

Entwicklung und Austestung kardiomyozyten- bzw.
pneumozytenspezifischer lentiviraler Vektoren für die
Anwendung in embryonalen Stammzellen

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

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Stephanie Wunderlich

geboren am 17.09.1977 in Wilhelmshaven

2008

Referent: Prof. Dr. Ulrich Martin

Koreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 06. März. 2008

Zusammenfassung

Eine ganze Reihe kardiorespiratorischer Erkrankungen sind derzeit nicht oder nur unzureichend behandelbar. Herz-Kreislauf Erkrankungen stellen in den industrialisierten Ländern sogar die häufigste Todesursache dar. Nicht selten ist die Organtransplantation die letzte Therapieoption. Neueste zell- und gewegetherapeutische Entwicklungen könnten zukünftig zu der Entwicklung eines alternativen Gewebeersatzes führen und die Zahl notwendiger Organtransplantationen reduzieren. Kritisch für die Entwicklung derartiger Technologien ist häufig die Verfügbarkeit einer geeigneten Zellquelle. Obwohl in vielen Fällen die klinische Anwendung von Stammzellen möglich erscheint, ist diesbezüglich noch eine Vielzahl von Problemen zu lösen. Die Isolierung verschiedener Stammzellen ist häufig noch schwierig und die Expansion sowie gezielte Differenzierung und Aufreinigung bisher weitgehend unmöglich. So wird z. B. durch das Fehlen spezifischer Oberflächenmarker sowohl die Entwicklung effizienter Protokolle für die Differenzierung von Kardiomyozyten und Typ II Pneumozyten (AT2 Zellen) aus embryonalen Stammzellen (ESC) als auch die Aufreinigung der resultierenden Zellen erschwert. Als Alternative bietet sich die Verwendung von transgenen Stammzellen an, in denen Selektions- und Reportergene unter Kontrolle zelltypspezifischer Promotoren exprimiert werden. Da die Transgenese vieler Stammzelltypen, insbesondere von humanen embryonalen Stammzellen (hESC), oder von ES-Zellen nichthumaner Primaten unter Verwendung konventioneller nicht-viraler Methoden bisher sehr ineffizient ist, war das Ziel der vorliegenden Dissertation, lentivirale Vektoren für die zelltypspezifische Transgenexpression zu entwickeln, bzw. geeignete Transduktionsprotokolle für die Herstellung transgener ES-Zellklone zu etablieren.

Zunächst wurden für die spätere Aufreinigung von aus ES-Zellen differenzierten Kardiomyozyten und Typ II Pneumozyten mehrere HIV-1-basierte lentivirale Vektoren hergestellt. Um die relativ schwache endogene Expression der verwendeten zelltypspezifischen Promotoren zu steigern, wurde eine CMV Enhancersequenz in die Basisvektoren eingefügt und deren Auswirkung auf Spezifität und Höhe der Transgenexpression in verschiedenen Ziel- und Kontrollzellen untersucht. Für die Etablierung der lentiviralen Transduktion von ES-Zellen aus Maus und Rhesusaffe wurden SIV_{mac}-basierte Vektoren verwendet, die im Gegensatz zu HIV-1-basierten Vektoren auch für ES-Zellen subhumaner Primaten geeignet sind. Des Weiteren wurden Expressionskassetten, welche sich im HIV-Vektorsystem als geeignet herausgestellt hatten, für die spätere Herstellung transgener ES-Zellklone in das verwendete SIV_{mac}-Vektorsystem umkloniert.

Unter Verwendung der atrialen Kardiomyozytenlinie HL-1 und neonataler Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass der humane CMV-Enhancer zu einer deutlichen Steigerung der lentiviralen ANF- und MLC2v-Promotor-vermittelten Transgenexpression führt. Durchgeführte Kontrollen belegten dabei den weitgehenden Erhalt der Zelltypspezifität für Kardiomyozyten. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für den hergestellten Vektor mit SP-C-Promoter erzielt werden. Hier konnte eine strenge Korrelation der starken GFP-Expression mit der endogenen SP-C-Expression in den AT2 Zelllinien MLE-12 und MLE-15 nachgewiesen werden. Mit Blick auf die Anwendung der o. g. Vektoren wurden außerdem erfolgreich Protokolle zur lentiviralen Transduktion von ES-Zellen aus Maus (mESC) und Rhesusaffe (RESC) etabliert. Mithilfe der etablierten Methodik konnte ein transduzierter mESC-Klon isoliert und charakterisiert werden. Die Differenzierungseigenschaften dieses Klons waren mit denen nicht transduzierter Zellen vergleichbar. Im Falle von RESCs konnte aufgrund der Empfindlichkeit dieser Zellen in Bezug auf die Behandlung mit Trypsin kein Einzelklon isoliert werden, nichtsdestotrotz aber eine Anreicherung auf 94% GFP^{pos} Zellen erreicht werden. Auch diese angereicherten Zellen zeigten sowohl im undifferenzierten als auch im differenzierten Zustand vergleichbare Eigenschaften wie nicht transduzierte Zellen.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der Dissertation erfolgreich lentivirale Vektoren zur zelltypspezifischen Transgenexpression in Kardiomyozyten und AT2-Zellen etabliert werden. Darüber hinaus wurden für deren geplante Anwendung zur Aufreinigung Stammzell-abgeleiteter pulmonaler und kardialer Zellen Protokolle zur Transduktion von mESCs und RESCs etabliert. Mittelfristig werden die etablierten Methoden einen bedeutenden Beitrag sowohl für die detaillierte Charakterisierung von aus Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten und Pneumozyten als auch für deren Anwendung in zelltherapeutischen Tiermodellen darstellen.

Schlagworte: lentivirale Vektoren, zelltypspezifische Transgenexpression, embryonale Stammzellen

Abstract

At the present time, the treatment of a series of cardio respiratory diseases is impossible or only insufficient. Diseases of the cardiovascular system are even leading causes of death in the industrialised countries. Quite often organ transplantation represents the last option of therapy. Recent cell- and tissue based therapeutic applications could lead to the development of an alternative replacement of damaged tissue and reduce the number of necessary organ transplantations. For the development of such technologies, the availability of a suitable cell resource is often critical. Although the clinical usage of stem cells seems to be possible in many cases, a lot of problems have to be solved in this context. For instance, the isolation of different types of stem cells is often complicated at the moment and the expansion as well as the differentiation and purification are so far largely impossible. Furthermore, the absence of specific surface markers hampers the establishment of efficient protocols for differentiation of embryonic stem cells (ESC) into cardiomyocytes and type II pneumocytes (AT2-cells) as well as the purification of the resulting cells. The application of transgenic stem cells expressing selection- and reporter-genes under the control of cell type specific promoters seems to be an alternative option. Because of an inefficient transgenesis in many types of ESCs especially human embryonic stem cells (hESC) or ESCs from nonhuman primates using conventional non-viral methods, it was the aim of this thesis to develop lentiviral vectors for cell type specific transgene expression and to establish transduction protocols to generate transgenic ESC clones respectively.

First of all, several HIV-1 based lentiviral vectors were produced for the purification of cardiomyocytes and AT2 cells derived from ESCs. To enhance the relative low endogenous expression of the used cell type specific promoters, a CMV enhancer sequence was introduced into the vector backbone and its effect on specificity and transgene expression in different target and control cells was examined. To establish the lentiviral transduction of ESCs derived from mouse and rhesus monkey, SIV_{mac}-based vectors were used, which are also suitable for ESCs derived from subhuman primates in contrast to HIV-1 based vectors. Furthermore, for later production of transgenic ESC clones, expression cassettes that were proved suitable in the HIV-1 based vector system were cloned into the SIV_{mac}- based vector.

By using the atrial cardiomyocyte cell line HL-1 and neonatal rat cardiomyocytes, it could be shown that the human CMV enhancer leads to a clear enhancement of the promoter depended transgene expression in the lentiviral vectors containing the ANF- and MLC2v promoters. Carried out Controls verified the preservation of cell type specificity for cardiomyocytes. Regarding the vector containing the SP-C promoter, comparable results could be obtained. In this case, a strict correlation of the strong GFP-expression and the endogenous SP-C expression in the AT2 cell lines MLE12 and MLE15 could be shown. Moreover, with regard to the application of the above-named vectors protocols for the lentiviral transduction of ESCs derived from mouse (mESC) and rhesus monkey (RESC) were also successfully established. By means of the established method, a transgenic mESC clone could be isolated and characterized. The characteristics of the differentiation behaviour of the established clone were similar to that of native ESCs. In the case of RESCs, it was not possible to isolate an ESC clone because of their sensitiveness adverse to trypsin treatment. Nevertheless, an enrichment of 94% GFP^{pos} cells could be obtained. These enriched cells showed similar characteristics compared to non-transduced cells in an undifferentiated and differentiated state as well.

Summarized, lentiviral vectors for cell type specific transgene expression in cardiomyocytes and AT2 cells could be established successfully in this thesis. Moreover, transduction protocols for mESCs and RESCs for the intended application to enrich stem cell based pulmonary and cardiac cells were obtained. Medium-term, the established methods could represent an important contribution to the detailed characterisation of stem cell-derived cardiomyocytes and pneumocytes as well as for their usage in cell therapeutic animal models.

Key Words: lentiviral vector, cell type specific transgene expression, embryonic stem cells

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	5
1.1. Embryonale Stammzellen (ESCs)	6
1.2. Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten	8
1.3. Differenzierung von ESCs zu Typ II Pneumozyten (AT2)	10
1.4. Gentransfer in embryonale Stammzellen (ESCs)	11
1.5.1. Lentiviren	12
1.5.3. Der Infektions- und Replikationszyklus des HIV-1 bzw. SIV	13
1.5.4. Aufbau und Entwicklung lentiviraler Vektoren	14
1.6. Shuttle System pLentiShuttle	18
1.7. Promotoren für die Detektion und die Selektion ES-Zell abgeleiteter Herzmuskelzellen und AT2 Zellen	22
1.7.1. Der Atriale Natriuretische Faktor (ANF) Promotor	23
1.7.2. Der ventrikuläre Myosin light chain-2 (MLC2v) Promotor	23
1.7.3. Der Surfactant Protein C (SpC) Promotor	24
1.8. Enhancer	25
1.8.1. Der CMV Enhancer	26
1.9. Expression ubiquitärer Promotoren in pluripotenten embryonalen Stammzellen	26
1.9.1. Der humane Cytomegalievirus (hCMV) Promotor	26
1.9.2. Der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) Promotor	27
1.9.3. Der chicken beta actin (CBA) Promotor	28
1.9.4. Der murine Phosphoglycerat Kinase (PGK) Promotor	28
1.10. GFP und die Entwicklung von GFP-Varianten	28
1.10.1. DsRed und die Entwicklung des RedStar	29
1.11. Zielsetzung	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Material	31
2.1.1. Geräte	31
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3. Chemikalien	32
2.1.4. Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie und Immunhistochemie	34
2.1.5. Kits	34
2.1.6. Oligonukleotide	35
2.1.7. Oligonukleotide und Sonden für die <i>Real Time</i> PCR	35
2.1.8. Oligonukleotide für die Charakterisierung der transduzierten embryonalen Stammzellen des Rhesusaffen im undifferenzierten und differenzierten Zustand	36
2.1.8. Enzyme	37
2.1.9. DNA-Marker	37
2.1.10. Antikörper	37
2.1.10.1. Primärantikörper	37

2.1.10.2. Isotypen Negativkontrollen.....	37
2.1.10.3. Sekundärantikörper	38
2.1.11. Vektoren	38
2.1.12. Bakterienstämme	40
2.1.12.1. E. coli TOP 10 (Invitrogen, Niederlande)	40
2.1.12.2. Elektromax™ STBL4™ (Life Technologies, Eggstein).....	40
2.1.12.3. HB101 (Takara Bio Inc. Japan).....	40
2.1.13. Nährmedien für Bakterien	41
2.1.14. verwendete Antibiotika.....	41
2.1.15. Zellen	42
2.1.15.1. A549 (CCL-185).....	42
2.1.15.2. HEK 293T-Zellen	42
2.1.15.3. HeLa 229 Zellen	42
2.1.15.4. HL-1 [183].....	42
2.1.15.5. Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)	42
2.1.15.6. Humane endodermale Fibroblasten.....	43
2.1.15.7. Humane glatte Muskelzellen (SMC)	43
2.1.15.8. MLE- 12	43
2.1.15.9. MLE- 15 [184]	43
2.1.15.10. Murine embryonale Fibroblasten	43
2.1.15.11. Murine embryonale Stammzellen Brachyury-GFP (Brachyury-GFP mESCs) [185].....	43
2.1.15.12. Neonatale Rattenkardiomyozyten.....	44
2.1.15.13. Embryonale Stammzellen des Rhesusaffen (RESCs), R366.4 [21].....	44
2.1.16. Zellkulturmedien und Medienzusätze.....	44

2.2. Methoden.....47

2.2.1. Molekularbiologische Methoden	47
2.2.1.1. Präparation von Plasmid-DNA.....	47
2.2.1.1.1. Schnellnachweis von Plasmiden in Bakterienklonen („Quick Check“)	47
2.2.1.1.2. Minipräparation von Plasmid-DNA.....	47
2.2.1.1.3. Midipräparation von Plasmid-DNA.....	48
2.2.1.1.4. Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	48
2.2.1.2. Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA	48
2.2.1.2.1. Phenol-Chloroform-Extraktion	48
2.2.1.3. Fällung von Nukleinsäuren	49
2.2.1.3.1. Ethanolische Fällung mit Natrium-Acetat.....	49
2.2.1.3.2. Isopropanol-Fällung.....	49
2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	50
2.2.1.5. PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	50
2.2.1.5.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der <i>Taq</i> -Polymerase	51
2.2.1.5.2. PCR von DNA-Fragmenten mit der Proofstart™- Polymerase	52
2.2.1.5.3. <i>Real time</i> PCR.....	53
2.2.1.6. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	55
2.2.1.6.1. Präparativer Restriktionsverdau	56
2.2.1.6.2. Analytischer Restriktionsverdau	57
2.2.1.7. Ligation	57
2.2.1.7.1. Ligation in den pJET1 <i>Cloning Vector</i>	58
2.2.1.8. Agarosegel-Elektrophorese	60

2.2.1.8.1. Extraktion von DNA aus dem Agarosegel.....	61
2.2.1.9. Transformation von Bakterien.....	61
2.2.1.9.1. Herstellung elektrokompetenter Bakterien TOP 10.....	61
2.2.1.9.2. Elektroporation von <i>E. coli</i>	62
2.2.1.9.3. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien des Stammes HB101.....	63
2.2.1.9.4. Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	63
2.2.1.10. Herstellung der Vektoren.....	64
2.2.1.10.1. pSh S.....	64
2.2.1.10.2. Klonierung des Reportergens RedStar (RS).....	64
2.2.1.10.3. pSh S EF1a hrGFP WPRE und pSh S EF1a RS WPRE.....	65
2.2.1.10.4. pSh S CeCBA hrGFP WPRE und pSh S CeCBA RS WPRE.....	65
2.2.2. Zellkultur.....	66
2.2.2.1. Zelllinien und Primärzellen.....	66
2.2.2.1.1. A549, HEK293T, HeLa, SMC, Mle12, Mle15, HUVEC.....	66
2.2.2.1.2. HL-1 Zellen.....	67
2.2.2.1.3. Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten.....	68
2.2.2.2. Embryonale Stammzellkultur.....	68
2.2.2.2.1. Isolierung muriner embryonaler Fibroblasten (<i>Feederzellen</i>).....	68
2.2.2.2.2. Murine embryonale Fibroblasten (<i>Feederzellen</i>).....	69
2.2.2.2.3. Inaktivierung von <i>Feederzellen</i>	69
2.2.2.2.4. Kultivierung von Rhesus embryonalen Stammzellen (RESCs).....	69
2.2.2.2.5. Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen (mESCs).....	70
2.2.2.2.6. kardiale Differenzierung von RESCs.....	71
2.2.2.2.7. kardiale Differenzierung von mESCs.....	72
2.2.3. Zellzahlbestimmung.....	72
2.2.4. Immunfluoreszenzfärbung.....	73
2.2.5. Arbeiten unter S2-Bedingungen.....	73
2.2.5.1. Virusproduktion.....	73
2.2.5.2. Transduktion.....	76
2.2.5.2.1. Transduktion zur Titerbestimmung.....	76
2.2.5.2.2. Proteinase-K-Verdau.....	76
2.2.5.2.3. Transduktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM).....	77
2.2.5.2.4. Transduktion von Zelllinien.....	77
2.2.5.2.5. Transduktion von mESC.....	77
2.2.5.2.6. Transduktion RESC.....	78
2.2.5.3. Durchflusszytometrie.....	78
3. Ergebnisse.....	80
3.1. Charakterisierung HIV-1-basierter lentiviraler Vektoren für die zelltypspezifische Transgenexpression.....	80
3.1.1. Verwendete zelltypspezifische Promotoren.....	80
3.1.1.1. Der Einfluss des CMV-Enhancerelements auf den Titer der lentiviralen Vektoren.....	81
3.1.1.2. RT-PCR Analyse der mRNA Expression der verwendeten Kontrollzellen bzw. Zielzellen für die Austestung des CMV Enhancers und der zelltypspezifischen Expression.....	83
3.2. Untersuchung der Funktionalität des CMV Enhancerelementes unter Verwendung des murinen PGK Promotors.....	84
3.3. Untersuchung des Einflusses des CMV Enhancerelements auf die Expression durch den kardialen humanen ANF-Promotor.....	85

3.3.1. Untersuchung des Einflusses des CMV Enhancerelements auf die Expression durch den kardialen humanen ANF-Promotor und den humanen MLC2v Promotor in primären neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	88
3.4. Untersuchung der Spezifität und des Einflusses des CMV Enhancerelements auf die Expression durch den Typ II Pneumozyten spezifischen Promotor.....	91
3.4.1. Charakterisierung der für die Austestung geplanten Kontroll- bzw. Zielzellen	91
3.4.2. Transduktion der Kontroll- bzw. Zielzellen zur Austestung der Spezifität der Transfervektoren pISh H SP-C hG W und pISh H Ce SP-C hG W	94
3.4.3. Analyse der Zelltypspezifität des durch den CMV Enhancer verstärkten AT2 spezifischen lentiviralen Vektors bei einer höheren MOI.....	98
3.5. Gentransfer in embryonale Stammzellen.....	101
3.5.1. Etablierung eines SIV _{mac} basierten lentiviralen Vektorsystems zum viralen Gentransfer in embryonale Stammzellen	102
3.6. Lentiviraler Gentransfer in embryonale Stammzellen der Maus (mESC).....	104
3.6.1. Austestung einer roten GFP-Variante (RedStar) als Transgen in mESCs	108
3.6.2. Etablierung der Einzelklonselektion von transduzierten mESCs über Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	110
3.6.2.1. Charakterisierung des Einzelzellklons RedStar ^{pos} Brachyury-GFP mESC Klon 2 im undifferenzierten Zustand	111
3.6.2.2. Kardiale Differenzierung des Einzelzellklons RedStar ^{pos} Brachyury-GFP mESC Klon 2112	111
3.7. Lentiviraler Gentransfer in embryonale Stammzellen des Rhesusaffen, (RESC)	114
3.7.1. Anreicherung von GFP ^{pos} RESCs.....	118
3.7.2. Charakterisierung der angereicherten GFP ^{pos} RESC Massenkultur (RESC EF1α hG W)	120
3.7.3. Nachweis des undifferenzierten Zustands der angereicherten GFP ^{pos} RESCs	120
3.7.4. Kardiale Differenzierung der angereicherten GFP ^{pos} Massenkultur (RESC EF1α hG W).....	121
4. Diskussion	126
4.1 Charakterisierung HIV-1-abgeleiteter lentiviraler Vektoren für die zelltypspezifische Transgenexpression	126
4.1.1. Lentivirale Vektoren zur kardiomyozytenspezifischen Transgenexpression	126
4.1.2. Lentivirale Vektoren zur Typ II Pneumozyten-spezifischen Transgenexpression	131
4.2. Gentransfer in embryonale Stammzellen.....	133
4.2.1. Transduktion von mESCs	137
4.2.2. Transduktion von RESCs	140
5. Perspektiven	143
6. Literatur	150
7. Anhang	168
8. Lebenslauf.....	171
9.1. Verzeichnis eigener Veröffentlichungen.....	172
9.1.1. Bisherige Publikationen	172
9.1.2. Abstracts.....	173

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau eines retroviralen Viruspartikels.....	13
Abb. 2: Schematische Darstellung des Infektionszyklus eines Retrovirus	13
Abb. 3: Schematische Darstellung der Herstellung infektiöser Viruspartikel und die Infektion von Zielzellen.....	17
Abb. 4: Schematische Darstellung des Ausgangsvektor pHR`SINcPPT-CMVP eGFP WPRE	19
Abb. 5: Schematische Darstellung des lentiviralen Transfervektors pSh H.....	20
Abb. 6: Schematische Darstellung des Hüllplasmids pMD2.G.....	20
Abb. 7: Schematische Darstellung des Verpackungsplasmids psPAX2.....	20
Abb. 8: Schematische Darstellung des lentiviralen Transfervektors pSh S.....	21
Abb. 9: Schematische Darstellung des Verpackungsplasmids PSIV3+ (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS Lyon France)	21
Abb. 10: Kein signifikanter Einfluss des CMV Enhancers auf die Titer der lentiviralen „LentiShuttle“ Konstrukte.....	82
Abb. 11: Zelltypspezifische mRNA Expression von Ziel- und Kontrollzellen.....	83
Abb. 12: Verstärkte Transgenexpression des mPGK Promotors durch das CMV Enhancerelement.....	85
Abb. 13: Die durch den CMV Enhancer gesteigerte Transgenexpression ist unter Verwendung des hANF Promotors zelltypspezifisch.....	88
Abb. 14: Verstärkte Transgen Expression in primär isolierten Kardiomyozyten unter Verwendung von Herz-spezifischen Promotoren kombiniert mit dem CMV Enhancer.....	90
Abb. 15: MLE-12 und MLE-15 Zellen zeigen ein Genexpressionsmuster vergleichbar mit TypII Alveolar Epithelzellen. RLE-6TN, M3E3/C3, A549 und H441 Zellen zeigen dieses Genexpressionsmuster nicht.	91
Abb. 16: Die immunhistologische Analyse von einem Lungenschnitt, MLE-12, MLE-15 (HITES) und MLE-15 (DMEM) Zellen auf die Expression von Pro-SP-C zeigte in den untersuchten Zellen das erwartete gepunktete Pro-SP-C Muster.	93
Abb. 17: Eine gesteigerte GFP Expression durch den CMV Enhancer führt bei der Verwendung des SP-C Promotors zu keinem Verlust der Zelltypspezifität.....	97
Abb. 18: Unterschiedliche Kopienzahlen der lentiviralen Vektoren pro Zelle in MLE-12, MLE-15 (DMEM), MLE-15 (HITES) und den Kontrollzellen.	98
Abb. 19: Eine gesteigerte GFP Expression durch den CMV Enhancer führt bei der Verwendung des SP-C Promotors zu keinem Verlust der Zelltypspezifität auch bei höheren MOIs.....	100
Abb. 20: Basisvektoren, der verwendeten HIV-1 bzw. SIV _{mac} abgeleiteten lentiviralen Vektoren	103
Abb. 21: Die Transduktion in Suspension unter Verwendung von Polybrene führt bei den mESCs zu dem höchsten Anteil an GFP ^{pos} Zellen.....	107
Abb. 22: Die Verwendung von RedStar als Transgen in mESCs führt zu einer ausreichenden, aber schwächeren Expression im Vergleich zum hrGFP.	109
Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des mESC Klon 2 in Kultur nach mehrmaligem Splitten nach der Einzelklonselektion.....	110
Abb. 24: Nachweis des Oberflächenantigens SSEA-1 (ein wichtiger Marker von undifferenzierten mESCs) durch immunhistologische Analyse des Einzelzellklons RedStar ^{pos} Brachyury-GFP mESC Klon 2.....	112
Abb. 25: Nachweis von sarkomerischem α Aktinin durch immunhistologische Analyse des mESC Klons2 nach kardialer Differenzierung.	114
Abb. 26: Transuzierte RESCs neigten nach den ersten Transduktionsversuchen verstärkt zu neuronaler Differenzierung.....	116

Abb. 27: Die Transduktion mit dem ubiquitären EF1 α Promotor führte zu dem größten Anteil an GFP ^{pos} Zellen und der stärksten Fluoreszenz Intensität.....	118
Abb. 28: Fluorezenzmikroskopische Analyse von transduzierten RESCs im Verlauf der Anreicherung	120
Abb. 29: Nachweis des Oberflächenantigens SSEA-4 (ein wichtiger Marker undifferenzierter RESCs) durch immunhistologische Analyse von transduzierten und angereicherten RESCs (Passage 65).	121
Abb. 30: Die transduzierten RESCs zeigten im Verlauf einer kardialen Differenzierung eine mit undifferenzierten RESCs vergleichbare mRNA Expression.	122
Abb. 31: Fluorezenzmikroskopische Analyse von transduzierten und angereicherten RESCs im Verlauf einer kardialen Differenzierung.	123
Abb. 32: Fluorezenzmikroskopische Analyse von transduzierten und angereicherten RESCs an Tag 17 einer kardialen Differenzierung.	124
Abb. 33: Nachweis von sarkomersichem α Aktinin (unter anderem ein Marker für Kardiomyozyten) durch immunhistologische Analyse von transduzierten und kardial differenzierten RESCs.	125
Tabelle 1: verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der verschiedenen Vektoren.....	35
Tabelle 2: verwendete Oligonukleotide und Sonden für die <i>Real Time</i> PCR.....	35
Tabelle 4: verwendete Oligonukleotide zur Kontrolle der transduzierten undifferenzierten RESC.....	36
Tabelle 5: verwendete Oligonukleotide für den Nachweis von Differenzierungsmarkern für die RESC	36
Tabelle 6: Primärantikörper	37
Tabelle 7: Reaktionsansätze für die PCR mit der Red Taq Polymerase	51
Tabelle 8: PCR Programm Red Taq Polymerase	51
Tabelle 9: Reaktionsansatz für die PCR mit der Proofstart TM Polymerase	52
Tabelle 10: PCR Programm Proofstart TM Polymerase.....	52
Tabelle 11: Ansatz für die A-tailing Reaktion	53
Tabelle 12: Real Time mit TaqMan TM Sonde	54
Tabelle 13: Programm für Real Time PCR mit TaqMan TM Sonde	54
Tabelle 14: Ansatz für Real Time PCR mit SYBR Green TM	55
Tabelle 25: Programm für Real Time PCR mit SYBR TM Green	55
Tabelle 16: Ligationsansätze	58
Tabelle 17: Cycle Ligationsprogramm.....	58
Tabelle 18: Reaktionsansatz für die Ligation von blunt end Fragmenten.....	59
Tabelle 19: Blunting Reaktionsansatz für die Ligation von sticky end PCR Fragmenten	59
Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Ligation von sticky end PCR Fragmenten	59
Tabelle 21: Ansatz für die Virusproduktion.....	74
Tabelle 22: Transduktionsansatz Titerbestimmung.....	76
Tabelle 23: Proteinase-K-Verdau.....	76
Tabelle 24: Kopienzahl der lentiviralen Vektoren, die eine Expressionskassette unter Kontrolle des hANF Promotors enthalten, in HL-1 Zellen und entsprechenden Kontrollzellen.....	86
Tabelle 25: Kopienzahl des lentiviralen Vektors, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des ubiquitären mPGK Promotors enthält.....	86
Tabelle 26: Transduktion mit dem lentiviralen Vektoren, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des SP-C Promotors enthält, führt zu einer sehr geringen Anzahl an GFP ^{pos} Zellen und einer niedrigen Fluoreszenz Intensität.	95
Tabelle 27: Beträchtliche Steigerung der GFP ^{pos} Zellen und der GFP-Expressionshöhe durch die Transduktion mit dem lentiviralen Vektor, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des SP-C Promotors in Kombination mit dem CMV Enhancer enthält.	95

Tabelle 28: MLE-15 besitzen im Gegensatz zu den Kontrollzellen nach der Transduktion die niedrigste Kopienzahl des lentiviralen Vektors pSh H Ce SP-C hG W) pro Zelle.....	96
Tabelle 29: Kopienzahl der lentiviralen Vektoren pSh H Ce SP-C hG W und pSh H Ce mPGK hG W pro Zelle in MLE-15 und Kontrollzellen nach Transduktion mit MOI 20.....	99
Tabelle 30: Die Transduktion von mESCs in Suspension mit dem Transduktionszusatz Polybrene führt zu dem größten Anteil GFP ^{pos} Zellen.	106

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Amp R	Ampicillin Resistenz Gen
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor

B

bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

C

c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	„complementary“ Desoxyribonukleinsäure
CeCBA	„Chicken beta actin“ Promotor kombiniert mit dem CMV Enhancer
Ce	CMV-Enhancer
CIP	„Calf Intestinal Phosphatase“, Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CMV	Cytomegalievirus
cPPT	„central polypurine tract“

D

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dest.	Destilliert
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DEPC	Dimethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	„Elution buffer“; Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EF1 α , E	Elongationsfaktor 1 α
eGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“
env	Envelope, virales Hüllprotein
et al	„et alii“, und andere

EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<u>F</u>	
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“, Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	„Fetal Calf Serum“, Fötale Kälberserum
FL-1	Fluoreszenzkanal 1 im Durchflusszytometer
FL-2	Fluoreszenzkanal 2 im Durchflusszytometer
FSC	„Forward Scatter“, Engwinkelstreulicht
<u>G</u>	
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifische Antigene
GFP	„Green Fluorescent Protein“, Grünes Fluoreszenz Protein
x g	Erdbeschleunigung
<u>H</u>	
h, hu	human
hG	„humanized Renilla Green Fluorescent Protein“
HBV	Humanes Hepatitis B Virus
HEK	Human embryonal kidney cells
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1
hrGFP, hG	Humanisiertes rekombinantes GFP
HUVEC	„Human umbilical vein endothelial cells“, humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen
<u>K</u>	
Kann R	Kanamycinresistenz Gen
kb	Kilobasenpaare
<u>L</u>	
L	Liter
LB	Lauria Broth
Lsg	Lösung
LTR	Long terminal repeat
<u>M</u>	
M	Molar
m	murin
mM	Millimolar
mA	Milliampere
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
mESC	Embryonale Stammzellen der Maus
MHC	„Myosin heavy chain“ oder „Major Histocompatibility Complex“

MLC2v	Myosin leichte Kette 2, ventrikulär
M-MLV	Moloney Maus Leukämie Virus
MOI	„multiplicity of infection“, Virenzahl pro Zellzahl
mRNA	<i>messenger</i> RNA
msec.	Milli Sekunde
μ	mikro
<u>N</u>	
Nef	Negative factor
NLS	„Nuclear localization signal“, Kerntransportsignal
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
<u>O</u>	
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
ori	<i>origin of replification</i>
<u>P</u>	
pA	Polyadenylierungs signal
PCR	Polymerase kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PGK; mPGK	Phosphatglyceratkinase; muriner Phosphoglycerat Promotor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Konzentration
PIC	Präintegrationskomplex
Pol	Polymerase
pol	Reverse Transkriptase
PBS- Puffer	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<u>R</u>	
RESC	Embryonale Stammzellen des Rhesusaffen, Linie 366.4
Rev	Regulator of expression of virion proteins
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRE	Rev response element
RS	RedStar
RSV	Respiratorisches Sycyitial Virus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Rverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
<u>S</u>	
sec	Sekunde
SFFV	„Spleen focus forming virus“
SIN	Selbst- inaktivierend

SIV; SIV _{mac}	„Simian immunodeficiency virus“
SMC	„Smooth muscle cells“, Glatte Muskelzellen
SpA, SpB, SpC	„Surfactant Protein“ A, B, C
SSC	“Side Scatter“, Seiten Streulicht
SSEA-1 / SSEA-4	Stage specific antigen 1 bzw. 4

I

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tat	Transactivator of transcription
Taq	Thermus aquaticus
Tm	Schmelztemperatur von DNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

U

U	Unit
U3	Untranslatierte Region am 3' Ende
U5	Untranslatierte Region am 5' Ende
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett

V

V	Volt
Vif	Viral infectiosy factor
Vol	Volumenanteil
Vpr	Viral protein rapid
Vpu	Viral protein out
v/v	Volumen pro Volumen
VSV-G	G-Protein des Vesikular Stomatitis Virus

W

w/v	Masse pro Volumen
WPRE, W	„Woodchuck Hepatitis Virus post-transcriptional regulatory element“

X

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

1. Einleitung

Verschiedene Erkrankungen im Bereich des Herzens bzw. der Lunge sind zu diesem Zeitpunkt nur unzureichend therapierbar. Im Bereich der Lunge zählen dazu Surfactant Defizienzen, die Cystische Fibrose sowie Lungenentzündung und Asthma. Im Bereich des Herzens können u.a. der Verlust funktionellen Myokards bei koronarer Herzerkrankung, sowie Kardiomyopathien, aufgrund verschiedenster Ursachen genannt werden.

Der Verlust funktionellen Myokards bei koronaren Herzerkrankungen, genauso wie virale genetisch bedingte Kardiomyopathien, führen zu einer Einschränkung der Pumpleistung des Herzens [1, 2]. Die im Verlauf der beschriebenen Erkrankungen funktionsunfähig gewordenen Kardiomyozyten können im adulten Herzen nicht ersetzt werden, da, soweit bekannt, adulte Kardiomyozyten keine nennenswerte Proliferationskapazität mehr besitzen [3-6]. Konventionelle pharmakologische Behandlungen können den Verlust funktionsfähiger Herzmuskelzellen bisher nicht beheben. Aufgrund dieser unzureichenden Therapiemöglichkeiten stellen laut WHO Herzerkrankungen die häufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern dar. Die einzig mögliche Therapie terminal herzinsuffizienter Patienten ist heutzutage deshalb die Transplantation eines neuen Herzens. Die Verfügbarkeit an Spenderorganen ist allerdings sehr begrenzt.

Jüngere Forschungsansätze haben zum Ziel, geschädigte Myokardareale durch die Transplantation von Stammzellen mit kardialem Differenzierungspotential bzw. von aus Stammzellen *in vitro* generierten Kardiomyozyten zu regenerieren oder sogar durch bioartifizielles Myokard zu ersetzen [7].

Eine ähnliche Problematik stellt sich bei Verletzungen oder Erkrankungen im Bereich der Lunge ein. Neben angeborenen Surfactant Defizienzen, sind z. B. auch andere Lungenerkrankungen, wie z. B. die Cystische Fibrose, Lungenemphysem oder Lungenfibrosen durch die klassische Medizin momentan nicht ausreichend therapierbar. Neben den Fragen, ob und wie pathologisch veränderte Lungenstrukturen wiederhergestellt werden können, steht derzeit vor allem die Frage im Raum, ob funktionelle respiratorische Epithelzellen aus verschiedenen adulten und embryonalen Stammzelltypen generiert werden können.

Basierend auf diesem Hintergrund gibt es im Rahmen der Regenerativen Therapien verstärkte Bemühungen, eine effiziente Differenzierung von Kardiomyozyten bzw. Pneumozyten aus verschiedenen Stammzellpopulationen zu erreichen. Zu erwähnen bleibt allerdings, dass eine robuste Differenzierung bislang ausschließlich für embryonale Stammzellen gezeigt werden konnte [8-10]. Die Entstehung der gewünschten Zellpopulationen erfolgt hierbei bisher meist relativ ungerichtet und bis heute ist es nicht gelungen, eine Differenzierung so zu verbessern, dass keine spätere Aufreinigung der

differenzierten Zellen für den Erhalt einer reinen Zellkultur nötig wäre. Denkt man an einen späteren klinischen Einsatz der aus embryonalen Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten oder Pneumozyten, ist eine Aufreinigung dieser Zellen unumgänglich und aufgrund der beschriebenen Teratombildung residierender Zellen pluripotenten Charakters zwingend notwendig. Aufgrund von fehlenden Oberflächenantigenen ist eine Aufreinigung dieser Zellen derzeit jedoch nur schlecht durch z. B. ein Fluoreszenz Activated Cell Sorter (FACS) zu erreichen [11]. Zudem kommt bei den Kardiomyozyten noch ihre Größe erschwerend hinzu. Da bei der Aufreinigung durch ein FACS große Scherkräfte wirken, könnte das Prozedere die Herzmuskelzellen schwer schädigen und so zur Zerstörung der Funktionalität der Zellen führen. Es wäre auch möglich, durch einen Gradienten eine Anreicherung von Kardiomyozyten zu erzielen [7, 12]. Ein anderer Weg differenzierte Kardiomyozyten aufzureinigen ist die Verwendung von Stammzellen, welche Selektionsgene unter Kontrolle von kardiomyozytenspezifischen Promotoren tragen. Möchte man die undifferenzierten embryonalen Stammzellen vor der eigentlichen Differenzierung markieren und eine stabile Zelllinie herstellen, muss eine geeignete Methode gewählt werden, die zum einen einen effizienten Gentransfer erlaubt und zum anderen zu einer stabilen Transgenexpression führt. Am geeignetsten hierfür erwies sich der virale Gentransfer, insbesondere durch lentivirale Vektoren [13-15], die auch die schwerer zu transduzierenden embryonalen Stammzellen mit einer ausreichenden Effizienz infizieren können und im Vergleich zu klassischen retroviralen Vektoren zu einer sehr stabilen Genexpression auch in embryonalen Stammzellen führen.

1.1. Embryonale Stammzellen (ESCs)

Der Begriff Stammzelle ist eine allgemeine Bezeichnung für verschiedene Zellpopulationen, die nach dem Zeitpunkt ihrer Isolierung in Gruppen einzuteilen sind und die einige charakteristische Eigenschaften miteinander teilen. Man unterscheidet embryonale, fetale und adulte Stammzellen, die in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien eines eukaryonten Organismus zu finden sind [16]. Diese Zellgruppen besitzen entsprechend ihres eigenen Differenzierungsstatus verschiedene Eigenschaften, was ihre Möglichkeit zur weiteren Differenzierung betrifft. Man unterscheidet zwischen den totipotenten Zellen der Morula, den pluripotenten Zellen der inneren Zellmasse von Blastozysten, multipotenten Zellen und den uni- bzw. oligopotenten Zellen des adulten Organismus, die in nur eine oder wenige bestimmte Zelltypen differenzieren können. Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse präimplantierter Blastozysten gewonnen und sind in die Gruppe der pluripotenten Zellen

einzuordnen [17, 18]. Trotz des nur transienten Vorkommens der embryonalen Stammzellen *in vivo*, zeichnen sie sich *in vitro* unter den geeigneten Kultivierungsbedingungen durch die Fähigkeit zur uneingeschränkten Selbsterneuerung und dadurch bedingt zu einer unbegrenzten Proliferation aus. Außerdem besitzen embryonale Stammzellen die Fähigkeit in Zellderivate aller drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm zu differenzieren. Die Kultivierungsbedingungen der embryonalen Stammzellen hängen entscheidend von den verschiedenen Spezies ab, aus denen sie isoliert wurden [19].

Die erste embryonale Stammzelllinie (mESCs) wurde in den frühen 80ern durch Evans et *al.* aus einer Mausblastozyste isoliert [17]. 1996 folgte dann die erste embryonale Stammzelllinie einer Primatenspezies aus dem Rhesusaffen (RESCs) und 1998 die erste humane embryonale Stammzelllinie (hESCs). Beide Linien wurden durch Thomson et *al.* isoliert [20, 21].

Die Charakterisierung pluripotenter embryonaler Stammzelllinien wird in der Regel aufgrund folgender Kriterien durchgeführt:

- Überprüfung der Expression von Pluripotenzmarkern, wie Oct4 (*octamer binding gene 4*) [22], Nanog [23], Sox2 (*SRY-box containing gene 2*) [24, 25] und Rex 1 [26, 27].
- Kontrolle des Vorhandenseins typischer Oberflächenantigene wie SSEA-3 (*stage specific embryonic antigen*) und SSEA-4, sowie der Nachweis von TRA-1-60 (*tumor rejection antigen*) und TRA-1-81 bei embryonalen Stammzellen aus Primatenspezies und SSEA-1 bei embryonalen Stammzellen aus der Maus [28].
- Kontrolle der Aktivität von alkalischer Phosphatase [29] und Telomerase [30], die bei embryonalen Stammzellen sehr hoch sein sollte.
- Injiziert man embryonale Stammzellen in eine immundefiziente SCID Maus, entstehen so genannte Teratome. In diesen Teratomen lassen sich Zellderivate aller drei Keimblätter identifizieren [31].
- Bringt man embryonale Stammzellen in eine Blastozyste ein, entsteht in der weiteren Entwicklung ein chimärer Organismus [32]. Die Erfüllung dieses Kriteriums ist selbstverständlich nicht im Menschen möglich und wurde bisher nur im Mausmodell gezeigt.

1.2. Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten

Aufgrund ihrer Pluripotenz besitzen ESCs das Potenzial in alle Zelltypen des Körpers zu differenzieren. Dies schließt die Entwicklung zu funktionierenden Herzmuskelzellen ein.

Am längsten untersucht ist die kardiale Differenzierung von mESCs. 1985 wurde erstmals das Differenzierungspotenzial zu Kardiomyozyten nachgewiesen [33]. Die ersten aus ESCs einer Primatenspezies abgeleiteten funktionalen Kardiomyozyten, wurden 2001 von Kehat *et al.* für hESCs beschrieben [9].

