.
- 35) Jahr H, Bretzel RG. Insulin-positive cells in vitro generated from rat bone marrow stromal cells. *Transplant Proc.* 2003 Sep;35(6):2140-1.

- 36) Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest.* 2004 May;84(5):607-17.
- 37) Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, Thyssen S, Gray DA, Bhatia M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol.* 2003 Jul;21(7):763-70. Epub 2003 Jun 22.
- 38) Mathews V, Hanson PT, Ford E, Fujita J, Polonsky KS, Graubert TA. Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury. *Diabetes.* 2004 Jan;53(1):91-8.
- 39) Zorina TD, Subbotin VM, Bertera S, Alexander AM, Haluszczak C, Gambrell B, Bottino R, Styche AJ, Trucco M. Recovery of the endogenous beta cell function in the NOD model of autoimmune diabetes. *Stem Cells.* 2003;21(4):377-88.
- 40) Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 5;97(14):7999-800.
- 41) Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med.* 2000 Mar;6(3):278-82.
- 42) Bonner-Weir S, Toschi E, Inada A, Reitz P, Fonseca SY, Aye T, Sharma A. The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Pediatr Diabetes.* 2004;5 Suppl 2:16-22.
- 43) Lardon J, Huyens N, Rooman I, Bouwens L. Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas. *Virchows Arch.* 2004 Jan;444(1):61-5. Epub 2003 Nov 25.
- 44) Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou JK, Rooman I, Bouwens L. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia.* 2005 Jan;48(1):49-57. Epub 2004 Dec 23.
- 45) Rooman I, Lardon J, Flamez D, Schuit F, Bouwens L. Mitogenic effect of gastrin and expression of gastrin receptors in duct-like cells of rat pancreas. *Gastroenterology.* 2001 Oct;121(4):940-9.
- 46) Teitelman G. Induction of beta-cell neogenesis by islet injury. *Diabetes Metab Rev.* 1996 Jul;12(2):91-102.

- 47) Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001 Mar;50(3):521-33.
- 48) Lechner A, Nolan AL, Blacken RA, Habener JF. Redifferentiation of insulin-secreting cells after in vitro expansion of adult human pancreatic islet tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Feb 11;327(2):581-8.
- 49) Zalzman M, Gupta S, Giri RK, Berkovich I, Sappal BS, Karnieli O, Zern MA, Fleischer N, Efrat S. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10;100(12):7253-8. Epub 2003 May 19.
- 50) Meivar-Levy I, Ferber S. New organs from our own tissues: liver-to-pancreas transdifferentiation. *Trends Endocrinol Metab*. 2003 Dec;14(10):460-6.
- 51) Kodama S, Kuhlreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science*. 2003 Nov 14;302(5648):1223-7.
- 52) Mallo GV, Fiedler F, Calvo EL, Ortiz EM, Vasseur S, Keim V, Morisset J, Iovanna JL. Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *J Biol Chem*. 1997 Dec 19;272(51):32360-9.
- 53) Motoo Y, Iovanna JL, Mallo GV, Su SB, Xie MJ, Sawabu N. P8 expression is induced in acinar cells during chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2001 Aug;46(8):1640-6.
- 54) Vasseur S, Vidal Mallo G, Fiedler F, Bodeker H, Canepa E, Moreno S, Iovanna JL. Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity. *Eur J Biochem*. 1999 Feb;259(3):670-5.
- 55) Su SB, Motoo Y, Iovanna JL, Berthezene P, Xie MJ, Mouri H, Ohtsubo K, Matsubara F, Sawabu N. Overexpression of p8 is inversely correlated with apoptosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2001 May;7(5):1320-4.
- 56) Path G, Opel A, Knoll A, Seufert J. Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth. *Diabetes*. 2004 Feb;53 Suppl 1:S82-5.

- 57) Malicet C, Lesavre N, Vasseur S, Iovanna JL. p8 inhibits the growth of human pancreatic cancer cells and its expression is induced through pathways involved in growth inhibition and repressed by factors promoting cell growth. *Mol Cancer*. 2003 Nov 5;2:37.
- 58) Vasseur S, Hoffmeister A, Garcia-Montero A, Mallo GV, Feil R, Kuhbandner S, Dagorn JC, Iovanna JL. p8-deficient fibroblasts grow more rapidly and are more resistant to adriamycin-induced apoptosis. *Oncogene*. 2002 Mar 7;21(11):1685-94.
- 59) Garcia-Montero A, Vasseur S, Mallo GV, Soubeyran P, Dagorn JC, Iovanna JL. Expression of the stress-induced p8 mRNA is transiently activated after culture medium change. *Eur J Cell Biol*. 2001 Nov;80(11):720-5.
- 60) Vasseur S, Hoffmeister A, Garcia S, Bagnis C, Dagorn JC, Iovanna JL. p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene. *EMBO Rep*. 2002 Feb;3(2):165-70. Epub 2002 Jan 29.
- 61) Vasseur S, Mallo GV, Garcia-Montero A, Ortiz EM, Fiedler F, Canepa E, Moreno S, Iovanna JL. Structural and functional characterization of the mouse p8 gene: promotion of transcription by the CAAT-enhancer binding protein alpha (C/EBPalph) and C/EBPbeta trans-acting factors involves a C/EBP cis-acting element and other regions of the promoter. *Biochem J*. 1999 Oct 15;343 Pt 2:377-83.
- 62) Vasseur S, Hoffmeister A, Garcia-Montero A, Barthet M, Saint-Michel L, Berthezene P, Fiedler F, Closa D, Dagorn JC, Iovanna JL. Mice with targeted disruption of p8 gene show increased sensitivity to lipopolysaccharide and DNA microarray analysis of livers reveals an aberrant gene expression response. *BMC Gastroenterol*. 2003 Sep 8;3:25.
- 63) Jiang YF, Vaccaro MI, Fiedler F, Calvo EL, Iovanna JL. Lipopolysaccharides induce p8 mRNA expression in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jul 14;260(3):686-90.
- 64) Encinar JA, Mallo GV, Mizyrycki C, Giono L, Gonzalez-Ros JM, Rico M, Canepa E, Moreno S, Neira JL, Iovanna JL. Human p8 is a HMG-I/Y-like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2001 Jan 26;276(4):2742-51. Epub 2000 Oct 30.

- 65) Vasseur S, Folch-Puy E, Hlouschek V, Garcia S, Fiedler F, Lerch MM, Dagorn JC, Closa D, Iovanna JL. p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I. *J Biol Chem.* 2004 Feb 20;279(8):7199-207. Epub 2003 Dec 1.
- 66) Su SB, Motoo Y, Iovanna JL, Xie MJ, Sawabu N. Effect of camostat mesilate on the expression of pancreatitis-associated protein (PAP), p8, and cytokines in rat spontaneous chronic pancreatitis. *Pancreas.* 2001 Aug;23(2):134-40.
- 67) Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Iovanna JL, Sawabu N. Effect of carboxamide derivative IS-741 on rat spontaneous chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 2002 Jan;47(1):139-47.
- 68) Igarashi T, Kuroda H, Takahashi S, Asashima M. Cloning and characterization of the *Xenopus laevis* p8 gene. *Dev Growth Differ.* 2001 Dec;43(6):693-8.
- 69) Goruppi S, Bonventre JV, Kyriakis JM. Signaling pathways and late-onset gene induction associated with renal mesangial cell hypertrophy. *EMBO J.* 2002 Oct 15;21(20):5427-36.
- 70) Su SB, Motoo Y, Iovanna JL, Xie MJ, Mouri H, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Watanabe H, Okai T, Matsubara F, Sawabu N. Expression of p8 in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2001 Feb;7(2):309-13.
- 71) *Clin Cancer Res.* 2001 Feb;7(2):309-13. Reexpression of p8 contributes to tumorigenic properties of pituitary cells and appears in a subset of prolactinomas in transgenic mice that hypersecrete luteinizing hormone. *Mol Endocrinol.* 2004 Oct;18(10):2583-93. Epub 2004 Jul 8.
- 72) Ree AH, Tvermyr M, Engebraaten O, Rooman M, Rosok O, Hovig E, Meza-Zepeda LA, Bruland OS, Fodstad O. Expression of a novel factor in human breast cancer cells with metastatic potential. *Cancer Res.* 1999 Sep 15;59(18):4675-80.
- 73) Ree AH, Pacheco MM, Tvermyr M, Fodstad O, Brentani MM. Expression of a novel factor, com1, in early tumor progression of breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 May;6(5):1778-83.
- 74) Bratland A, Risberg K, Maelandsmo GM, Gutzkow KB, Olsen OE, Moghaddam A, Wang MY, Hansen CM, Blomhoff HK, Berg JP, Fodstad O, Ree AH. Expression of a novel factor, com1, is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2000 Oct 1;60(19):5578-83.