Die Differenzierung von ESCs über die Formation eines so genannten Embryonalkörperchens (*Embryoid bodies*, EBs) in Suspension stellt die gebräuchlichste Art der Differenzierung dar [34]. In den EBs sind Zellderivate aller drei Keimblätter (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) enthalten [34]. Dieses manifestiert sich einige Tage nach dem Überführen der EBs auf adhäsive Kulturschalen durch das Auswachsen von Zellen verschiedener Morphologie. Die Differenzierung zu Herzmuskelzellen verdeutlicht sich durch die Bildung kontrahierender Areale. Da die bisher erzielten Effizienzen der Entstehung solcher *beating areas* nicht für den Einsatz in der Regenerativen Therapie ausreichen, wurde versucht, die bisherigen Protokolle zu verbessern. So ist eine Steigerung der Effizienz z. B. durch die Aktivierung von endogenen Transkriptionsfaktoren, den Einsatz von ausgesuchten Wachstumsfaktoren oder einer Kokultur mit Zelltypen, die über eine induzierende Wirkung verfügen, möglich. Um in Frage kommende Zusätze oder Transkriptionsfaktoren auszuwählen, sind Kenntnisse der *in vivo* Embryonalentwicklung des Mesoderms über kardiales Mesoderm bis hin zu Kardiomyozyten sehr wichtig.

So konnten bereits sehr früh vor allen Dingen die Differenzierungsprotokolle für mESCs deutlich in ihrer Effizienz verbessert werden. Basierend auf der Beobachtung, dass Mäuse, denen der Rezeptor für Retinolsäure fehlt, eine Missbildung in der Herzanlage aufweisen, gelang es Wobus *et al.* 1997 durch die Zugabe von Retinolsäure eine gesteigerte kardiale Differenzierung zu erzielen [35]. Auch Zusätze wie Stickoxid [36] und Ascorbinsäure [37] führten zu einer verbesserten kardialen Differenzierung. Des Weiteren wurden mögliche Transkriptionsfaktoren auf der Grundlage ihrer Funktion *in vivo* im *in vitro* Modell getestet. So konnte Behfar *et al.* 2002 zeigen, dass Mitglieder der *transforming growth factor* Familie (TGF β) wie TGF- β 1, *bone morphogenetic protein 2* (BMP2) und BMP4 positiv auf die kardiale Differenzierung wirken [38]. Als weiterer Faktor konnte zusätzlich zum BMP2, der *fibroblast growth factor 2* (FGF2) als induktiv für die kardiale Differenzierung nachgewiesen werden [39].

Auch die Kokultivierung von ESCs mit induktiven Geweben und Zelllinien führte zu einer Verbesserung der kardialen Differenzierung. So konnte durch die Kokultivierung mit anterioren prekardialen Endoderm und Mesoderm des Hühnchens einer Ausbeute von einhundert Prozent kontrahierenden EBs erzielt werden [40].

Eine andere Möglichkeit der Induktion der kardialen Differenzierung ist die ektopische Überexpression von Transkriptionsfaktoren, die essenziell für eine spezifische Differenzierung sind. So wurde gezeigt, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-4 und GATA-6 in mESCs zu einer Differenzierung von viszeralem Endoderm führt [41]. Grepin et al. zeigte, dass die Überexpression von GATA-4 zu einer gesteigerten Kardiogenese in P19 Zellen führt [42].

Alle bisher beschriebenen Verbesserungen der kardialen Differenzierung wurden an mESCs ausgetestet. Für hESCs wurde in Bezug auf eine Verbesserung bis vor kurzem nur eine Kokultivierung mit viszeralem Endoderm-ähnlichen Zellen (END-2 Zellen) veröffentlicht. Diese Zellen können sowohl die Differenzierung von murinen [16] als auch von humanen ES-Zellen beeinflussen [43, 44]. Die gewonnenen Kardiomyozyten weisen ein Genexpressionsmuster ähnlich dem fetaler Kardiomyozyten auf, gekennzeichnet durch Marker wie z. B. GATA-4, Nkx2.5, α -MHC, β -MHC und ANF [45, 46]. Auch die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Zellen sind mit denen fetaler Kardiomyozyten vergleichbar [6, 46, 47]. Ein bahnbrechender Schritt in der kardialen Differenzierung von hESCs gelang kürzlich der Arbeitsgruppe um Murry [7]. Sie zeigte, dass eine Steigerung der Differenzierungseffizienz durch eine zeitlich begrenzte Zugabe bestimmter induktiv wirkender Zytokine von 1% auf 30% möglich ist. Ein entscheidender Unterschied zu herkömmlichen Protokollen ist, dass die Differenzierung nach diesem Protokoll nicht über den Zwischenschritt in Suspension unter Ausbildung von EBs erfolgt, sondern in einem so genannten undifferenzierten *high-density* Monolayer. Die Induktion der Differenzierung erfolgt zunächst durch die Zugabe von Activin A, das nach 24 Stunden durch BMP4 ersetzt wird. Die hESC-abgeleiteten Kardiomyozyten wurden anschließend über einen Percoll Gradienten aufgereinigt und in einem Infarktmodell der Ratte erfolgreich in die geschädigten Areale des Herzens transplantiert [7]. Diese enorme Steigerung der kardialen Differenzierungseffizienz zeigt, dass die bisher erzielten geringen Differenzierungseffizienzen für ESCs aus Primatenspezies vor allen Dingen auf der Tatsache beruhen, dass die geeigneten Protokolle noch nicht zur Verfügung standen. Die von Murry et al. publizierten Protokolle geben jedoch große Hoffnungen, dass sich diese in sehr naher Zukunft ändern wird. Diese Tatsache und die darauf basierende erfolgreiche Transplantation der ESC-abgeleiteten Herzmuskelzellen unterstreichen, welche Bedeutung die ESCs für Regenerative Therapien künftig haben werden.

1.3. Differenzierung von ESCs zu Typ II Pneumozyten (AT2)

Ein Hauptaugenmerk bei der Differenzierung von ESCs zu Zellen des respiratorischen Traktes liegt auf der Differenzierung zu AT2 Zellen. Diese Zellen sind in der Lage auch nach Verletzungen stark zu proliferieren und Typ I Pneumozyten (AT1) zu regenerieren [48]. Sie stellen somit Vorläuferzellen für AT1 Zellen dar [49]. AT1 und AT2 Zellen sind zilienfreie Epithelzellen, die die Alveolen auskleiden. AT1 Zellen bilden eine dünne Diffusionsschicht zwischen dem Lumen des Atemwegs und dem pulmonalen Kapillarnetzwerk. Die AT2 Zellen synthetisieren Surfactant, das ein Kollabieren der Alveolen während der Respiration verhindert und somit eine wichtige Funktion beim Gasaustausch in der Lunge hat. Surfactant enthält neben verschiedenen Lipiden als essenzielle Bestandteile die Surfactant Proteine A, B, C und D, welche neben strukturellen Funktionen bei der Bildung von Lamellarkörperchen auch wichtige Surfactant Funktion vermitteln. Das Surfactant Protein C (SpC) ist das einzige Protein, welches spezifisch in AT2 Zellen exprimiert wird.

Arbeiten der Gruppe um A.E. Bishop wiesen bereits 2002 auf die Möglichkeit einer *in vivo* Differenzierung muriner ES-Zellen zu AT2- ähnlichen Zellen hin. Dabei erfolgte die Differenzierung in einem Serum-supplementierten Medium [50]. Außerdem berichtete dieselbe Gruppe, dass eine Steigerung der Differenzierungseffizienz durch die Umstellung des Protokolls auf ein Zwei-Phasen Protokoll erzielt werden könne. Im ersten Schritt erfolgte dabei die Differenzierungsinduktion in einem auf Serum basierenden Medium, dass in der zweiten Phase der Differenzierung durch ein serumfreies Activin A-haltiges Medium ersetzt wurde [51]. Activin A gilt als potenter Induktor zur Bildung von Zellen mesendodermalen Charakters [52-56]. Im Bereich von Kokultivierungsmodellen von mESCs konnten erste Daten von Differenzierungen zu AT2 ähnlichen Zellen gezeigt werden [57]. Diese Daten bedürfen aber noch einer detaillierten Bestätigung.

Neben der Differenzierung von mESCs zu AT2 ähnlichen Zellen, wurden auch von Differenzierungen von hESCs in diese Richtung berichtet [58, 59].

Im Bereich der Differenzierung von ESCs zu AT2 ähnlichen Zellen ist, aufgrund der geringen Effizienzen, eine Verbesserung der bisher bestehenden Protokolle notwendig. Wie schon im Bereich der kardialen Differenzierung von ESCs beschrieben, ist auch hier ein wichtiger Ansatz, die für die *in vivo* Entwicklung wichtigen Faktoren besser zu verstehen. Entwicklungsstudien weisen darauf hin, dass einige aus dem distalen Lungenmesenchym freigesetzten Faktoren wichtig sind [60-67]. Die genauen Schlüsselfaktoren sind allerdings bisher nicht genau zu benennen.

In Hinblick auf einen späteren klinischen Einsatz im Rahmen Regenerativer Therapien sind die bislang erzielbaren Differenzierungseffizienzen ES-Zell abgeleiteter Herzmuskelzellen und AT2 Zellen bei weitem nicht ausreichend. Um eine ausreichende Menge an entsprechend differenzierten Zellen zur Verfügung stellen zu können, muss die Effizienz der Differenzierungsprotokolle entscheidend verbessert werden. Des Weiteren kann eine nachfolgende Aufreinigung der Zellen neben einer Anreicherung des gewünschten Zelltyps auch zur Vermeidung einer Teratombildung durch undifferenzierte Zellen führen. Wie bereits erwähnt, könnten stabile ESC-Linien, die durch eine genetische Veränderung eine solche Selektion bzw. Anreicherung zulassen, eine gute Möglichkeit darstellen.

1.4. Gentransfer in embryonale Stammzellen (ESCs)

Aufgrund ihrer Eigenschaften sind ESCs ein wichtiges Modellsystem für die Entwicklungsbiologie und viel versprechende Zellquellen für die Entwicklung und Austestung von Medikamenten sowie für Regenerative Therapien. Grundvoraussetzung für viele Anwendungen ist allerdings eine effiziente Anreicherung der gewünschten Zellderivate. Wie im Falle von Herzmuskelzellen und AT2-Zellen, wird so trotz Mangel an entsprechenden Oberflächenantigenen [11] eine selektive Anreicherung durch die Verwendung von zelltypspezifisch exprimierten Transgenen ermöglicht. Für den Gentransfer in mESCs wurden bereits verschiedene nicht-virale Methoden beschrieben. Diese lassen sich allerdings nur sehr schlecht auf hESCs übertragen. So kann für die genetische Manipulation von murinen embryonalen Stammzellen z. B. die Methode der Elektroporation eingesetzt werden, wie von Thomas et *al.* beschrieben [68]. Für hESCs ist diese Methode jedoch eher wenig geeignet, da von den eingesetzten Zellen nur sehr wenige die Elektroporation überleben [69]. Auch die Methode der Lipofektion führte bei humanen embryonalen Stammzellen im Gegensatz zu den murinen Zellen nicht zu hohen Transfektionsraten [70]. Die Gentransfermethode der Nukleofektion, eine auf der Elektroporation basierenden Methode, bei der ein spezifischer Nucleofektor und elektrische Parameter zum Einsatz kommen [71, 72], führten ebenfalls zu geringen Transfektionseffizienzen [69]. Das liegt vor allem daran, dass die zytotoxischen Effekte dieser Methode zu einer hohen Zellmortalität führen [73, 74]. Die beschriebenen Methoden sind transient und führen nur zu sehr wenigen stabil transfizierten Zellklonen [69, 71, 72]. Für die Herstellung von stabilen ESC Linien sind diese transienten Methoden also eher ungeeignet.

Eine andere Möglichkeit des Gentransfers ist der virale Gentransfer. Neben anderen viralen Vektoren, wie Vektoren abgeleitet von Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren, klassischen Retroviren und Herpesviren werden auch Vektoren abgeleitet vom Lentivirus verwendet.

Lentivirale Vektoren, stellen gegenüber nicht-viralen Ansätzen eine effiziente Gentransfermethode für den Einsatz in ESCs dar. Sie transduzieren effizient murine, humane und auch nicht embryonale Stammzellen aus Primatenspezies [13-15, 70] sowie auch adulte Stamm- und Progenitorzellen [75-77]. Die lentiviralen Vektoren können zudem noch für die Transduktion von terminal differenzierten Zellen eingesetzt werden, wie z. B. aus ES-Zellen abgeleiteten Neuronen, Hepatozyten und kardialen Myozyten [78-80]. Ein großer Vorteil der Transduktion mit lentiviralen Vektoren ist die Integration der transferierten Expressionskassette mit dem gewünschten Transgen in das Genom der Zielzelle, was wiederum zu einer stabilen Expression des Transgens führt. Dieser Aspekt ist im Hinblick auf die Etablierung von stabil exprimierenden embryonalen Stammzelllinien sehr wichtig.

Die Verwendung von lentiviralen Vektoren stellt also eine viel versprechende Möglichkeit für die Herstellung von stabilen ESC-Linien dar, die eine Selektion bzw. Anreicherung verschiedener Zielzellen zulassen.

1.5. Lentiviraler Gentransfer

1.5.1. Lentiviren

Die Unterfamilie der Lentiviren mit dem Genus Lentiviren gehört zur Familie der Retroviren und stellt die Gruppe mit dem komplexesten Aufbau dar. Lentiviren beinhalten unter anderem die humanen Immundefizienzviren (HIV-1/HIV-2) [81-84], Affen-Immundefizienzviren (SIV) [85, 86], das Katzen-Immundefizienzvirus (FIV), das Rinder-Immundefizienzvirus (BIV), das Visna-Maedi-Virus der Schafe, das Virus der infektiösen Anämie der Pferde (EIAV) und das Arthritis-Enzephalitis-Virus der Ziegen (CAEV). Alle diese Viren sind exogen und sind nicht in der Keimbahn der Wirtsspezies verankert. Lentivirale Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 100nm, das Capsid hat eine ikosaedrische bis konische Form [87, 88] und ist von einer Hüllmembran umgeben, mit der die viralen Glykoproteine assoziiert sind [89].

Das Genom aller Retroviren einschließlich der Lentiviren besteht aus einzelsträngiger RNA, die mit einer 5'-Cap-Struktur und der 3'- Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryontischen mRNA aufweist. Das Genom dieser Viren ist ca. 9kb groß.

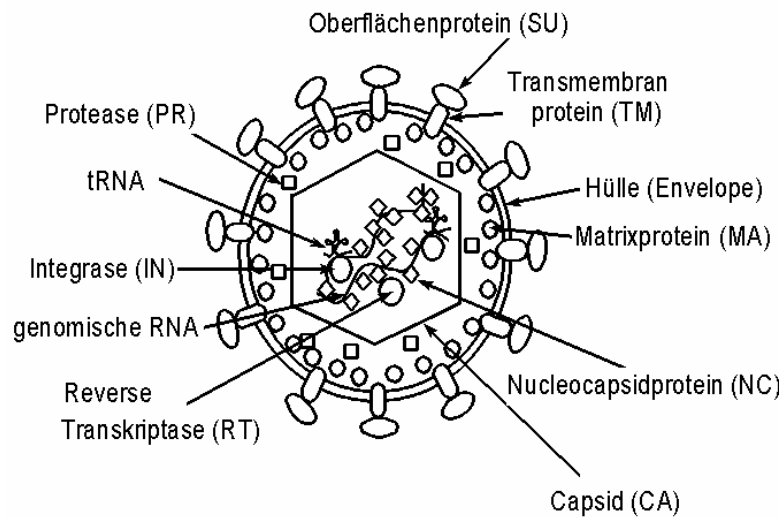


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines retroviralen Viruspartikels

1.5.3. Der Infektions- und Replikationszyklus des HIV-1 bzw. SIV

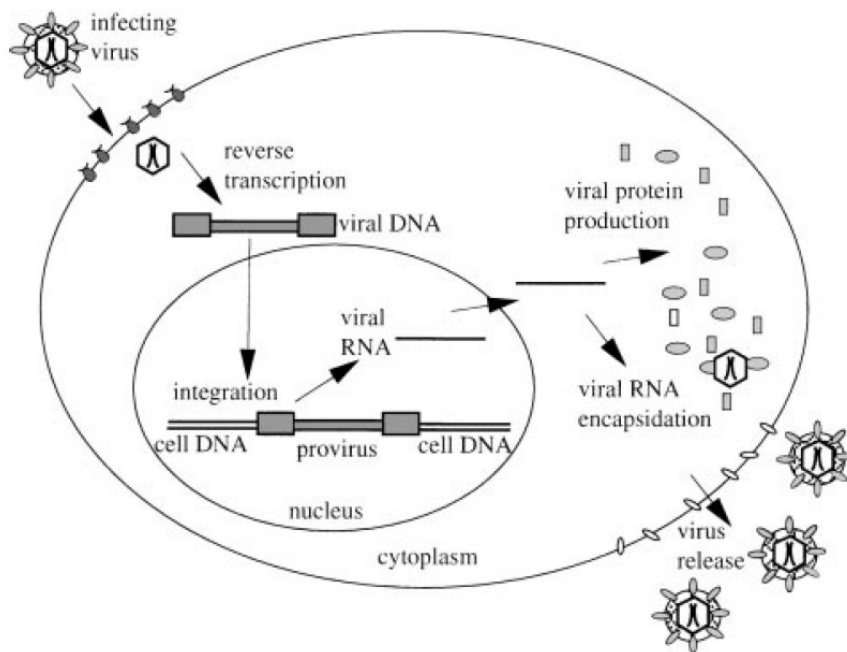


Abb. 2: Schematische Darstellung des Infektionszyklus eines Retrovirus

Aus "Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases" Gary L. Buchsacher, Jr, and Flossie Wong-Staal; Blood, 15 April 2000 Volume 95, Number 8 p.2499-2504

Die Infektion einer Zielzelle durch HIV-1 bzw. SIV_{mac} (Affenimmundefizienzvirus hier speziell der Macaque) beginnt mit der Bindung des Hüllproteins gp120 an den CD4-Rezeptor auf der Zielzelle. Außerdem bindet das gp120 gleichzeitig auch an einen Korezeptor, der bei diesen Viren einen bestimmten Tropismus bedingt. Diese Korezeptoren sind Chemokinrezeptoren. Für das HIV-1 sind zwei verschiedene Chemokinrezeptoren bekannt [90], der alpha Chemokinrezeptor CXCR4, der auf Lymphozyten zu finden ist [91] und der beta Chemokinrezeptor CCR5, der auf Makrophagen zu finden ist [92]. Bei SIV und auch HIV-2 werden als Korezeptoren der Chemokinrezeptor CCR5 [93] und verschiedene andere Korezeptoren vergleichbar mit CXCR4 und CCR5 gebunden [94, 95].

Die Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor und dem Korezeptor bildet den *ternary complex*. Dieser Komplex führt zur Konformationsänderung des gp41 [90, 96-98]. Diese Konformationsänderung legt die Ectodomänen des gp41 frei, bestehend aus hoch hydrophoben N-Termini, den Fusionspeptiden [94]. Es folgt das Entpacken des Virus in der Wirtszelle. Nach der Bildung des reversen Transkriptionskomplexes, bestehend aus dem viralen RNA-Genom, tRNA-Primern und den viralen Proteinen reverse Transkriptase, Integrase, der Matrix, dem Nucleocapsid, dem viralen Protein Vpr beim HIV-1 und Vpx beim SIV und Wirtsproteinen bindet dieser Komplex stabilisiert durch Vif an Aktinfilamente des Zytoskeletts, wo schließlich die reverse Transkription stattfindet [99].

Nach der reversen Transkription bildet sich der Präintegrationskomplex bestehend aus doppelsträngiger viraler cDNA, Integrase, Matrix, Vpr, der reversen Transkriptase und dem *high mobility group* DNA bindenden Protein [100]. Dieser Präintegrationskomplex wird aktiv in den Kern eingeschleust. Es ist also kein vorheriger Abbau der Kernhülle nötig, wie es z. B. bei den Retroviren der Fall ist. Für den aktiven nukleären Import sind drei Komponenten sehr wichtig, die Integrase [101], das Vpr [102] und das Matrixprotein [103].

Im Kern werden die LTR's von der Integrase erkannt und die virale cDNA wird durch die Erzeugung von 5'Überhängen und Schnitten im Wirtszellgenom integriert. Man spricht dann von einem Provirus.

Es folgt die Transkription der viralen Gene, der Zusammenbau und die Freisetzung infektiöser Viruspartikel.

1.5.4. Aufbau und Entwicklung lentiviraler Vektoren

Die lentiviralen Vektoren haben gegenüber allen anderen viralen Vektoren eine Vielzahl von Vorteilen. Hauptsächlich werden Vektoren, die sich vom humanen Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) ableiten standardmäßig verwendet. Sie transduzieren sowohl nicht proliferierende Zellen als auch stark

proliferierende Zellen effizient und stabil. [78, 79, 104]. Anders als bei den oft verwendeten adenoviralen Vektoren kommt es des Weiteren bei der Transduktion mit lentiviralen Vektoren zur Integration der Expressionskassette in das Genom der Zielzelle, was eine stabile Transgenexpression zur Folge hat. Außerdem können relativ hohe Insertgrößen von mehr als 8 kb in einen lentiviralen Partikel verpackt werden [105]. Ein weiterer Vorteil der lentiviralen Vektoren ist das, nur im geringen Maße zu beobachtende *gene silencing*, anders als bei den ebenfalls verwendeten onkoretroviralen Vektoren [106].

Die Konstruktion von lentiviralen Vektoren basiert auf der Separation von *cis*-aktiven Sequenzen, die für den Transfer des viralen Genoms in die Zielzelle benötigt werden und den *trans*-aktiven Sequenzen, die für die viralen Proteine kodieren [107]. Lentivirale Vektoren wurden ursprünglich als replikationsdefekte, hybride virale Partikel entworfen, bei denen lediglich die Core Proteine und die Enzyme des HIV-1 genutzt wurden. Die Hüllproteine wurden von anderen Viren geliefert, z. B. vom Vesiculären Stomatitis Virus (VSV) [108]. Diese Pseudotypisierung führt zu einer gesteigerten Infektionsrate durch die Infektion vieler verschiedener Zellen. [108].

Durch verschiedene im Laufe der letzten Jahre durchgeführte Modifikationen wurde bei der Verwendung von lentiviralen Vektoren ein hoher Stand der Sicherheit erreicht, da alle Gene, die verantwortlich für die Pathogenität sind oder nicht unbedingt als regulatorisches Element benötigt werden, deletiert wurden. Für die Herstellung von lentiviralen Partikeln sind, abhängig vom Entwicklungszeitraum, drei (2.Generation) bzw. vier Plasmide (3.Generation) nötig. Zu diesen Plasmiden gehören das (die) Verpackungsplasmid(e), der Transfervektor und das Hüllplasmid. Die Entwicklung der Verpackungsplasmide fand in 3 Stufen statt. Das Verpackungssystem der ersten Generation enthielt neben einem Plasmid für die Expression eines Hüllproteins, z. B. des VSV-G-Proteins, ein zweites Plasmid, von dem Gag und Pol, sowie regulatorische und akzessorische Proteine (Rev, Tat, Vif, Nef, Vpr, Vpu) unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurden. In der 2. Generation wurden alle Gene, die nicht essenziell für die Infektiosität, aber für die Pathogenität essenziell sind (Vif, Nef, Vpr, Vpu), deletiert. Die Effizienz der Infektion der Viruspartikel, die mit diesem Verpackungskonstrukt hergestellt wurden, war *in vivo* und *in vitro* vergleichbar mit der Effizienz der direkt vom Wildtyp abgeleiteten Vektoren [109]. Verpackungsplasmide der 3. Generation wurden durch Dult et al. eingeführt. Diesen Verpackungsplasmiden fehlt das *tat* und das *reverse* Gen. Das *reverse* Protein wird von einem weiteren Expressionskonstrukt geliefert [80]. Das Fehlen des *tat* Gens wird durch einen konstitutiven Promotor, der einen Teil der Upstream LTR im Transfervektor ersetzt,

ausgeglichen [80]. Die 3. Generation von Verpackungsplasmiden stellte eine weitere Verbesserung der Sicherheit der lentiviralen Vektoren dar. Da das Rev- Protein für die Expression von *tat*- und *pol*- Genen benötigt wird, würden Rekombinationen zwischen Verpackungsplasmid und Transfervektor außerhalb der Virus produzierenden Zelle nicht funktionell sein [80]. Außerdem bindet das *reverse* Protein an das *reverse responsive element* (RRE), verbindet es mit dem nukleären Export Faktor Exportin-1 (CRM) und verstärkt so den cytoplasmatischen Export von ungespleißten und einfach gespleißten viralen Transkripten, die die späten viralen Proteine exprimieren. Dieses Problem wurde durch den Ersatz der RRE durch ein konstitutives RNA Transport Element von anderen Viren gelöst [107].

Nach einer Kotransfektion der entsprechenden Plasmide in HEK293T-Zellen kommt es im Anschluss zur Produktion von Viruspartikeln, die in den Zellkulturüberstand abgegeben werden.

Auch die Transfervektoren wurden in Bezug auf die Sicherheit verbessert. Es wurden die Selbst Inaktivierenden Vektoren entwickelt, die sogenannten SIN Vektoren. Diese Vektoren weisen eine Deletion in der 3'Region der LTR auf. Diese Deletion beinhaltet die TATA-Box und wird während der reversen Transkription auch auf die 5'LTR des Provirus übertragen. So verliert die LTR ihre Promotor Aktivität. Eine negative Auswirkung auf den Titer der Viruspartikel oder die Transgenexpression *in vitro* wurden nicht beobachtet [110]. Die SIN-Vektoren minimieren die Möglichkeit der Entstehung von replikationskompetenten Rekombinanten durch die Mobilisierung des Vektors und die daraus mögliche Rekombination mit Wildtyp Virus [111] und vermindern das Risiko von Onkogen Aktivierungen durch Promotor Insertion [107]. Außerdem weisen sie einen weiteren Vorteil auf: sie können das Transgen nur über interne Promotoren exprimieren. Diese Tatsache erlaubt den Gebrauch von gewebsspezifischen und regulierbaren Promotoren ohne eine Interferenz der LTR-Aktivität [107]. Zusätzlich führte eine weitere Modifikation des Transfervektors zu einer gesteigerten Infektiosität der SIN-Viruspartikel, die mit der des Wildtyp Virus vergleichbar ist [112, 113]. Die so modifizierten Vektoren werden als *advanced* Vektoren bezeichnet. Die *advanced* Vektoren enthalten eine als „DNA-Flap“ bezeichnete Sequenz. Bei der reversen Transkription erfolgt eine zentrale Strangverschiebung. Diese wird durch den zentralen Polypurin Trackt (cPPT) und die zentrale Terminationssequenz (CTS) kontrolliert [114]. Der 99 Nukleotide lange „DNA Flap“ spielt vermutlich aufgrund einer durch ihn ermöglichten Faltung des Präintegrationskomplexes beim Kernimport eine entscheidende Rolle [115].

In der vorliegenden Arbeit wurden abweichend von den standardmäßig verwendeten HIV-1 basierten Vektoren auch SIV_{mac} basierte Vektoren verwendet. Der Einsatz von SIV_{mac} abgeleiteten lentiviralen Vektoren wurde notwendig, da neben einem Transduktionsprotokoll für mESCs auch RESCs transduziert werden sollten. In Zellen des Rhesusaffen findet zwar zunächst eine Infektion mit

anschließender Penetration des HIV-1 statt, aber nachfolgend kommt es zu keiner reversen Transkription der viralen RNA. Diese speziesspezifische Restriktion basiert auf repressiven Faktoren [116-118], die auf das eindringende Virus Capsid zielen [116, 118, 119]. Die Proteine TRIM5 α [120] und das Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like (APOBEC) 3 Protein [121] wurden bisher als HIV-1 blockierende Faktoren identifiziert. TRIM5 Isoformen werden in vielen Geweben konstitutiv exprimiert und sind dort in cytoplasmatischen Vesikeln gespeichert [120]. Ihre Funktion innerhalb der Zelle ist bisher noch ungeklärt. Das TRIM5 α und das APOBEC3G Protein verhindern die reverse Transkription des HIV-1 [122, 123] und somit eine Integration der viralen cDNA ins Wirtsgenom. So konnte konträr zu den Ergebnissen von HIV-1 gezeigt werden, dass eine Infektion durch SIV_{mac} im Rhesusaffen ungehindert stattfinden und nicht durch das TRIM5 α des Rhesusaffen blockiert werden kann [124].

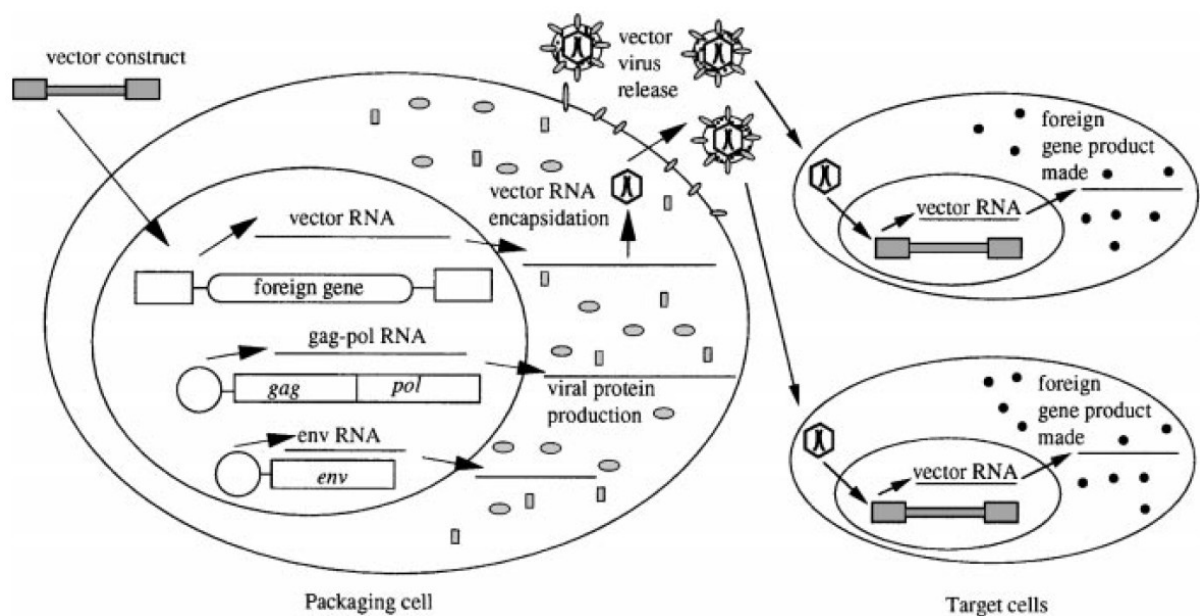


Abb. 3: Schematische Darstellung der Herstellung infektiöser Viruspartikel und die Infektion von Zielzellen
 Aus "Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases" Gary L. Buchsacher, Jr, and Flossie Wong-Staal; Blood, 15 April 2000 Volume 95, Number 8 p.2499-2504

1.6. Shuttle System pLentiShuttle

Trotz der vielen Vorteile der lentiviralen Vektoren stellt die Herstellung dieser Konstrukte eine große Herausforderung dar.

Ein Problem bei der Herstellung von lentiviralen Vektoren ist die Vektorgröße, die zu geringen Klonierungseffizienzen verglichen mit Standard *high copy* Plasmiden führt. Daneben kommt es zu hohen Rekombinationsraten und für das Klonieren neuer DNA-Fragmente stehen nur wenige Restriktionsschnittstellen zur Verfügung.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde deshalb ein System zur Lösung dieses ausgesprochen schwierigen Problems entwickelt.

Aufgrund der hohen Rekombinationsrate von lentiviralen Vektoren können für die Vermehrung dieser Vektoren nur rekombinationsdefiziente Bakterienstämme, z. B. die von Invitrogen hergestellten ElectroMax Stbl4 Bakterien, verwendet werden. Die Verwendung dieser Bakterien verlängert die Klonierung von lentiviralen Vektoren, da diese Bakterien nur bei geringen Temperaturen wachsen dürfen, um eine Rekombination zu verhindern. Zudem ist eine eigene Herstellung dieses kompetenten Bakterienstamms nicht möglich und der Erwerb der Bakterien mit zusätzlichen Kosten verbunden. Trotz der Verwendung dieses besonderen Bakterienstamms kann eine Rekombination nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher war eine Veränderung des Klonierungssystems von großem Vorteil. Die wichtigste Veränderung war das Einführen der Restriktionsschnittstellen für die Meganukleasen I-*Ceu* I und PI-*Sce* I in den lentiviralen Basisvektor [125]. Diese Meganukleasen haben Erkennungssequenzen von 26bp bzw. 19bp Länge und sind normalerweise nicht in den zu klonierenden Sequenzen aus Vertebraten, Viren oder innerhalb von Plasmidsequenzen vorhanden. Ein häufigeres Vorkommen dieser Restriktionsschnittstellen in den zu klonierenden Sequenzen ist somit nahezu ausgeschlossen. Diese Restriktionsschnittstellen wurden auch in das Standard high copy Plasmid pBShuttle eingebracht. Die Restriktionsschnittstellen flankieren den Bereich der *multiple cloning* Sequenz, in der die Expressionskassette aufgrund der ausreichend vorhandenen Restriktionsschnittstellen hergestellt werden kann. So können die Expressionskassetten erst in dem leicht zu vermehrenden Shuttle Vektor pBShuttle fertig gestellt werden. Für dieses Plasmid können die selbst herzustellenden TOP10 Bakterien verwendet werden, mit denen man schnell eine ausreichende Menge an Plasmid produzieren kann. Erst der letzte Schritt der Klonierung in den lentiviralen Vektor macht die Verwendung der ausschließlich kommerziell erhältlichen ElectroMax Stbl4 Bakterien nötig.

Als Grundlage für die Etablierung des pLentiShuttle Systems diente das SIN-Transferplasmid pHR`SINcPPT-CMVP eGFP WPRE. Es zählt zu der „advanced Generation“ (freundlicherweise von D. Trono, Universität Genf zur Verfügung gestellt). Das Rückgrad dieses Vektors basiert auf HIV-1.

pHR`SINcPPT CEW 9897 bp

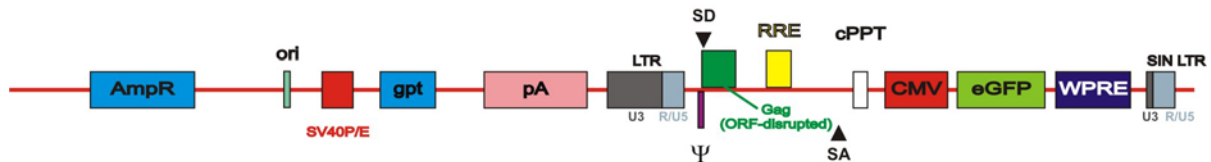


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ausgangsvektor pHR`SINcPPT-CMVP eGFP WPRE

Amp = Ampicillinresistenz, ori = Startpunkt der Replikation, SV40 P/E = Promoter/Enhancer von SV40, gpt = Guaninphosphoryltransferase, pA = Polyadenylierungssignal, LTR = long terminal repeats, R = redundant, U = Unique, SD = Spleißdonorstelle, RRE = rev responsive element, cPPT = central polypurine tract, ψ = Verpackungssignal, CMV = CMV Promotor, eGFP = enhanced GFP, WPRE = posttranscriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus

Ausgehend von diesem Transfervektor (pHR`SINcPPT-CMVP eGFP WPRE), wurde der lentivirale Transfervektor pLentiShuttle H (H für HIV-1 abgeleitet) generiert. Im Ausgangstransfervektor wurde dazu die Expressionskassette deletiert und die Restriktionsschnittstellen für die homing Restriktionsendonukleasen *PI-Sce I* und *I-Ceu I* aus dem Shuttle Vektor pShuttle der Firma Clontech eingeführt. Zu dem entwickelten Shuttle System gehören zusätzlich zum Transfervektor pSh H auch die Shuttle Vektoren pShuttle der Firma Clontech und der modifizierten Variante pBSh (abgeleitet vom *high copy* Plasmid pBluescript II SK (-)). Diese Vektoren haben den Vorteil, dass sie keine LTRs enthalten, durch die eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Rekombination gegeben wäre. Auch diese Vektoren beinhalten die homing Restriktionsendonukleasen, zwischen denen die Expressionskassette für den späteren Transfervektor fertig gestellt werden kann. Die innerhalb der viel kleineren Shuttle Vektoren fertig gestellten Expressionskassetten können dann in einem einzigen Klonierungsschritt in den Transfervektor eingebracht werden.

Bei der Herstellung der Expressionskassetten wurde als Enhancerelement die regulatorische Sequenz aus dem *Woodchuck* Hepatitis Virus (WPRE) hinter das Transgen kloniert, was zu einer Verbesserung der Expression führte. Das WPRE wurde in die 3'untranslatierte Region (UTR) der codierenden Sequenz inseriert und steigert so posttranskriptional in onkoretroviralen und lentiviralen Vektoren abhängig von Transgen, Promotor und Vektor die Höhe der Expression des Transgens [35]. Die GFP-Expression kann durch das WPRE um das 5 bis 8 Fache gesteigert werden [35]. Die Orientierung des WPRE muss bei der Klonierung beachtet werden, da sie nur in *sense* Orientierung eine Verbesserung der Expression zeigt.

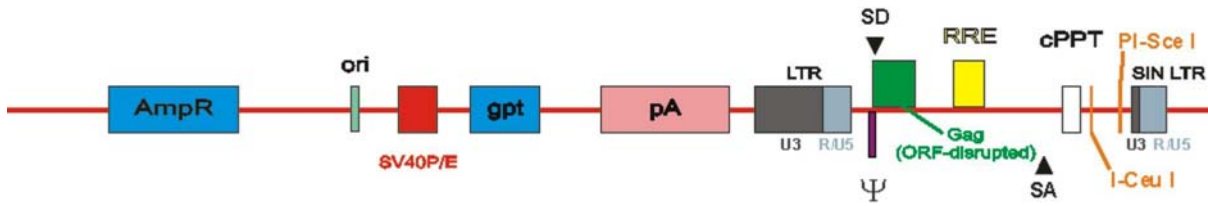


Abb. 5: Schematische Darstellung des lentiviralen Transfervektors pSh H

Amp = Ampicillinresistenz, ori = Startpunkt der Replikation, SV40 P/E = Promotor/Enhancer von SV40, gpt = Guaninphosphoryltransferase, pA = Polyadenylierungssignal, LTR = long terminal repeats, R = redundant, U = Unique, SD = Spleißdonorstelle, RRE = reverse responsive element, cPPT = central polypurine tract, ψ = Verpackungssignal

Für die eigentliche Virusproduktion wurden zusätzlich zum oben beschriebenen Transferplasmid pSh H das Hüllplasmid pMD2.G und das Verpackungsplasmid der zweiten Generation psPAX2 verwendet.



pMD2.G 5824 bp

Abb. 6: Schematische Darstellung des Hüllplasmids pMD2.G

CMV = Promotor/Enhancer des Zytomegalovirus, β Glo = β -Globin-Intron, VSV-G = Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus, pA = Polyadenylierungssignal, Ampr = Ampicillinresistenzgen

Das Hüllplasmid pMD2.G codiert das Gen für das G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus. Aufgrund des heterologen G-Proteins kann mit den hergestellten Viruspartikeln eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen transduziert werden.



psPAX2 10703 bp

Abb. 7: Schematische Darstellung des Verpackungsplasmids psPAX2

Ce = Enhancer des Zytomegalovirus, caPro = Chicken beta actin Promotor, SD = Spleißdonorstelle, CaIntro = Chicken beta actin Intron, SA = Spleißakzeptorstelle, gag = group antigen, pro = Protease, pol = Polymerase, dEnv = bestehend aus Tat und Rev, RRE = reverse responsive element, pA = Polyadenylierungssignal, SV40P/E = simian virus 40 Promotor/Enhancer, Ampr = Ampicillinresistenzgen

Das Verpackungsplasmid psPAX2 codiert für die lentiviralen Proteine Gag, Pol, Rev und Tat. Es wurde hier ein Verpackungsplasmid der zweiten Generation verwendet, da die hergestellten viralen Partikel

nicht für eine klinische Anwendung vorgesehen sind. Mit diesem Hintergrund wurde auf die zusätzlichen Sicherheitsmaßnahmen der Vektoren der dritten Generation zugunsten höherer Virustiter verzichtet. Das beschriebene Shuttle System wurde auch auf die in dieser Arbeit verwendeten Transfervektoren abgeleitet vom SIV_{mac} übertragen, welche vom SIV_{mac} abgeleitet sind. Dazu wurden die Schnittstellen für die homing Restriktionsendonukleasen *PI-Sce I* und *I-Ceu I* in den Ausgangstransfervektor pSIV_{RMES}GAE (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS Lyon France) eingeführt. Der so entstandene Transfervektor wurde als pSh S (S für abgeleitet vom SIV_{mac}) bezeichnet. Auch hier wurden die Expressionskassetten in den kleineren Shuttle Vektoren hergestellt und dann in den Transfervektor in einem Schritt umkloniert.

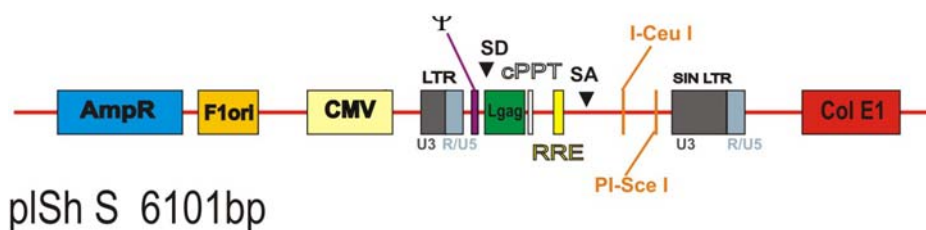


Abb. 8: Schematische Darstellung des lentiviralen Transfervektors pSh S

Amp = Ampicillinresistenz, ori = Startpunkt der Replikation, SV40 P/E = Promotor/Enhancer von SV40, gpt = Guaninphosphoryltransferase, pA = Polyadenylierungssignal, LTR = long terminal repeats, R = redundant, U = Unique, SD = Spleißdonorstelle, RRE = reverse responsive element, cPPT = central polypurine tract, ψ = Verpackungssignal

Als Verpackungsplasmid wurde das Plasmid pSIV3+ [126] verwendet, welches ebenfalls freundlicherweise von Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS Lyon France zur Verfügung gestellt wurde.