- 75) Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005 Jan;10(1):75-86.
- 76) Ema H, Sudo K, Seita J, Matsubara A, Morita Y, Osawa M, Takatsu K, Takaki S, Nakauchi H. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Dev Cell*. 2005 Jun;8(6):907-14.
- 77) Takeda Y, Mori T, Imabayashi H, Kiyono T, Gojo S, Miyoshi S, Hida N, Ita M, Segawa K, Ogawa S, Sakamoto M, Nakamura S, Umezawa A. Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J Gene Med*. 2004 Aug;6(8):833-45.
- 78) Seruya M, Shah A, Pedrotty D, du Laney T, Melgiri R, McKee JA, Young HE, Niklason LE. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant*. 2004;13(2):93-101.
- 79) Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth SE, Koc ON, Kozik MM, Szekely E, Daum-Woods K, Goetchius GW, Fu P, Welniak LA, Murphy WJ, Laughlin MJ. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. *Stem Cells*. 2002;20(6):573-82.
- 80) Moussavi-Harami F, Duwayri Y, Martin JA, Moussavi-Harami F, Buckwalter JA. Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering. *Iowa Orthop J*. 2004;24:15-20.
- 81) Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961 Dec;25:585-621.
- 82) Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol*. 2002 Jun;20(6):592-6.
- 83) Bianchi ME, Beltrame M. Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep*. 2000 Aug;1(2):109-14.

- 84) Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol.* 1999 Aug;19(8):5237-46.
- 85) Mashima H, Yamada S, Tajima T, Seno M, Yamada H, Takeda J, Kojima I. Genes expressed during the differentiation of pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *Diabetes.* 1999 Feb;48(2):304-9.
- 86) Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, Seno M, Yamada H, Kojima I. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest.* 1996 Apr 1;97(7):1647-54.
- 87) Liebl A, Spannheimer A, Reitberger U, Gortz A. Costs of long-term complications in type 2 diabetes patients in Germany. Results of the CODE-2 Study. *Med Klin (Munich).* 2002 Dec 15;97(12):713-9.
- 88) Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol.* 2002 Mar;20(3):251-5.
- 89) Omer A, Duvivier-Kali VF, Trivedi N, Wilmot K, Bonner-Weir S, Weir GC. Survival and maturation of microencapsulated porcine neonatal pancreatic cell clusters transplanted into immunocompetent diabetic mice. *Diabetes.* 2003 Jan;52(1):69-75.
- 90) Stoye JP, Le Tissier P, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA. Endogenous retroviruses: a potential problem for xenotransplantation? *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Dec 30;862:67-74.
- 91) Wilson CA, Wong S, Muller J, Davidson CE, Rose TM, Burd P. Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol.* 1998 Apr;72(4):3082-7.
- 92) van der Laan LJ, Lockey C, Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, Herring BJ, Long Z, Otto E, Torbett BE, Salomon DR. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature.* 2000 Sep 7;407(6800):90-4.