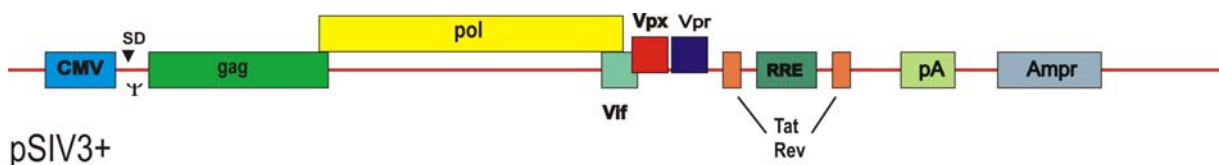


Abb. 9: Schematische Darstellung des Verpackungsplasmids PSIV3+ (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS Lyon France)

CMV = Promotor/Enhancer des Zytomegalovirus, SD = Spleißdonorstelle, gag = group antigen, pol = Polymerase, RRE = reverse responsive element, pA = Polyadenylierungssignal, Ampr = Ampicillinresistenzgen

Als Hüllplasmid wurde das für die Herstellung der lentiviralen Vektoren abgeleitet von HIV-1 beschriebene Hüllplasmid pMD2.G verwendet.

1.7. Promotoren für die Detektion und die Selektion ES-Zell abgeleiteter Herzmuskelzellen und AT2 Zellen

Nachdem man mit Hilfe des Shuttle Systems eine sehr effiziente Möglichkeit besitzt, lentivirale Vektorkonstrukte, die für die Herstellung von stabilen ESC-Linien verwendet werden könnten, herzustellen, müssen nun geeignete Promotoren für die Transgenexpression ausgewählt werden.

Die Wahl der verwendeten Promotoren ermöglicht sowohl die Identifizierung und Aufreinigung früher Vorläuferzellen als auch terminal differenzierter Zellen des gewünschten Zelltyps. Basierend auf dem Genexpressionsmuster des sich entwickelnden Organismus kommen dafür verschiedene kardiale bzw. lungeneithelspezifische Marker in Betracht.

Für die Selektion von Kardiomyozyten kommen z. B. der Nkx2.5 Promotor für frühe Kardiomyozyten, der α - Aktin Promotor und der α - MHC (myosin heavy chain) Promotor als allgemeine Marker für verschiedene Kardiomyozytensubtypen oder der ANF bzw. der MLC2v (ventrikulärer Myosin light chain-2) Promotor für die Selektion von ausgereiften Kardiomyozytensubtypen in Betracht. Der α - Aktin Promotor, der α - MHC Promotor und der MLC2v Promotor wurden schon erfolgreich zur Anreicherung von aus ESCs gewonnenen Kardiomyozyten verwendet werden [6, 35, 47, 127-129]. Der ANF-Promotor kam bisher nur in neonatalen Rattenkardiomyozyten zur Anwendung [130].

Für eine spätere Verwendung der aus ESCs gewonnenen Kardiomyozyten wäre eine Anreicherung von Kardiomyozytensubtypen von Vorteil, um eine gezielte Therapie von zerstörten Arealen im Herzen zu gewährleisten. Obwohl bisher keine vollständige Entwicklung von atrialen bzw. ventrikulären Kardiomyozyten *in vitro* erzielt werden kann, ist davon auszugehen, dass dies durch die Weiterentwicklung der Differenzierungsprotokolle in naher Zukunft möglich sein dürfte. Daher wurden die gewebetypspezifischen Promotoren ANF und MLC2v auf eine Anwendung zur Selektion von atrialen bzw. ventrikulären Kardiomyozyten getestet.

Im Bereich der Lunge ist über die Marker und damit über die verwendbaren Promotoren zur Selektion von Vorläufern oder unreifen Stadien der AT2 Zellen wenig bekannt. Der AT2 Zellen spezifische SpC Promotor konnte schon erfolgreich für die Herstellung transgener Mäuse eingesetzt werden [131] und könnte daher ein geeigneter Promotor für die Selektion und Anreicherung von aus ESCs differenzierten AT2 Zellen darstellen.

1.7.1. Der Atriale Natriuretische Faktor (ANF) Promotor

Der Promotor des Atrialen Natriuretischen Faktors (ANF) steuert das Gen eines Peptidhormons, das eine diuretische, natriuretische und eine vasodilatatorische Wirkung aufweist.

Der ANF-Promotor besitzt in der -35bp Region eine TATA-Box und in der -94bp Region eine Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5. Im Anschluss an eine AT-reiche Sequenz folgt die Erkennungsstelle für GATA-4, sowie mehrere E-Box [132] und T-Box Motive [133]. Außerdem beinhaltet der ANF-Promotor die -700bp stromaufwärts liegenden Sequenzen des ANF Enhancers. Im *Xenopus*-Modell wurden in der Promotorregion weitere Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren *serum response factor* (SRF) und *myocyte-specific enhancer-binding factor-2* (MEF2C) identifiziert [134]. Es konnte durch Atlas *et al* gezeigt werden, dass Deletionsmutanten ab -136 bp stromaufwärts zu einer Expression von ANF in nicht-kardialen Zellen führt. Es wird daher vermutet, dass diese Region essenziell für die Kardiomyozyten spezifische Expression des ANF Promotors ist [134].

Die Sequenzen des ANF Promotors und somit auch der hier verwendete humane ANF-Promotor sind evolutionär hoch konserviert, weswegen der Promotor Spezies übergreifend in Säugetieren wie Ratte, Mensch, Maus oder Rind anwendbar ist [135].

Im Verlauf der Embryonalentwicklung des Herzens wird ANF das erste Mal während der frühen Herzscheidenbildung auf der ventralen Seite exprimiert. Die Expression verlagert sich dann im Verlauf der Herzentwicklung auf den linken Ventrikel und die Atrien. Im adulten Herzen findet die Expression von ANF ausschließlich im Atrium statt [136]. Daher kann dieser Promotor für die Selektion und die Anreicherung von atrialen Herzmuskelzellen verwendet werden.

1.7.2. Der ventrikuläre Myosin light chain-2 (MLC2v) Promotor

Die *Myosin Light Chain* (MLC) Gene kodieren für die leichte Kette des Myosinmoleküls und kommen in allen glatten und quer gestreiften Muskelzellen vor. Die Isoformen des MLC2 kommen ausschließlich in der quer gestreiften Muskulatur vor, wobei MLC2A im Atrium des Herzens exprimiert wird [137] und das MLC2V im Ventrikel [129]. Die meisten Untersuchungen zum Aufbau des MLC2V Promotors wurden bisher an der Ratte und dem Huhn durchgeführt. So konnte Müller *et al* 2000 zeigen, dass der MLC2v Promotor der Ratte für eine Aufreinigung von Ventrikel ähnlichen Kardiomyozyten ausdifferenzierten mESCs [6, 129] geeignet ist.

Aufgrund der hohen Konservierung des Promotors sollte eine Übertragung auf den in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Promotor möglich sein. Die Transkriptionsbindungsstellen des humanen MLC2v Promotor wurden mithilfe des Computerprogramms Alibaba2.1 mit den Transkriptionsbindungsstellen des MLC2v Promotors der Ratte verglichen. Der humane Promotor enthält wie der MLC2v Promotor der Ratte eine TATA-Box und Bindungsstellen für SRF, AP2 und RSRFC9, welches ein alternatives Spleißprodukt von MEF-2 ist und eine ähnliche Funktion ausübt (<http://harvester.embl.de>). Auch ein Sequenzvergleich der im Hühnchen vorkommenden CSS-Sequenz wurde durchgeführt. In beiden Sequenzen liegen 40 Basenpaare konserviert vor und es kann daher vermutet werden, dass der humane MLC2v Promotor eine der CSS des Hühnchens homologe Sequenz besitzt.

MLC2v wird innerhalb der Embryonalentwicklung im kardiogenen Mesoderm exprimiert [138]. Im Herzschlauch bildet es entlang der anterior-posterioren Achse einen bilateralen Gradienten aus. Erst nach der Entwicklung der Herzscheife ist das MLC2V auf das ventrikuläre Myokard beschränkt [136]. Der MLC2V Promotor enthält – 30bp eine TATA-Box und stromaufwärts Sequenzmotive für HF-1a, HF-1b, HF-2 und HF-3 [139]. Die Expression wird durch HF-1b und MEF2 reguliert [140]. Die Spezifität der Expression in ventrikulären Zellen wird durch die Repression der Expression in nicht kardialen Muskelzellen durch die „*cardiac specific sequence*“ (CSS) bewirkt [141]. Durch diese Spezifität ist es möglich, mithilfe dieses Promotors ventrikuläre Kardiomyozyten zu selektionieren und anzureichern.

1.7.3. Der Surfactant Protein C (SpC) Promotor

Da das Surfactant Protein C (SPC) früh in der Lungenentwicklung nachweisbar ist und spezifisch von AT2 Zellen exprimiert wird, eignet sich der SpC Promotor grundsätzlich für die Markierung und die Selektion von aus ES-Zellen abgeleiteten AT2 Zellen. Die Regulationselemente für die spezifische Expression des SpC Promotors in AT2 Zellen konnten innerhalb der -215 bp Region des humanen SpC Promotors gezeigt werden [131]. Diese proximale Region des SpC Promotors ist hochkonserviert in Maus und Mensch.

In diesem Bereich befinden sich Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren nuclear factor I (NFI) und für das TTF-1. Beide Transkriptionsfaktoren sind unerlässlich für die zelltypspezifische Expression des SpC [142]. Der ubiquitäre Transkriptionsfaktor NFI bindet an Elemente bei -215 bp und -100 bp, diese Bindung ist für eine Expression des SpC unerlässlich, ebenso die Bindung des TTF-1 an zwei

Bindungsstellen (TBE) bei -180bp [143]. Außerdem beinhaltet der SpC Promotor mehrere Sp-1 und Ap-2 Bindungsstellen.

Das SpC ist das erste Mal an Tag E.11 der Mausembryonalentwicklung in Epithelzellen der sich entwickelnden primitiven Atemwege auf mRNA Ebene nachweisbar [144]. Diese Expression wird entlang der proximalen Achse zur distalen Achse im Verlauf der Entwicklung herunterreguliert. In der adulten Mauslunge wird das Protein ausschließlich in alveolaren Epithelzellen des Typ II exprimiert, wohingegen SpA und SpB nicht nur in diesen Zellen, sondern auch in Bronchialepithelzellen zu finden sind [131].

1.8. Enhancer

Die Expression vieler gewebetypspezifischer Promotoren ist allein ist jedoch häufig nicht hoch genug, um Zellen zu markieren geschweige denn zu selektionieren [145], sodass die Expression der Transgene durch Enhancer Elemente verstärkt werden muss.

Bei der Herstellung transgener Tiere oder Zelllinien besteht die Möglichkeit, die Problematik der schwachen Transgenexpression durch die Auswahl eines Klons, der eine starke Transgenexpression aufweist, zu umgehen. Diese Unterschiede der Transgenexpression von verschiedenen Klonen einer Transduktion sind zurückzuführen auf die unterschiedlichen Integrationsorte der lentiviralen Vektoren. Bei Klonen, die eine starke Transgenexpression eines sonst eher schwachen Promotors zeigen, könnten im Bereich der Integrationsstelle verstärkende Sequenzen einen Einfluss auf den Promotor nehmen. Betrachtet man aber eine von der Integrationsstelle des lentiviralen Vektors unabhängige Expression, so werden für eine Verstärkung der Transgenexpression verstärkende Elemente (Enhancer) im lentiviralen Vektor nötig sein.

Enhancer sind cis-aktive Elemente, die in größeren Distanzen vom basalen Promotor liegen können. Der Enhancer kann sowohl *Upstream* als auch *downstream* vom Promotor liegen. Die Orientierung des Enhancers spielt dabei oft keine Rolle. Nicht selten liegen Enhancer in einem Intron. An die Sequenzelemente von Enhancern binden spezifische Transkriptionsfaktoren, die die Promotor Aktivität zum einen steigern, aber zum Anderen auch reprimieren können.

Oft sind in Plasmidvektoren verwendete Enhancer viralen Ursprungs. Neben anderen viralen Enhancern vom Herpes Virus, dem Rous Sarkoma Virus und dem Hepatitis B Virus hatte der Enhancer des Cytomegalievirus (CMV) die höchste Aktivität nicht nur in Primatenspezies, sondern auch in Zelllinien

von anderen Spezies [146]. Aus diesem Grund wurde für die gewebetypspezifischen Promotoren der CMV Enhancer zur Verstärkung der Transgenexpression verwendet.

1.8.1. Der CMV Enhancer

Der CMV Enhancer ist Bestandteil des CMV Promotor/Enhancer Komplexes und liegt stromabwärts des CMV Promotors (- 550bp bis -39bp). Der Enhancer wird in eine distale und proximale Region eingeteilt. Die distale Region des Enhancers ist essenziell wichtig für eine ausreichende Verstärkung und eine zelltypspezifische Expression eines Promotors [147]. Diese Region enthält repetitive Sequenzen und Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Es gibt drei verschiedene repetitive Sequenzen. Die vier 18bp Sequenzwiederholungen enthalten Konsensusbindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NFκ B, die fünf 19bp Sequenzwiederholungen enthalten Bindungsstellen für CREB/ATF und die drei 21bp Sequenzwiederholungen enthalten Bindungsstellen für YY1, Est.2 und für den Repressor SP1 [148, 149].

Für den CMV Enhancer konnte schon eine Erhöhung der Transgenexpression bei Erhaltung der Gewebetypspezifität in Neuronen und Muskelzellen erfolgreich gezeigt werden [150-152]. Außerdem konnte ein positiver Einfluss des CMV Enhancers auf die Expressionshöhe des MLC2v Promotors gezeigt werden [6]. Die Aktivität des CMV Promotor/Enhancer Elements in undifferenzierten Zellen ist allerdings umstritten (siehe 1.9.1.) [153-155].

1.9. Expression ubiquitärer Promotoren in pluripotenten embryonalen Stammzellen

1.9.1. Der humane Cytomegalievirus (hCMV) Promotor

Der CMV Promotor ist einer der am häufigsten verwendeten Promotoren in Expressionsvektoren. Der hCMV Promotor führt in fast allen Zellen zu einer starken Transgenexpression [156, 157]. Innerhalb der Promotorsequenz sind Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Sp1, CRE-Bindeprotein (CREB), *activation transcription factor* (ATF), *nuclear factor* κB (NF-κB), NF-1 und *activation protein-1* (AP-1) vorhanden.

Umstritten ist allerdings die Aktivität dieses Promotors in undifferenzierten ESCs [153-155]. Die Funktion des CMV Promotor/Enhancers scheint abhängig vom Zelltyp, dem Differenzierungsstadium

und der Aktivierung bestimmter Signalwege zu variieren. Innerhalb des CMV Promotor/Enhancers befinden sich vier verschiedene imperfekte Sequenzwiederholungen (17 bp, 18 bp, 19bp und 21 bp repetitive Sequenzwiederholungen). In undifferenzierten Zellen scheinen die 21bp Sequenzwiederholungen zu einer Repression zu führen [148]. Es konnte gezeigt werden, dass in undifferenzierten humanen teratocarcinoma Zellen (T2) die Bindung des differenzierungsspezifischen modulierenden Faktors (MBF1) an den Bereich der 21bp Sequenzwiederholungen zu einer Repression führt [158]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des CMV Enhancers ohne die 21bp Sequenzwiederholungen in undifferenzierten Zellen zu einer gesteigerten Expression des Transgens führt [158]. Die Differenzierung dieser Zellen führt zu einem Rückgang der Expression des MBF1 [159]. Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Transkriptionsfaktor YY1, der innerhalb der 21bp Sequenzwiederholungen bindet und auch zur Repression des CMV Promotor/Enhancer in undifferenzierten Zellen beiträgt [149]. Für die Repression des CMV Promotor/Enhancer scheinen also im Wesentlichen die 21 bp Sequenzwiederholungen ausschlaggebend zu sein. Deletiert man diese Sequenzwiederholung führt der CMV Enhancer/Promotor auch in undifferenzierten Zellen zu einer gesteigerten Expression des Transgens.

Der CMV Promotor/Enhancer alleine wurde im Verlauf dieser Arbeit in undifferenzierten ESCs nicht verwendet, aber der mit dem CMV Promotor/Enhancer kombinierte Beta Aktin Promotor des Hühnchens.

1.9.2. Der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) Promotor

Der EF1 α Promotor ist für die Expression des EF1 α Proteins verantwortlich. Der Elongationsfaktor 1 α ist ein G-Protein. Er bildet einen ternären Komplex bestehend aus EF1 α , GTP und aminoacylt-RNA. Die Bindung der aminoacylt-RNA an das Ribosom stimuliert die GTP-Hydrolyse durch den EF1 α , was zu einer Konformationsänderung im EF1 α führt. Aufgrund dessen löst sich der EF1 α -GDP-Komplex vom Ribosom und der aminoacylt-RNA.

Der EF1 α Promotor enthält mehrere Sp1 und Ap1 Bindungsstellen, sowie eine TATA-Box.

Dieser Promotor wird sehr häufig für die Expression von Transgenen in embryonalen Stammzellen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Promotor zu einer sehr hohen Expression in undifferenzierten embryonalen Stammzellen führt [13, 153, 155, 160]. In terminal differenzierten Zellen allerdings scheint der EF1 α Promotor nur eine schwache oder sogar keine Transgen Expression zu vermitteln [155].

1.9.3. Der chicken beta actin (CBA) Promotor

Aktinfilamente sind ein wichtiger Teil des Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen. Das Aktin ist eines der fünf häufigsten Proteine in Eukaryonten. Aktin besteht aus verschiedenen Isoformen: Alpha-, Beta- und Gamma-Aktin. Der Beta-Aktin-Promotor kodiert für die Beta-Untereinheit des Aktins. Der CBA-Promotor enthält mehrere Sp1 – Bindungsstellen. Außerdem enthält er an Position -89bp eine CCAAT-Box, an Position -50bp eine CArG-Box und eine TATA-Box in der Nähe des Transkriptionsstarts.

Neben dem EF1 α Promotor wird auch der Beta-Aktin-Promotor des Hühnchens oft für die Expression von Transgenen in embryonalen Stammzellen verwendet [153, 155, 160]. Der Beta-Aktin-Promotor wird dazu mit einem CMV Enhancerelement (CeCBA) kombiniert eingesetzt und führt zu einer eher moderaten Transgenexpression [155]. Trotz der umstrittenen Aktivität des CMV Promotor/Enhancer Elements wurde der CeCBA Promotor in der vorliegenden Arbeit in undifferenzierten ESCs verwendet. In terminal differenzierten Zellen führt der Einsatz dieses Promotors zu einer ausreichend hohen Expression des Transgens [155].

1.9.4. Der murine Phosphoglycerat Kinase (PGK) Promotor

Der PGK-Promotor kontrolliert die Expression der 3-Phosphoglycerat Kinase. Die 3-Phosphoglycerat Kinase ist ein Enzym der Glykolyse. Es katalysiert die Reaktion von D-1,3-Bisphosphoglycerat und ADP zu ATP und D-3-Phosphoglycerat.

Die Promotorregion besitzt einen sehr hohen Anteil an GC-Nukleotiden und enthält zahlreiche GC-Boxen für die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 sowie ein CAAT-Element.

Der murine PGK-Promotor wird neben dem EF1 α - und dem Beta-Aktin Promotor des Hühnchens in embryonalen Stammzellen, aber auch in terminal differenzierten Zellen eingesetzt [155, 161]. Er vermittelt eine eher moderate Transgenexpression.

1.10. GFP und die Entwicklung von GFP-Varianten

Das klassische *green fluorescent protein* (GFP) wurde aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert. GFP ist ein fluoreszierendes Protein, welches ohne Coenzyme funktional ist [162] und über Speziesgrenzen hinweg [163, 164]. Das Protein kann mit vielen Proteinen fusioniert werden und ermöglicht so z. B. die

Sichtbarmachung des Aufenthaltsortes des Proteins in einer lebenden Zelle oder Protein:Protein Wechselwirkungen [162, 165]. Durch Mutagenese wurde das GFP in Bezug auf die schnellere Formation des Chromophors [166] und die korrekte Faltung bei 37°C [162] verbessert. Auch das Absorptionsspektrum des Wildtyp GFP wurde durch Mutagenese von zwei Maxima auf ein Maximum bei ~ 489 nm verändert. Varianten wie das *enhanced* GFP (eGFP) wurden für die Nutzung in Säugerzellen optimiert [162]. Ein Problem der eGFP Variante ist die Zelltoxizität. Eine gute Alternative zum eGFP ist das aus *Renilla reniformis* isolierte humanized Renilla GFP (hrGFP). Diese für humane Zellen optimierte GFP Variante scheint eine geringere Zelltoxizität bei einer gleich starken Expression des Transgens aufzuweisen [167].

Es wurden auch verschiedene Varianten mit unterschiedlichen Absorptions und Emissionsspektren entwickelt, wie z. B. das gelb fluoreszierende YFP [168], das blau fluoreszierende BFP [169], oder das blaugrün fluoreszierende CFP [166]. Diese Varianten neigen zum *photobleaching* und sind weniger effizient als das GFP bzw. eGFP.

Aus diesem Grund wurde zur Herstellung einer effizienteren roten GFP-Variante in anderen marinen Organismen nach rot fluoreszierenden Proteinen gesucht [170].

1.10.1. DsRed und die Entwicklung des RedStar

DsRed, auch RFP oder drFP583 genannt, wurde 1999 aus der Koralle *Discosoma genus* isoliert [168]. DsRed ist in Bezug auf die Aminosäuresequenz nur wenig homolog zum GFP, sie beträgt 23%. Das DsRed ist ein rot fluoreszierendes Protein. Die Tertiärstrukturen von DsRed und GFP zeigen Ähnlichkeiten zu einer 11 strängige β -barrel Struktur durch die koaxial eine Helix verläuft [171-173]. Das Exzitation- und Emissionsspektrum des DsRed liegt bei 558 und 583 nm [169]. Dieses macht DsRed zu einem attraktiven Werkzeug als Reporter gen in Kombination mit anderen GFP Varianten [174, 175] für die Mehrfachfluoreszenzmarkierung oder für Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) Experimente [176]. Weiter kann man DsRed auch in Hefen [177, 178] oder Drosophila verwenden [179]. Das Wildtyp DsRed hat aber einige Nachteile, wie die ineffiziente Faltung des Proteins, die extrem langsame Reifung des Chromophors und die Tetramerisierung. Um diese Nachteile zu verbessern, wurde die Primärsequenz des DsRed durch „DNA- Shuffling“ [175] für die Nutzung in der Hefe optimiert. Es entstand das *Yeast* RFP (YRFP).

Das erhaltene YRFP wurde dann sechs Mal durch weiteres „DNA- Shuffling“ und anschließendes *Screening* in *E. coli* in Bezug auf die Helligkeit verbessert. Zur weiteren Optimierung wurde durch

weiteres „DNA Shuffling“ und dem anschließendem Screening in *Saccharomyces cerevisiae* die hellste Mutante ermittelt. Diese Mutante, RedStar, leuchtete im Vergleich zu YRFP in *E. coli* sechs Mal heller und in Hela-Zellen bzw. Hefe-Zellen 10-20 Mal heller [180]. Neben der Verbesserung der Helligkeit auch eine Verbesserung der Faltung des Proteins, die Dauer der Fluoreszenz-Entwicklung und der Tetramerisierung erzielt. Trotz dieser Verbesserungen ist das RedStar immer noch ineffizienter als das *enhanced* GFP [180].

1.11. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, lentivirale Selektionsvektoren zu etablieren, die durch den Einsatz von gewebetypspezifischen Promotoren eine spezifische Transgenexpression von Selektionsmarkern ermöglichen. Des Weiteren galt es, ein effizientes Transduktionsprotokoll für ESCs zu etablieren. Die folgenden Aufgabenstellungen waren zu bearbeiten:

1. Charakterisierung unterschiedlicher lentiviraler Vektoren zur Kardiomyozyten- und Typ II Pneumozyten spezifischen Genexpression.
2. Etablierung eines Transduktionsprotokolls für mESCs.
3. Etablierung eines Transduktionsprotokolls für RESCs. Etablierung eines SIV_{mac} basierten lentiviralen Vektorsystems.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Brutschrank (Bakterien)	GFL, Burgwedel Modell 3032
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus BBD 6220
Elektrophoresekammern	Horizontalgelkammer Sub-Cell; Bio-Rad,
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II; Bio-Rad, München
Fluorescence Activated Cell Analyser,	FACSCalibur; Becton Dickinson, Heidelberg
Geldokumentation	E.A.S.Y. 429K; Herolab, Wiesloch
Glaspipetten	Brand
Heizblock	Thermomixer 5437; Eppendorf, Hamburg
i-Cycler	Bio-Rad, München
Küvetten Plastik	Sarstedt, Nürnberg
Mikrowelle	MW 4270 E; HTS, Mettmann
Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	Nunc, Neerijse, Belgien
Nikon Eclipse TE300	Nikon, Düsseldorf
Olympus Zellkulturmikroskop CK 40	Olympus, Hamburg
PCR-Thermocycler	TRIO Thermoblock; Biometra, Göttingen
	UNO II Thermoblock; Biometra, Göttingen
Fotometer	Bio Fotometer Eppendorf; Eppendorf,
Pipette BIOHIT 1-10 µl, 20-200µl, 100-1000 µl	BIOHIT, Helsinki, Finnland
Pipettierhilfe	Pipetboy, Hirschmann Laborgeräte
Plastikpipette	Falcon
Quarzküvetten	Hellma; LAT, Garbsen
Sanyo CO ₂ Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Bad Nenndorf
Spannungsgerät	Power Pack 300; Bio-Rad, München
Sterilbank Hera Safe	Hera Safe HS18; Heraeus, Osterode
Sterilwerkbank Heraeus Lamin Air	Heraeus Instruments, Osterode
UV-Tisch	Transilluminator T11; Biometra, Göttingen
	UVT-28 ME; Herolab, Wiesloch
Vortex	MS1 Minishaker; Ika-Works, USA
Wasserbad	Modell 1038; Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zählkammer	Neubauer HBG
Zentrifugen	Avanti J-25; Beckmann, Glenrothes, U
	BIO Fuge fresco; Heraeus, Osterode
	PICO Fuge; Stratagene, La Jolla, USA

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Kimtech Labortücher
Elektroporationsküvetten

Kimberly-Clark®, England
Gene Pulser Cuvette, 0,1 cm ; Bio-Rad,
München

Reaktionsgefäße

0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße
1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße
15 ml Falcon-Röhrchen
50 ml Falcon-Röhrchen
14 ml sterile Greiner Röhrchen

Sarstedt, Nürnberg
Sarstedt, Nürnberg
Greiner, Kremsmünster, Österreich
Greiner, Kremsmünster, Österreich
Greiner, Kremsmünster, Österreich

Spitzen

gelbe Spitzen max. 200 µl
weiße Spitzen 0,1-10 µl (Mikrospitze)
blaue Spitzen max. 1 ml
Einweg Pipettenspitzen, gestopft

Sarstedt, Nürnberg
Roth, Karlsruhe
Sarstedt, Nürnberg
Star Lab, Ahrensburg

Zellkultur

Filteraufsatz 0,22 µm
Filteraufsatz 0,45 µm
Einmal Spritze 20 ml
Einfrierröhrchen 1ml
Einweg Injektionskanülen Gr. 1
Sterilfilter Bottle Top 500 ml
6-Loch Platte
12-Loch Platte
24-Loch Platte
96-Loch Platte
6-Loch Platte
24-Loch Platte
Gewebe Kulturschalen Cellstar 100 mm
Zellkulturflaschen 25 cm² mit Filterkappe
Zellkulturflaschen Cellstar 75 cm² mit Filterkappe
Zellkulturflaschen Cellstar 175 cm² mit Filterkappe

Millipore, Bedford, USA
Nalgene, Roskilde, Dänemark
Braun, Melsungen
Greiner, Kremsmünster, Österreich
Braun, Melsungen
Nalgene, Roskilde, Dänemark
Nunc, Neerijse, Belgien
Nunc, Neerijse, Belgien
Nunc, Neerijse, Belgien
Nunc, Neerijse, Belgien
Greiner, Kremsmünster, Österreich
Greiner, Kremsmünster, Österreich
Greiner, Kremsmünster, Österreich
Greiner, Kremsmünster, Österreich
Greiner, Kremsmünster, Österreich

2.1.3. Chemikalien

Agarose NEE0; ultra pure
Ampuwa
Ampicillin (50 mg/ml)
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V

Bayer, Leverkusen
MHH Apotheke, Hannover
Invitrogen, Leek, Niederlande
Biomol, Hamburg

Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Transferrin	Sigma, Deisenhofen
<u>C</u> alciumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Chloroquine	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
<u>D</u> esoxynucleotide Ultra Pure dNTP Set	Amersham, Freiburg
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma, Deisenhofen
DNA-Marker: Smart SF Ladder	Eurogentec, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat, DEPC	Sigma, Deisenhofen
<u>E</u> DTA (Ethylendiaminessigsäure)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol (zur Analyse)	Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen
<u>G</u> elatine	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Glycogen	Boehringer, Mannheim
<u>I</u> soamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
<u>K</u> anamycin (50 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen
<u>M</u> agnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mountingmedium Immu-Mount	Thermo, Pittsburgh, USA
Mitomycin C	Sigma, Deisenhofen
<u>N</u> atriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Butyrat	Biomol, Hamburg
<u>P</u> araformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Penicillin G (10000 U/ml)	Biochrom/ Seromed, Berlin
Polybrene (Hexadimethrin Bromid)	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
<u>R</u> oti® – Phenol-Chloroform	Roth, Karlsruhe
Roti® – Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
<u>S</u> treptomycin 10 mg/ml	Biochrom/ Seromed, Berlin
<u>T</u> ris- Base	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizol Reagenz	Life Technologies, Eggstein
Trypanblau	Serva, Heidelberg
<u>X</u> - Gal	Serva, Heidelberg

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Sigma, St. Louis USA bezogen.

2.1.4. Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie und Immunhistochemie

25x TAE-Puffer	1 M Tris-Base Essigsäure 25 mM EDTA pH 8,0
DNA-Auftragspuffer	100 mM EDTA 2% SDS 60% Glycerin etwas Bromphenolblau
<i>Quick Check-Puffer</i>	40% Glycerin 0,25% Bromphenolblau in Aqua _{dest}
EB-Puffer	10 mM Tris HCl, pH 8
P1-Puffer	50 mM Tris HCL, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase
P2-Puffer	200 mM NaOH; 1%ig SDS
P3-Puffer	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
Färbepuffer	1% BSA in PBS (ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺)
10x TBS	0,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan 1,625 M NaCl Auf 4,0 l mit H ₂ O auffüllen, pH 7,6
TBS+ Puffer	95% 1x TBS 0,025% Triton-X-100 5% Serum des Tieres, aus dem der Sekundärantikörper isoliert wurde

2.1.5. Kits

QIAquick® GelExtraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAgen® Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAgen® Midi Kit	Qiagen, Hilden
Double Digestion Kit	Clontech, Palo Alto, Kalifornien
GeneJet™ PCR Cloning Kit	MBI Fermentas, St. Leon Roth
HP Plasmid Maxi Kit	Sigma, Deisenhofen
qPCR Core Kit	Eurogentec, Belgien
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien

2.1.6. Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Verwendung	TA	Größe Amplifikat
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung durch die Firma SeqLab Göttingen		
Sp 6	ATTTAGGTGACACTATAG			
pJET1 Forward sequencing primer	GCCTGAACACCATATCCATCC	Sequenzierung durch die Firma SeqLab Göttingen		
pJET1 Reverse sequencing primer	GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC			
SIV.MCS.pBSh. sense	CGGGATCCGCGCGCCACCTGACGTTAAC	Herstellung pSh S	63°C	306 bp
SIV.MCS.pBSh. ras	CCCTCGAGGCGCGGTTGGCCGATTC			

Tabelle 1: verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der verschiedenen Vektoren

2.1.7. Oligonukleotide und Sonden für die *Real Time* PCR

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Verwendung	T _A	Größe Amplifikat
Lenti sense	AGCTTGCCTTGAGTGCTTCA	Real Time für HIV abgeleitete Viren; bindet an LTR (aus Scherr <i>et al.</i> Biotechniques 2001) [181]		84 bp
Lenti ras	TGACTGAAAGGGTCTGAGGGA			
Lenti Sonde	TGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTG	Bindet an 84 bp Fragment amplifiziert mit Lenti sense/ras (aus Scherr <i>et al.</i> Biotechniques 2001) [181]		
SIV sense Hanawa	TACGGCTGAGTGAAGGCAGTAAG	Real Time für SIV abgeleitete Viren (aus Hanawa <i>et al.</i>) [182]		92 bp
SIV ras Hanawa	CTCCTCACGCCGTCTGGTA			

Tabelle 2: verwendete Oligonukleotide und Sonden für die *Real Time* PCR

2.1.8. Oligonukleotide für die Charakterisierung der transduzierten embryonalen Stammzellen des Rhesusaffen im undifferenzierten und differenzierten Zustand

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Ziel	Position	mRNA	T _A
Oct3/4 sense	TCTTCAGGAGATATGCAAAGCA	gi 42560241	464	370bp	55°C
Oct3/4 ras	GAAAGGGACCGAGGAGTACAGT		833		
Nanog sense	GTCCCAGTCAAGAAACAGAAGAC	gi 13376297	487	265bp	60°C
Nanog ras	AGTAGAGGCTGGGGTAGGTAGG		751		
Sox2 sense	ATGCACCGCTACGACGTGA	gi 29826338	1016	437bp	55°C
Sox2 ras	CTTTTGCACCCCTCCCATT		1452		

Tabelle 4: verwendete Oligonukleotide zur Kontrolle der transduzierten undifferenzierten RESC

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Ziel	Position	mRNA	T _A
GAPDH sense	GGCCAAGGTCATCCATGA	gi 7669491	555	352bp	55°C
GAPDH ras	TCAGTGTAGCCCAGGATG		907		
Brachyury sense	CGGAACAATTCTCCAACCTATT	gi 19743811	1382	357bp	55°C
Brachyury ras	GTACTGGCTGTCCACGATGTCT		1738		
FOG2 sense	TGCTACCACCCAAGATGTGAT	gi 10862688	2371	203bp	55°C
FOG2 ras	AGCCTTTTGGGAGACGTG		2573		
GATA-4 sense	GGAGGAAGGCTCTCACTGCC	gi 1065568	1089	228bp	60°C
GATA-4 ras	GAGTGGGCCTCTCCTGTG		1317		
Nkx2.5 sense	CCAGCCCTGCTCTCAG	gi 6161957	184	167bp	55°C
Nkx2.5 ras	GCCCAGCGTAGGCCTCT		351		
Goosecoid sense	CGAGAACCTCTTCCAGGAGACC	gi 39795448	574	190bp	65°C
Goosecoid ras	CGACGACGACGTCTTGTTCAC		763		
ANF sense	GAACCAGAGGGGAGAGACAGA	gi 178635	513	405bp	60°C
ANF ras	CCCTCAGCTTGCTTTTTAGGAG		1040		
TBX5 sense	AGCAGTGACTTCCTACCAGAAC	gi 31652233	1303	108bp	55°C
TBX5 ras	TGACATTCTGTGCAGCTCCAT		1411		
TBX20 sense	AGGTACCGCTACGCCTAC	gi 31652229	486	470bp	50°C
TBX20 ras	GTCAGTGAGCCTGGAGGA		893		
αMHC sense	AGGATCCTCTCAACGAGACT	gi 27764860	1796	469bp	50°C
αMHC ras	GTGATCAATGTCCAGAGAGC		2265		
MLC2a sense	GAGGAGAATGGCCAGCAGGAA	gi 20380769	4	446bp	60°C
MLC2a ras	GCGAACATCTGCTCCACCTCA		451		

Tabelle 5: verwendete Oligonukleotide für den Nachweis von Differenzierungsmarkern für die RESC

2.1.8. Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP) 10000 U/ml	New England Biolabs
Proteinase K (Stocklösung 20 mg/ml)	Merck, Darmstadt
Proof Start™ Polymerase (2,5 U/μl)	Qiagen, Hilden
Red Taq DNA-Polymerase (1U/μl)	Sigma, Deisenhofen
T4 DNA-Ligase (1U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Diverse Restriktionsenzyme	New England Biolabs Frankfurt
Kollagenase Typ IV	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.9. DNA-Marker

Smart Ladder (Eurogentec, Heidelberg)

2.1.10. Antikörper

2.1.10.1. Primärantikörper

Antigen	Spezies	Isotyp	Klon	Verd.	Hersteller
ANF	Kaninchen	IgG	T-4011	1:500	Bachem
MLC2v	Maus	IgG1	F109.3E1	1:10	Biocytex
SSEA-4	Maus	IgG3	MC-813-70	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank
SSEA-1	Maus	IgM	P3-X63-AG8	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank
Sarkomerisches α-Actinin	Maus	IgG1	EA-53	1:800	Sigma

Tabelle 6: Primärantikörper

2.1.10.2. Isotypen Negativkontrollen

Kaninchen IgG1 Isotyp-Kontrolle (200 μg/0,5 ml)	Santa Cruz, Kalifornien, USA
Kaninchen Vollserum Kontrolle	Eigene Herstellung
Maus IgG1 Isotyp-Kontrolle (100 μg/ml)	DAKO, Glostrup, Dänemark
Maus IgM Isotyp-Kontrolle (100 μg/ml)	DAKO, Glostrup, Dänemark

2.1.10.3. Sekundärantikörper

Cy TM 2-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgG, Verd. 1:250	Jackson, Baltimore, USA
Cy TM 3-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgG, Verd. 1:250	Jackson, Baltimore, USA
Cy TM 3-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgM, Verd. 1:250	Jackson, Baltimore, USA
Cy TM 2-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG, Verd. 1:50	Jackson, Baltimore, USA
Cy TM 3-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG, Verd. 1:300	Jackson, Baltimore, USA

2.1.11. Vektoren

Shuttle Vektoren

pBSh del.	(in der Arbeitsgruppe vorhanden)
pBSh MCS hrGFP WPRE	(in der Arbeitsgruppe vorhanden)
pShuttle	(Clontech, Palo Alto, Californian)

Klonierungsvektoren

T-Vektor	(in der Arbeitsgruppe vorhanden)
pBlueskriptII SK (-)	(Stratagene, La Jolla, USA)
p415-Gal-1RedStar	(zur Verfügung gestellt von Michael Knop, EMBL Heidelberg)
pcDNA3+	(Invitrogen, Carlsbad, USA)
pJET1/blunt <i>Cloning Vector</i>	(MBI Fermentas, St. Leon Roth)
pLVTH	(zur Verfügung gestellt von Dr. med. Axel Seltsam, Transfusionsmedizin, MHH)
pCAGGS	(Niwa <i>et al.</i> Gene 1991)
pTRIEX-1	(Novagen)
pHRGFP-1	(Stratagene, La Jolla, USA)
<u>lentivirale Vektoren</u>	
pHR`SINcPPT-SEW	(zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)
plentiSh H	(in der Arbeitsgruppe vorhanden)

pISh H Ce hANF hrGFP WPRE	(in der Arbeitsgruppe vorhanden; Diplomarbeit Jennifer Heinke)
pISh H hANF hrGFP WPRE	(in der Arbeitsgruppe vorhanden; Diplomarbeit Jennifer Heinke)
pISh H MLC2v hrGFP WPRE	(in der Arbeitsgruppe vorhanden; Diplomarbeit Jennifer Heinke)
pISh H Ce MLC2v hrGFP WPRE	(in der Arbeitsgruppe vorhanden; Diplomarbeit Jennifer Heinke)
pISh H Ce SpC hrGFP WPRE	(in der Arbeitsgruppe vorhanden; Diplomarbeit Kerstin Radtke)
pISh H SpC hrGFP WPRE	(in der Arbeitsgruppe vorhanden; Diplomarbeit Kerstin Radtke)
pSIV ^{-RMES} GAE	(zur Verfügung gestellt von Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS Lyon Frankreich)
pSIV ^{-RMES} GAEwh	(zur Verfügung gestellt von Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS Lyon Frankreich)
<u>Verpackungsplasmide</u>	
pCMV Δ R8.91	(zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)
pMD.G	(zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)
psPAX	(zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)
pMD2.G	(zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)
pSIV 3+	(zur Verfügung gestellt von Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS Lyon Frankreich)

2.1.12.. Bakterienstämme

2.1.12.1. E. coli TOP 10 (Invitrogen, Niederlande)

Genotyp: *F-mcrAΔ (mrr-hsdRMS- mcrBC), φ80/lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139Δ (ara-leu) 7697 galJ galK rpsL (Str^R), endA1 nupG*

E. coli TOP 10 besitzt eine *hsdR*- Mutation, was zu einer effizienten Transformation von unmethylierter DNA führt. Die effiziente Transformation von methylierter DNA ermöglicht die *mcrA*- Mutation. Der *lacZΔM15*- Marker erlaubt durch die α- Komplementierung des β- Galactosegens eine Blau-Weiß-Selektion auf Agarplatten, die X-Gal enthalten. Der unspezifische Verdau durch Endonukleasen, die bei der Plasmidisolierung freigesetzt werden, wird durch die *endA1*- Mutation verhindert. Eine Sequenzstabilisierung erfolgt durch verminderte Rekombinationssequenzen bedingt durch die *recA1*-Mutation.

Referenz: Grant et al., 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4645-4649

2.1.12.2. Elektromax™ STBL4™ (Life Technologies, Eggstein)

Genotyp: *mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 gal supE44χ-- thi-1 gyrA96 relA1 Δ(lac-proAB)/F' proAB+ lac^qZΔM15 Tn 10 Tet^r*

STBL4™ ist ein Derivat von STBL2™. Durch verschiedene genetische Modifikationen kann dieser Stamm auch instabile Sequenzen, wie beispielsweise retrovirale Sequenzen stabil replizieren. Aber auch große Plasmide, wie 50 kb Cosmide oder 100-200 kb P1-Klone können stabil repliziert werden. Durch den *lac^qZΔM15*- Marker ist durch die α- Komplementierung des β- Galactosegens eine Blau-Weiß-Selektion auf Agarplatten, die X-Gal enthalten möglich. Durch die *mcrA*-Mutation und die *mcrBC-hsdRMS-mrr*- Deletion wird eine Klonierung von methylierten genomischen Sequenzen möglich. Der unspezifische Abbau durch Endonukleasen wird durch die *endA1*-Mutation verhindert.

Referenz: Calvin, N.M. und Hanawalt, P.C. (1988) *J Bacterol.* 170,2796

2.1.12.3. HB101 (Takara Bio Inc. Japan)

Genotyp: *supE44 Δ(mcrC-mrr) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi 1*

Dieser Bakterienstamm ist wurde zur Vermehrung bereits fertig gestellter lentiviraler Vektoren verwendet.

2.1.13. Nährmedien für Bakterien

Luria Broth Medium	10 g Bacto-Trypton (1%ig) 5 g Hefeextrakt (0,5%ig) 10 g Natriumchlorid (15%ig) add Aqua _{dest} 1 Liter, pH 7,5
Luria Broth Agar	10 g Bacto-Trypton (1%ig) 5 g Hefeextrakt (0,5%ig) 10 g Natriumchlorid (15%ig) 15 g Agar (1,5%ig) add Aqua _{dest} 1 Liter, pH 6,9
SOC Medium	20 g Bacto-Tryton 5 g Hefeextrakt (0,5%ig) 0,5 g Natriumchlorid 10 ml 0,25 M Kaliumchlorid 5 ml 2 M Magnesiumchlorid 20 ml 1 M Glucose add Aqua _{dest} 1 Liter, pH 7,0
Terrific Broth	12 g Trypton (1,2%ig) 24 g Hefeextrakt (2,4%ig) 9,4 g Dikaliumphosphat (0,94%ig) 2,2 g Kaliumphosphat (0,22% ig) add Aqua _{dest} 1 Liter 8 ml Glycerol
2x YT-Agar	16 g Trypton (1,6%ig) 10 g Hefeextrakt (1%ig) 5 g Natriumchlorid (1%ig) 15 g Agar (1,5 %ig)

2.1.14. verwendete Antibiotika

	<u>Verwendete Konzentration</u>
Ampicillin	50 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml

2.1.15. Zellen

2.1.15.1. A549 (CCL-185)

Diese adhären wachsenden Zellen wurden aus dem explantierten Lungentumor eines 58 Jahre alten Mannes isoliert. Sie besitzen eine epitheliale Morphologie und können Lecithin mit einem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren produzieren. Sie sind Cytokeratin und Vimentin positiv.

2.1.15.2. HEK 293T-Zellen

Diese humane embryonale Nierenzelllinie ist adhären und hat eine epitheliale Morphologie. Die Zellen sind durch Transfektion mit einem fragmentierten Adenovirus Genom immortalisiert und exprimieren den Rezeptor für Vitronectin. Sie erzeugen in Nacktmäusen Tumore und sind hypotriploid (64 Chromosomen). Außerdem enthalten sie das temperatursensitive SV40 large T-Antigen und sind sehr gut transfizierbar.

Referenz: Graham, F.L. et al, *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977

2.1.15.3. HeLa 229 Zellen

Diese adhären wachsenden Zellen wurden aus einem humanen Cervix-Adenocarcinom einer 31 Jahre alten Frau isoliert und haben eine epitheliale Morphologie. Außerdem sind sie Vimentin positiv.

2.1.15.4. HL-1 [183]

Murine Herzzelllinie isoliert aus AT-1 Zellen. AT-1 Zellen wurden ursprünglich aus atrialen Kardiomyozyten gewonnen. AT-1 Zellen exprimieren das SV 40 large T-Antigen unter der Kontrolle des ANF-Promotors.

Zur Verfügung gestellt von W.C. Claycomb, New Orleans, USA

2.1.15.5. Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

Humane Endothelzellen isoliert aus der Nabelschnur. Diese Zellen wurden innerhalb des LEBAOs durch Frau Ingrid Schmidt-Richter isoliert.

2.1.15.6. Humane endodermale Fibroblasten

Diese Zellen wurden freundlicherweise von der Plastischen Hand und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover zu Verfügung gestellt.

2.1.15.7. Humane glatte Muskelzellen (SMC)

Die humanen glatten Muskelzellen wurden aus der Koronararterie gewonnen.

Diese Zellen wurden bezogen von der Firma Promocell®, Heidelberg, Deutschland.

2.1.15.8. MLE- 12

Diese adhärent wachsenden Zellen besitzen eine epitheliale Morphologie und wurden aus einem Lungentumor einer transgenen weiblichen Maus isoliert. Das SV40 large T Antigen steht unter der Kontrolle des Sp-C Promotors. Die Zellen exprimieren Sp-B und Sp-C und sekretieren Phospholipide. In Nackt-Mäusen sind sie nach 6-9 Monaten tumorigen.

2.1.15.9. MLE- 15 [184]

MLE-15 ist eine murine Lungenepithel-Zelllinie und wurde 1993 von Wikenheiser *et al.* Aus Lungentumoren transgener Mäuse isoliert. Das SV40 large T-Antigen steht unter der Kontrolle des SP-C-Promotors.

2.1.15.10. Murine embryonale Fibroblasten

Die Zellen wurden innerhalb des LEBAOs selbst von der Arbeitsgruppe aus 13 Tage alten Mäuseembryonen isoliert.

2.1.15.11. Murine embryonale Stammzellen Brachyury-GFP (Brachyury-GFP mESCs)

[185]

Die murine ESC-Linien E14.1 wurde aus dem Mausstamm 129/Ola gewonnen und besitzen ein *Knock-In* des eGFP-Transgens im brachyury-Lokus

2.1.15.12. Neonatale Rattenkardiomyozyten

Diese Zellen wurden innerhalb des LEBAOs durch Frau Schmidt-Richter isoliert.

2.1.15.13. Embryonale Stammzellen des Rhesusaffen (RESCs), R366.4 [21]

Die embryonale Stammzelllinie wurde 1995 durch Thomson *et al.* isoliert und hat den Karyotyp 42 normal.

2.1.16. Zellkulturmedien und MedienzusätzeBasalmedien

D-Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
D-MEM:F12 +Glutamax	Invitrogen, Carlsbad, USA
DMEM für Kollagenase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Knockout DMEM	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad, USA
Claycomb Medium	JRH Biosciences

Medium Kits

Endothelzell Basal Medium	Promocell, Heidelberg, Deutschland,
Supplement Pack Endothelzellen:	Promocell, Heidelberg, Deutschland,
Fötale Kälberserum	
Heparin	
Epidermal Cell Growth Factor rec. human	
Basic Fibroblast Growth Factor rec. human	
Hydrocortisone	
Glatte Muskelzellen Basal Medium	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Supplement Pack Glatte Muskelzellen:	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Fötale Kälberserum	
Epidermal Growth Factor rec. human	
Basic Fibroblast Growth Factor rec. human	
Insulin rec. human	

Medienzusätze

Fötale Kälberserum	PAA, Cölbe
Fötale Kälberserum für HL-1	JHR Biosciences
Basic fibroblast Growth Factor (bFGF)	Invitrogen, Carlsbad, USA
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Carlsbad, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
MEM nicht essenzielle Aminosäuren	Invitrogen, Carlsbad, USA
Serum Replacement	Invitrogen, Carlsbad, USA
Insulin	Sigma, Deisenhofen
Apo-Transferrin	Sigma, Deisenhofen
Hydrocortison	Sigma, Deisenhofen
β-Estradiol	Sigma, Deisenhofen
Norepinephrin	Sigma, Deisenhofen
<i>Leukemia Inhibitory Factor</i> (LIF)	Hergestellt innerhalb der Arbeitsgruppe Gewonnen aus dem Überstand von 293 Zellen, die mit einem huLIF Expressions Plasmid transient transfiziert wurden.

Lösungen

2x HBS- Puffer	8 g NaCl 6,5 g HEPES 10 ml Na ₂ HPO ₄ Stock Lösung (5,25 g in 500 ml Aquadest.) Auf 500 ml mit Aqua _{dest.} auffüllen pH 7,0
1 x Dulbeccos` s Phosphat Buffered Saline	PAA Laboratories, Cölbe
HEPES	Sigma, Deisenhofen
0,05/0,02% (w/v) Trypsin/EDTA Lösung in PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Trypsin Inhibitor	Sigma, Deisenhofen
Fibronectin	Sigma, Deisenhofen
Gelatine Lösung	1% (10 g/L)
Poly-L-Lysin Lösung	0,1% w/v in H ₂ O, Thimersosal 0,1%
Trypanblau Lösung	PAA Laboratories, Cölbe
Polybrene-Lösung	<u>Stock Lösung</u> 100 mg auf 10 ml Aqua _{dest.} <u>Gebrauchslösung (40 µg/10 ml)</u> 400 µl 2500x Stock Lösung 9,6 ml Aqua _{dest.} sterilfiltrieren

Chloroquine Lösung	0,51 g in 10 ml Aqua _{dest.} sterilfiltrieren
3 mM EDTA-Lösung (EDTA in PBS ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺)	EDTA (Sigma, Deisenhofen) PBS (PAA Laboratories, Cölbe)
FACS Flow	
FACS Clean	
FACs Rinse	
0,2 % Kollagenase	Kollagenase Typ IV, Invitrogen, Carlsbad,
<u>Antibiotika</u>	
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Cölbe

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Präparation von Plasmid-DNA

2.2.1.1.1. Schnellnachweis von Plasmiden in Bakterienklonen („Quick Check“)

Die *Quick Check*- Methode erlaubt schnell zu überprüfen, ob Bakterienklone ein Plasmid enthalten und ermöglicht auch eine grobe Abschätzung der Größe des Plasmids.

Dazu wurden jeweils 100 µl der Flüssigkultur zu 10 µl *Quick Check*-Puffer gegeben und mit 50 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt. Nach dem Vortexen für 30 Sekunden wurden die Proben zur Phasentrennung 6 Minuten bei 16045 x g zentrifugiert. Zur Analyse wurden 15 µl der oberen Phase auf ein 0,8% - 1%-iges Agarosegel aufgetragen und für 45 Minuten bei 130 V aufgetrennt.

2.2.1.1.2. Minipräparation von Plasmid-DNA

Durch die Minipräparation erhält man kleinere Mengen an Plasmid-DNA. Die gewonnene Plasmid-DNA kann für eine weitere Analyse mittels Restriktionsenzymen verwendet werden.

Für die Minipräparation von Plasmiden werden die Bakterien mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen, sodass es zur Freisetzung der Plasmide kommt. Während der Lyse denaturiert die DNA und die Plasmid-DNA kann, aufgrund ihrer geringen Größe während der Neutralisation wieder hybridisieren, wohingegen die chromosomale DNA, einzelsträngig bleibt und ausfällt. Mit der chromosomalen DNA wird auch die Mehrzahl Proteine präzipitiert.

Für die Minipräparation von Plasmid-DNA wurde eine 3 ml Flüssigkultur angeimpft und über Nacht unter Schütteln (rpm) inkubiert. Bei Verwendung der Bakterienstämme STBL4™ und STBL2™ wurde TB-Medium mit 80 µg/ml Ampicillin versetzt und bei 30°C inkubiert. Wurde die Transformation mit Bakterien des Stamms TOP 10 durchgeführt, wurde LB-Medium je nach Resistenzgen mit 30 µg/ml Kanamycin oder 80 µg/ml Ampicillin versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden nach der Inkubation für 3 Minuten mit 4652 x g abzentrifugiert. Die weiteren Schritte erfolgten mithilfe eines *Qiagen® Mini Kits* nach Herstellerangaben.

2.2.1.1.3. Midipräparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid Midipräparation dient der Isolation von größeren Mengen an DNA, die z. B. weiter für Klonierungen verwendet werden können. Die durchgeführte Midipräparation erfolgt nach alkalischer Lyse der Bakterien über eine Anionenaustauschersäule.

Für die Plasmidpräparation wurde je nach Bakterienstamm und Resistenzgen eine 100ml Flüssigkultur angeimpft und schüttelnd bei der dementsprechenden Temperatur über Nacht inkubiert.

Zum Ernten der Bakterien wurde die Kultur in einen 250 ml Zentrifugenbecher überführt und für 10Minuten bei 500 x g zentrifugiert.

Die Plasmidpräparation wurde mit einem *Qiagen® Midi Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Midipräparation erfolgte eine Isopropanol-Fällung nach Herstellerangaben. Die DNA wurde dann nach dem Trocknen in 150µl EB-Puffer aufgenommen.

2.2.1.1.4. Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid Maxipräparation diente der Isolation von größeren DNA-Mengen, welche für die Virusproduktion verwendet wurden. Für die Maxipräparation wurde das HP-Plasmid Maxi Kit von Sigma verwendet. Als Bakterienstamm wurde ausschließlich der Stamm HB101 verwendet.

Für die Maxipräparation wurde eine 150 ml Flüssigkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien zum Ernten mit 5000 x g bei 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Die weiteren Schritte einschließlich der Konzentration der DNA erfolgten, wie vom Hersteller angegeben.

2.2.1.2. Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA

2.2.1.2.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Reinigung von Nukleinsäurelösungen von unerwünschten Verschmutzungen, wie Proteinen. Angewendet wird die Phenol-Chloroform-Extraktion z. B. nach einem Restriktionsverdau mit PI-*Sce I* und I- *Ceu I*.

Die Restriktionsansätze (30 µl) wurden nach der Inkubation mit 70 µl Elbufer pH 8,0 versetzt. Zu diesen 100 µl Ausgangsvolumen wurden 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gegeben und 30 Sekunden

gevortext. Nach der Zentrifugation für 10 Minuten bei 16045 x g wurden 80µl der oberen Phase in ein neues 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mittels Natrium-Acetat (5.2.2.1.) die DNA gefällt.

2.2.1.3. Fällung von Nukleinsäuren

2.2.1.3.1. Ethanolische Fällung mit Natrium-Acetat

Die Natrium-Acetat-Fällung dient der Aufkonzentrierung der Nukleinsäurelösung. Für diese Fällung wird Alkohol und ein monovalentes Salz eingesetzt.

Das Ausgangsvolumen für die Natrium-Acetat-Fällung wurde auf 100 µl festgelegt. Zum Ausgangsvolumen wurden 10 µl Natrium Acetat 2,5 pH 5,2 (monovalentes Salz), 1 µl Glycogen (Trägersubstanz) und 250 µl 96% (v/v) Ethanol (-20°C) gegeben. Die Fällung erfolgte dann bei -20°C für 30 Minuten. Durch die Zentrifugation für 30 Minuten mit 16045 x g wurde die DNA pelletiert. Es folgte ein Waschschrift mit 70% (v/v) Ethanol (RT), um Salzreste zu entfernen, bei dem nochmals für 15 Minuten mit 16045 x g zentrifugiert wurde. Nach dem Trocknen des Pellets auf dem Heizblock bei 37°C wurde das Pellet in 10 µl Aqua_{dest} resuspendiert.

2.2.1.3.2. Isopropanol-Fällung

Die Fällung mit Isopropanol ist effektiver als die Fällung mit Ethanol. Es reichen 0,6-0,8 Volumen Isopropanol für eine quantitative Fällung aus. Diese Möglichkeit der Fällung ist vor allem interessant bei größeren Volumina. Ein Nachteil ist, dass sich das Isopropanol aufgrund seines höheren Siedepunktes nicht so leicht wieder entfernen lässt.

Nach einer Midipräparation bzw. Maxipräparation wurden 0,7 Volumen an Isopropanol zum Überstand gegeben und sofort für 30 Minuten bei 15.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit gleicher Menge 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation für 10 Minuten bei 15.000 x g und der Trocknung des Pellets wurde das Pellet in entsprechender Menge EB-Puffer aufgenommen.

2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration wird aufgrund des DNA-Absorptionsmaximums bei 260 nm photometrisch gemessen. Für die Messung wurde eine Quarzküvette verwendet.

Die Konzentration errechnet sich durch die Formel:

$$C_{\text{DNA}} [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times V \times 50 \mu\text{g/ml (bei doppelsträngiger DNA)}$$

V = Verdünnungsfaktor

50 $\mu\text{g/ml}$ (bei doppelsträngiger DNA) = Wert für die DNA-Konzentration bei $E_{260} = 1$

Zur Messung der DNA-Konzentration wurde in der Regel eine 1:40 Verdünnung (2 μl DNA-Lösung + 78 μl Aqua_{dest.}) der DNA-Lösung gemessen. Als Null-Wert wurde Aqua_{dest.} gemessen.

Der Grad der Verunreinigung errechnet sich über das Verhältnis zwischen der OD bei 260 nm (Absorptionsmaximum DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum Proteine). Besteht nur eine geringe Proteinkontamination, liegt das Verhältnis zwischen 1,8-2,0.

2.2.1.5. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Bei einer PCR wird *in vitro* ein bestimmter Abschnitt in der DNA selektiv vermehrt. Für eine PCR sind passende Oligonucleotid-Primer, „Matrizen“- DNA, Nucleotide, thermostabile DNA-Polymerase und der passende Puffer nötig. Ein typischer PCR-Lauf beginnt mit einem Denaturierungsschritt bei 94°C, bei dem die beiden Stränge der „Matrizen“- DNA getrennt werden, einem Annealingschritt, bei 45°C – 65°C, bei dem es zur Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige „Matrizen“- DNA kommt. Am Ende folgt dann der Elongationsschritt bei 72°C, während dem die Polymerase die Primer verlängert. Die *Taq*-Polymerase braucht für die Elongation zweiwertige Ionen als Co-Faktoren, die dem Puffer in Form von MgCl_2 zugesetzt sind. Die *Taq*-Polymerase hat ihr Aktivitätsoptimum bei einem pH-Wert oberhalb von 8. Der Puffer hat meist einen pH-Wert von 9. Die *Taq*-Polymerase besitzt neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3' Exonucleaseaktivität, jedoch keine 3'-5'-Exonucleaseaktivität. Die drei Schritte der PCR werden mehrmals wiederholt, wodurch es zu einem exponentiellen Anstieg des PCR-Produkts kommt.

Es gibt andere hitzestabile Polymerasen, die zusätzlich eine Fehlerkorrektur-Aktivität besitzen, so z. B. die Proofstart™ Polymerase von Qiagen. Sogenannte „*proofreading*“- DNA Polymerasen werden in der Regel verwendet bei der Amplifikation von längeren DNA Abschnitten, die fehlerfrei vorliegen müssen, z. B. bei Klonierung eines Gens in eine Expressionskassette. Bei solchen Klonierungen ist die korrekte

Abfolge der Basen sehr wichtig, da das Gen nach der Transkription und Translation ein korrektes Protein hervorbringen soll. Die Proofstart™ Polymerase hat eine 3`- 5`- Exonuklease Aktivität und kann so Fehler korrigieren. Aufgrund dieser Exonuklease Aktivität ist die Syntheserate der proofreading Polymerase geringer als die der *Taq*-Polymerase. Die Syntheserate der *Taq*-Polymerase liegt bei ca. 2800 Nukleotiden pro Minute, wohingegen die proofreading Polymerase nur 550 Nukleotide pro Minute synthetisiert, aber die Fehlerrate pro eingebauter Base ist mit 10^{-6} deutlich geringer als 10^{-5} bei der *Taq*-Polymerase.

2.2.1.5.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der *Taq*-Polymerase

Die PCR-Reaktion wurde in 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße wie folgt angesetzt:

Ansatz für Red Taq Polymerase	
Red Taq Puffer (10x)	2,5 µl
d`NTP Mix (10 mM)	1 µl
Primer sense (10 pmol)	1 µl
Primer antisense (10 pmol)	1 µl
DNA	1 µg
Red Taq Polymerase (1 U/µl)	1,25 µl
Aqua _{dest}	add 25 µl

Tabelle 7: Reaktionsansätze für die PCR mit der Red Taq Polymerase

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgenden Programmen:

PCR-Programm für Red Taq PCR			
Schritt	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklen
2	1 Minute	94	34 x
5	1 Minute	94	
6	1 Minute	Annealing- Temperatur	
7	1 Minute	72	
8	15 Minuten	72	
9	∞	4	

Tabelle 8: PCR Programm Red Taq Polymerase

Die Annealing-Temperatur wurde für die Primer nach folgender Gleichung berechnet:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{Anzahl A bzw. T}) - 5$$

Mit dieser Gleichung wird die Schmelztemperatur der Primer näherungsweise über den GC-Gehalt des Primers bestimmt. Diese Gleichung eignet sich nur für kurze Primer mit einer Länge um 20 Basenpaare.

2.2.1.5.2. PCR von DNA-Fragmenten mit der Proofstart™- Polymerase

Der Ansatz für die Amplifikation mittels Proofstart™ Polymerase sah wie folgt aus:

Ansatz für Proofstart™ Polymerase	
Puffer (10x)	2,5 µl
d`NTP Mix 10 mM	0,75 µl
Primer sense (10 pmol)	2,5 µl
Primer antisense (10 pmol)	2,5 µl
DNA	1 µg
Q- Lösung	5 µl
ProofStart™ Polymerase (2,5 U/µl)	1,25 µl
Aqua_{dest}	add 25 µl

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die PCR mit der Proofstart™ Polymerase

PCR Programm für Proofstart™ Polymerase			
Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
1	5 Minuten 30 Sekunden	95°C	
2	1 Minute	94°C	34 x
3	1 Minute	Annealing-Temperatur	
4	1 Minuten	72°C	
5	15 Minuten	72°C	
6	∞	4°C	

Tabelle 10: PCR Programm Proofstart™ Polymerase

Sollte PCR-Produkte, die mittels Proofstart™ Polymerase gewonnen wurden, in den T-Vektor kloniert werden, wurde zuvor ein A-tailing durchgeführt.

A-tailing Reaktion	
PCR-Produkt	10 µl
Aquadest	6 µl
dATPs (10 mM)	1 µl
Red Taq Puffer 10x	2 µl
Red Taq Polymerase (1 U/µl)	1 µl

Tabelle 11: Ansatz für die A-tailing Reaktion

Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei 72°C.

2.2.1.5.3. Real time PCR

Mittels der *Real Time* PCR kann die Amplifikation von definierten Sequenzen mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen optisch verfolgt werden. Vorteil zu einer herkömmlichen PCR ist, dass anhand einer Standardreihe die Anzahl an Kopien bestimmt werden kann. Für die optische Verfolgung der Amplifikation während der *Real Time* PCR können verschiedene fluoreszierende Farbstoffe eingesetzt werden.

Während der Dissertation wurde die *Real Time* PCR für die Titerbestimmung der hergestellten lentiviralen Vektoren eingesetzt. Für die Detektion der HIV abgeleiteten lentiviralen Vektoren wurde das TaqMan™ Detektionsverfahren verwendet und für die SIV abgeleiteten lentiviralen Vektoren wurde der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green™*. Als Template wurde Lysat der mit den zu messenden lentiviralen Vektoren transduzierten HeLa Zellen eingesetzt.

Das TaqMan™ Verfahren basiert auf dem ursprünglichen 5'Nuclease Assays und macht sich die 5'-3'Exonuklease Aktivität der Taq Polymerase zunutze. Die verwendete fluorogene Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'Ende mit einem Reporter Farbstoff markiert ist. Am 3'Ende befindet sich ein Quencher Farbstoff (Rhodaminderivat), der mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wird eine intakte Sonde mit 488 nm Wellenlänge angeregt, wird die Fluoreszenz durch die räumliche Nähe zum Quencher durch FET (Fluoreszenz Energietransfer) unterdrückt. Während der PCR bindet die Sonde zusammen mit den Primern an die Matrize. Im Zuge der Extensionsphase der PCR wird die Sonde durch die Taq Polymerase verdrängt. Dabei bildet sich eine Y-förmige Struktur, wodurch die 5'-3'Exonuklease Aktivität der Taq Polymerase aktiviert wird. So kommt es zur Sondenhydrolyse. Das

TaqMan™ System ist sequenzspezifisch, da nur 100%-ig gebundene Sonden hydrolysiert werden können.

Der Einsatz von *SYBR Green™* dagegen ist nicht sequenzspezifisch. Das *SYBR Green™* bindet sequenzunabhängig an doppelsträngige DNA. Daher wird am Ende einer *Real Time* mit *SYBR Green™* als Fluoreszenzfarbstoff eine Schmelzkurve durchgeführt. Dabei wird das Reaktionsgemisch in 1°C Schritten von 50°C-95°C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Der Punkt, an den die doppelsträngige DNA schmilzt, ist durch einen Abfall der Fluoreszenz gekennzeichnet. Bei unterschiedlichen Amplifikaten sind mehrere Schmelzpunkte zu erwarten.

Die Ansätze für die TaqMan™ *Real Time* bzw. die *SYBR Green™ Real Time* sehen wie folgt aus:

Ansatz für <i>Real Time</i> PCR mit TaqMan™ Sonde	
Reaktions Puffer (10x)	2,8 µl
d`NTP Mix 5 mM	1,12 µl
Primer sense (10 pmol)	0,84 µl
Primer antisense (10 pmol)	0,84 µl
Sonde	0,896 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,96 µl
H ₂ O	16,40 µl
HotGoldStar Enzym (5U/µl)	0,14 µl
Template (Lysat transduzierte HeLa Zellen)	5 µl (1:10 verdünnt)

Tabelle 12: Real Time mit TaqMan™ Sonde

Programm für <i>Real Time</i> PCR mit TaqMan™ Sonde			
Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
1	5 Minuten 30 Sekunden	95°C	34 x
2	1 Minute	94°C	
3	1 Minute	Annealing-Temperatur	
4	1 Minute	72°C	
5	15 Minuten	72°C	
6	∞	4°C	

Tabelle 13: Programm für Real Time PCR mit TaqMan™ Sonde

Ansatz für <i>real time</i> PCR mit <i>SYBR Green™</i>	
<i>SYBR Green™</i> Super Mix (2x) -100mM KCL -40mM Tris-HCl, pH 8,4 -0,4 mM jedes dNTPs -iTaq DNA Polymerase (50U/ml) -6mM MgCl ₂ - <i>SYBR Green™</i> I -20nM fluoresein -Stabilisatoren	12,5 µl
H₂O	6,5 µl
Primer sense (10 pmol)	0,5 µl
Primer antisense (10 pmol)	0,5 µl
Template (Lysat transduzierte HeLa Zellen)	5 µl (1:10 verdünnt)

Tabelle 14: Ansatz für Real Time PCR mit SYBR Green™

Programm für <i>Real Time</i> PCR mit <i>SYBR™ Green</i>			
Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
1	5 Minuten 30 Sekunden	95°C	
2	1 Minute	94°C	34 x
3	1 Minute	Annealing-Temperatur	
4	1 Minute	72°C	
5	15 Minuten	72°C	
6	∞	4°C	

Tabelle 25: Programm für Real Time PCR mit SYBR™ Green

2.2.1.6. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Man unterscheidet den analytischen und den präparativen Restriktionsverdau. Analytische Restriktionsanalysen werden durchgeführt, um DNA Moleküle aufgrund ihres spezifischen Restriktionsmusters zu charakterisieren. Für die Klonierung von bestimmten Fragmenten wird mittels geeigneter Restriktionsendonukleasen ein präparativer Restriktionsverdau durchgeführt. Die resultierenden DNA-Fragmente können anschließend nach der Aufreinigung auf dem Gel in einen Vektor ligiert werden.

2.2.1.6.1. Präparativer Restriktionsverdau

Der präparative Restriktionsverdau wurde eingesetzt, um bestimmte DNA-Fragmente aus der DNA zu isolieren und sie dann in andere Vektoren zu ligieren. In diesem Fall wurden 20 µl Ansätze pipettiert:

NEB Buffer (10x)	2 µl
BSA (10x)	2 µl
DNA	2 µg
Enzym	10 U
Aqua_{dest}	add 20 µl

Puffer und Inkubationstemperaturen wurden nach Herstellerangaben gewählt. Lag die Aktivität eines der Enzyme aufgrund der Puffer-Wahl unter 100%, wurden vom entsprechenden Enzym 15 U eingesetzt.

Der Restriktionsansatz wurde nach der Inkubation vollständig auf ein Gel aufgetragen und die entsprechenden Fragmente aus dem Gel isoliert.

Abweichend von dem oben beschriebenen Schema, wurde für die Restriktionsspaltung mit den Enzymen I-*Ceu* I und PI-*Sce* I ein größerer Ansatz von 30 µl gewählt:

Double Digestion Buffer (10x)	3 µl
BSA (10x)	3 µl
DNA	2 µg
I-<i>Ceu</i> I	0,5 U
PI-<i>Sce</i> I	2 U
Aqua_{dest}	add 30 µl

Der Verdau erfolgte für drei Stunden bei 37°C, die Inaktivierung für 25 Minuten bei 65°C und die weitere Lagerung, z. B. bei einem über Nacht Verdau, bei 4°C.

2.2.1.6.2. Analytischer Restriktionsverdau

Der analytische Restriktionsverdau wurde zur Analyse von isolierten Klonen eingesetzt. Die Ansätze sahen dann wie folgt aus:

NEB Buffer (10x)	1 µl
BSA (10x)	1 µl
DNA	0,5 µg
Enzym	3 U
Aqua_{dest}	add 10 µl

Der Puffer und die Inkubationstemperaturen wurden nach Herstellerangaben ausgewählt.

2.2.1.7. Ligation

Die Ligation wird zur Klonierung von DNA-Fragmenten genutzt. Vektor und Insert werden in der Regel nach Restriktionsverdau aus einem Gel aufgereinigt und ligiert.

Für eine Ligation wurde normalerweise die T4-DNA-Ligase genutzt.

Die Verknüpfung von Insert und Vektor erfolgt dabei über die Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen freien 5'- Phosphatgruppen und freien 3- Hydroxylgruppen, die von der Ligase katalysiert wird.

Für diesen Prozess wird ATP (1-5 mM) benötigt. Die Ligase hat ihr Temperaturoptimum bei 37°C. In der Praxis wird jedoch meist eine niedrigere Temperatur gewählt, da die Molekülbewegungen bei 37°C zu stark sind, was, aufgrund instabiler Wasserstoffbrückenbindung, in einer niedrigen Ligationseffizienz resultiert. Man ligiert in der Regel normalerweise bei einer Temperatur von 8-16°C für einige Stunden. Bei Fragmenten mit *sticky ends* ist eine Inkubation von 1 Stunde bei RT häufig ausreichend. Bei *blunt ends* ist die Ligation schwieriger und sollte für 4-18 Stunden bei 16°C inkubiert werden.

In dem verwendeten Ligationsprogramm wird zwischen dem Temperaturoptimum der Ligase und der Temperatur, bei der die Wasserstoffbrücken stabil sind gewechselt. So können sich die für die Ligation benötigten Wasserstoffbrücken ausbilden, aber die Ligase kann aufgrund der optimalen Temperatur effizienter arbeiten.

Zur Erhöhung der Ligationseffizienz wurde meist ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:10 eingesetzt. Um eine möglichst hohe Moleküldichte im Ansatz zu erreichen, wurde das Ligationsvolumen möglichst klein gehalten. Begrenzender Faktor war dabei die DNA-Konzentration von Vektor bzw. Insert.

Ligationsansatz		Ligationsansatz nach I-Ceu I / P1-Sce I Verdau	
T4 Ligase Puffer 10x	2 µl	T4 Ligase Puffer 10x	3 µl
Vektor DNA	100 ng	Vektor DNA	100 ng
Insert DNA	in der Regel 10x soviel wie Vektor- DNA	Insert DNA	in der Regel 10x soviel wie Vektor- DNA
PEG	1 µl	PEG	1 µl
T4-Ligase [1U/µl]	1,5 µl	T4-Ligase [1U/µl]	2 µl
Aqua _{dest}	add 20 µl	Aqua _{dest}	add 30 µl

Tabelle 16: Ligationsansätze

Die Ligation erfolgte im Thermocycler über Nacht, abweichend von den Standard Vorgaben, nach folgendem Programm:

Schritt	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklen
1	20 Minuten	37	30x 10x
2	1 Minute	10	
3	30 Sekunden	22	
4	30 Sekunden	4	
5	30 Sekunden	30	
6	60 Minuten	37	1x
7	15 Minuten	68	1x
8	∞	4	1x

Tabelle 17: Cycle Ligationsprogramm

2.2.1.7.1. Ligation in den pJET1 Cloning Vector

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde neben dem T-Vektor auch der pJET1 *Cloning Vector* der Firma MBI Fermentas verwendet. Der pJET1 *Cloning Vector* liegt als linearisierter *blunt end* Vektor vor und besitzt an seinen Enden Phosphat Gruppen, die eine Ligation von *blunt end* Produkten ermöglicht. Außerdem wird die Selektion auf positive Klone erleichtert. Durch die Ligation eines PCR Fragment wird der Leserahmen eines für viele *E.-coli* Stämme letalen Gens unterbrochen. Es ist also davon auszugehen, dass die erhaltenen Klone das PCR-Fragment enthalten.

Für *blunt end* PCR Fragmente, wie sie bei der Verwendung der Proofstart™ Polymerase entstehen, sah der Ansatz wie folgt aus:

Ligation von <i>blunt end</i> Fragmenten	
Reaktions Puffer (2x)	10 μ l
PCR Produkt (nicht aufgereinigt)	2 μ l
pJET1/blunt <i>Cloning Vector</i> (50 ng/μl)	1 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
Aqua_{dest}	add 20 μ l

Tabelle 18: Reaktionsansatz für die Ligation von blunt end Fragmenten

Nach dem Durchmischen erfolgte die Ligation bei 22°C für 5 Minuten.

Für *sticky end* PCR Fragmente, wie sie bei der Verwendung der RedTaq Polymerase entstehen, musste vor der Ligation erst eine blunting Reaktion durchgeführt werden.

Die Ansätze sahen wie folgt aus:

<i>Blunting</i> Reaktion	
Reaktions Puffer (2x)	10 μ l
PCR Produkt (nicht aufgereinigt)	2 μ l
DNA Blunting Enzym	1 μ l
Aqua_{dest}	add 18 μ l

Tabelle 19: Blunting Reaktionsansatz für die Ligation von sticky end PCR Fragmenten

Nachdem Durchmischen erfolgte eine Inkubation von 5 Minuten bei 70°C. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis erfolgte die Ligation. Dabei wurden nur die folgenden Agenzien zum Blunting Reaktionsansatz zugefügt:

Ligation von sticky end Fragmenten	
pJET1/blunt <i>Cloning Vector</i> (50 ng/μl)	1 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l

Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Ligation von sticky end PCR Fragmenten

Die Ligation erfolgte dann für 5 Minuten bei 22°C.

Für die Transformation von elektrokompenten Bakterien wurde der Ligationsansatz zuvor durch eine Phenol-Chloroform Extraktion vorbereitet und dann 1 μ l des extrahierten Ligationsansatzes transformiert.

2.2.1.8. Agarosegel-Elektrophorese

Agarosegele sind geeignet, um DNA-Fragmente von 0,1 – 25 kb mittels Elektrophorese aufzutrennen. Diese Auftrennung im elektrischen Feld ist möglich durch die negative Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats des DNA-Moleküls. So wandert die DNA während der Elektrophorese von der Kathode zur Anode. Die Konzentration der Agarose spielt neben der Stärke des elektrischen Feldes, der Größe und Form der Moleküle bei der Geschwindigkeit der Wanderung zur Anode eine große Rolle. Die Agarose bildet eine Siebstruktur aus, die kleine Fragmente schneller durchqueren können als größere. Die Laufstrecke der Fragmente ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge.

Für eine optimale Auftrennung muss die Agarosekonzentration deshalb den aufzutrennenden Fragmentgrößen angepasst werden.

Die am häufigsten eingesetzten Elektrophoresepuffer sind TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) und TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer). TAE ist gut für die Aufreinigung aus dem Gel geeignet. Die Pufferkapazität ist aber gering und die Gele müssen bei geringeren Spannungen (0,5 – 5 V/cm Elektrodenabstand) laufen. TBE-Puffer ist belastbarer (> 10 V/cm), aber das Borat kann bei der Aufreinigung stören.

Für alle Gele wurde der TAE-Puffer verwendet.

Für die analytischen und auch die präparativen Gelelektrophoresen wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8% und 1% verwendet. Dazu wurde die entsprechend Menge Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer gegeben und in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen wurden zu 100 ml gelöster Agarose 5 µl Ethidiumbromid (50 ng/100 ml) gegeben. Auch im Laufpuffer befand sich die gleiche Ethidiumbromid Konzentration wie im Gel. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem zehntel Volumen 10x Ladepuffer versetzt. Der Lauf erfolgte bei 130V und 100 mA für ca. 45 Minuten.

Die Gele wurden dann auf dem UV-Tisch (302 nm) betrachtet und mit dem Videodokumentationssystem (Herolab) dokumentiert.

Als Größenstandard wurde *Smart Ladder* (Eurogentec) verwendet.

Bei der präparativen Gelelektrophorese wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und das Gelstück in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

2.2.1.8.1. Extraktion von DNA aus dem Agarosegel

Für die Extraktion wurde das *Qiagen Extraction Kit*® verwendet. Die DNA wurde mit 30 µl EB-Puffer von der Säule eluiert.

2.2.1.9. Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien können aufgrund ihres physiologischen Zustands leichter Fremd DNA aufnehmen. Die Kapazität für die Aufnahme von Fremd-DNA ist am größten, wenn sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die während der Dissertation verwendeten kompetenten *E. coli* K12 Derivate wurden bis auf die Stble 4 Bakterien selbst vorbereitet.

2.2.1.9.1. Herstellung elektrokompetenter Bakterien TOP 10

Von einer 2 ml Vorkultur wurden Verdünnungsausstriche als Kontrolle auf LB+Kanamycin (30 µg/ml), LB+Tetracyclin, LB+Ampicillin (40 µg/ml) und nur antibiotikafreie LB-Platten gemacht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Wachstum auf eventuell erworbene Resistenzen überprüft. Wenn kein Wachstum auf Antibiotikaplatten zu verzeichnen war, wurde mit einer Kolonie der LB-Platte eine 2 ml Flüssigkultur angeimpft und bei 37°C schüttelnd über Nacht inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden zwei 250 ml LB-Medium Kulturen angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C auf dem Schüttler (180 rpm) bis zu einer OD_{600nm} von 0,6. Dann wurden die Flüssigkulturen auf 4 Zentrifugenbecher verteilt und für 1 Stunde bei 4°C auf Eis gelagert. Zum Ernten der Bakterien wurde 10 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die weiteren Schritte sind alle Lösungen und Materialien vorgekühlt.

Die Pellets wurden in je 60 ml 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und 20 Minuten bei 3500 x g zentrifugiert. Diese Schritte wurden wiederholt. Die Pellets wurden dann mit 2,5 ml/L Ausgangsmenge 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und aliquotiert (50 µl). Die aliquotierte Bakteriensuspension wurde sofort in flüssigen Stickstoff überführt und dann bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der Kompetenz wurde durch die Elektroporation mit 20 pg DNA des Vektors pUC 19 ermittelt und dann auf 1 µg DNA hochgerechnet.

2.2.1.9.2. Elektroporation von *E. coli*

Zu den 50 µl Aliquots der hergestellten elektrisch kompetenten *E. coli* TOP 10 Bakterien, die auf Eis aufgetaut wurden, wurden 5 µl des gefällten und in 10 µl Aqua_{dest.} aufgenommenen Ligationsansatzes (bei 100 ng eingesetztem Vektor) gegeben und für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Dadurch wird eine Anlagerung der DNA an die Bakterien gewährleistet. Der gesamte Ansatz wurde in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und unter folgenden Bedingungen transformiert:

Widerstand R	400 Ω
Kondensatorkapazität C	25 µF
Ausgangsspannung U	2,5 kV/cm

Die Zeitkonstante gibt die Länge des Pulses wieder. Es wurden Pulslängen von 4,5- 4,8 msec abgelesen.

Nach der Elektroporation wurde zu den transformierten Bakterien sofort 800 µl SOC-Medium in die Elektroporationsküvette gegeben und die transformierten Zellen in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Regeneration wurden die transformierten Bakterien für 60 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler (225 rpm) inkubiert.

Die Bakteriensuspension wurde dann, je nach Resistenzgen des Plasmids, auf 2 Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Dazu wurden auf einer Platte 150 µl der transformierten Bakterien und auf eine zweite Platte 150 µl eines ankonzentrierten Ansatzes (3 Minuten 3418 x g) ausplattiert.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

Die elektrokompetenten Bakterien STBL4™ wurden nicht selbst hergestellt, sondern über die Firma Life Technologies, Eggstein bezogen. Die Bakteriensuspension lag in 100 µl Aliquots vor. Diese 100 µl wurden in 20 µl Aliquots aufgeteilt, die nicht benötigten Aliquots in einem Ethanol-Trockeneis-Bad wieder eingefroren und dann bei -80°C gelagert. Dabei verlieren die Bakterien einen Teil ihrer Kompetenz (1×10^1).

Zu den 20 µl Bakteriensuspension wurden 50 ng DNA aus dem Ligationsansatzes gegeben und sofort elektroporiert. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Widerstand R	400
Kondensatorkapazität C	25 μ F
Ausgangsspannung U	1,2 kV/cm

Es konnten Pulslängen zwischen 4,5- 4,8 msec gemessen werden. Nach dem Puls wurden sofort 1000 μ l SOC-Medium zu den transformierten Bakterien gegeben. Die Regeneration erfolgte für 90 Minuten bei 30°C auf dem Schüttler (180 rpm). Nach der Regeneration wurde die Bakteriensuspension auf YT-Platten mit einem Antibiotikum entsprechend des Resistenzgens des Plamids ausplattiert (siehe TOP 10).

Die Inkubation erfolgte bei 30°C über Nacht.