- 93) Beckmann J. On the German debate on human embryonic stem cell research. *J Med Philos.* 2004 Oct;29(5):603-21.
- 94) Langa F, Kress C, Colucci-Guyon E, Khun H, Vandormael-Pournin S, Huerre M, Babinet C. Teratocarcinomas induced by embryonic stem (ES) cells lacking vimentin: an approach to study the role of vimentin in tumorigenesis. *J Cell Sci.* 2000 Oct;113 Pt 19:3463-72.
- 95) Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990 Feb 23;60(4):585-95.
- 96) Hunziker E, Stein M. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Apr 29;271(1):116-9.
- 97) Selander L, Edlund H. Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mech Dev.* 2002 May;113(2):189-92.
- 98) Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 11;99(12):8078-83. Epub 2002 Jun 4.
- 99) Kojima H, Nakamura T, Fujita Y, Kishi A, Fujimiya M, Yamada S, Kudo M, Nishio Y, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Kojima I, Seno M, Wong NC, Kikkawa R, Kashiwagi A. Combined expression of pancreatic duodenal homeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to produce insulin. *Diabetes.* 2002 May;51(5):1398-408.
- 100) Di Gioacchino G, Di Campli C, Zocco MA, Piscaglia AC, Novi M, Santoro M, Santoliquido A, Flore R, Tondi P, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Transdifferentiation of stem cells in pancreatic cells: state of the art. *Transplant Proc.* 2005 Jul-Aug;37(6):2662-3.
- 101) Ende N, Chen R, Reddi AS. Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Aug 13;321(1):168-71.
- 102) Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Hematology.* 2005;10 Suppl 1:293-6.
- 103) Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaillie CM. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Sep;6(9):726-37.

- 104) Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11854-60. Epub 2003 Aug 18.
- 105) Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 2004 May 6;429(6987):41-6.
- 106) Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology*. 2002 Aug;143(8):3152-61.
- 107) Eberhardt M, Salmon P, Mach MA, Hengstler JG, Brulport M, Linscheid P, Seboek D, Oberholzer J, Barbero A, Martin I, Muller B, Trono D, Zulewski H. Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jul 7;345(3):1167-76. Epub 2006 May 11.
- 108) Limbert C, P ath G, Rothhammer V, Niu X, Brendel M, Bretzel RG, Kassem M, and Seufert J 2006. Overlapping phenotypes of human adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, endocrine pancreas and umbilical cord blood. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 114(Supp.1):S12 (Abstr.)
- 109) Lechner A, Leech CA, Abraham EJ, Nolan AL, Habener JF. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 3;293(2):670-4.
- 110) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530.
- 111) Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 1999;199:391-396.
- 112) Gussoni E, Ssoneoka Y, Strickland CD et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;401:390-394.

- 113) Orlic D, Kajstura J, Chimienti S et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10344-10349.
- 114) Fuchs S, Satler LF, Kornowski R et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1721-1724.
- 115) Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003;107:2294-2302.
- 116) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16.
- 117) Alison MR, Poulson R, Jeffery R et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
- 118) Krause DS, Theise ND, Collector MI et al. Multiorgan, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-377.
- 119) Korbiling M, Katz RL, Khanna A et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002;346:738-746.
- 120) Okamoto R, Yajimi T, Yamazaki M et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002;8:1011-1017.
- 121) Brittan M, Hunt T, Jeffery R et al. Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut* 2002;50:752-757.
- 122) Theise ND, Henegariu O, Grove J et al. Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. *Exp Hematol* 2002;30:1333-1338.
- 123) Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001;128:5181-5188.
- 124) Deng W, Obrocka M, Fischer I et al. In vitro differentiation of human bone marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that

- increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:148-152.
- 125) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000;164:247-256.
- 126) Ianus A, Holz GG, Theise ND et al. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003;111:843-850.
- 127) Hess D, Li L, Martin M et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003;21:763-770.
- 128) Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE et al. Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997;64:278-294.
- 129) Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ et al. Rapid expansion of recycling stem cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3213-3218.
- 130) Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968-973.
- 131) Gronthos S, Chen S, Wang CY, Robey PG, Shi S. Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, osterix and osteocalcin. *J Bone Miner. Res* 2003;18:716-722.
- 132) Path G, Opel A, Gehlen, Rothhammer V, Niu X, Limbert C, Romfeld L, Huegl S, Knoll A, Brendel MD, Bretzel RG, Seufert J. Glucose-dependent expansion of pancreatic β -cells by the protein p8 in vitro and in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Jul 18.
- 133) Goruppi S, Kyriakis JM. The pro-hypertrophic basic helix-loop-helix protein p8 is degraded by the ubiquitin/proteasome system in a protein kinase B/Akt- and glycogen synthase kinase-3-dependent manner, whereas endothelin induction of p8