2.2.1.9.3. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien des Stammes HB101

Bei der Herstellung der chemisch kompetenten Bakterien wurde ebenfalls, wie bei der Herstellung elektrokompetenter Zellen beschrieben, erst eine Resistenz Überprüfung durchgeführt. Auch für die chemisch kompetenten Bakterien wurden 250 ml Kulturen von einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Nach der Verteilung der Bakterienkultur auf die Zentrifugenbecher folgte eine Inkubation von einer Stunde auf Eis. Durch die Zentrifugation für 10 Minuten mit 5000 x g bei 4°C wurden die Bakterien pelletiert. Das Pellet wurde nach dem Resuspendieren in 50 ml eiskalter 100mM $MgCl_2$ Lösung für 20 Minuten mit 3500 x g bei 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde wiederum in 50 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$ Lösung resuspendiert und wieder 20 Minuten mit 3500 x g bei 4°C zentrifugiert. Nachdem dieses Pellet in 5 ml 50 mM $CaCl_2$ Lösung aufgenommen wurde, folgte eine Inkubation von 20 Minuten auf Eis. Nach der Inkubation wurden 500 μ l 96%iges (v/v) Glycerin zugegeben und die Bakteriensuspension zu 50 μ l aliquotiert. Die Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.9.4. Chemische Transformation von *E. coli*

Für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien HB101 wurden 20 ng DNA des fertigen Plasmids eingesetzt, die nach dem Auftauen der Bakterien auf Eis zugegeben wurden. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis und dann der Hitzeschock für 2 Minuten bei 42°C. Die Bakterien wurden sofort auf Eis gestellt und für 10 auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 900 μ l SOC-Medium wurden die Bakterien zur Regeneration für 60 Minuten schüttelnd bei 37°C inkubiert (225 rpm).

Die transformierten Bakterien wurden entsprechend des Resistenzgens des transformierten Plasmids auf LB-Agarplatten mit Antibiotikumzusatz ausgestrichen. Dazu wurden auf einer Platte 150 µl der transformierten Bakterien und auf eine zweite Platte 150 µl eines ankonzentrierten Ansatzes (3 Minuten 3418 x g) ausplattiert.

2.2.1.10. Herstellung der Vektoren

2.2.1.10.1. pSh S

Der lentivirale Vektor pSh S sollte aus dem SIV abgeleiteten Vektor pSIV_{-RMES}GAE (Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS Lyon France) nach dem Vorbild des pSh H generiert werden. Da sich das Shuttle System in den HIV-abgeleiteten Vektoren bewährt hatte, sollten die für dieses System wichtigen Restriktionsschnittstellen für die *homing* Restriktionsendonukleasen I-*Ceu* I und PI-*Sce* I auch in den SIV abgeleiteten Vektor pSIV GAE eingebracht werden.

Dazu wurde die *multiple cloning site* des Shuttle Vektors pBSh del. mittels der Primer SIV.MCS.pBSh sense und antisense amplifiziert. Die *multiple cloning site* des Vektors wurde flankiert von den Restriktionsschnittstellen für die *homing* Restriktionsendonukleasen PI-*Sce* I und I-*Ceu* I. Das Amplifikat wurde zunächst in den T-Vektor kloniert, um dann über die mit den Primern eingeführten Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Bam*HI in den SIV abgeleiteten Vektor pSIV_{-RMES}GAE umkloniert zu werden. Dabei wurde aus dem SIV abgeleiteten Vektor die Expressionskassette entfernt, sodass ein Basisvektor für die Umklonierung von fertig gestellten Expressionskassetten generiert wurde.

2.2.1.10.2. Klonierung des Reporter gens RedStar (RS)

Das Reporter gen RedStar wurde aus dem Vektor p415-Gal1-RedStar (von Michael Knop freundlicherweise zur Verfügung gestellt) über die Schnittstellen *Xba*I und *Xho*I in den Shuttle Vektor pBSh CMV kloniert. So entstand die Expressionskassette CMV RS innerhalb des Shuttle Vektors. Um die Expressionskassette durch das Verstärkerelement des *Woodchuck Hepatitis Virus* (WPRE) zu vervollständigen, wurde die Expressionskassette CMV RS über die Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Kpn*I in den Shuttle Vektor pSh CMV hrGFP WPRE gebracht. Durch den Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Kpn*I wurde im Vektor pSh CMV hrGFP WPRE der Promotor CMV und das Reporter gen hrGFP deletiert und durch die ausgeschnittene Expressionskassette CMV RS ersetzt.

Anschließend folgte die Umklonierung der im pSh generierten Expressionskassette CMV RS WPRE über die Restriktionsschnittstellen *PI-Sce I* und *I-Ceu I* in den Shuttle Vektor pBSh.

Diese Vektoren wurden im Verlauf der vorangegangenen Diplomarbeit hergestellt.

2.2.1.10.3. pSh S EF1a hrGFP WPRE und pSh S EF1a RS WPRE

Diese SIV abgeleiteten Vektoren enthalten das Reporterogen hrGFP bzw. RedStar zusammen mit dem Verstärkerelement WPRE unter Kontrolle des Elongationsfaktor 1 alpha Promotors (EF1a). Der Elongationsfaktor 1 alpha wurde neben dem Chicken beta actin Promotor, aufgrund vieler Veröffentlichungen zur Verwendung in undifferenzierten Stammzellen ausgewählt.

Der EF1a Promotor wurde aus dem Plasmid pLVTH, welches freundlicherweise von Dr. med. Axel Seltsam zur Verfügung gestellt wurde, über die Restriktionsschnittstellen *Nru I* und *Hpa I* isoliert. Der Promotor wurde dann in den Vektor pBlueskriptII SK (-) über die mit *Nru I* und *Hpa I* kompatiblen Restriktionsschnittstellen *Hind I* und *EcoRV* kloniert. Aus dem pBlueskript II SK (-) Vektor wurde der EF1a Promotor über *Xba I* und *Hind I* isoliert und über die kompatiblen Restriktionsschnittstellen *Xba I* und *Sma I* in den pBSh MCS hrGFP WPRE umkloniert. So entstand der Shuttle Vektor pBSh EF1a hrGFP WPRE.

Für die Klonierung des Reportergens RedStar unter der Kontrolle des EF1a Promotors wurde der EF 1a Promotor aus dem pBlueskriptII SK (-) über die Restriktionsschnittstellen *Spe I* und *Apa I* isoliert. Das isolierte Fragment wurde dann im Austausch gegen den CMV Promotor in den Vektor pBSh CMV über *Spe I* und *Apa I* umkloniert. In diesen Vektor konnte nun das Reporterogen RedStar sowie das Verstärkerelement WPRE aus dem Vektor pBSh CMV RS WPRE über die Restriktionsschnittstellen *Xba I* und *Afl I* hinter den EF1a kloniert werden. So entstand der Shuttle Vektor pBSh EF1a RS WPRE.

Beide Expressionskassetten, EF1a Promotor mit hrGFP bzw. RedStar und WPRE, wurden im letzten Schritt über die *homing* Restriktionseendonukleasen *PI-Sce I* und *Ceu I* in den pSh S gebracht.

2.2.1.10.4. pSh S CeCBA hrGFP WPRE und pSh S CeCBA RS WPRE

Diese SIV abgeleiteten Vektoren enthalten das Reporterogen hrGFP bzw. RedStar sowie das Verstärkerelement WPRE unter der Kontrolle des mit einem CMV Verstärkerelement gekoppelten *Chicken beta actin* Promotors (CeCBA). Dieser Promotor wurde wie der EF1a Promotor für die Verwendung in undifferenzierten embryonalen Stammzellen ausgewählt.

Um das entsprechende Konstrukt mit dem Reporter gen hrGFP herzustellen, wurde der CeCBA Promotor aus dem Vektor pCAGGS (Niwa *et al.* Gene 1991) über *Apal* und *Sal* isoliert. Der Promotor wurde danach über die Restriktionsschnittstellen *Apal* und *Sal* in den pBlueskriptII SK (-) kloniert. Über die Restriktionsschnittstellen *Apal* und *Bam*HI wurden das Promotor Element erneut isoliert und über die kompatiblen Restriktionsschnittstellen *Apal* und *Bgl*II in den Vektor pBSh MCS hrGFP WPRE umkloniert. So konnte der Shuttle Vektor pBSh CeCBA hrGFP WPRE generiert werden.

Für die Herstellung des zweiten Shuttle Vektors pBSh CeCBA RS WPRE konnte sowohl das Reporter gen RedStar sowie das Verstärkerelement WPRE aus dem Vektor pSh CMV RS WPRE über *Xba*I und *Bsu*36I isoliert werden. Dieses Element bestehend aus RedStar und WPRE wurde gegen das hrGFP mit dem Verstärkerelement WPRE im pBSh CeCBA hrGFP WPRE ausgetauscht. Auf diese Weise konnte der Shuttle Vektor pBSh CeCBA RS WPRE generiert werden.

Im letzten Schritt wurden dann beide Expressionskassetten, CeCBA hrGFP WPRE bzw. CeCBA RS WPRE, über die *hom*ing Restriktionsendonukleasen *Pi-Sce*I-*Ceu*I in den pSh S umkloniert.

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Zelllinien und Primärzellen

2.2.2.1.1. A549, HEK293T, HeLa, SMC, Mle12, Mle15, HUVEC

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln erwärmt und in 9 ml vorgekühltes Zellkulturmedium überführt. Nach der Zentrifugation mit 100xg- 500xg bei 4°C, wurden die Zellen in eine entsprechende Zellkulturflasche überführt. Für die Mle12, Mle15 und HUVEC wurden die Zellkulturflaschen zuvor mit 1%-iger Gelatine beschichtet.

Zur Kultivierung wurden die Zellen alle 2-3 Tage 1:3 (SMC)-1:10 (HEK293T) gesplittet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen von 25 cm²-175 cm² kultiviert. Zum Splitten wurden die Zellen 1x mit PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen, mit 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung 3 Minuten im Brutschrank inkubiert und die 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung mit der dreifachen Menge an Stopp-Medium (DMEM mit 20% FCS) inaktiviert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in neue entsprechend vorbereitete (siehe Auftauen der Zellen) Zellkulturflaschen überführt.

Eine Ausnahme in dieser Gruppe von Zelllinien und Primärzellen bildeten die HEK293T sowie die MLe15 Zellen. Die HEK293T Zellen konnten ohne den Einsatz von PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) und 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung, nur durch das Schlagen an die Zellkulturflasche abgelöst werden.

Beim Splitten der MLe15 Zellen entfiel das Waschen mit PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}). Die Zellen wurden mit der 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung gewaschen und dann mit 500 μ l 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung (Raumtemperatur) nach 1-2 Minuten abgelöst.

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie zum Splitten abgelöst und das Zellpelett nach der Zentrifugation in 1 ml Einfriermedium (90% FCS mit 10% DMSO) resuspendiert. Nach dem Überführen der Zellsuspension in Einfrierröhrchen erfolgte das Einfrieren in einem Nalgene *Freezing Container*. Nach einem Tag wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.1.2. HL-1 Zellen

Für das Auftauen der HL-1 Zellen mussten am Vortag die entsprechenden Zellkulturflaschen mit 0,02%-iger Gelatine Fibronectin-Lösung im Inkubator beschichtet werden. Die 0,02%-ige Gelatine Fibronectin Lösung wurde am Tag des Auftauens durch 10 ml Zellkulturmedium (Claycomb Medium mit 10% FCS, 100 U/ml – 100 μ g/ml Penicillin – Streptomycin, 0,1 mM Norepinephrin und 2 mM L-Glutamin) ersetzt und weiter inkubiert.

Die eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes Waschmedium (Claycomb Medium mit 5% FCS und Penicillin/Streptomycin) überführt. Nach der Zentrifugation mit 500xg für Minuten bei 4°C wurde das Pellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und zu den in der Zellkulturflasche befindlichen 10 ml Zellkulturmedium zugegeben. Nachdem die Zellen attähriert waren, wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

Zur Kultivierung wurden die Zellen ausschließlich bei Erreichen absoluter Konfluenz gesplittet. Zum Splitten wurden die Zellen mit 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung gewaschen, nach erneuter Zugabe von 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung für 2 Minuten im Inkubator inkubiert und nochmals mit erneuerter 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung für 3 Minuten im Inkubator belassen. Die 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung wurde durch einen Trypsin Inhibitor inaktiviert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen 1:3 gesplittet und auf eine mit 0,02%-iger Gelatine Fibronectin Lösung beschichtete Zellkulturflasche ausgesät.

Zum Einfrieren wurden die Zellen, wie beschrieben abgelöst und nach dem Pelletieren in 1,5 ml Einfriermedium (95% FCS mit 5% DMSO) resuspendiert und in Einfrierröhrchen im *Nalgene Freezing Container* eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.2.1.3. Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten

Die NRCMs wurden aus den Herzen von neonatalen Wistar-Ratten gewonnen. Diese Tiere waren maximal einen Tag alt.

Nach dem Dekapitieren der Ratten wurden die Herzen entnommen und durch Trypsin und DNase enzymatisch vorbehandelt. Nach der mechanischen Isolation der Zellen aus dem Gewebeverband und einer Zentrifugation mit 100xg bei 4°C für 10 Minuten wurde die Einzelzellsuspension zur Entfernung von Gewebeteilen über ein 100-µm-Zellsieb gegeben. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium (DMEM mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und 100 U/ml – 100 µg/ml Penicillin – Streptomycin) aufgenommen und auf mit 1%-iger Gelatine beschichtete Zellkulturgefäße ausgesät.

2.2.2.2. Embryonale Stammzellkultur

2.2.2.2.1. Isolierung muriner embryonaler Fibroblasten (*Feederzellen*)

Die für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen notwendigen murinen embryonalen Fibroblasten wurden aus Mäuseembryonen an Tag 13 isoliert. Die dazu verwendeten Mäuse gehören zum Mausstamm ICR. Die Embryonen wurden zunächst aus dem Uterus präpariert. Den präparierten Embryonen wurden Kopf, Gliedmaße und die sichtbaren Herz-Kreislauf Anlagen entfernt. Die Körper wurden in PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) überführt zweimal darin gewaschen. Vor dem enzymatischen Verdau, erfolgte eine mechanische Zerkleinerung des Gewebes in 2 ml 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung mittels einer Schere für 10 Minuten auf Eis. Nach der Zerkleinerung folgte der enzymatische Verdau. Zu dem zerkleinerten Gewebe wurden 15 ml 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung gegeben und unter Rühren in einem Erlenmeyerkolben bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Trypsin durch die Zugabe von 51 ml Stopp-Medium (DMEM + 20% FCS) inaktiviert. Zur Entfernung noch vorhandener Gewebeteile wurde die Zellsuspension über ein 100-µm-Zellsieb gegeben. Nach der Zentrifugation für 5 Minuten mit 500xg bei 4°C und dem Bestimmen der Zellzahl wurden 5x10⁶ Zellen pro 100 mm Gewebekulturschale ausgesät. Nach Erreichen 100%-iger Konfluenz wurden die Zellen abgelöst, bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in den flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.2. Murine embryonale Fibroblasten (*Feederzellen*)

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln erwärmt und in 9 ml vorgekühltes Zellkulturmedium (DMEM mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und 1% nicht essenzielle Aminosäuren) überführt. Nach der Zentrifugation mit 500xg bei 4°C für 5 Minuten wurden die Zellen in unbeschichtete Zellkulturschalen überführt.

Zur Kultivierung wurden die Zellen alle 3-4 Tage 1:2 – 1:4 gesplittet. Zum Splitten wurden die Zellen 1x mit PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen, mit 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung 4-5 Minuten im Brutschrank inkubiert und die 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung mit der dreifachen Menge an Zellkulturmedium inaktiviert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in neue Zellkulturschalen überführt.

Da diese Zellen nur für 4 Passagen nach dem Auftauen verwendet werden konnten, wurden diese Zellen nicht wieder eingefroren.

2.2.2.2.3. Inaktivierung von *Feederzellen*

Um diese Zellen als Grundlage für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen zu verwenden, mussten die Zellen zuvor durch Mitomycin C inaktiviert werden.

Dazu wurde Zellkulturmedium mit Mitomycin C versetzt und für 3-5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um das Mitomycin C von den Zellen zu entfernen, wurde nach der Inkubation 3x mit PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen, die Zellen mit 0,05/0,02% Trypsin/EDTA Lösung abgelöst und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen, gezählt und in einer ausgetesteten Zellzahl für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen ausgesät. Nach einem Tag wurde erneut ein Mediumwechsel zur Entfernung letzter Mitomycin C Reste vorgenommen. Diese so inaktivierten Zellen konnten für 7 Tage für die Kultivierung embryonaler Stammzellen verwendet werden.

2.2.2.2.4. Kultivierung von Rhesus embryonalen Stammzellen (RESCs)

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln erwärmt. Die aufgetauten Zellen wurden vorsichtig mit einer 2-ml-Pipette in ein 15-ml-Falcon Röhrchen überführt. Vorgekühltes, falls vorhanden durch RESC auf Feeder Zellen konditioniertes Zellkulturmedium (KnockOut-Dulbeccos Modified Eagle Medium mit 20% *Serum Replacement*, 1mM L-Glutamin, 0.1mM β -Mercaptoethanol, 1% nicht-essenzielle Aminosäuren und 4 ng/ml *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF)) wurde unter

Schütteln zu den aufgetauten Zellen zugetropft. Nach sofortiger Zentrifugation mit 100xg für 3 Minuten bei 4°C wurden die Zellen nach sorgfältiger Abnahme des Mediums in 1 ml konditioniertem Medium aufgenommen und vorsichtig mit einer 2-ml-Pipette in ein mit inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (*Feeder Layer*) und konditioniertem Medium vorbereitete Vertiefung einer 6-Loch-Platte überführt. Ein Mediumwechsel wurde erst bei sichtbar werden der ersten Kolonien der RESCs durchgeführt. Zum ersten Splitten wurden die Kolonien mithilfe einer Glaskapillare aus dem *Feeder Layer* ausgeschnitten. Dazu wurde das Zellkulturmedium gegen eine 0,2%-ige Kollagenase Lösung ausgetauscht und die Zellen für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation war es möglich, die abgelösten Kolonien unter optischer Kontrolle am Mikroskop auszuschneiden. Dabei wurden nur die nach optischer Betrachtung undifferenzierten Kolonien ausgeschnitten.

Für die weitere Kultivierung wurden die Kolonien zwei Mal pro Woche je nach Kolonie Dichte und Größe 1:2 – 1:6 gesplittet. Zum Splitten wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch 0,2%-ige Kollagenase Lösung ersetzt. Nach einer Inkubation von 10-30 Minuten lösten sich die Kolonien aus dem *Feeder Layer* und konnten durch Klopfen vollständig abgelöst werden. Nach der Verdünnung der Kollagenase Lösung mit Zellkulturmedium und der Zentrifugation mit 100xg für 3 Minuten bei 4°C wurden die Kolonien in 1 ml Zellkulturmedium durch leichtes Pipettieren zerkleinert und dann auf einen neuen *Feeder Layer* ausgesät. Befanden sich zu viele differenzierte Kolonien in der Kultur, wurden die optisch undifferenzierten Kolonien nach der Kollagenase Behandlung für die weitere Kultivierung ausgeschnitten. Die RESCs benötigten alle 1 bis 2 Tage einen Mediumwechsel.

Zum Einfrieren wurden die Kolonien, wie beschrieben vom *Feeder Layer* abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 0,5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden 0,5 ml Einfriermedium (30% konditioniertes Medium 30% frisches Medium 20% DMSO 20% *Serum Replacement*) unter Schütteln zu den resuspendierten Zellen getropft. Die Zellen wurden in einem *Nalgene Freezing Container* eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.2.2.5. Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen (mESCs)

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln erwärmt. Die aufgetauten Zellen wurden vorsichtig mit einer 2-ml-Pipette in ein 15-ml-Falcon Röhrchen überführt. Vorgekühltes Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) mit 15% FCS (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 0,2 mM L-Glutamin, 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 0,1 mM Nicht-essenzielle Aminosäuren und 0,1% huLIF (human leukemia inhibitory factor)) wurde unter Schütteln zu den

aufgetauten Zellen zugetropft. Nach sofortiger Zentrifugation mit 100 xg für 3 Minuten bei 4°C wurden die Zellen nach sorgfältiger Abnahme des Mediums in 1 ml konditioniertem Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit einer 2-ml-Pipette in eine mit inaktivierten *Feederzellen* und Zellkulturmedium vorbereitete Vertiefung einer 6-Loch-Platte überführt. Ein Mediumwechsel wurde nach 2 Tagen durchgeführt.

Für die weitere Kultivierung wurden die Kolonien zwei Mal pro Woche je nach Kolonie Dichte und Größe 1:10 - 1:50 gesplittet. Zum Splitten wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch 0,2%-ige Kollagenase Lösung ersetzt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten lösten sich die Kolonien aus dem *Feeder Layer* und konnten durch Klopfen vollständig abgelöst werden. Nach der Verdünnung der Kollagenase Lösung mit Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) mit 15% FCS (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 0,2 mM L-Glutamin, 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 0,1 mM Nicht-essenzielle Aminosäuren und 0,1% huLIF (human leukemia inhibitory factor)) und der Zentrifugation bei 800 rpm für 3 Minuten bei 4°C, wurden die Kolonien mit 1 ml PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) gewaschen. Nach der Zentrifugation wurden die Kolonien in 1 ml ES-Trypsin (0,25% Trypsin-EDTA Lösung) resuspendiert und unter Schütteln für 20 Sekunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Das ES-Trypsin wurde durch die Zugabe der dreifachen Menge Zellkulturmediums inaktiviert. Nach der erneuten Zentrifugation wurden die Kolonien durch Pipettieren mechanisch zerkleinert, sodass sich nur noch Einzelzellen in der Suspension befanden. Diese Einzelzellen wurden auf einen *Feeder Layer* ausgesät. Während der Kultivierung wurde alle 1 bis 2 Tage einen Mediumwechsel vorgenommen.

Zum Einfrieren wurden die Kolonien, wie beschrieben vom *Feeder Layer* abgelöst und abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 0,5 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Zu den resuspendierten Zellen wurden 0,5 ml des Einfriermediums (30% konditioniertes Medium 30% frisches Medium 20% DMSO 20% FCS) unter Schütteln zugetropft und in einem Einfrierröhrchen in einem *Nalgene Freezing Container* eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff.

2.2.2.2.6. kardiale Differenzierung von RESCs

Für die kardiale Differenzierung der RESCs wurde die Differenzierung in *embryoid bodies* (EBs) verwendet. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Differenzierungsmedium (IMDM mit 20% FCS der Firma Hyclone, 1mM L-Glutamin, 0,1mM β -Mercaptoethanol und 1% nicht-essenzielle Aminosäuren) aufgenommen. Für die kardiale Differenzierung war es wichtig, die Zellen nicht zusätzlich zum enzymatischen Verdau mechanisch zu

zerkleinern. Für die Bildung der EBs wurden die Zellen in zuvor mit 1%iger Agarose beschichtete 12-Loch-Platten überführt (Tag 0 der Differenzierung). Die verwendete Agarose-Lösung wurde in IMDM Medium angesetzt. Nach einer Woche wurden die EBs in mit 0,1%iger Gelatine beschichtete 6-Loch-Platten ausplattiert (Tag 7 der Differenzierung). Ab Tag 9 der Differenzierung konnten die ersten schlagenden Areale beobachtet werden.

2.2.2.2.7. kardiale Differenzierung von mESCs

Für die kardiale Differenzierung der mESCs wurde die *hanging drop* Methode verwendet. Diese Methode erlaubt es, die Menge an Zellen, die einen EB bilden zu definieren. Die Größe der EBs kann je nach gewünschter Differenzierungsrichtung wichtig sein, da sie einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Zellen in einem EB hat.

Für die Herstellung der *hanging drops*, wurden die Zellen wie beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Nach der Aufnahme der Zellen im Differenzierungsmedium (IMDM mit 20% FCS der Firma PAA, 1mM L-Glutamin, 0.1mM β -Mercaptoethanol und 1% nicht-essenzielle Aminosäuren) und dem Bestimmen der Zellzahl, wurden in den Deckel einer Zellkulturschale mithilfe einer Multipette einzelne Tropfen getropft (Tag 0 der Differenzierung). Die sich anschließende Inkubationszeit betrug zwei Tage. Danach wurden die EBs von dem Deckel abgenommen und in eine mit 1%iger Agarose beschichtete Zellkulturschale überführt (Tag 2 der Differenzierung). Auch bei der kardialen Differenzierung der mESCs wurde die Agarose in IMDM Medium gelöst. An Tag 7 der Differenzierung wurden die EBs auf mit 0,1%iger Gelatine beschichtete 6-Loch-Platte ausplattiert. Auch hier konnten ab Tag 9 der Differenzierung die ersten schlagenden Areale beobachtet werden.

2.2.3. Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in Zellkulturmedium aufgenommen. 10 μ l der Zellsuspension wurden zu 90 μ l Trypanblau gegeben. Durch das Trypanblau werden die toten Zellen blau angefärbt, da der Farbstoff in diesem Fall in den Zellkern gelangen kann. Die lebenden Zellen bleiben farblos. Es wurden vier Großquadrate einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$\frac{\text{Zellen}}{4 \text{ GQ}} \cdot 10^4 \quad * V = \text{Zelldichte [1/ml]}$

5 ml

V = Verdünnungsfaktor GQ = Großquadrat

2.2.4. Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen in *Culture Slides* oder in 24 bzw. 12 Loch Platten für 4 bis 20 Minuten mit 4%-iger Paraformaldehyd Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) wurden die fixierten Zellen mit TBS+ Puffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der TBS+ Puffer enthielt Serum des Tieres, aus dem der später verwendete Sekundärantikörper stammt. So konnte unspezifischen Bindungen vorgebeugt werden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}), wurde der in Färbepuffer verdünnte Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) gewaschen, bevor der in Färbepuffer verdünnte Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellkerne mit DAPI Lösung (1,7 $\mu\text{g/ml}$) für 15 Minuten gegengefärbt. Für eine längere Lagerung wurden die Zellen mit Mountingmedium bedeckt und mit einem Deckgläschen versehen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.5. Arbeiten unter S2-Bedingungen

2.2.5.1. Virusproduktion

Um die im Rahmen der Doktorarbeit hergestellten lentiviralen Vektoren in lentivirale Partikel zu verpacken, musste das jeweilige Transferplasmid zusammen mit 2 Verpackungsplasmiden in eine Verpackungszelllinie transfiziert werden. Anschließend können die in den Zellen produzierten Viruspartikel aus dem Zellkulturüberstand geerntet werden.

Das folgende Protokoll der Virusproduktion gilt für 2 Ansätze also 2 Petri-Schalen:

Diese Größe der Virusproduktion wurde ausschließlich für die erste Überprüfung eines neu generierten lentiviralen Konstruktes verwendet.

Zuerst wurden 293T-Zellen in Petrischalen mit einer Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ je Schale ausgesät. Die Beschichtung der Petrischalen erfolgte mit Poly-L-Lysin.

Dazu wurde Poly-L-Lysin in die Petrischalen gegeben, sodass der Boden bedeckt war. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde 1 Mal mit PBS (mit Kalzium und Magnesium) gewaschen und die Petrischalen vor dem Aussäen der Zellen stehen gelassen, bis die Oberfläche trocken war.

Am nächsten Tag sollten die Zellen zu 70-80% konfluent sein.

Es folgte die Kalzium-Phosphat-Transfektion der drei Plasmide. Dafür wurden von den einzelnen Plasmiden folgende Mengen verwendet:

Plasmid	eingesetzte Menge für 2 Ansätze
Transfervektor	20 µg
Verpackungskonstrukt pCMVΔ R8.91/ pS PAX / pSIV3+	13 µg
Hüllplasmid pMD.G / pMD2.G	7 µg
CaCl Lösung [2M]	122 µl
Aqua _{dest}	add 1000 µl

Tabelle 21: Ansatz für die Virusproduktion

Es wurden 1000 µl 2x HBS Puffer in einem Greiner Röhrchen mit rundem Boden vorbereitet. Unter ständiger Produktion von Luftblasen, mithilfe einer automatischen Pipettierhilfe und einer 2-ml-Plastikpipette, wurden die 1000 µl des DNA-Ansatzes zugetropft. Nachdem der gesamte DNA Ansatz zugetropft worden war, wurden noch für eine weitere Minute Luftblasen produziert. Des Weiteren wurden 10 ml Zellkulturmedium mit 3,3 µl 100mM Chloroquine Lösung versetzt. Nach Abnahme des Zellkulturmediums wurden 3 ml Zellkulturmedium/Chloroquine-Lösung auf die 293T- Zellen gegeben. Die Chloroquine-Lösung verhindert den lysosomalen Abbau von DNA in Endosomen (H:G: Gassen 1999). 1000 µl des DNA-Präzipitates wurden zu den 3 ml Zellkulturmedium/Chloroquine-Lösung zugetropft und die Petrischale leicht geschwenkt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ für 8-16 Stunden.

Am nächsten Tag wurden 10 ml Zellkulturmedium mit 100 µl 1M Natriumbutyrat-Lösung vorbereitet. Die Natriumbutyrat-Lösung begünstigt eine aktive Chromatinform (H.G.Gassen 1999). Das Zellkulturmedium mit dem Präzipitat wurde abgenommen und die Zellen mit je 10 ml PBS (mit Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen bevor 5 ml des vorbereiteten Zellkulturmediums mit Natriumbutyrat auf die Zellen gegeben wurde. Es folgte eine Inkubation bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ für 8-16 Stunden.

Noch am selben Tag wurde das Zellkulturmedium mit Natriumbutyrat abgenommen, die Zellen mit je 10 ml PBS (mit Mg^{2+} und Ca^{2+}) gewaschen und je 5 ml Zellkulturmedium ohne Zusatz von FCS zugegeben. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 für 8-16 Stunden.

Am nächsten Tag folgte die erste Virusernte. Dazu wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und durch einen Filter (0,45 μm Porengröße) in ein 50-ml-Falcon gegeben. Auf die Zellen wurden für die zweite Virusernte, nach weiteren 8 Stunden Inkubation, 10 ml Zellkulturmedium ohne Zusatz von FCS gegeben. Die zweite Virusernte erfolgte wie zuvor beschrieben. Der geerntete Überstand der ersten und zweiten Ernte wurde auf Zentrifugenröhrchen verteilt und über Nacht mit 18000xg für 18 Stunden bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 μl Zellkulturmedium aufgenommen, auf Einfrierröhrchen verteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

Für ausgetestete lentivirale Vektoren wurde eine größere Produktion durchgeführt.

Es wurden neun 175 cm^2 Zellkulturflaschen wie vorher beschrieben mit Poly-L-Lysin Lösung beschichtet und auf jeder Zellkulturflasche 9×10^6 HEK293T-Zellen ausgesät. Für die Transfektion und die folgenden Waschschrte wurde die dreifache Menge der Plasmide, der Medien und PBS Volumina verwendet im Vergleich zur vorher beschriebenen Virusproduktion. Nach der zweiten Ernte wurde der Überstand auf sechs Zentrifugenröhrchen verteilt und die Pellets wurden nach der Zentrifugation in 200 μl Zellkulturmedium pro Zentrifugenröhrchen aufgenommen und auf 20 Einfrierröhrchen verteilt. Das Zellkulturmedium wurde je nach später zu transduzierender Zellart ausgewählt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5.2. Transduktion

2.2.5.2.1. Transduktion zur Titerbestimmung

Für die Titerbestimmung wurden 1×10^6 HeLa Zellen in einem Gesamtvolumen von 1000 μl mit den zu bestimmenden Viren transduziert.

Transduktionsansatz Titerbestimmung	
1x10 ⁶ HeLa Zellen	
Zu bestimmende Viren	25 μl
Polybrene 250x	4 μl
Zellkulturmedium	add 1000 μl

Tabelle 22: Transduktionsansatz Titerbestimmung

Die Inkubation erfolgte in Suspension in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß rotierend bei 37°C für 4 Stunden. Danach wurden die Zellen unter Zugabe von 2 ml Zellkulturmedium in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen in eine 100-mm-Zellkulturschale umgesetzt. Nach 2 weiteren Tagen erfolgte ein erneutes Splitten der Zellen, bevor sie nach weiteren zwei Tagen Inkubation abgelöst und gezählt wurden. Für den folgenden Proteinase-K-Verdau wurden 1×10^6 Zellen in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß abzentrifugiert und das Zellepellet in den Proteinase-K-Verdau eingesetzt.

2.2.5.2.2. Proteinase-K-Verdau

Für den Aufschluss der für die Titerbestimmung transduzierten HeLa Zellen wurde das Zellpelett in 100 μl Proteinase-K-Verdau Lösung pro 1×10^6 Zellen aufgenommen.

Proteinase-K-Verdau Lösung	
Proteinase-K-Lösung (10mg/ml)	20 μl
RedTaq PCR Puffer (10x)	100 μl
Aqua _{dest}	880 μl

Tabelle 23: Proteinase-K-Verdau

Das Zellepellet wurde mithilfe einer 200 μl Pipette kräftig in der Proteinase-K-Verdau Lösung resuspendiert. Danach erfolgte der Zellaufschluss für 3 Stunden bei 56°C unter Schütteln. Zur

Inaktivierung der Proteinase-K wurde eine Hitzeinaktivierung bei 95°C für 10 Minuten unter Schütteln durchgeführt. Die verdauten Zellen wurden aliquotiert und bei -20°C eingefroren bevor sie in die unter Punkt 2.2.1.5.3. beschriebene *Real Time* PCR eingesetzt wurden.

2.2.5.2.3. Transduktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM)

Die NRCMs wurden direkt nach ihrer Isolierung für die Transduktion verwendet. In einem typischen Ansatz wurden 4×10^5 Zellen eingesetzt. Dazu kamen 4µg/ml Protaminsulfat, 10 µM Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und Zellkulturmedium. Der Transduktionsansatz wurde möglichst klein gehalten und so wurde das Volumen des gesamten Ansatzes auf 1000µl begrenzt. Die Transduktion erfolgte in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß rotierend bei 37°C für vier Stunden. Danach wurden die Zellen auf eine mit Gelatine beschichtete Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Die Auswertung der Transduktion konnte nach 5 Tagen vorgenommen werden.

2.2.5.2.4. Transduktion von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in Suspension transduziert. Dazu wurden in der Regel 1×10^5 Zellen mit Polybrene (4µg/ml), den entsprechenden viralen Partikeln und Zellkulturmedium für vier Stunden bei 37°C rotierend in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß inkubiert. Das Gesamtvolumen der Transduktionsansätze wurde auf 1000 µl begrenzt. Die MOI lag bei den Transduktionen zwischen 1 und 20. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf entsprechend der Zelllinie vorbereitete Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen ausgesät. Die Auswertung erfolgte in der Regel nach dem zweiten Mal Splitten und einer Inkubation von mindestens 3 Tagen.

2.2.5.2.5. Transduktion von mESC

Für die Transduktion von mESCs wurden die Zellen abgelöst und durch den Verdau mit ES-Trypsin eine Einzelzellsuspension hergestellt. Für die Transduktion wurden in der Regel 4×10^4 Zellen verwendet. Zu den Zellen wurden Polybrene (8µg/ml), die entsprechenden lentiviralen Partikeln und Zellkulturmedium gegeben. Die MOI bei diesen Transduktionen lag zwischen 20 und 100. Das Gesamtvolumen wurde auf 1000 µl begrenzt. Der gesamte Transduktionsansatz zusammen mit den Zellen wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorbereitet und sofort auf einen dafür vorbereiteten

Feeder Layer ausgesät. Nach 6-8 Stunden wurde zwischen 500-1000µl, je nach Größe des Zellkulturgefäßes, frisches Zellkulturmedium zugegeben. Die Auswertung erfolgte in der Regel nach dem 2. Mal Splitten und nach 4 Tagen Inkubation. Für die weiteren Versuche mussten die transduzierten mESCs durch eine manuelle Selektion und später mithilfe eines *Cell Sorters* angereichert werden.

2.2.5.2.6. Transduktion RESC

Im Unterschied zu den mESCs wurden die RESC im adärenten Zustand transduziert. Dazu wurden die RESC auf eine mit einem Feeder Layer vorbereitete Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät. Nach einem Tag wurde das Zellkulturmedium gegen 1000µl eines Transduktionsansatzes ausgetauscht. Der Transduktionsansatz enthielt die entsprechenden lentiviralen Partikel, Polybrene (8µg/ml) und Zellkulturmedium. Nach 6-8 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden 500 µl frisches Zellkulturmedium zugegeben. Die Auswertung der Transduktion erfolgte nach dem zweiten Mal Splitten und einer Inkubation von vier Tagen. Für die weiteren Versuche mussten die transduzierten Zellen über die Markierung positiver Kolonien und das Ausschneiden der markierten Kolonien angereichert werden. Eine Aufreinigung über den *Cell Sorter* war bei diesen Zellen nicht möglich.

2.2.5.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Voraussetzung für die Durchflusszytometrie ist, dass Zellsuspensionen vorliegen, diese Zellsuspensionen stammen hier aus der Transduktion oder Transfektion von 293T-Zellen. Die Zellsuspensionen werden über eine Kapillare aus dem Röhrchen angesaugt und anschließend durch hydrodynamische Fokussierung in einer isotonen Lösung, wie an einer Perlenkette an einem monochromatischen Laserstrahl vorbeigeleitet. Dabei wird das Licht in unterschiedliche Richtungen abgelenkt. Vorwärts gestreutes Laserlicht wird als Forward *Scatter* (FSC) und im rechten Winkel abgelenktes Licht als *Side Scatter* (SSC) bezeichnet. Die beiden Signale geben Auskunft über die Größe und die Granularität einer Zelle. Dabei korreliert der FSC mit der Größe der Zelle und der SSC mit der Granularität der Zelle. Als weitere Parameter können unterschiedliche Fluoreszenzen gemessen werden. Durch das Licht des Laserstrahls werden Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe auf ein höheres Energieniveau gehoben und emittieren beim Zurückkehren in den Ausgangszustand Licht (Photonen). Dieses Licht ist energieärmer als das absorbierte Licht und hat eine

größere Wellenlänge. Streu- und das Fluoreszenzlicht werden durch verschiedene Fotodioden/Fotomultiplier erfasst, in Impulse umgewandelt und verstärkt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung HIV-1-basierter lentiviraler Vektoren für die zelltypspezifische Transgenexpression

Embryonale Stammzellen und insbesondere die jüngst in der Maus aus adulten Fibroblasten generierten und funktionell den ES-Zellen vergleichbaren reprogrammierten „iPS“-Zellen [186-190] stellen eine viel versprechende Zellquelle für regenerative Therapien wie das *Tissue Engineering* und die Zelltherapie im Bereich von Herz- bzw. Lungenerkrankungen dar. Die Differenzierung von embryonalen Stammzellen führt bisher nicht zu einer reinen Population der gewünschten Zielzellen sondern zu einem Gemisch verschiedenster Zelltypen. Für einen therapeutischen Einsatz der differenzierten Zellen genauso wie für detaillierte molekulare und funktionelle Charakterisierungen ist eine Aufreinigung der Zielzellen deshalb unumgänglich. Für Kardiomyozyten und Typ II Pneumozyten (AT2 Zellen) stehen leider keine spezifischen Oberflächenmarker zur Verfügung, die eine antikörperbasierte FACS-Aufreinigung vitaler Zellen erlauben würden. In diesem Fall stellt das gentechnische Einbringen von Selektionsmarkern unter Kontrolle zelltypspezifischer Promotoren eine alternative Methode dar, die sowohl *FACS-Sorting* als auch eine Antibiotika-basierte Zellaufreinigung ermöglicht. Da konventionelle nicht-virale Methoden für den Gentransfer insbesondere in ES-Zellen von Primaten bisher nur unbefriedigende Ergebnisse erbrachten, wurden lentivirale Vektoren zur Etablierung einer zelltypspezifischen Transgenexpression in Stammzellen bzw. in daraus abgeleiteten ausdifferenzierten Derivaten ausgewählt.

Zur Charakterisierung der generierten zelltypspezifischen lentiviralen Vektoren abgeleitet vom HIV-1 (und auch von SIV) war es notwendig, diese zuvor in verschiedenen Zelltypen auf ihre Funktionalität und Spezifität auszutesten. Für diese Charakterisierung der verwendeten Promotoren im lentiviralen Kontext wurde aufgrund der einfachen Detektierbarkeit als Transgen das *Green Fluorescent Protein* (GFP) ausgewählt.

3.1.1. Verwendete zelltypspezifische Promotoren

In Bezug auf eine kardiomyozytenspezifische Genexpression wurde der humane Promotor des Atrialen Natriuretischen Faktors (hANF) und der humane Promotor für die leichte Kette des Myosins (MLC2v) verwendet. Der ANF-Promotor sollte aufgrund seiner spezifischen Expression von ANF im adulten Herzvorhof die Aufreinigung atrialer Kardiomyozyten ermöglichen. Der humane MLC2v Promotor wurde

im Hinblick auf die auf den kardialen Ventrikel beschränkte Expression ausgewählt und sollte für die Aufreinigung ventrikulärer Kardiomyozyten genutzt werden.

Im Hinblick auf eine lungenspezifische Transgenexpression wurde der humane SP-C Promotor verwendet. Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist das Surfactant Protein C der einzige molekulare Marker von Typ II Alveolarepithelzellen, der sich tatsächlich nur auf diesen Zelltyp beschränkt.

In vorangegangenen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe hatte sich herausgestellt, dass zelltypspezifische Promotoren meist zu schwach sind, um ohne verstärkende Elemente im genomischen Umfeld des Integrationsortes zu einer ausreichenden Transgenexpression zu führen. In der Hoffnung eine Verstärkung der Transgenexpression ohne, oder zumindest nur mit begrenztem Verlust der Spezifität erzielen zu können, waren deshalb in der Arbeitsgruppe auch Vektoren, bei denen ein CMV-Enhancer in das Backbone des lentiviralen Vektors eingefügt wurde, hergestellt worden. CMV-Enhancer waren in jüngerer Vergangenheit bereits von anderen Arbeitsgruppen zur Steigerung der Transgenexpression sowohl in Kombination mit ubiquitären [191] als auch mit zelltypspezifischen Promotoren [6, 150] verwendet worden, nicht jedoch in lentiviralen Vektoren.

Im Fall der zelltypspezifischen Promotoren hANF und MLC2v wurden Vektoren, die in der Diplomarbeit von Frau Jennifer Heinke fertig gestellt worden waren, verwendet.

Um einen direkten Einfluss des eingefügten CMV Enhancers auf die Expression des Transgens auszuschließen, wurde ein Kontrollvektor, der innerhalb der Expressionskassette nur das hrGFP und das WPRE ohne einen Promotor besitzt, aber das CMV Enhancer enthält, bei den Experimenten mitgeführt. Sollte ein direkter Einfluss des CMV Enhancers vorliegen, könnte keine zelltypspezifische Expression mehr gewährleistet werden. Auch dieser Vektor wurde von Frau Jennifer Heinke im Zuge ihrer Diplomarbeit hergestellt.

Eingesetzt wurden weiterhin lentivirale Vektoren mit dem humanen SP-C-Promoter, die im Verlauf der Diplomarbeit von Frau Kerstin Radtke hergestellt wurden.

Als Positivkontrolle wurde ein lentiviraler Vektor mit einem ubiquitären Promotor, dem murinen Phosphoglycerat Kinase (PGK) Promotor verwendet. Auch diese lentiviralen Vektoren entstanden innerhalb der Diplomarbeit von Frau Jennifer Heinke.

3.1.1.1. Der Einfluss des CMV-Enhancerelements auf den Titer der lentiviralen Vektoren

Nach der Herstellung der HIV-1 abgeleiteten lentiviralen Vektoren wurde der Titer mithilfe der *Real Time* PCR bestimmt. Bei diesen Messungen war es zunächst wichtig darauf zu achten, ob sich eventuelle Unterschiede bedingt durch den CMV Enhancer in Bezug auf den Titer der produzierten lentiviralen

Vektoren erkennen lassen. Durch das Einbringen von neuen Elementen kann es durch die vergrößerte Genomgröße, aber auch durch Interferenzen mit dem Verpackungssignal [192] zu Problemen und damit zu verringerten Titern führen. Auf der anderen Seite ist aber auch eine Beeinflussung der viralen Transkription, insbesondere über eine Verstärkung des in der LTR lokalisierten endogenen viralen Promoters durch den CMV Enhancer denkbar, was zu einer effizienteren Virusproduktion führen könnte. Für die Messung der infektiösen Titer wurden HeLa229 Zellen transduziert. Nach dreimaligem Splitten wurden Vektorkopien in Zelllysaten über die *Real Time* PCR bestimmt.

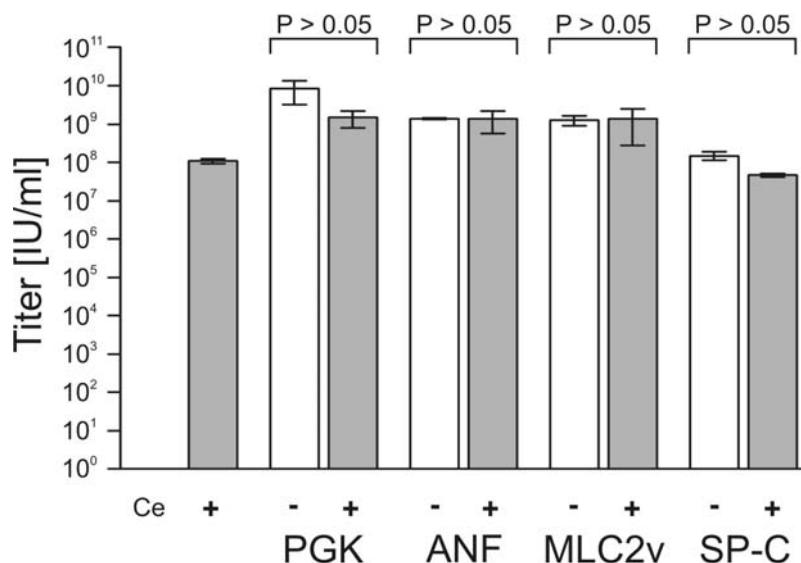


Abb. 10: Kein signifikanter Einfluss des CMV Enhancers auf die Titer der lentiviralen „LentiShuttle“ Konstrukte.

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Titerbestimmung der hergestellten lentiviralen Vektoren mit zelltypspezifischen Promotoren von zwei Transduktionen, die in Dreifachansätzen in der Real Time PCR bestimmt wurden. Titer für lentivirale Vektoren mit (graue Balken) und ohne (weiße Balken) CMV Enhancerelement. Aus Wunderlich/Gruh *et al*, Journal of Gene Medicine 2008, 10(1):21-32.

Die Bestimmung der infektiösen Titer via *Real Time* PCR zeigte, dass das Einbringen des CMV Enhancers keinen signifikanten Einfluss auf die Titer der hergestellten lentiviralen Vektoren hat (Abb. 10). Die Titer variierten zwischen $4,6 \times 10^7 \pm 4,4 \times 10^6$ IU/ml für den lentiviralen Vektor, der eine Expressionskassette unter der Kontrolle des SP-C Promotor in Kombination mit dem CMV Enhancer (pSh H Ce SP-C hG W) enthält und $8,3 \times 10^9 \pm 5,1 \times 10^9$ IU/ml für den lentiviralen Vektor mit einer Expressionskassette unter Kontrolle des PGK Promotors (pSh H mPGK hG W) (Abb. 10).

3.1.2. RT-PCR Analyse der mRNA Expression der verwendeten Kontrollzellen bzw. Zielzellen für die Austestung des CMV Enhancers und der zelltypspezifischen Expression

Bevor die produzierten lentiviralen Vektoren in den Kontrollzellen sowie in den Zielzellen verwendet wurden, wurden zunächst die endogenen Expressionsmuster dieser Zellen überprüft.

Für die Charakterisierung der Zelltypspezifität der generierten Vektoren sollten im Falle des humanen ANF Promotors die Zelllinie HL-1 [183], für den MLC2v Promotor neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM) und für den SP-C-Promotor die MLE15 Zelllinie transduziert werden. Als Negativkontrollzellen wurden für alle lentiviralen Konstrukte humane dermale Fibroblasten, humane glatte Muskelzellen (SMC) und humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs) verwendet. Um sowohl in den Zielzellen die erwartete Expression von ANF, MLC2v bzw. SP-C zu bestätigen, als auch die entsprechende Expression endogener Gene in den Negativkontrollzellen auszuschließen, wurden im Vorfeld der Transduktionen von einem Mitglied der Arbeitsgruppe, Frau Dr. Ina Gruh, Genexpressionsanalysen der o.g. Zellen durchgeführt.

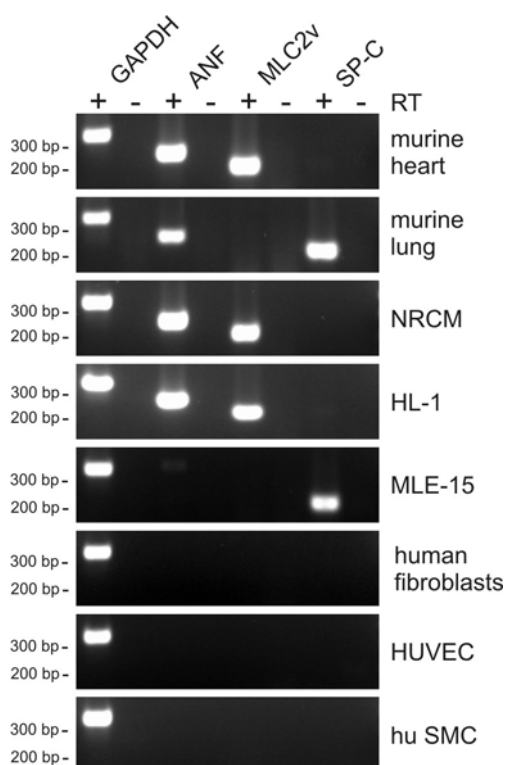


Abb. 11: Zelltypspezifische mRNA Expression von Ziel- und Kontrollzellen.

Die Expression von zelltypspezifischen Transkripten wurde mittels RT-PCR analysiert. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass sie Introns beinhalten und daher verschiedene Transkriptgrößen für genomische DNA bzw. cDNA ergeben. Die RNA wurde durch RT-PCR mit Primern für das Housekeeping Gen GAPDH überprüft. Aus Wunderlich/Gruh *et al*, Journal of Gene Medicine 2008, 10(1):21-32.

Es bestätigte sich das erwartete Expressionsmuster der getesteten Zellen und Zelllinien. Im Gegensatz zu den Zielzellen, welche ANF (neonatale Rattenkardiomyozyten, HL-1), MLC2v (neonatale

Rattenkardiomyozyten) bzw. SP-C (MLE-15) exprimierten, konnte für die Negativkontrollzellen humane Fibroblasten, HUVECs und SMCs wie erwartet keine ANF, MLC2v oder SP-C Expression auf mRNA Ebene nachgewiesen werden (Abb. 11).

3.2. Untersuchung der Funktionalität des CMV Enhancerelementes unter Verwendung des murinen PGK Promotors

Die Funktionalität des CMV Enhancers wurde in Kombination mit dem mPGK Promotor getestet. Verglichen mit dem sehr starken CMV Promotor führt der mPGK Promotor zu einer eher moderaten ubiquitären Genexpression in verschiedenen Zelltypen. Für die Austestung des Einflusses des CMV Enhancers auf die Expression des Transgens unter Kontrolle des mPGK Promotors wurden HeLa229 Zellen mit den entsprechenden lentiviralen Vektoren, die eine Expressionskassette unter Kontrolle des mPGK Promotors mit und ohne den CMV Enhancer (pISh H mPGK hG W bzw. pISh H Ce mPGK hG W) enthielten, transduziert. Die Transduktion erfolgte in drei Parallelansätzen und wurde mit verschiedenen MOIs (*Multiplicity of Infection*) durchgeführt. Als Kontrolle wurde der lentivirale Vektor ohne einen Promotor innerhalb der Expressionskassette, aber mit dem CMV Enhancer (pISh H Ce hG W) verwendet. Die transduzierten Zellen wurden nach dreimaligem Splitten durchflusszytometrisch analysiert. Die Kontrolltransduktion mit dem pISh H Ce hG W führte zu keiner signifikanten GFP-Expression bei MOI 1 und 5. Erst bei MOI 20 konnte eine geringe GFP-Expression beobachtet werden. (Abb. 12). Zusätzlich wurden noch die Zelllinien HL-1 und MLE-15 und die primären Zellen humane dermale Fibroblasten, HUVECs und SMCs zur Austestung des CMV Enhancers in Kombination mit dem mPGK untersucht. Fünf Tage nach der Transduktion zeigten die HL-1 Zellen eine sehr schwache GFP-Expression für den mPGK Promotor ohne den CMV Enhancer (pISh H mPGK hG W). Die Transduktion mit dem mPGK Promotor kombiniert mit dem CMV Enhancer führte zu einem 1,4-fachen Anstieg der Expressionshöhe verglichen mit dem mPGK Promotor ohne den CMV Enhancer. In humanen dermalen Fibroblasten konnte eine 6-fache Steigerung des Expressionslevels bei einer Transduktion mit MOI 5 erzielt werden. Der CMV Enhancer war in allen analysierten Zelltypen in Kombination mit dem mPGK Promotor funktionell. Im Durchschnitt konnte ein 3-facher Anstieg des Expressionslevels nach der Kombination des mPGK mit dem CMV Enhancer beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

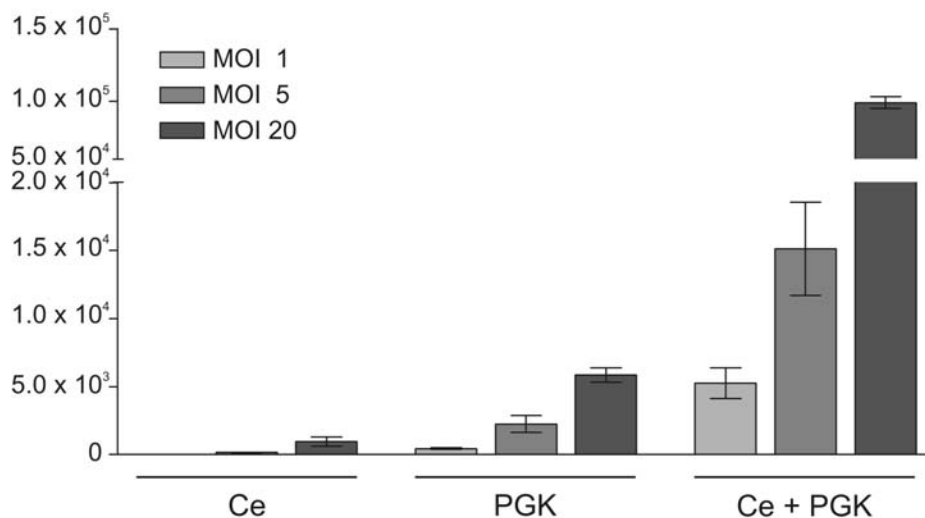


Abb. 12: Verstärkte Transgenexpression des mPGK Promotors durch das CMV Enhancerelement.

Die Transgenexpression des CMV Enhancerelements ohne einen weiteren Promotor sowie die verstärkte Expression des mPGK Promotors wurden mittels FACS bestimmt. Für die Analyse wurden HeLa229 Zellen mit verschiedenen MOIs transduziert. Die gezeigten Balken repräsentieren die totale Zunahme an Fluoreszenz Intensität im Vergleich mit nicht transduzierten Zellen. Aus Wunderlich/Gruh *et al*, Journal of Gene Medicine 2008, 10(1):21-32.

3.3. Untersuchung des Einflusses des CMV Enhancerelements auf die Expression durch den kardialen humanen ANF-Promotor

Für die durchflusszytometrische Analyse der Spezifität der ANF-Promotor-vermittelten Transgenexpression in lentiviralen Vektoren mit und ohne CMV Enhancer wurde die atriale Kardiomyozytenlinie HL-1 [183] verwendet. Zur Kontrolle der Spezifität wurden humane Fibroblasten, SMCs und HUVECs verwendet. Die Transduktion erfolgte abhängig vom Zelltyp mit geeigneten MOIs (HL-1 MOI 50, humane Fibroblasten MOI 5 und andere Zelltypen MOI 1), um jeweils ca. eine Viruskopie pro Zelle zu erzielen. Die Kopienanzahl wurde mittels *Real Time* PCR bestimmt.

Die Analyse der durchschnittlichen Kopienzahl des lentiviralen Vektors, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des hANF Promotors in Kombination mit dem CMV Enhancer (pSh H Ce hANF hG W) bzw. ohne den CMV Enhancer enthält (pSh H hANF hG W), ergab nach der Transduktion pro Zelle folgende Werte:

Kopienzahl der eingesetzten lentiviralen Vektoren pro Zelle				
	HL-1	HUVECs	SMCs	humane Fibroblasten
pISh H hANF hG W	0,82±0,02	0,49±0,22	1,2±0,7	0,11±0,06
pISh H Ce hANF hG W	0,73±0,23	0,41±0,21	0,72±0,04	0,19 ±0,18

Tabelle 24: Kopienzahl der lentiviralen Vektoren, die eine Expressionskassette unter Kontrolle des hANF Promotors enthalten, in HL-1 Zellen und entsprechenden Kontrollzellen.

In der Tabelle sind die Kopienzahlen pro Zelle nach einer Transduktion der Zellen mit den oben angegebenen MOIs aufgeführt. Die Zellen wurden nach der Transduktion mindestens drei Mal gesplittet. Zur Bestimmung der Kopienzahlen pro Zelle wurden Zellsate der transduzierten Zellen in die *Real Time* eingesetzt.

Als Positivkontrolle der Transduktion wurde ein Transfervektor, der eine Expressionskassette unter der Kontrolle des ubiquitären Promotors mPGK in Kombination mit dem CMV Enhancer (pISh H Ce mPGK hG W) enthält, mit den gleichen MOIs verwendet. Die Analyse der Kopienzahlen dieses Vektors pro Zelle brachte folgendes Ergebnis:

Kopienzahl der eingesetzten lentiviralen Vektoren pro Zelle				
	HL-1	HUVECs	SMCs	humane Fibroblasten
pISh H Ce mPGK hG W	0,58±0,11	0,57±0,68	1,58±1,21	0,19±0,05

Tabelle 25: Kopienzahl des lentiviralen Vektors, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des ubiquitären mPGK Promotors enthält.

In der Tabelle sind die Kopienzahlen pro Zelle nach einer Transduktion der Zellen mit den oben angegebenen MOIs aufgeführt. Die Zellen wurden nach der Transduktion mindestens drei Mal gesplittet. Zur Bestimmung der Kopienzahlen pro Zelle wurden Zellsate der transduzierten Zellen in die *Real Time* eingesetzt.

Alle Zellen wurden fünf Tage nach der Transduktion mittels FACS analysiert.

Durch die Kombination des hANF Promotors mit dem CMV Enhancer (pISh H Ce hANF hG W) konnte in HL-1-Zellen ein signifikanter Anstieg der GFP-Expressionshöhe gegenüber dem Transfervektor ohne den CMV Enhancer (pISh H hANF hG W) beobachtet werden (Abb. 13). Nach der Transduktion mit pISh H Ce hANF hG W konnten $18,8 \pm 1,8\%$ GFP^{pos} Zellen mittels FACS gemessen werden. Die Transduktion mit dem Kontrollvektor pISh H Ce mPGK hG W resultierte mit $11,2 \pm 0,2\%$ in einer ähnlichen Anzahl an GFP^{pos} Zellen. Die Expressionshöhe des Kontrollvektors lag allerdings unter der des pISh H Ce hANF hG W. Dies lässt auf eine relativ geringe generelle transkriptionelle Aktivität der

HL-1 Zellen schließen. Die GFP-Expression vermittelt durch den hANF Promotor ohne den CMV Enhancer war kaum nachweisbar.

Die Transduktion der Kontrollzellen SMCs und HUVECs führte mit dem hANF Promotor verstärkt durch den CMV Enhancer zu keiner detektierbaren GFP-Expression, wohingegen bei der Transduktion der humanen Fibroblasten eine schwache unspezifische Expression zu messen war. Dieser Effekt trat abhängig von der Anzahl integrierter Viren auf. Eine höhere MOI ging in Fibroblasten erwartungsgemäß mit einem höheren Grad an unspezifischer Transgen Expression durch den Transfervektor pSh H Ce hANF hG W einher. Auch in den anderen Kontrollzellen, den HUVECs und SMCs, konnte dieses Phänomen beobachtet werden. Hier allerdings erst ab einer MOI von 100.

Die Transgenexpression des Transferkonstruktes, das eine Expressionskassette unter Kontrolle des MLC2v Promotors (pSh H MLC2v hG W) bzw. unter Kontrolle des MLC2v Promotors in Kombination mit dem CMV Enhancer (pSh H Ce MLC2v hG W) enthält, konnte nicht in der atrialen Zelllinie HL-1 untersucht werden. Wie schon bei der Analyse des Expressionsmusters in Abbildung 11 zu erkennen war, exprimieren die HL-1 Zellen nur eine geringe Menge an MLC2v mRNA. So konnte nach der Transduktion mit den MLC2v Konstrukten in HL-1-Zellen keine GFP-Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

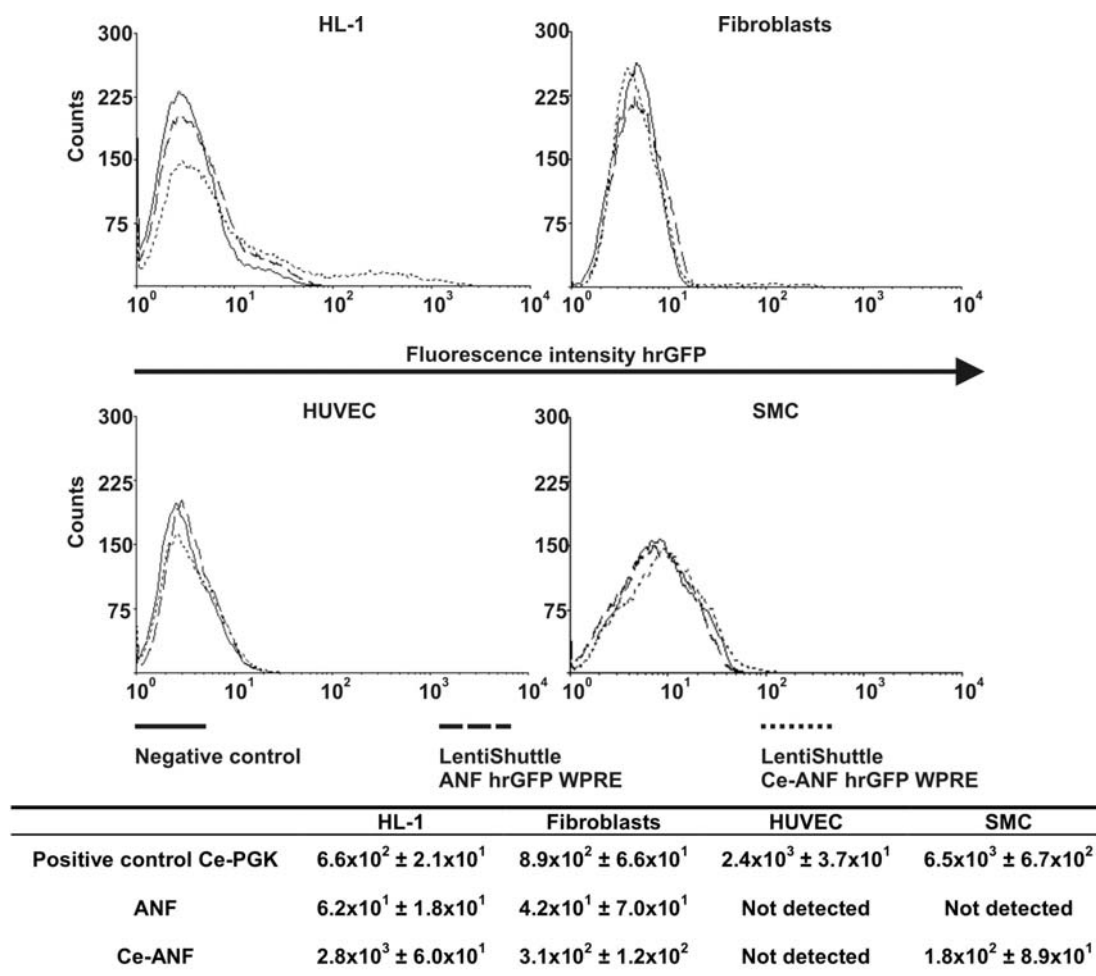


Abb. 13: Die durch den CMV Enhancer gesteigerte Transgenexpression ist unter Verwendung des hANF Promotors zelltypspezifisch.

In der Abbildung ist die Analyse der Kontroll- und Zielzellen, transduziert mit pSh H hANF hG W, pSh H Ce hANF hG W und pSh H Ce mPGK hG W zu sehen. Die Fluoreszenzintensität des pSh H hANF hG W bzw. pSh H Ce hANF hG W in Kontroll- und Zielzellen ist abgebildet in Form von Histogrammen. In der Tabelle sind Dreifachwerte mit entsprechender Abweichung aufgeführt. Sie stellen die Zunahme der Fluoreszenzintensität verglichen mit der Negativkontrolle dar. Aus Wunderlich/Gruh *et al*, Journal of Gene Medicine 2008, 10(1):21-32.

3.3.1. Untersuchung des Einflusses des CMV Enhancerelements auf die Expression durch den kardialen humanen ANF-Promotor und den humanen MLC2v Promotor in primären neonatalen Rattenkardiomyozyten

Zusätzlich zu Analysen in der Zelllinie HL-1 [183] wurde der Einfluss des CMV Enhancers auf die herzspezifischen Promotoren auch in primären neonatalen Rattenkardiomyozyten getestet. Die neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden aus Herzen neonataler Ratten gewonnen. Die isolierten Kardiomyozyten enthalten sowohl atriale als auch ventrikuläre Zelltypen sowie kontaminierende Zelltypen, insbesondere kardiale Fibroblasten. In primären neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte

neben der ANF-Promotor-vermittelten Transgenexpression auch die Spezifität der Vektoren mit dem MLC2v Promotor untersucht werden. Dazu wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten mit den lentiviralen Vektoren, die eine Expressionskassette unter Kontrolle des hANF- bzw. MLC2v Promotors mit (pISh H Ce hANF hG W und pISh H Ce MLC2v hG W) bzw. ohne den CMV Enhancer (pISh H hANF hG W, pISh H MLC2v hG W) enthalten, jeweils mit einer MOI von 5 transduziert und nach 5 Tagen auf eine GFP Expression überprüft. Für die Identifikation der Kardiomyozyten wurde freundlicherweise von Frau Ingrid Schmidt-Richter eine immunhistologische Färbung gegen sarkomerisches α -Aktinin durchgeführt (Abb. 14). So konnte die GFP-Expression der Transfervektoren und die Spezifität der Expression mittels Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Als Positivkontrolle wurde auch hier der Kontrollvektor mit dem ubiquitären mPGK Promotor in Kombination mit dem CMV Enhancer (pISH H Ce mPGK hG W) verwendet. Für die Transfervektoren mit den herzspezifischen Promotoren konnte ein signifikanter Anstieg der GFP-Expression durch den CMV Enhancer beobachtet werden (Abb. 14).

Wie schon erwähnt, enthalten Präparationen primärer neonataler Rattenkardiomyozyten methodisch bedingt kontaminierende Fibroblasten, aber auch andere Zelltypen wie Endothelzellen und glatte Muskelzellen. Diese kontaminierenden Zellen ermöglichen es, neben dem Einfluss des CMV Enhancers auch eine Aussage über die Spezifität der GFP-Expression zu treffen. Während die GFP-Expression der Positivkontrolle pISh H Ce mPGK hG W sowohl in für sarkomerisches α -Aktinin^{pos} Kardiomyozyten als auch in für sarkomerisches α -Aktinin^{neg}, d.h. kontaminierenden Zellen zu beobachten war, war die GFP-Expression der herzspezifischen Promotoren beschränkt auf die für sarkomerisches α -Aktinin^{pos} Kardiomyozyten (Abb. 14). Für den Transfervektor unter Kontrolle des hANF Promotors in Kombination mit dem CMV Enhancer (pISh H Ce hANF hG W) konnte eine schwache unspezifische GFP Expression in wenigen α -Aktinin^{neg} Zellen detektiert werden (Abb. 14 siehe Spitze des Dreiecks). Durch die Transduktion der neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte eine zelltypspezifische hrGFP Expression für alle verwendeten lentiviralen Vektoren unter Kontrolle des hANF- bzw. des MLC2v Promotors mit (pISh H Ce hANF hG W und pISh H Ce MLC2v hG W) und ohne den CMV Enhancer (pISh H hANF hG W und pISh H MLC2v hG W) bestätigt werden. Nur im Falle des pISh H Ce hANF hG W, konnte eine geringe GFP-Expression auch in den kontaminierenden Zellen beobachtet werden. Außerdem konnte eine Verstärkung der Transgenexpression durch den Einsatz des CMV Enhancers in diesen lentiviralen Vektoren festgestellt werden.

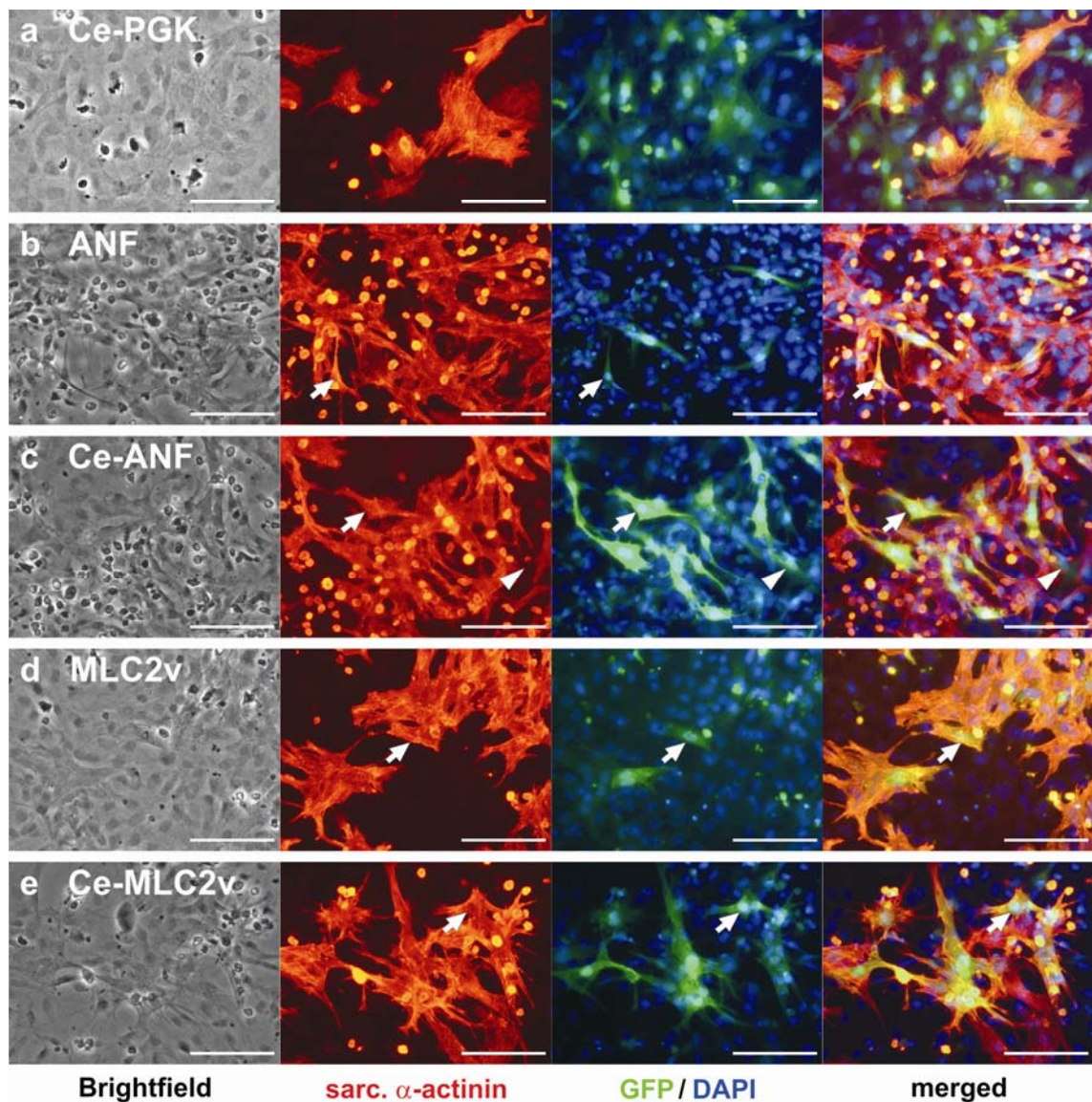


Abb. 14: Verstärkte Transgen Expression in primär isolierten Kardiomyozyten unter Verwendung von Herzspezifischen Promotoren kombiniert mit dem CMV Enhancer.

Die Abbildung zeigt eine immunhistologische Analyse der neonatalen Rattenkardiomyozyten nach der Transduktion mit pSh H hANF hG W, pSh H Ce hANF hG W und pSh H Ce mPGK hG W. Alle Transferplasmide enthalten als Transgen hrGFP (grün). a) Ce PGK; b) hANF; c) Ce hANF; d) MLC2v; e) Ce MLC2v.

Die transduzierten neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden 5 Tage nach der Transduktion analysiert und die Kardiomyozyten mit einem anti sakomerischen- α -Aktinin-Antikörper (rot) spezifisch angefärbt. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

Skalierung 100 μ m. Aus Wunderlich/Gruh *et al*, Journal of Gene Medicine 2008, 10(1):21-32.

3.4. Untersuchung der Spezifität und des Einflusses des CMV Enhancerelements auf die Expression durch den Typ II Pneumozyten spezifischen Promotor

3.4.1. Charakterisierung der für die Austestung geplanten Kontroll- bzw. Zielzellen

Zwei Transferplasmide, die zum einen eine Expressionskassette unter Kontrolle des SP-C Promotors (pSh H Ce SP-C hG W) und zum anderen unter Kontrolle des SP-C Promotors in Kombination mit dem CMV Enhancer (pSh H SP-C hG W) enthalten, sollten auf eine zelltypspezifische GFP-Expression bzw. auf den Einfluss des CMV Enhancers untersucht werden. Um die zelltypspezifische Expression der Konstrukte zu analysieren, wurden neben den erwähnten MLE-15 Zellen auch noch andere als Lungenepithel beschriebene Zelllinien eingesetzt. Dazu zählten die Zelllinien MLE-12, A549, M3E3/C3, RLE-6TN und H441. Bevor diese Zellen für die Überprüfung der Zelltypspezifität verwendet werden konnten, wurden sie auf ihre Expressionsmuster bezüglich lungenepithelspezifischer Gene überprüft. Diese Analyse des endogenen mRNA Expressionsmusters wurde freundlicherweise von Frau Jennifer Beier und Frau Sandra Menke durchgeführt.

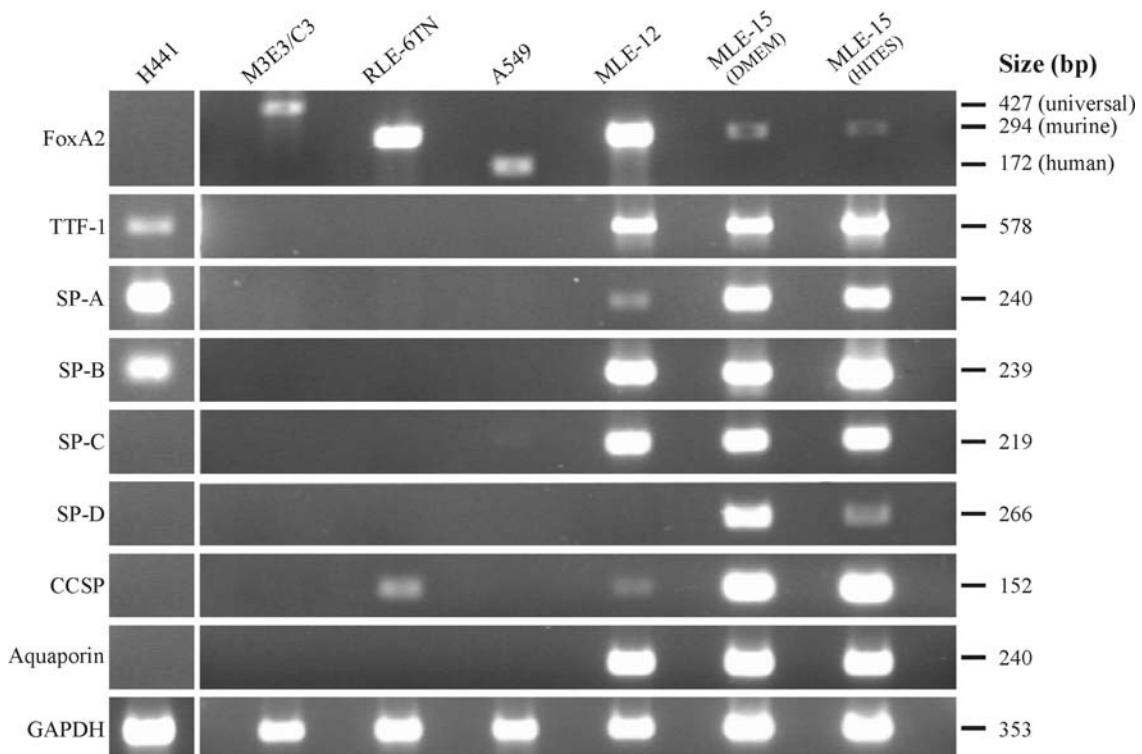


Abb. 15: MLE-12 und MLE-15 Zellen zeigen ein Genexpressionsmuster vergleichbar mit TypII Alveolar Epithelzellen. RLE-6TN, M3E3/C3, A549 und H441 Zellen zeigen dieses Genexpressionsmuster nicht.

Dazu wurden die Zelllinien MLE-15, MLE-12, A549, M3E3/C3, RLE-6TN und H441 mittels RT-PCR auf die vorhandene Expression von Lungenepithelzellen untersucht. Abkürzungen: CCSP: clra cell specific protein; FoxA2: forkhead box A2; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; TTF-1: thyroid transcription factor 1; SP: surfactant protein.

Aus Wunderlich/Gruh *et al*, Human Gene Therapy 2008,19:39-51.

Zusätzlich zu den MLE-15 Zellen, die wie im Material- und Methodenteil erwähnt in einem speziellen Medium (HITES) kultiviert werden, sollten auch MLE-15 verwendet werden, die in einem weniger reichhaltigen Medium dem Dulbecco`s modified Eagle medium (DMEM) kultiviert werden. Nach der Auswertung des mRNA Expressionsmusters wurden bestimmte Zelllinien für die weitere Austestung der Transfervektoren ausgewählt.

Die Zelllinien M3E3/C3 und RLE-6TN wurden für die Austestung der SP-C spezifischen Transgenexpression ausgeschlossen, da sie nach Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe, welche konträr zu einigen anders lautenden Berichten sind [193-197], keine Surfactant Proteine exprimieren (Abb. 15). Selbiges gilt für die Lungenepithelzelllinie A549, die nach Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe kaum Ähnlichkeit mit Typ II Pneumozyten aufweist. Diese, genauso wie die Clara Zelllinie H441 wurden als zusätzliche Negativkontrolle in den weiteren Versuchen eingesetzt.

In den Zelllinien MLE-12 und MLE-15 konnte, wie erwartet SP-C mRNA nachgewiesen werden (Abb. 15). Zusätzlich zum mRNA Nachweis wurde bei diesen Zelllinien von Frau Ingrid Schmidt-Richter und Frau Jennifer Beier freundlicherweise eine immunhistologische Färbung mit einem Pro-SP-C Antikörper durchgeführt (Abb. 16).

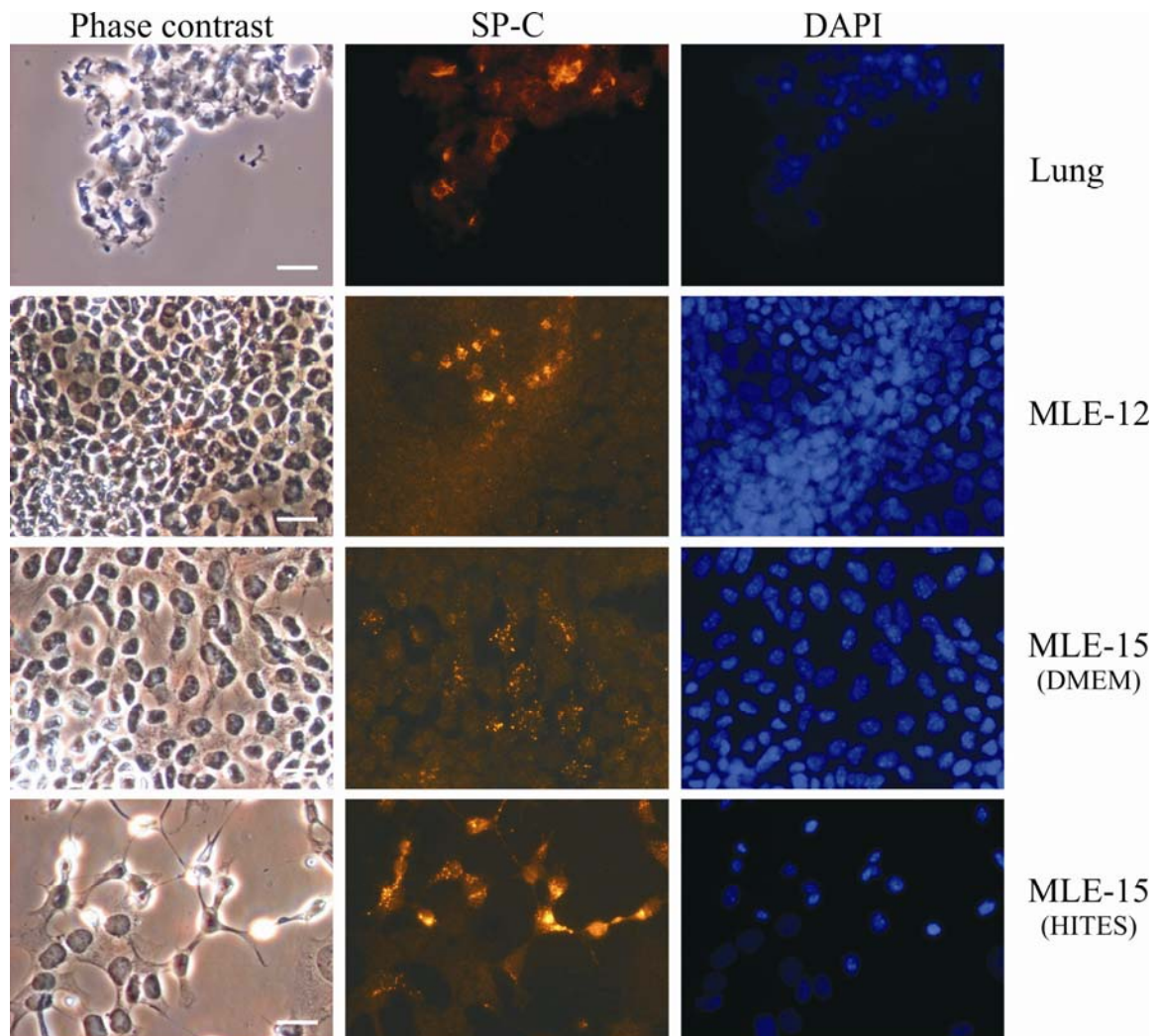


Abb. 16: Die immunhistologische Analyse von einem Lungenschnitt, MLE-12, MLE-15 (HITES) und MLE-15 (DMEM) Zellen auf die Expression von Pro-SP-C zeigte in den untersuchten Zellen das erwartete gepunktete Pro-SP-C Muster.