- mRNA and renal mesangial cell hypertrophy require NFAT4. *J Biol Chem.* 2004 May 14;279(20):20950-8.
- 134) Li J, Law HK, Lau YL, Chan GC. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol.* 2004 Nov;127(3):326-34.
- 135) Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll HJ. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy - evidence of resistance to apoptosis-induction. *Stem Cells.* 2006 Aug 24.
- 136) Malicet C, Giroux V, Vasseur S, Dagorn JC, Neira JL, Iovanna JL. Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin α complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 21;103(8):2671-6. Epub 2006 Feb 14.
- 137) Kallwellis K, Grempler R, Gunther S, Path G, Walther R. Tumor Necrosis Factor Alpha Induces the Expression of the Nuclear Protein p8 via a Novel NFkappaB Binding Site within the Promoter. *Horm Metab Res.* 2006 Sep;38(9):570-4.
- 138) Hunziker E, Stein M. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Apr 29;271(1):116-9.

8. Danksagung

Herrn **Prof. Dr. med. J. Seufert** danke ich besonders für die allumfassende Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation. Mit großem Engagement und Interesse kümmerte er sich um die Belange seiner Doktoranden und ermöglichte mir, meine Forschungsergebnisse nicht nur im Rahmen dieser Doktorarbeit, sondern auch auf verschiedenen Kongressen in Vorträgen und Postern zu präsentieren. So verhalf er mir zu einem grundlegenden Verständnis für wissenschaftliches und experimentelles Arbeiten und Denken und weckte meine Begeisterung für die medizinische Forschung.

Als Leiter der Medizinischen Poliklinik schufen **Prof. Dr. med. K. Wilms** sowie sein Nachfolger **Prof. Dr. med. H. Einsele** die Rahmenbedingungen für die Erstellung meiner Dissertation. Mein herzlicher Dank hierfür.

Herr **Dr. rer. nat. G. Päth** war mir aufgrund seiner langjährigen Erfahrung als Biologe und kundiger Wissenschaftler bei komplexen molekularbiologischen und methodischen Fragestellungen sowie im Rahmen zahlreicher intensiver Diskussionen stets kompetenter Ansprechpartner, Lehrer und Partner. Auch ihm sei für die Ausbildung meines wissenschaftlichen Verständnisses außerordentlich gedankt.

Frau **Dr. med. E. Urban** ist für zahlreiche Diskussionen, eine produktive Arbeitsatmosphäre und Durchhaltewillen bei der Erstellung dieser Textfassung mein Dank gewiss.

Veit Johannes Rothhammer

<i>Geburtsdatum</i>	24. August 1979
<i>Geburtsort</i>	Schweinfurt
<i>Staatsangehörigkeit</i>	deutsch
<i>Familienstand</i>	ledig
<i>Adresse</i>	Brudermühlstraße 9 81371 München Tel. 089/37416328 E-Mail: veit.rothhammer@gmx.de
<i>Eltern</i>	Rothhammer, Adelgunde (geb. Jenatschke) Grundschullehrerin Rothhammer, Prof. Dr. med. Anton Anaesthesist
<i>Geschwister</i>	Rothhammer, Tilmann Market planner, Procter&Gamble

Schulische Ausbildung

<i>Sept. 1986 – Juni 1990</i>	Schiller - Volksschule, Schweinfurt
<i>Sept. 1990 – Juni 1999</i>	Celtis - Gymnasium, Schweinfurt
<i>Juni 1999</i>	Allgemeine Hochschulreife Leistungskurse: Latein, Mathematik 3. und 4. Abiturfach: Deutsch, Religion

Universitäre Ausbildung

<i>Okt. 1999 – Mai 2006</i>	Studium der Humanmedizin Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
<i>August 2001</i>	Ärztliche Vorprüfung
<i>August 2002</i>	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>März 2005</i>	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>Mai 2006</i>	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Klinische Ausbildung

<i>Februar – März 2002</i>	Famulatur Innere Medizin Medizinische Klinik II (Gastroenterologie, Onkologie) am Leopoldina-Krankenhaus der Stadt Schweinfurt, Prof. Dr. Koch
<i>Sept. – Okt. 2002</i>	Famulatur Viszeral- und Unfallchirurgie Klinik für Viszeral- und Unfallchirurgie am Juliusspital Würzburg, Prof. Dr. Schippers, Prof. Dr. Gay
<i>März 2003</i>	Famulatur Dermatologie Dermatologische Gemeinschaftspraxis, Würzburg, Dr. Schubert, Dr. Frank
<i>Feb. – März 2004</i>	Famulatur Gynäkologie Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe an der Missionärztlichen Klinik Würzburg, Prof. Dr. Kranzfelder
<i>September 2004</i>	Famulatur Viszeral- und Unfallchirurgie Chirurgische Gemeinschaftspraxis, Würzburg, Dr. Eckert, Dr. Hüller
<i>April – Juni 2005</i>	1. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin Gastroenterology, Cardiology am Mount Sinai Hospital, University of Toronto ON, Kanada, Dr. Steinhart, Dr. Barolet
<i>Juni – August 2005</i>	1. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin Pneumologie, Medizinische Klinik der Universität Würzburg, Prof. Dr. Ertl, Prof. Dr. Schmidt
<i>Sept. – Oktober 2005</i>	2. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie Viszeralchirurgie, Chirurgische Klinik der Universität Würzburg, Prof. Dr. Prof. Dr. h. c. Thiede
<i>Okt. – November 2005</i>	2. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie Chirurgie Générale et Endocrinienne, Hôpital Civil de Strasbourg, Frankreich, Prof. Dr. Marescaux
<i>Dez. 2005 – März 2006</i>	3. Tertial des Praktischen Jahres, Wahlfach Neurologie Neurologie, Neurologische Klinik der Universität Würzburg, Prof. Dr. Toyka

Weiterbildung

<i>1.8.2006 – 31.7.2007</i>	Assistenzarzt an der Klinik für Neurologie der Universität Düsseldorf unter Leitung von Prof. Dr. med. H.-P. Hartung
<i>Seit 1.8.2007</i>	Assistenzarzt an der Klinik für Neurologie der Technischen Universität München unter Leitung von Prof. Dr. med. B. Hemmer

Dissertation

Wachstumsverhalten und Expansionskapazität humaner mesenchymaler Stammzellen aus Pankreas und Knochenmark

Doktorvater: Prof. Dr. med. Jochen Seufert

Bis Mitte 2006

Medizinische Klinik II und Poliklinik, Universitätsklinikum Würzburg
Schwerpunkt Stoffwechsel, Endokrinologie und Molekulare Medizin

Ab Mitte 2006

Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie und Klinische Infektiologie
Universitätsklinikum Freiburg, Schwerpunkt Endokrinologie und Diabetologie

Stipendium

1999-2006

Studienstipendium FAG Kugelfischer, Schweinfurt

Sonstige Fähigkeiten und Persönliche Interessen

Fremdsprachen

Englisch, Französisch, Spanisch, Latein

EDV

Office - Software, Netzwerkverwaltung, Internet

Interessen

Klassische Literatur, Alte Sprachen, Klavier

Sport

Joggen, Bergwandern, Turnierformationstanz

München, März 2008

Veit Rothhammer

10. Veröffentlichungen

Originalarbeiten

1. Kruger S., Bier A., Plaschke J., Hohl R., Aust D.E., Kreuz F.R., Pistorius S.R., Saeger H.D., **Rothhammer V.**, Al-Taie O., Schackert H.K. Ten novel MSH2 and MLH1 germline mutations in families with HNPCC.
Hum Mutat. 2004 Oct;24(4):351-2.
2. Päth G., Opel A., Gehlen M., **Rothhammer V.**, Niu X., Limbert C., Romfeld L., Hügl S., Knoll A., Brendel MD., Bretzel RG., Seufert J. Glucose-dependent expansion of pancreatic beta-cells by the protein p8 in vitro and in vivo.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006 Dec;291(6):E1168-76. Epub 2006 Jul 5.