Ganz rechts sind die Phasenkontrastaufnahmen, in der Mitte die immunhistologische Färbung und links ist die Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI gezeigt.

Skalierung 20µM. Aus Wunderlich/Gruh *et al*, Human Gene Therapy 2008,19:39-51.

Die immunhistologische Färbung mit einem polyklonalen anti-(Pro-)SP-C Kaninchserum zeigte auf Lungenschnitten die erwartete typische gepunktete (Pro-)SP-C Expression, welche von den Pro-SP-C enthaltenden cytoplasmatischen Vesikeln und Lamellarkörperchen herrührt. Dieses typische Färbemuster erlaubte eine Unterscheidung zwischen spezifischer Färbung und dem bei Verwendung des Serums bekanntermaßen auftretenden relativ starken Hintergrund.

Das in MLE-Zellen beobachtete typische Färbemuster belegt, dass sowohl MLE-12 als auch MLE-15 (Pro-)SP-C exprimieren (Abb. 16). Dies bestätigt die Beobachtungen mehrerer Veröffentlichungen, steht im Fall von MLE-15 Zellen allerdings im Gegensatz zu ursprünglichen Publikationen [198-201]. Es ist außerdem wichtig zu erwähnen, dass MLE-12 bzw. MLE-15 Zellen eine inhomogene Anfärbung durch den Pro-SP-C Antikörper zeigten. Bei MLE-15 Zellen, die in HITES kultiviert wurden, konnte eine stärkere immunhistologische Färbung beobachtet werden, verglichen mit MLE-15, die in DMEM kultiviert wurden (Abb. 16).

3.4.2. Transduktion der Kontroll- bzw. Zielzellen zur Austestung der Spezifität der Transfervektoren pSh H SP-C hG W und pSh H Ce SP-C hG W

Für die Austestung der Transfervektoren wurden als Zielzellen die Lungenepithel-Zelllinien MLE-12 und MLE-15 verwendet, da sie in der mRNA Analyse, sowie in der immunhistologischen Färbung positiv für endogenes SP-C getestet wurden (Abb. 15 und Abb. 16). Als Kontrollen wurden wie schon erwähnt die Zelllinien A549 und H441 verwendet. Als weitere Negativkontrollen dienten humane Fibroblasten, SMCs und HUVECs. Fünf Tage nach der Transduktion mit dem lentiviralen Vektor, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des SP-C Promotors (pSh H SP-C hG W) enthält, wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Weder A549 Zellen, noch H441 Zellen, humane Fibroblasten, SMCs oder HUVECs zeigten eine GFP-Expression (Abb. 17). Die Transduktion der MLE-12 bzw. MLE-15 Zellen mit dem pSh H SP-C hG W führte zu einer sehr geringen Zahl GFP^{pos} Zellen.

Die Transduktion mit dem pSh H SP-C hG W führte demnach zwar zu einer Typ II Pneumozyten spezifischen Expression des GFP, die Anzahl GFP^{pos} Zellen und die Fluoreszenz Intensität (MFI (Mean Fluorescence Intensity)) waren jedoch sehr niedrig (Tabelle 26).

Ergebnisse der Transduktion mit dem lentiviralen Vektor pISh H SP-C hG W			
	MLE-12	MLE-15 (DMEM)	MLE-15 (HITES)
GFP^{pos} Zellen [%]	0,24 ± 0,06	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1
MFI	34 ± 2	66 ± 1	71 ± 3

Tabelle 26: Transduktion mit dem lentiviralen Vektoren, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des SP-C Promotors enthält, führt zu einer sehr geringen Anzahl an GFP^{pos} Zellen und einer niedrigen Fluoreszenz Intensität. In der Tabelle ist der Anteil an GFP^{pos} Zellen in Prozent angegeben. Diese Daten wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Außerdem ist die Fluoreszenz Intensität der GFP^{pos} Zellen in Form der *Mean fluorescent Intensity* (MFI) angegeben.

Für die Herstellung des Transfervektors war der 2 kb lange SP-C Promotor verwendet worden. Für diese Promotor Sequenz war gezeigt worden, dass ihre Verwendung zwar zur höchsten Typ II Pneumozyten Spezifität führt [202], dafür ist die Expressionshöhe allerdings deutlich geringer als im Falle der kompletten Promotersequenz. Da die lentivirale Expressionshöhe des 2 kb SP-C Promotorfragmentes augenscheinlich zu niedrig war, um in der Mehrzahl der transduzierten Zellklone eine signifikante GFP-Expression zu erzielen, wurde auch die Kombination mit CMV-Enhancer untersucht.

Nach der Transduktion mit dem lentiviralen Vektor, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des SP-C Promotors in Kombination mit dem CMV Enhancer (pISh H Ce SP-C hG W) enthält, wurden die Zellen wiederum mittels FACS untersucht. Der zusätzlich eingebrachte CMV Enhancer führte in MLE-12 und MLE-15 Zellen zu einer beträchtlichen Steigerung der GFP^{pos} Zellen und der GFP-Expressionshöhe. Die MLE-15 Zellen, die in HITES Medium kultiviert wurden, zeigten eine höhere GFP-Expression als die MLE-15 Zellen, kultiviert in DMEM oder die MLE-12 Zellen (Abb. 17 und Tabelle 27).

Ergebnisse der Transduktion mit dem lentiviralen Vektor pISh H Ce SP-C hG W			
	MLE-12	MLE-15 (DMEM)	MLE-15 (HITES)
GFP^{pos} Zellen [%]	9,9 ± 0,2	12,7 ± 1,1	14,7 ± 0,7
MFI	81 ± 2	196 ± 16	208 ± 4

Tabelle 27: Beträchtliche Steigerung der GFP^{pos} Zellen und der GFP-Expressionshöhe durch die Transduktion mit dem lentiviralen Vektor, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des SP-C Promotors in Kombination mit dem CMV Enhancer enthält.

In der Tabelle ist der Anteil an GFP^{pos} Zellen in Prozent angegeben. Diese Daten wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Außerdem ist die Fluoreszenz Intensität der GFP^{pos} Zellen in Form der *Mean fluorescent Intensity* (MFI) angegeben.

Trotz der beobachteten deutlich erhöhten GFP-Expression in MLE-Zellen im Vergleich zum Vektor ohne Enhancer, konnte in den Negativkontrollzellen A549, H441, humane Fibroblasten, SMCs und HUVECs keinerlei GFP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 17). Diese Beobachtung deckt sich mit der endogenen SP-C Expression der getesteten Zelllinien.

Um auszuschließen, dass die fehlende GFP-Expression in Zelltypen ohne eine endogene SP-C Expression auf einer mangelhaften Transduktionsrate dieser Zellen beruht, wurde eine *Real Time* PCR mit den transduzierten Zellen durchgeführt. Die Zahl der Vektorkopien pro Zelle lagen zwischen $0,63 \pm 0,06$ und $12,63 \pm 0,86$. Anzumerken ist dabei, dass die MLE-15 Zellen, die in HITES kultiviert wurden, eine relative niedrige Kopienzahl pro Zelle verglichen mit z. B. den HUVECs, SMCs oder den A549 Zellen aufwiesen (Abb. 18 und Tabelle 28).

Kopienzahl des eingesetzten lentiviralen Vektors pro Zelle				
	MLE-15 (HITES)	HUVECs	SMCs	A549
pISh H Ce SP-C hG W	$2,07 \pm 0,51$	$7,26 \pm 1,16$	$2,7 \pm 0,46$	$4,55 \pm 1,43$

Tabelle 28: MLE-15 besitzen im Gegensatz zu den Kontrollzellen nach der Transduktion die niedrigste Kopienzahl des lentiviralen Vektors pISh H Ce SP-C hG W pro Zelle.

In der Tabelle sind die Kopienzahlen pro Zelle nach einer Transduktion der Zellen aufgeführt. Die Zellen wurden nach der Transduktion mindestens drei Mal gesplittet. Zur Bestimmung der Kopienzahlen pro Zelle wurden Zellysate der transduzierten Zellen in die *Real Time* eingesetzt.

Obwohl es wie erwartet, gewisse Unterschiede in Bezug auf die Kopienzahl pro Zelle zwischen den verwendeten Zellen gab, konnte eine zelltypspezifische Transgenexpression der Transfervektoren pISh H SP-C hG W und pISh H Ce SP-C hG W eindeutig nachgewiesen werden.

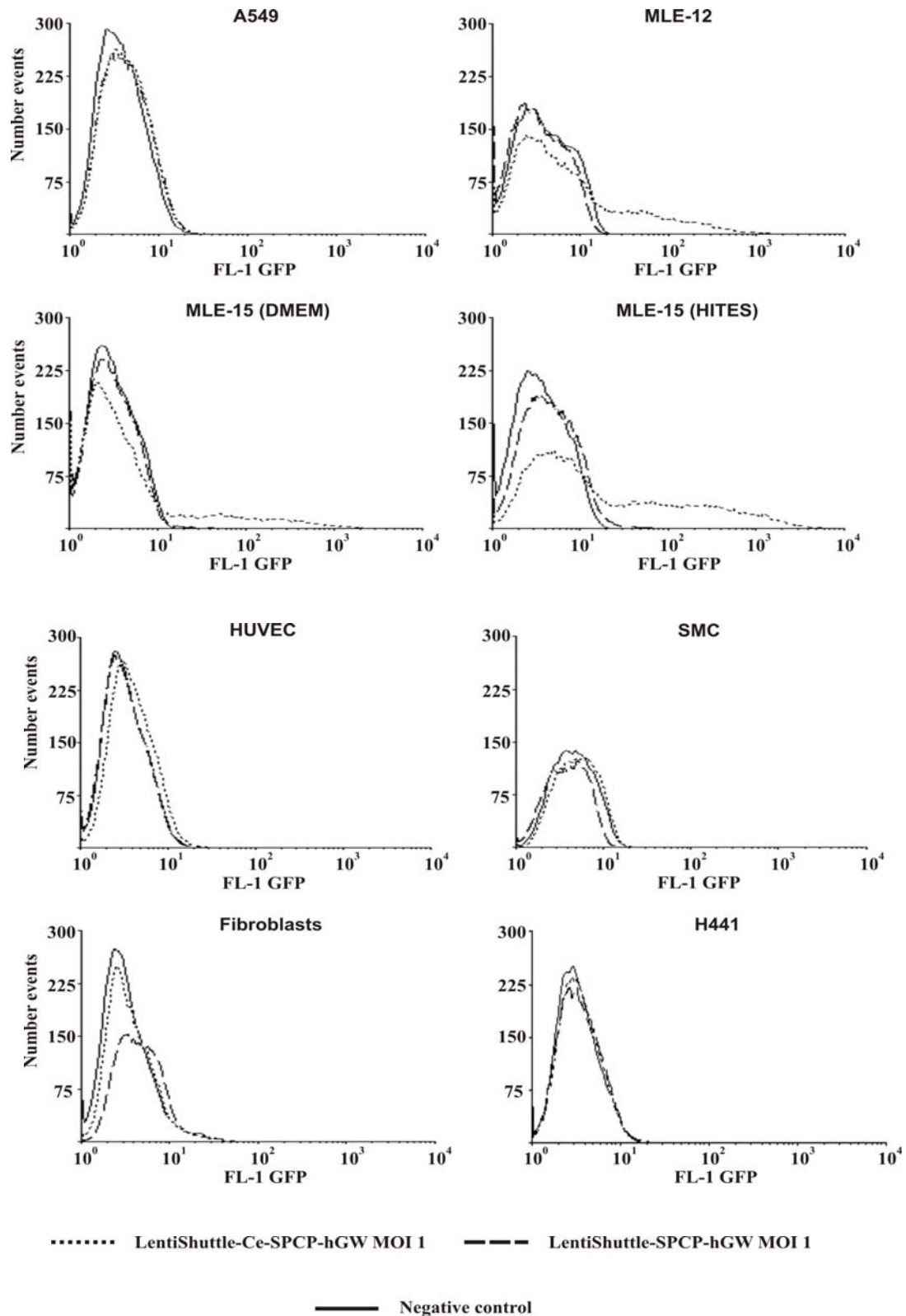


Abb. 17: Eine gesteigerte GFP Expression durch den CMV Enhancer führt bei der Verwendung des SP-C Promotors zu keinem Verlust der Zelltypspezifität.

Analyse der Kontroll- und Zielzellen nach der Transduktion mit dem pSh H SP-C hG W und dem pSh H Ce SP-C hG W (MOI 1). A) Analyse der transduzierten Zellen mittels FACS; Darstellung der Fluoreszenzintensität in Histogrammen. Aus Wunderlich/Gruh *et al*, Human Gene Therapy 2008,19:39-51.

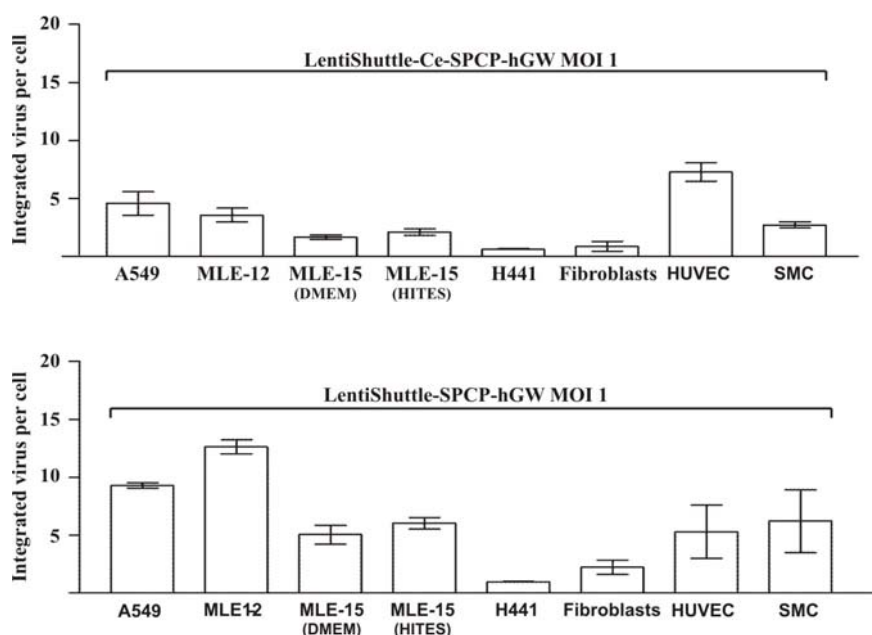


Abb. 18: Unterschiedliche Kopienzahlen der lentiviralen Vektoren pro Zelle in MLE-12, MLE-15 (DMEM), MLE-15 (HITES) und den Kontrollzellen.

Analyse der Kontroll- und Zielzellen nach der Transduktion mit dem pSh H SP-C hG W und dem pSh H Ce SP-C hG W (MOI 1). Bestimmung der Kopienzahl der integrierten lentiviralen Vektoren in den transduzierten Zellen mittels *Real Time* PCR. Aus Wunderlich/Gruh *et al*, Human Gene Therapy 2008,19:39-51.

3.4.3. Analyse der Zelltypspezifität des durch den CMV Enhancer verstärkten AT2 spezifischen lentiviralen Vektors bei einer höheren MOI

Nachdem bei niedrigen MOIs eine sehr gute Korrelation der Transgenexpression mit der endogenen SP-C Expression gezeigt worden war, war es außerdem von Interesse ob diese hohe SP-C Promotor-vermittelte Zelltypspezifität auch bei einer höheren Zahl von Vektorkopien pro Zelle erhalten bleiben würde. Dazu wurden MLE-15 Zellen, humane Fibroblasten, SMCs und HUVECs mit einer MOI von 20 transduziert und danach sowohl die resultierenden Vektorkopien pro Zelle als auch die Höhe der GFP-Expression untersucht.

Die Transduktion von MLE-15 Zellen führte zu einer sehr beträchtlichen GFP-Expression mit einer MFI von 686 ± 161 . Die als Negativkontrolle transduzierten SMCs und HUVECs zeigten keine detektierbare GFP-Expression. In humanen Fibroblasten konnte eine sehr niedrige GFP-Expression nach der Transduktion mit dem lentiviralen Vektor, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des SP-C

Promotors in Kombination mit dem CMV Enhancer (pISh H Ce SP-C hG W) enthält, beobachtet werden (Abb. 19).

Auch bei diesem Versuch wurde eine Analyse der Viruskopienzahl pro Zelle mittels *Real Time* PCR durchgeführt (Tabelle 29). Parallel zum Transfervektor pISh H Ce SP-C hG W wurden die Zellen auch mit dem Kontrollvektor, der den ubiquitären mPGK Promotors in Kombination mit dem CMV Enhancer (pISh H Ce mPGK hG W) enthält, transduziert und auch auf die Viruskopienzahl pro Zelle untersucht (Tabelle 29).

Kopienzahl der eingesetzten lentiviralen Vektoren pro Zelle nach Transduktion mit MOI 20				
	MLE-15 (HITES)	HUVECs	SMCs	humane Fibroblasten
pISh H Ce SP-C hG W	22,93±5,11	31,73±5,68	9,85±3,49	7,00±3,74
pISh H Ce mPGK hG W	13,71±8,41	9,53±2,34	7,4±1,7	3,93±3,62

Tabelle 29: Kopienzahl der lentiviralen Vektoren pISh H Ce SP-C hG W und pISh H Ce mPGK hG W pro Zelle in MLE-15 und Kontrollzellen nach Transduktion mit MOI 20.

In der Tabelle sind die Kopienzahlen pro Zelle nach einer Transduktion der Zellen aufgeführt. Die Zellen wurden nach der Transduktion mit einer MOI von 20 mindestens drei Mal gesplittet. Zur Bestimmung der Kopienzahlen pro Zelle wurden Zellsate der transduzierten Zellen in die *Real Time* eingesetzt.

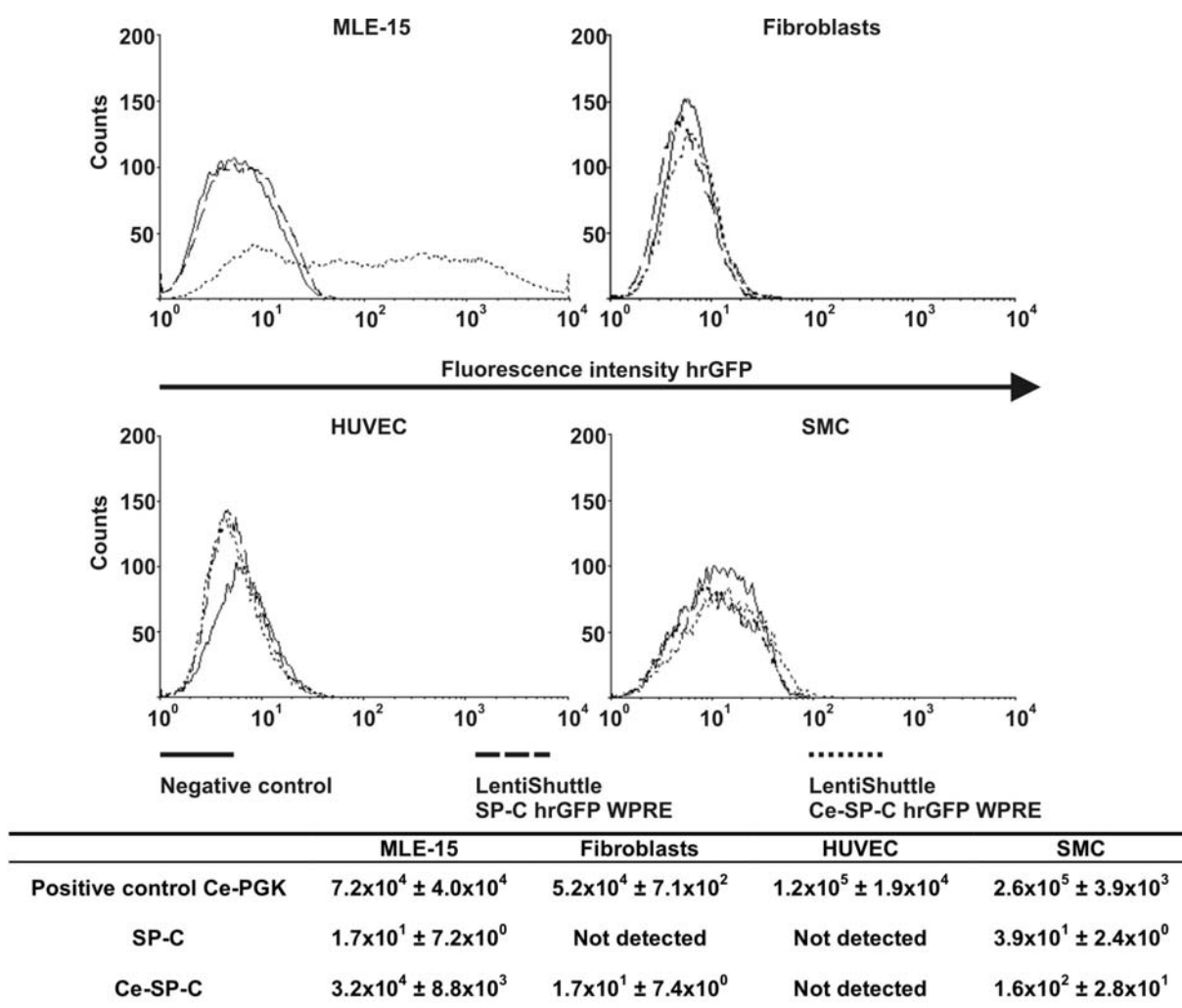


Abb. 19: Eine gesteigerte GFP Expression durch den CMV Enhancer führt bei der Verwendung des SP-C Promotors zu keinem Verlust der Zelltypspezifität auch bei höheren MOIs.

Die Fluoreszenzintensität des pSh H SP-C hG W bzw. pSh H Ce SP-C hG W in Kontroll- und Zielzellen ist abgebildet in Form von Histogrammen. In der Tabelle sind Zweifachwerte mit entsprechender Abweichung aufgeführt. Sie stellen die Zunahme der Fluoreszenzintensität verglichen mit der Negativkontrolle dar. Aus Wunderlich/Gruh *et al*, Journal of Gene Medicine 2008, 10(1):21-32.

3.5. Gentransfer in embryonale Stammzellen

Die genetische Modifikation von Stammzellen ist sowohl aus experimenteller Sicht, als auch im Hinblick auf klinische Anwendungen von höchster Bedeutung. So können z. B. Stammzellen markiert werden, um Differenzierungsabläufe besser verfolgen zu können oder Stammzellen nach Transplantation besser identifizieren zu können. Andere Anwendungen sind die gezielte Überexpression bestimmter Transkriptionsfaktoren, z. B. als Differenzierungsstimulus, genauso wie die Inhibierung der Expression bestimmter Gene oder die gentechnische Korrektur von Gendefekten. Auch können, wie schon erwähnt, gentechnische Modifikationen für eine spezifische Anreicherung von aus Stammzellen generierten Zellderivaten sehr nützlich sein.

Insbesondere im Falle humaner und nichthumaner Primaten-ES-Zellen wurden mit konventionellen nichtviralen Gentransfermethoden bisher nur sehr mäßige Resultate erzielt. Für einen möglichst effizienten Gentransfer mit stabiler Transgenexpression bieten sich in diesem Fall lentivirale Vektoren an.

Nachdem in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin bereits Protokolle zur kardialen und pulmonalen Differenzierung von murinen ES-Zellen (mESC) und ES-Zellen aus dem Rhesusaffen (RESC) etabliert worden waren [203], war ein Ziel der Promotion effektive Transduktionsprotokolle für derartige embryonale Stammzellen zu etablieren, sodass im Anschluss eine Transgen-basierte Aufreinigung von ES-Zell-abgeleiteten Herzmuskelzellen und Typ II Pneumozyten stattfinden kann. Da der Fokus der Promotion auf der Transduktion von RESCs lag, und sich bei Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Martin gezeigt hatte, das sich, wie bereits in der Einleitung erwähnt, mit den üblicherweise verwendeten HIV1-abgeleiteten Vektoren keine effiziente Transduktion von RESCs erzielen lässt, wurden auch für die Transduktion der mESCs SIV_{mac} abgeleitete lentivirale Vektoren verwendet. Dazu musste das bereits in der Arbeitsgruppe etablierte, auf HIV-1 basierende lentivirale Vektorsystem plentiShuttle [204], im Zuge der vorliegenden Arbeit zunächst komplett auf SIV_{mac} umgestellt werden.

Da sich die Kultivierung der embryonalen Stammzelllinien der beiden Spezies in vielen Punkten stark voneinander unterscheidet, mussten auch unterschiedliche Transduktionsprotokolle etabliert werden.

3.5.1. Etablierung eines SIV_{mac} basierten lentiviralen Vektorsystems zum viralen Gentransfer in embryonale Stammzellen

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde ein auf SIV_{mac} basiertes lentivirales Vektorsystem etabliert. Als Ausgangsvektor wurde pSIV_{-RMES}GAE, der freundlicherweise von Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS, Lyon, France zur Verfügung gestellt wurde, genutzt. Der Vektor enthält einen CMV Promotor und das eGFP als Transgen. Dieser Vektor wurde vor der weiteren Modifizierung, gegen die bereits in der Arbeitsgruppe etablierten HIV-1 abgeleiteten Vektoren in ersten generellen Versuchen ausgetestet. Das bereits etablierte Virusproduktionsprotokoll der HIV-1 abgeleiteten lentiviralen Vektoren wurde, abgesehen von der Verwendung der für das SIV_{mac}-System verwendeten Transfer- und Verpackungsplasmide, unverändert auch für die SIV-Vektoren genutzt.

Die durchflusszytometrisch gemessenen Titer nach einer Transduktion von HEK293T Zellen zeigten, dass die Übertragung des Protokolls von den HIV-1 abgeleiteten lentiviralen Vektoren problemlos möglich zu sein scheint. Die Titer der HIV-1 abgeleiteten Vektoren lagen bei $3\text{-}8 \times 10^7$ IU/ml (*infectious units per milliliter*) und die der SIV_{mac} abgeleiteten Vektoren lagen bei $9 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ IU/ml. Für diesen Vergleich wurden HIV-1 abgeleitete Vektoren mit Expressionskassetten, die unter der Kontrolle des CMV Promotor und des mPGK Promotors standen verwendet. Als Transgen enthielten die beiden Vektoren das hrGFP verstärkt durch WPRE. Als SIV_{mac} abgeleitete Vektoren wurden nicht modifizierte Ausgangsvektoren verwendet. Diese beinhalteten Expressionskassetten unter der Kontrolle des CMV Promotors bzw. des PGK Promotors. Als Transgen enthielten die, freundlicherweise von Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS, Lyon, France zur Verfügung gestellten Vektoren eGFP, das bei zwei Vektoren auch durch WPRE (pSIV_{-RMES}GAE wh und pSIV_{-RMES}PGASE) verstärkt wurde. In diesem Zusammenhang wurden keine weiteren systematischen Vergleiche der Titer vorgenommen. Die Titerbestimmung sollte zukünftig für HIV-1 abgeleitete sowie für die SIV-abgeleiteten Vektoren mithilfe einer *Real Time* PCR durchgeführt werden, um eine noch genauere Messung der Titer zu gewährleisten.

Nach der ersten generellen Austestung der Funktionalität der SIV_{mac} abgeleiteten Vektoren wurde zur Vereinfachung zukünftiger Klonierungsarbeiten das in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin in HIV-1 – Vektoren entwickelte pLentiShuttle System auf die verwendeten SIV-Vektoren übertragen [204]. Diese Modifizierung des SIV_{mac} abgeleiteten Vektors war im weiteren Verlauf von großem Vorteil, da so alle bereits im HIV-Vektorsystem hergestellten Expressionskassetten in nur einem Klonierungsschritt in das neue System überführt werden konnten.

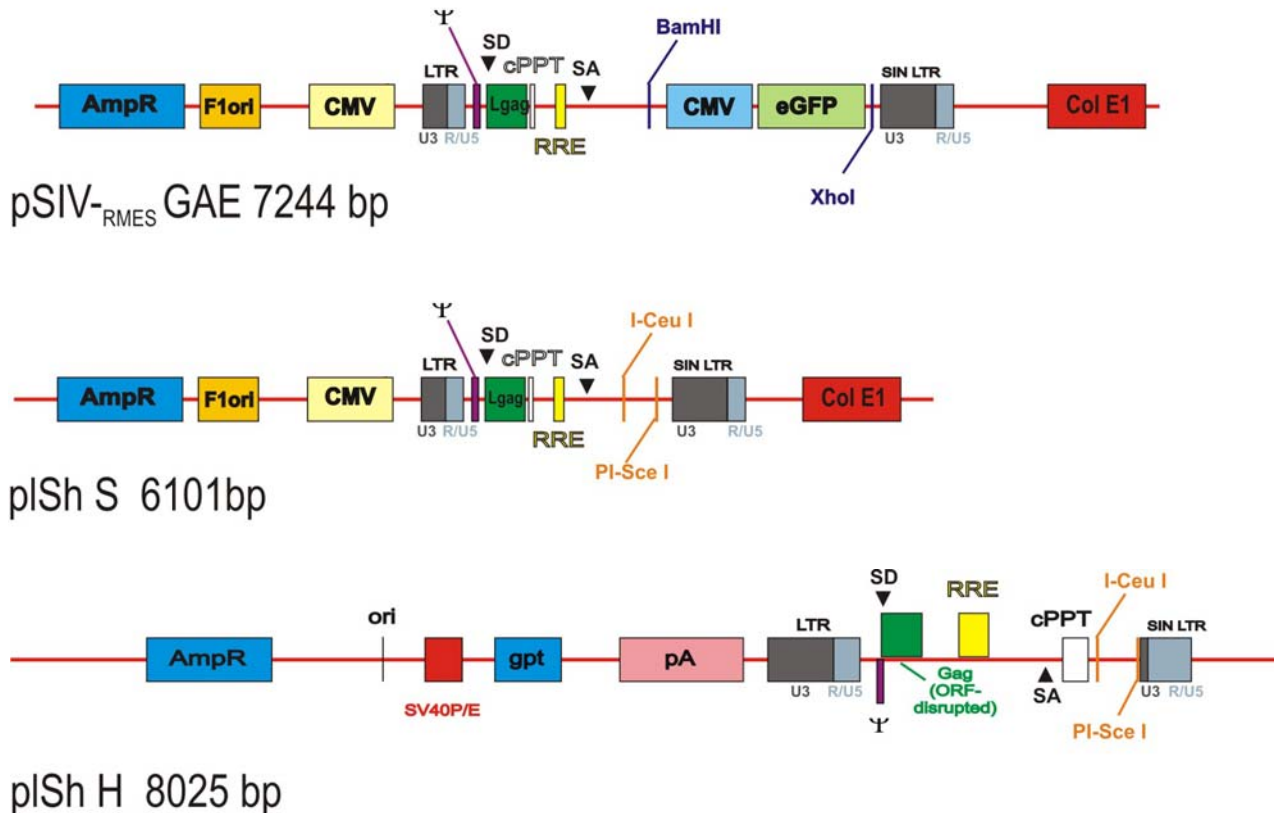


Abb. 20: Basisvektoren, der verwendeten HIV-1 bzw. SIV_{mac} abgeleiteten lentiviralen Vektoren

Amp = Ampicillinresistenz, ori = Startpunkt der Replikation, SV40 P/E = Promotor/Enhancer von SV40, gpt = Guaninphosphoryltransferase, pA = Polyadenylierungssignal, LTR = long terminal repeats, R = redundant, U = Unique, SD = Spleißdonorstelle, RRE = reverse responsive element, cPPT = central polypurine tract, ψ = Verpackungssignal, CMV = Promotor/Enhancer des Cytomegalovirus, Lgag = Leader Sequenz mit einer verkürzten Sequenz des gag, mPGK = muriner Phosphoglycerat Promotor, CeCBA = chicken beta actin Promotor mit CMV Enhancerelement, EF1a = Elongationsfaktor 1 α Promotor, hG = humanized renilla reniformis GFP, RS = RedStar, W = posttranscriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus

Nach der Herstellung des Basisvektors pSh S galt es, die modifizierten SIV_{mac} abgeleiteten Vektoren auf ihre Funktionalität zu überprüfen. Dazu wurden zwei verschiedene Expressionskassetten mit ubiquitären Promotoren und dem leicht zu detektierenden hrGFP als Transgen hergestellt. Die Titer der hergestellten lentiviralen Vektoren lagen nach der Bestimmung mittels Durchflusszytometrie wie die HIV-1 abgeleiteten Vektoren zwischen 1×10^6 bis 6×10^7 IU/ml und deuteten daher, obwohl auch an dieser Stelle kein systematischer Vergleich der Titer der beiden Vektorsysteme durchgeführt wurde, auf die Möglichkeit hin, ähnlich hohe Titer mit beiden Systemen erzielen zu können.

Auch die spätere Bestimmung der Titer der produzierten lentiviralen Vektoren mittels *Real Time* PCR führte zu vergleichbaren infektiösen Titern. Für die *Real Time* PCR der SIV_{mac} abgeleiteten Vektoren wurden die in Hanawa *et al.* veröffentlichten *Real Time* PCR Primer verwendet [182]. Obwohl im Verlauf der Diplomarbeit von Peter Christalla auch SIV-abgeleitete Vektoren hergestellt wurden, die

Expressions-kassetten unter Kontrolle verschiedener Promotoren und verschiedener Größen beinhalteten, kann aufgrund fehlender vergleichender Daten keine Aussage über eine Korrelation der Höhe des Titers und der Größe der Expressionskassette getroffen werden. Die Integration neuer Elemente könnte die Verpackungseffizienz beeinflussen, was durch die vergrößerte Genomgröße oder die Interferenz mit dem Verpackungssignal herrühren könnte [205].

Nach der Etablierung der pSh S Vektoren musste getestet werden, ob diese Vektoren wie erhofft auch in Zellen von Rhesusaffen zu einer effizienten Transduktion und ausreichenden Transgenexpression führen. Dazu wurden primäre Endothelzellen des Rhesusaffen mit einem pSh S Konstrukt, welches den CMV Promotor, das hrGFP und das WPRE enthielt, transduziert. Diese Versuche bestätigten, dass die verwendeten SIV_{mac} abgeleiteten Vektoren in der Lage sind, prinzipiell Zellen des Rhesusaffen effizient und stabil zu transduzieren (Daten nicht gezeigt). Ein Vergleich von HIV-1 abgeleiteten und SIV_{mac}-abgeleiteten Vektoren wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt, da dieser Versuch nur einen Schritt zur Etablierung eines Transduktionsprotokolls darstellt und keine weitere quantitative Analyse nötig war.

Nachdem die grundsätzliche Eignung SIV_{mac} basierter lentiviraler Vektoren für die Verwendung auf Zellen des Rhesusaffen nachgewiesen worden war, galt es geeignete Promotoren für die Expression von Transgenen in embryonalen Stammzellen (ESCs) zu identifizieren. Eine Auswahl an möglicherweise geeigneten Promotoren wurde basierend auf bisher erschienen Veröffentlichungen getroffen. Als Promotoren wurden der humane Elongationsfaktor 1 α (EF1 α), der β -Actin Promotor aus dem Huhn (CBA) in Kombination mit dem CMV Enhancerelement (Ce) und der Phosphoglycerat Promotor (PGK) aus der Maus ausgewählt. Diese Promotoren wurden bereits vielfach in embryonalen Stammzellen verwendet und führten dort den betreffenden Publikationen zufolge zu guten Transgenexpressionen [13, 153, 155, 160]. Basierend auf den bisherigen Veröffentlichungen war bereits zu vermuten, dass der EF1 α -Promotor die höchsten Transgenexpressionsraten in undifferenzierten Zellen vermitteln würde. Als Transgen wurden das hrGFP (humanized Renilla GFP) und eine rote Variante des GFP, das RedStar verwendet.

3.6. Lentiviraler Gentransfer in embryonale Stammzellen der Maus (mESC)

Die ersten Experimente zur Etablierung eines geeigneten Transduktionsprotokolls für mESCs wurden in Anlehnung an bereits publizierte Protokolle durchgeführt [13-15, 70]. So kommen bei mESCs verschiedene Möglichkeiten der Transduktion durch lentivirale Vektoren in Frage. Im Gegensatz zu vielen standardmäßig verwendeten Zelllinien wachsen ES Zellen in Form von mehrschichtigen Zellverbänden (Kolonien) auf einem Monolayer aus inaktivierten embryonalen Mausfibroblasten

(*Feederlayer*). Um eine effiziente Infektion der Stammzellen zu erreichen, ist es daher notwendig, dass die Kolonien aus möglichst sehr wenigen Zellen bestehen. Im Idealfall liegen die ES Zellen während der Transduktion als Einzelzellen vor. Im Unterschied zu den RESCs, tolerieren die mESCs das Splitten mit Trypsin. Diese Zerkleinerung der Zellverbände bis hin zu Einzelzellen bietet einen großen Vorteil. So konnten die Zellen sowohl im adhärenen Zustand einen Tag nach dem Passagieren als auch als Einzelzellen in Suspension transduziert werden. In beiden Fällen erfolgte die Transduktion immer auf einem *Feederlayer*. Zur Verbesserung der Transduktionseffizienz wurden zwei oft verwendete Zusätze ausgetestet. Zum einen das Protaminsulfat und zum anderen Polybrene [13, 70, 161, 206, 207]. Zur Austestung der optimalen Bedingungen für eine Transduktion, wurden mESCs, die das eGFP im Brachyury Locus tragen (Brachyury-eGFP mESC Linie) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hans-Jörg Fehling) [185] und eGFP erst nach Differenzierung exprimieren, adhären und in Suspension sowie mit Protaminsulfat bzw. Polybrene mit dem lentiviralen Vektor unter Kontrolle des ubiquitären EF1 α Promotors (pSh S E hG W) transduziert. Der lentivirale Vektor mit dem EF1 α Promotor erschien aufgrund publizierter Daten für mESCs [153, 155, 208], humane embryonale Stammzellen (hESCs) [13, 160, 209-211] und RESCs [212] sowie aufgrund persönlicher Mitteilungen der aller Voraussicht nach geeignetste Promotor im Hinblick auf die Expression in undifferenzierten ESCs zu sein.

Für die Infektion der adhärenen Zellen wurden die Zellen mit Trypsin gesplittet und auf inaktivierte Fibroblasten ausgesät. Die Transduktion erfolgte dann am nächsten Tag. Dazu wurde das Kultivierungsmedium gegen den Transduktionsansatz, bestehend aus Kultivierungsmedium, lentiviralen Vektoren und einem der beiden Transduktionszusätze, ausgetauscht. Für die Transduktion in Suspension wurden die mESCs wie für das Splitten mit Trypsin vereinzelt und dann zusammen mit den jeweiligen lentiviralen Vektoren und einem der beiden Transduktionszusätze auf einen *Feederlayer* ausgesät. Der Transduktionszusatz Protaminsulfat wurde in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ und die Polybrenelösung in einer Konzentration von 8 $\mu\text{g/ml}$ zum Transduktionsansatz zugegeben. Um einen ausreichend großen Kontakt der Zellen mit den lentiviralen Vektoren zu gewährleisten, wurde der Transduktionsansatz so klein wie möglich gewählt. Das heißt, die Transduktion wurde in einer 24-Lochplatte in einem Volumen von 250 μl durchgeführt. Die Transduktion erfolgte über Nacht für ca. 16-18 Stunden. Durch den Einsatz von Einzelzellen konnte eine genaue MOI festgelegt werden. Die MOIs bewegten sich zwischen 20 und 100. Bei den hier gezeigten Daten wurde eine MOI von 25 verwendet. Nach der Transduktion war es nur in den ersten 2-3 Passagen nach der Transduktion problematisch, die Zellen in einem undifferenzierten Zustand zu halten. Die Zellen neigten im Verlauf des

fortschreitenden Wachstums der einzelnen Kolonien schneller zur spontanen Differenzierung als nicht transduzierte Zellen. Nach dieser initialen Phase entsprach das Kulturverhalten der transduzierten mESCs jedoch 'normalen' nicht transduzierten mESCs.

Generell konnte nach Transduktion in Suspension ein höherer Anteil an GFP^{pos} Zellen beobachtet werden (mit Protaminsulfat 3,36 % und mit Polybrene 8,78 %), als nach Transduktion im adhärenen Zustand (mit Protaminsulfat 0,94 % und mit Polybrene 7,22 %). Außerdem stellte sich die Transduktion unter Verwendung von Polybrene effizienter dar als mit Protaminsulfat (s. Abb. 21 und Tabelle 30). Der höchste Anteil GFP^{pos} Zellen wurde nach Transduktion in Suspension unter Zusatz von Polybrene erzielt.

Ergebnisse des Vergleichs verschiedener Transduktionsprotokolle für mESCs				
	Transduktion adhärenent		Transduktion in Suspension	
	Protaminsulfat 4 µg/ml	Polybrene 8µg/ml	Protaminsulfat 4 µg/ml	Polybrene 8µg/ml
GFP^{pos} Zellen [%]	0,94	7,22	3,36	8,78

Tabelle 30: Die Transduktion von mESCs in Suspension mit dem Transduktionszusatz Polybrene führt zu dem größten Anteil GFP^{pos} Zellen.

Dieser Versuch wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit nur einmal durchgeführt. Es sollte kein quantitativer Vergleich bzw. Analyse mithilfe dieses Versuchs erzielt werden, sondern der Versuch stellt ausschließlich einen weiteren Etablierungsschritt dar.