Weitere Veröffentlichungen

3. Päth, G., **Rothhammer, V.**, Opel, A., and Seufert, J. 2004. p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth and enhances proliferation of adult hMSC-TERT stem cells.
Second International Meeting of the Stem Cell Network NRW (Abstr.)
4. Schürger, K., Päth, G., **Rothhammer, V.**, Meyer, T., and Seufert, J. 2004. Phänotyp-spezifische Vektoren zur Analyse der Differenzierung adulter, Nestin-positiver Stammzellen des endokrinen Pankreas in Insulin produzierende Zellen.
Med.Klin. 99(4):101 (Abstr.)
5. Päth, G., **Rothhammer, V.**, Opel, A., and Seufert, J. 2004. p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth and enhances proliferation of adult hMSC-TERT stem cells.
Diabetes und Stoffwechsel 13(Suppl.1):38 (Abstr.)
6. Schürger, K., Päth, G., **Rothhammer, V.**, Meyer, T., and Seufert, J. 2004. Phänotyp-spezifische Vektoren zur Analyse der Differenzierung adulter, Nestin-positiver Stammzellen des endokrinen Pankreas in Insulin produzierende Zellen.
Diabetes und Stoffwechsel 13(Suppl.1):120 (Abstr.)
7. Päth, G., **Rothhammer, V.**, Opel, A., and Seufert, J. 2004. p8 is associated with glucose-induced beta-cell growth and enhances proliferation of adult hMSC-Tert stem cells.
Cytotherapy 6(3):292-293 (Abstr.)
8. Päth, G., Meyer, T., **Rothhammer, V.**, and Seufert, J. 2004. Development of strategies for identification, isolation and expansion of human pancreatic endocrine intra-islet stem cells.
Cytotherapy 6(3):274-275 (Abstr.)

9. **Rothhammer, V.**, Päth, G., Kassem, M., Brendel, M., Bretzel, R.G., and Seufert, J. 2005. p8 overexpression enhances proliferation and growth of adult human hMSC-TERT stem cells. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 113(Suppl.1):S54 (Abstr.)
10. **Rothhammer, V.**, Päth, G., Kassem, M., Brendel, M., Bretzel, R.G., and Seufert, J. 2005. p8-Überexpression steigert Wachstum und Proliferation von humanen adulten hMSC-TERT Stammzellen. *Med.Klin.* 100(3):18 (Abstr.)
11. Päth, G., Opel, A., **Rothhammer, V.**, Gehlen, M., Limbert, C., Romfeld, L., Hügl, S., Brendel, M., Bretzel, R.G., and Seufert, J. 2005. Glucose-dependent expansion of pancreatic beta-cells by the protein p8 in vitro and in vivo. *Diabetes und Stoffwechsel* 14(Suppl.):20-21 (Abstr.)
12. Päth, G., Opel, A., **Rothhammer, V.**, Gehlen, M., Limbert, C., Romfeld, L., Hügl, S., Brendel, M., Bretzel, R.G., and Seufert, J. 2005. Glucose-Dependent Expansion of Pancreatic Beta-Cells by the Protein p8 *In Vitro* and *In Vivo*. *Diabetes* 54(Suppl.1):A391-A392 (Abstr.)
13. Päth, G., Opel, A., **Rothhammer, V.**, Gehlen, M., Limbert, C., Romfeld, L., Hügl, S., Brendel, M., Bretzel, R.G., and Seufert, J. 2005. Glucose-dependent expansion of pancreatic beta-cells by the protein p8 *in vitro* and *in vivo*. *Diabetologia* 48(Suppl.1):A13 (Abstr.)
14. **Rothhammer, V.**, Päth, G., Niu, X., Limbert, C., Kassem, M., and Seufert, J. 2006. The protein p8 mediates expansion of human bone marrow derived mesenchymal stem cells by both induction of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 114(Supp.1):S45 (Abstr.)
15. Limbert, C., Päth, G., **Rothhammer, V.**, Niu, X., Brendel, M., Bretzel, R.G., Kassem, M., and Seufert, J. 2006. Overlapping phenotypes of human adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, endocrine pancreas and umbilical cord blood. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 114(Supp.1):S12 (Abstr.)