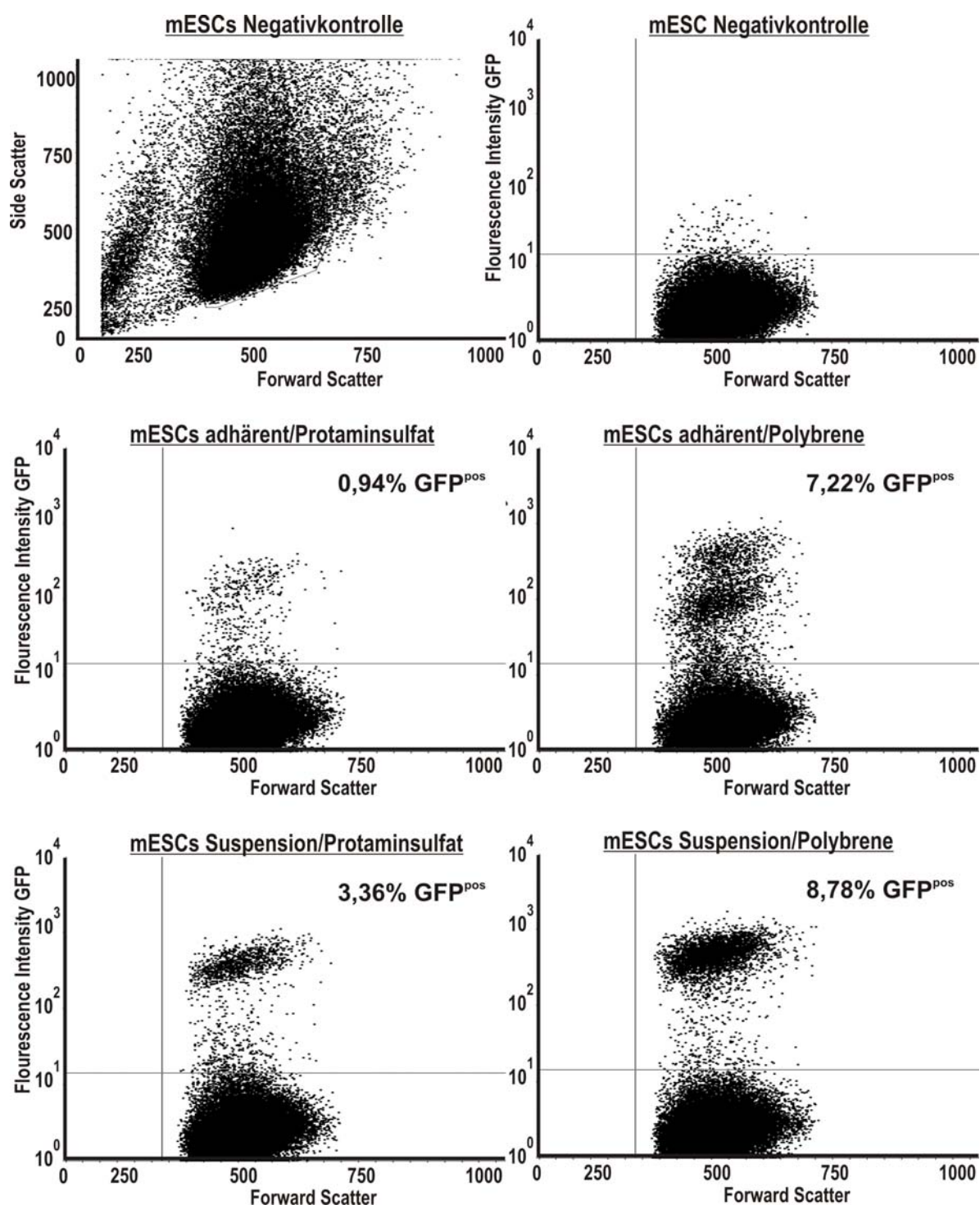


Abb. 21: Die Transduktion in Suspension unter Verwendung von Polybrene führt bei den mESCs zu dem höchsten Anteil an GFP^{pos} Zellen.

Dargestellt ist die FACS-Analyse der Transduktionsansätze von eGFP-Brachyury mESCs (Passage 30), die mit pISh S EF1α hG W mit einer MOI 25 transduziert wurden. Gegeneinander ausgetestet wurden die Transduktion in adhärenem Zustand und in Suspension unter Zugabe der Zusätze Protaminsulfat (4µg/ml) oder Polybrene (8µg/ml).

n = 1

3.6.1. Austestung einer roten GFP-Variante (RedStar) als Transgen in mESCs

Für die in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin in Arbeit befindliche Generierung von mehrfach-transgenen Stammzellklonen war neben der Austestung unterschiedlicher Promotoren auch die Verfügbarkeit mehrerer geeigneter Chromophore von Bedeutung. Im Rahmen dieser Dissertation sollten deshalb ein SIV-Vektor mit dem roten Chromophor RedStar, einem über verschiedene Mutationen modifizierten DsRed [180], unter Kontrolle des EF1 α -Promoters, mit einem hrGFP-Expression vermittelnden, aber ansonsten identischen Vektor, in ES-Zellen verglichen werden.

Vergleichend analysiert wurden beide Vektoren in der von Prof. Fehling freundlicherweise zur Verfügung gestellten murinen embryonalen Stammzelllinie Brachyury-eGFP mESC Linie [185]. Wie bereits unter 3.6. erwähnt, zeigt diese ES-Zelllinie im undifferenzierten Zustand keine GFP-Expression, erst bei Differenzierung zu mesendodermalen Vorläufern wird GFP sichtbar exprimiert. Soll diese Stammzelllinie, die bereits zelltypspezifisch GFP exprimiert, mit einem zweiten Reporterkonstrukt versehen werden, könnte z. B. das rot fluoreszierende RedStar verwendet werden, dessen Emissionsspektrum nahezu keine Überschneidung mit dem Spektrum des GFP aufweist.

Bei der Transduktion der eGFP-Brachyury mESC Linie mit dem lentiviralen Vektor, der die Expression der GFP Variante RedStar unter Kontrolle des ubiquitären EF1 α Promoters vermittelt (pISh S E RS W) bzw. mit dem lentiviralen Vektor, der die Expression von hrGFP unter Kontrolle des ubiquitären EF1 α Promoters vermittelt (pISh S E hG W), wurde das zuvor optimierte Transduktionsprotokoll in Suspension unter der Zugabe von Polybrene (8 μ g/ml) verwendet. Die Zellen wurden mit einer MOI von 25 transduziert. Die transduzierten mESC wurden nach zweimaligem Splitten, ohne eine Anreicherung der Zellen vorzunehmen, morphologisch mit dem Fluoreszenzmikroskop auf eine Transgenexpression beurteilt. Nach Transduktion konnte eine gut detektierbare, wenn gleich auch unterschiedlich intensive Fluoreszenz der beiden Transgene hrGFP und RedStar beobachtet werden. Die Fluoreszenzintensität von RedStar-exprimierenden Zellen erschien deutlich geringer als die von hrGFP-exprimierenden Zellen und resultierte in der Notwendigkeit ca. vier- fach längere Belichtungszeiten zur Detektion von RedStar zu verwenden. Anzumerken ist, dass die in Abbildung 22 dargestellten mESC Kolonien nicht repräsentativ für die Gesamtheit der Kolonien sind, sondern als Kolonien mit überdurchschnittlich hoher Zahl an hrGFP^{pos} bzw. RedStar^{pos} Zellen ausgewählt wurden.

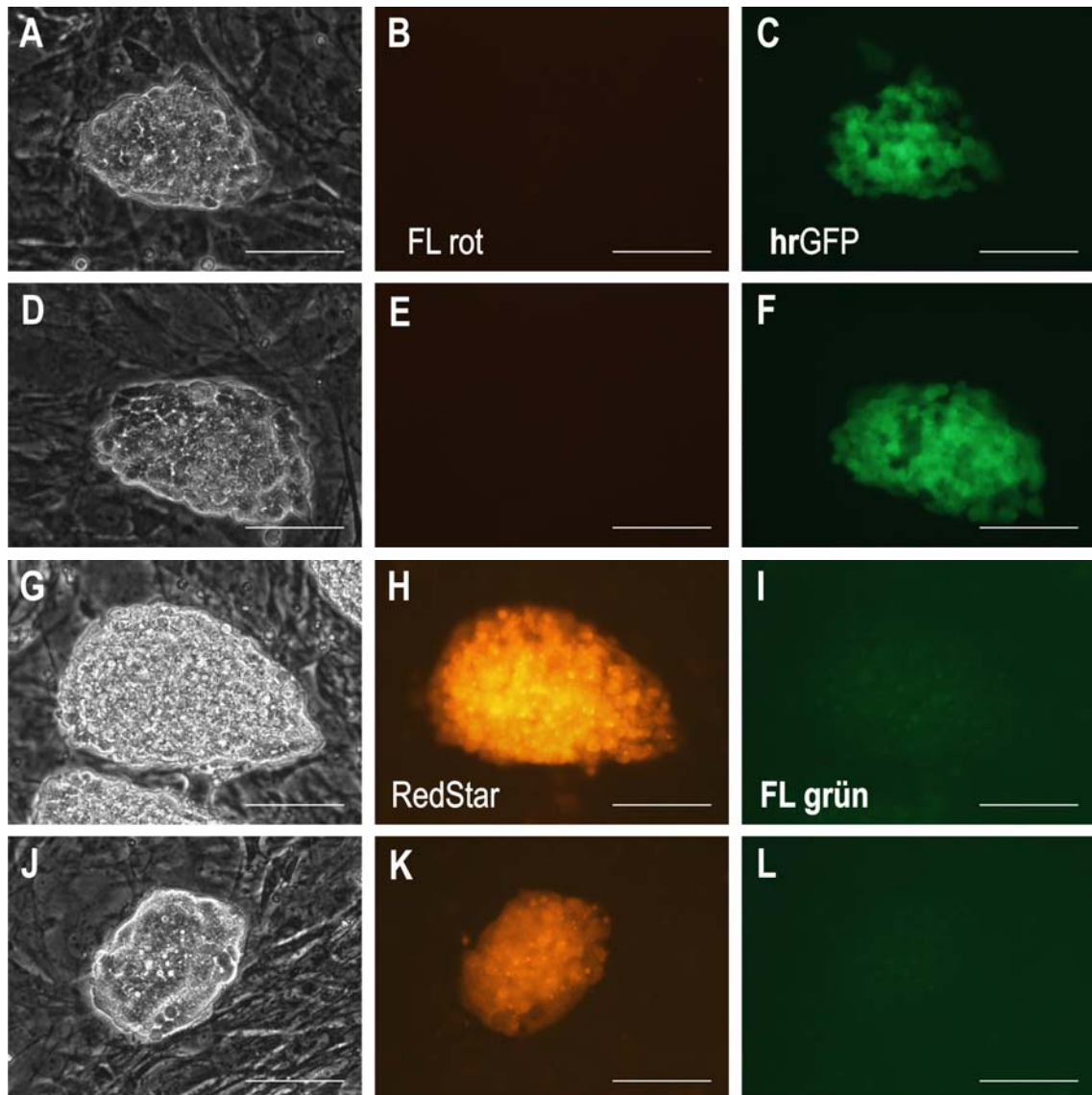


Abb. 22: Die Verwendung von RedStar als Transgen in mESCs führt zu einer ausreichenden, aber schwächeren Expression im Vergleich zum hrGFP.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der mESCs nach der Transduktion mit den lentiviralen Vektoren pSh S E hG W und pSh S E RS W. In der Abbildung sind eGFP-Brachyury mESCs in Passage 45 gezeigt. Die Transduktion erfolgte in Passage 43 mit einer MOI von 25. B., E., H., K. Fluoreszenz im roten Spektrum (H.+ K. Fluoreszenz RedStar); C., F., I., L. Fluoreszenz im grünen Spektrum (C. + F. Fluoreszenz hrGFP); A., D., G., J. Korrespondierende Phasenkontrastbilder. Die Belichtungszeit für die rote Fluoreszenz des RedStar (pSh S E RS W) lag ungefähr vierfach höher als für die Fluoreszenz des hrGFP (pSh S E hG W).

Skalierung 100 μ m.

3.6.2. Etablierung der Einzelklonselektion von transduzierten mESCs über Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Unter Verwendung der mit dem RedStar unter Kontrolle des EF1 α Promotors (pSh S E RS W) transduzierten mESCs wurde ein Protokoll zur durchflusszytometrischen Einzelklonselektion etabliert. Die Zellen wurden dazu mit Trypsin vereinzelt, sodass die RedStar^{pos} ES-Zellen dann mittels FACS auf eine 96-Lochplatte vereinzelt auf einen *Feederlayer* ausgesät werden konnten. Das „Sorten“ der mESCs wurde von Dr. Mathias Ballmeier in der *Core Facility* der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Mithilfe des FACS konnten drei RedStar^{pos} eGFP-Brachyury mESC Klone [185] isoliert werden. Die Klone wurden fortlaufend nummeriert. Die Einzelklone brauchten nach der Selektion mittels FACS eine Woche, um wieder eine gut sichtbare Kolonie auszubilden. Von 48 Einzelzellen konnten drei undifferenzierte Klone gewonnen werden. Bis zur zweiten Passage tendierten die vereinzelt Zellen zu Differenzierungsvorgängen, doch schon nach 2 Passagen, war die Kultivierung vergleichbar mit normalen undifferenzierten mESCs.

Der etablierte Klon 2 zeigte nach dem Sorten über bisher 17 Passagen eine stabile Transgenexpression. Insgesamt waren die transduzierten mESCs seit der Transduktion bis zu 30 Passagen in Kultur.

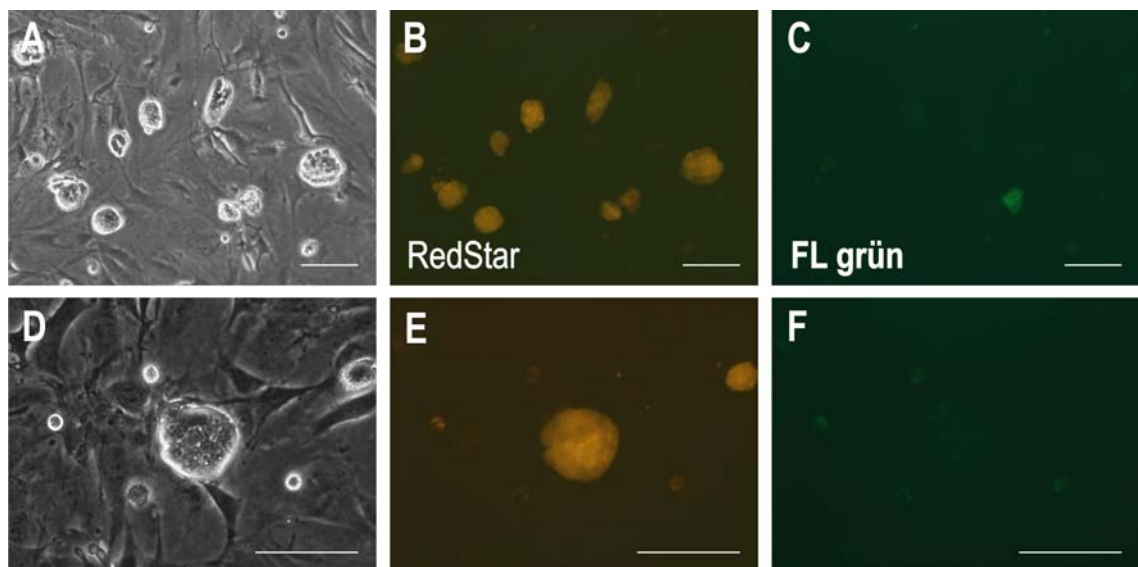


Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des mESC Klon 2 in Kultur nach mehrmaligem Splitten nach der Einzelklonselektion

In der Abbildung sind eGFP-Brachyury mESCs (Passage 65), die mit dem SIV_{mac} abgeleiteten lentiviralen Vektor pSh S E RS W transduziert wurden zu sehen. Die Transduktion der eGFP-Brachyury mESCs erfolgte in Passage 47. Die Einzelklonselektion erfolgte in Passage 60.

B. + E. Fluoreszenz im roten Spektrum (RedStar); C. + F. Fluoreszenz im grünen Spektrum; A. + D. Korrespondierende Phasenkontrastbilder

Skalierung 100 μ m.

3.6.2.1. Charakterisierung des Einzelzellklons RedStar^{pos} Brachyury-GFP mESC Klon 2 im undifferenzierten Zustand

Typischerweise ist der Prozess der durchflusszytometrischen Zellaufreinigung nicht förderlich für die Zellvitalität. Zudem ist bekannt, dass sowohl der Selektionsprozess als auch die genomische Integration bzw. die Expression von Transgenen das Kultur- und Differenzierungsverhalten von ES-Zellen beeinflussen können. Resultierende Klone besitzen nicht selten deutlich verändertes Kulturverhalten, sehen morphologisch anders aus als typische ES-Zellen oder zeigen ein modifiziertes Differenzierungsverhalten. Wie schon zuvor erwähnt, kommt es insbesondere in der initialen Phase nach Klonierung zu verstärkten Differenzierungstendenzen bei den überlebenden Zellklonen. Mit diesem Hintergrund erschien es geboten, zusätzlich zur morphologischen Beurteilung der Kolonien zumindest noch eine immunhistologische Färbung gegen einen typischen Marker undifferenzierter mESCs durchzuführen. Die erfolgte Immunfärbung gegen SSEA-1, einem der wichtigsten Oberflächenmarker undifferenzierter muriner ES-Zellen, zeigte die für das Oberflächenantigen typische Färbung. Somit konnte ein undifferenzierter Zustand der etablierten mESC Kultur angenommen werden. Auch die morphologische Beurteilung der Kolonien zeigte die für mESCs typische runde bis ovale Kolonieform sowie den im Phasenkontrast sichtbaren hellen Rand um die Kolonien. Auch die Kultivierung der transduzierten mESCs war vergleichbar mit dem nicht transduzierter mESCs. Die Zellen konnten 2 Mal in der Woche mit Kollagenase vom *Feederlayer* abgelöst werden und mit Trypsin vereinzelt werden. Aus zeitlichen Gründen war eine Überprüfung weiterer Marker für die Charakterisierung und die Bestätigung des undifferenzierten Zustandes nicht möglich.

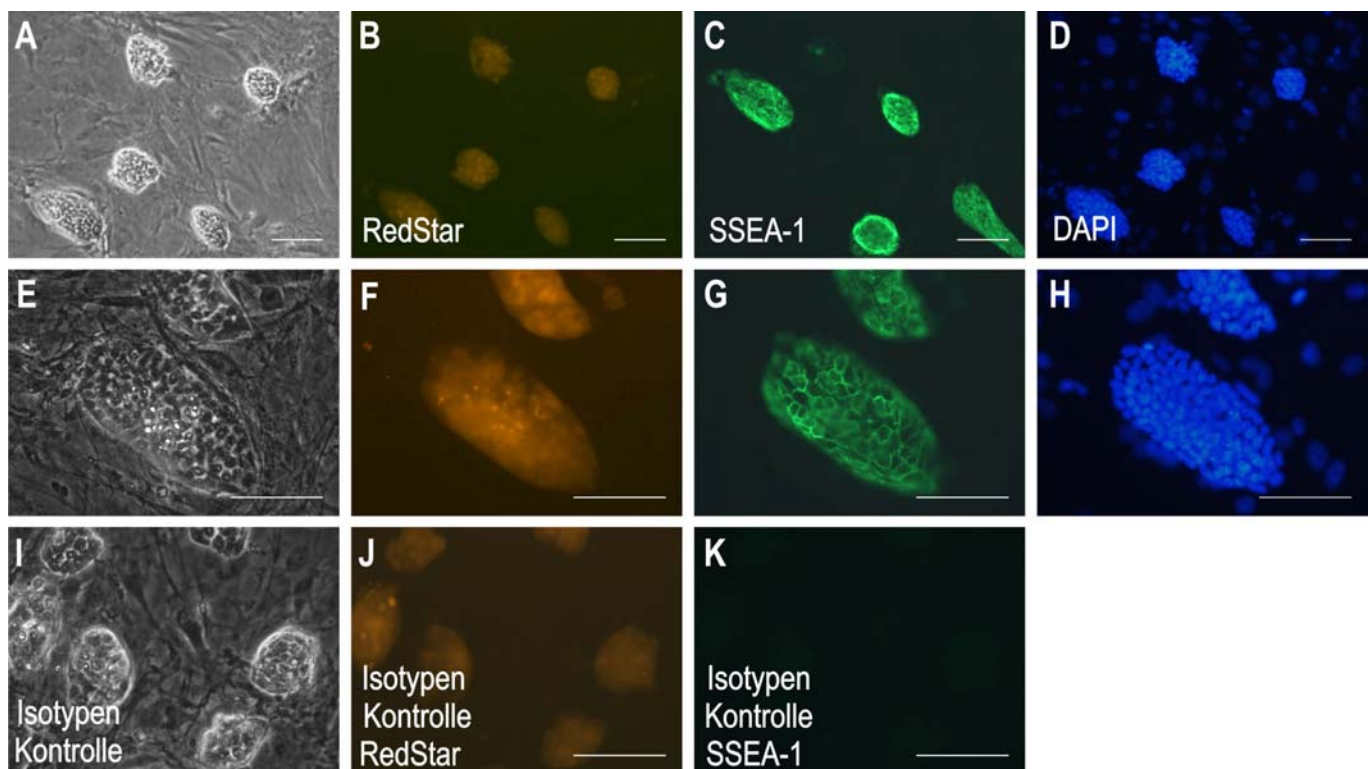


Abb. 24: Nachweis des Oberflächenantigens SSEA-1 (ein wichtiger Marker von undifferenzierten mESCs) durch immunhistologische Analyse des Einzelzellklons RedStar^{pos} Brachyury-GFP mESC Klon 2.

In der Abbildung sind eGFP-Brachyury mESCs (Passage 70), die mit dem SIV_{mac} abgeleiteten lentiviralen Vektor plSh S E RS W transduziert wurden zu sehen. Die Transduktion der eGFP-Brachyury mESCs erfolgte in Passage 47. Die Einzelklonselektion erfolgte in Passage 60.

B., F. und J. Fluoreszenz im roten Spektrum (RedStar); C., G. und K. Fluoreszenz im grünen Spektrum (SSEA-1); A., E. und I. Korrespondierende Phasenkontrastbilder. Die Gegendarstellung der Zellkerne erfolgte durch die Anfärbung mit DAPI (D. + H.)

Skalierung 100 µm.

3.6.2.2. Kardiale Differenzierung des Einzelzellklons RedStar^{pos} Brachyury-GFP mESC Klon 2

Im Hinblick auf den oben angedeuteten Einfluss von Zellselektionsprozessen und gentechnischer Zellmodifikation auf das Differenzierungsverhalten von ES-Zellen war ein Nachweis des unveränderten Differenzierungspotentials des Zellklons geboten. Exemplarisch für den Nachweis des erhalten gebliebenen Differenzierungspotentials, wurde deshalb eine kardiale Differenzierung dieses Klons durchgeführt.

Die Differenzierung erfolgte wie im Material und Methoden Teil Seite 68 beschrieben. Im Verlauf der Differenzierung entwickelten sich in den Kulturen des untersuchten Zellklons genauso wie in den als Kontrolle differenzierten unselektierten ES-Zellen spontan kontrahierende Areale embryonaler

Kardiomyozyten. Die Effizienz der kardialen Differenzierung, gemessen am Anteil kontrahierender „Embryoid bodies“ war vergleichbar mit nicht transduzierten mESCs. Die kardiale Differenzierung wurde zwei Mal durchgeführt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen.

Ergänzend wurde am 18. Tag der Differenzierung eine immunhistologische Färbung der kardial differenzierten mESCs gegen das für quergestreifte Muskulatur spezifische Antigen sarkomerisches α -Aktinin durchgeführt. Die Färbung zeigte deutlich die für Kardiomyozyten spezifische Querstreifung (Abb. 25). In Abbildung 25 E und F sind Zellen zu beobachten, die positiv für sarkomerisches α -Aktinin sind, aber noch keine organisierte Querstreifung aufweisen. Diese Zellen haben im Vergleich zu Zellen mit einer bereits organisierten Querstreifung eine eher rundliche Morphologie. Diese Zellen könnten frühere Stadien im Verlauf der Kardiomyozytenreifung darstellen. Eine detailliertere Charakterisierung dieses Zellklons konnte aus Zeitgründen leider nicht mehr durchgeführt werden.

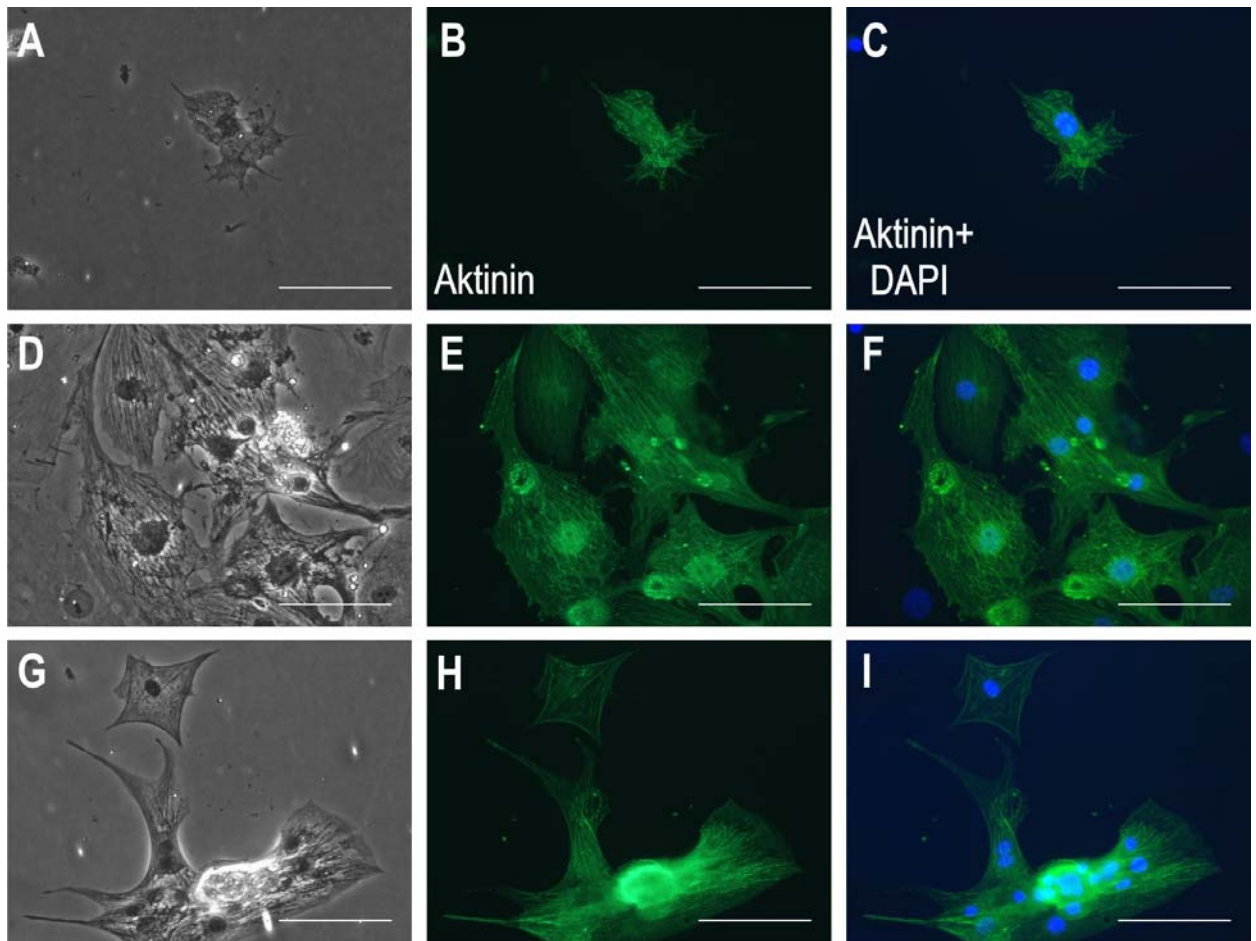


Abb. 25: Nachweis von sarkomerischem α Aktinin durch immunhistologische Analyse des mESC Klon2 nach kardialer Differenzierung.

Darstellung von RedStar[®]s eGFP-Brachyury mESC-abgeleiteten Kardiomyozyten am achtzehnten Tag einer Differenzierung (d18). Die mESCs befanden sich an do der Differenzierung in Passage 70, zehn Passagen nach der Einzelklonselektion und dreiundzwanzig Passagen nach der Transduktion.

B., C., E., F., H., I. Fluoreszenz im grünen Spektrum (sarkomerisches α -Aktinin); A., D., G. Korrespondierende Phasenkontrastbilder. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI.

Skalierung 100 μ m.

3.7. Lentiviraler Gentransfer in embryonale Stammzellen des Rhesusaffen, (RESC)

Das zur Transduktion von mESCs etablierte Transduktionsprotokoll sollte zunächst auf die RESCs übertragen werden. Verwendet wurde dabei die ursprünglich im Labor von J. Thomson, Wisconsin, isolierte Linie R366.4.

Bei der Übertragung des an mESCs etablierten Transduktionsprotokolles war zu beachten, dass die Kultivierung von RESCs wesentlich problematischer ist, als die Kultivierung von mESCs. RESCs sind in Bezug auf ihr Kulturverhalten etwa mit den schwieriger zu kultivierenden Linien unter den humanen

ESC-Linien vergleichbar. Diese Tatsache erschwerte die Etablierung eines Transduktionsprotokolls sehr. Die Zellen reagieren, anders als die mESCs äußerst empfindlich auf kleinste Schwankungen in der Medienzusammensetzung und neigen zur spontanen Differenzierung zu neuronalen Zellen.

Ein sehr wichtiger Aspekt in Hinblick auf die Übertragbarkeit des Protokolls war die Problematik, dass sich die verwendete RESC-Linie bisher nicht wie mESCs vereinzeln ließ. Die bei mESCs anwendbare Trypsinbehandlung führt im Falle der RESCs zu hoher Zellmortalität und sofortigem Ausdifferenzieren der verbleibenden Stammzellen. Aus diesem Grund konnten die RESCs wie beim routinemäßigen Splitten nur mit 0,2%iger Kollagenase behandelt werden. Diese Behandlung resultiert zwar in relativ kleinen Zellaggregaten, Einzelzellen waren jedoch nicht herstellbar, da die Zellen bei zusätzlicher mechanischer Beanspruchung, z. B. durch mehrfaches zu starkes Resuspendieren mithilfe einer Pipette, mit einem dramatischen Abfall der Zellvitalität reagierten. Bei der Aussaat einen Tag vor der Transduktion auf 12-Lochplatten wurden somit statt Einzelzellen kleine Zellverbände aus RESCs ausgesät.

Die Transduktion der RESCs erfolgte einen Tag nach dem Splitten durch den Austausch des Kultivierungsmediums gegen das Transduktionsmedium. Für die Transduktion wurden die lentiviralen Vektoren zusammen mit 8 µg/ml Polybrene und Kultivierungsmedium in einem Gesamtansatz von 500 µl auf die RESCs gegeben. Die Transduktion erfolgte für 16-18 Stunden über Nacht, bevor am nächsten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

Die ersten Versuche die RESC mit den SIV_{mac} abgeleiteten lentiviralen Vektoren zu transduzieren mussten in der Regel bereits zwei Passagen nach der Transduktion abgebrochen werden. Die transduzierten Zellen waren zu diesem Zeitpunkt jeweils bereits stark differenziert. In vielen Fällen war eine starke neuronale Differenzierung zu beobachten, erkennbar an Bildung neuronaler Rosetten bzw. dunkler und stark verdichteter Bereiche innerhalb der Kolonien (Abb. 26). Die Transgenexpression in diesen Kulturen war sehr gering, dies beruht allerdings vermutlich in der Hauptsache auf den zu diesem Zeitpunkt verwendeten und in undifferenzierten ES-Zellen relativ schwachen chicken beta actin Promotor (CeCBA) und Phosphoglyceratkinase Promotor (mPGK).

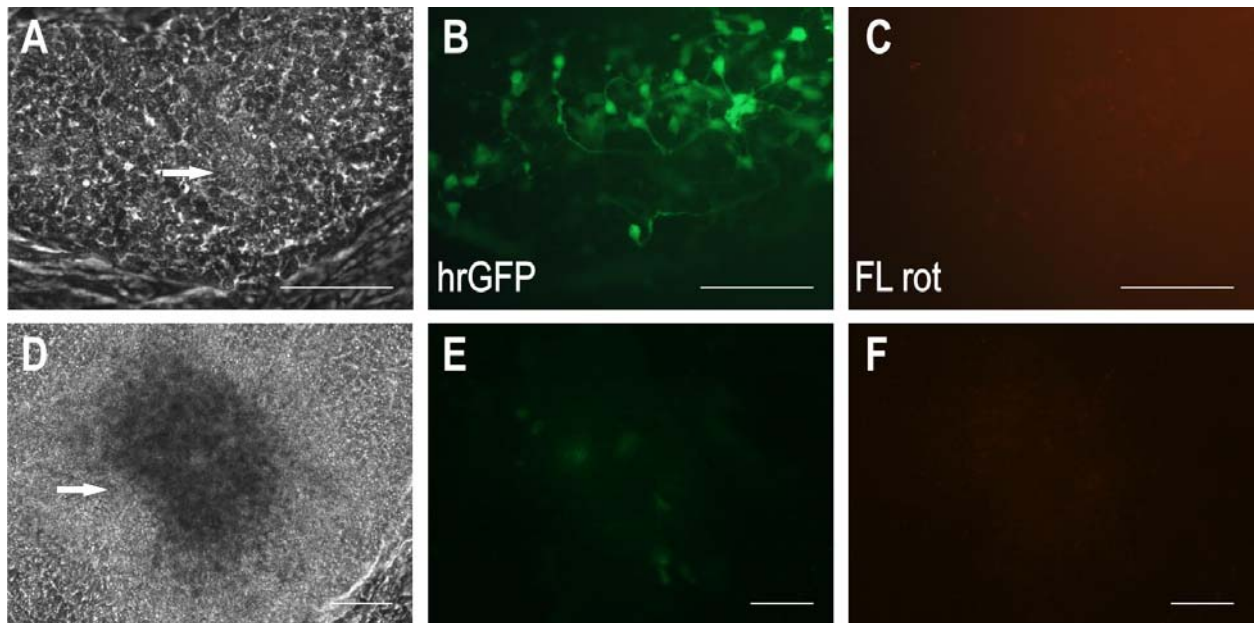


Abb. 26: Transuzierte RESCs neigten nach den ersten Transduktionsversuchen verstärkt zu neuronaler Differenzierung.

In der Abbildung sind RESCs (Passage 75 und Passage 80) zu sehen, die mit den SIV_{mac} abgeleiteten lentiviralen Vektoren pISh S CeCBA hG W (A-C) bzw. mit pISh S PGK hG W (D-F) transduziert wurden. In Abbildung 20 A-C sind RESCs fünf Tage nach der Transduktion und in Abbildung 20 D-F drei Tage nach dem ersten Splitten nach der Transduktion zu sehen.

B. + E. Fluoreszenz im roten Spektrum (RedStar); C. + F. Fluoreszenz im grünen Spektrum; A. + D. Korrespondierende Phasenkontrastbilder. Der Pfeil zeigt in Bild A eine neuronale Differenzierung in Form einer Rosette und in Bild D eine neuronale Differenzierung in Form eines stark verdichteten und verdunkelten Bereichs innerhalb einer RESC Kolonie. GFP Expression war mit den verwendeten ubiquitären Promotoren CeCBA und mPGK vorwiegend in den differenzierten Zellen zu beobachten.

Skalierung 100 μm .

Im weiteren Verlauf der Promotion konnte der Umgang mit den RESCs verbessert werden und so eine nahezu vollständige Differenzierung der transduzierten Kolonien verhindert werden. Da die Kultivierung der RESCs, wie schon erwähnt sehr anspruchsvoll ist, lassen sich die durch die Zeit gewonnenen Erfahrungswerte und ihre Auswirkungen nur schwer in konkreten Verbesserungen ausdrücken. Eine wichtige Veränderung war zusätzlich zum verbesserten Umgang mit den Zellen, die lentiviralen Vektoren nach Ankonzentration direkt im Kultivierungsmedium der RESCs aufzunehmen. Dadurch wurden die Schwankungen der Medienzusammensetzung möglichst gering gehalten. Trotz der Verbesserungen war es nach einer Transduktion immer noch sehr schwierig, die Zellen in einem undifferenzierten Zustand zu halten, jedoch verhielten sich die transduzierten Zellen nach etwa 5-6 Passagen, wieder ähnlich wie eine nicht transduzierte Kultur. Obwohl damit eine erfolgreiche Transduktion und weitergehende Kultur der transduzierten RESCs im undifferenzierten Zustand grundsätzlich möglich war, war die Expression des Transgens in den RESCs gemessen an der

detektierbaren GFP-Fluoreszenz gering oder gar nicht vorhanden. Wurde allerdings eine GFP-Expression in den Kolonien beobachtet, lag diese meist in einem differenzierten Bereich der Kolonie. Diese Beobachtung würde sich auch mit den Untersuchungen von Hong *et al.* decken, die verschiedene ubiquitäre Promotoren in undifferenzierten und differenzierten mESCs untersucht haben [155]. Um auszutesten, ob die geringe GFP-Expression an einer mangelnden Transduktionseffizienz oder an der Funktion der ausgewählten Promotoren in undifferenzierten Zellen begründet lag, wurden verschiedene ubiquitäre Promotoren für die Transduktion von RESCs vergleichend ausgetestet. Verwendet wurden der mPGK-, der CeCBA- und der EF1 α Promotor. Die Zellen wurden jeweils mit denselben MOIs unter Verwendung des gleichen Protokolls transduziert und anschließend drei Mal gesplittet, bevor sie mittels FACS analysiert wurden. Die FACS-Analyse zeigte, dass die Transduktionseffizienz mit dem verwendeten Protokoll sehr gering ausgefallen war (Abb. 27). Nach Transduktion konnten jeweils nur geringe Zahlen an GFP^{pos} Zellen beobachtet werden: Die Transduktion mit dem lentiviralen Vektor, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des ubiquitären mPGK Promotors (pSh S mPGK hG W) trägt, führte zu keiner GFP^{pos} Zelle. Die Transduktion mit dem CeCBA- und dem EF1 α -Konstrukt führte in dem hier beschriebenen Versuch zu einer vergleichbaren Anzahl an GFP^{pos} Zellen (2% mit dem CeCBA-Konstrukt und 2,4% mit dem EF1 α -Konstrukt), jedoch war die Fluoreszenzintensität in diesem Versuch beim dem EF1 α Konstrukt ca. zehn Mal so hoch als im Falle des CeCBA-Konstruktes (Abb. 27). Der Vergleich der verschiedenen ubiquitären Promotoren wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit nur einmal durchgeführt. Für die weitere Etablierung eines Transduktionsprotokolls waren keine weiteren quantitativen Analysen notwendig.

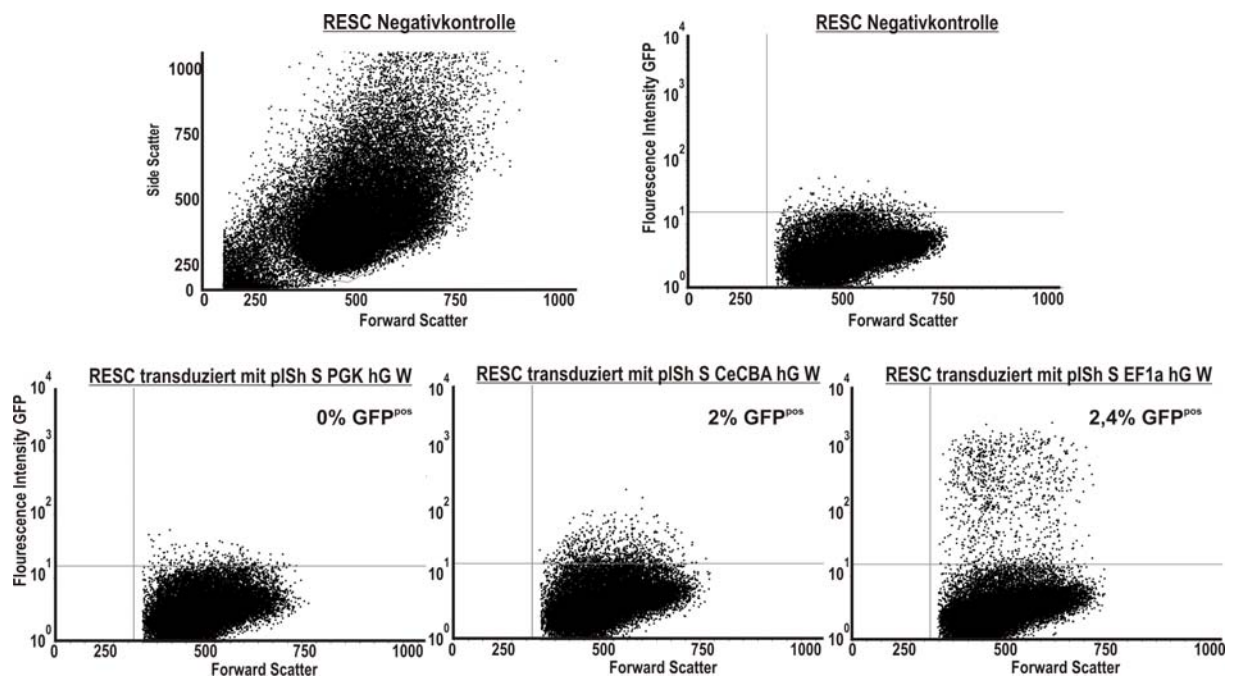


Abb. 27: Die Transduktion mit dem ubiquitären EF1 α Promotor führte zu dem größten Anteil an GFP^{pos} Zellen und der stärksten Fluoreszenz Intensität.

FACS-Analyse der Austestung verschiedener Promotoren mit dem hrGFP und WPRE in RESCs (MOI von ungefähr 60).

Die gezeigten RESCs befinden sich in Passage 68 und wurden vor der FACS-Analyse drei Mal ohne eine Anreicherung nach der Transduktion mit den verschiedenen Vektoren gesplittet. Für die Transduktion wurden die SIV_{mac} abgeleiteten Vektoren plSh S E hG W, pl Sh S CeCBA hG W und plSh S mPGK hG W verwendet.

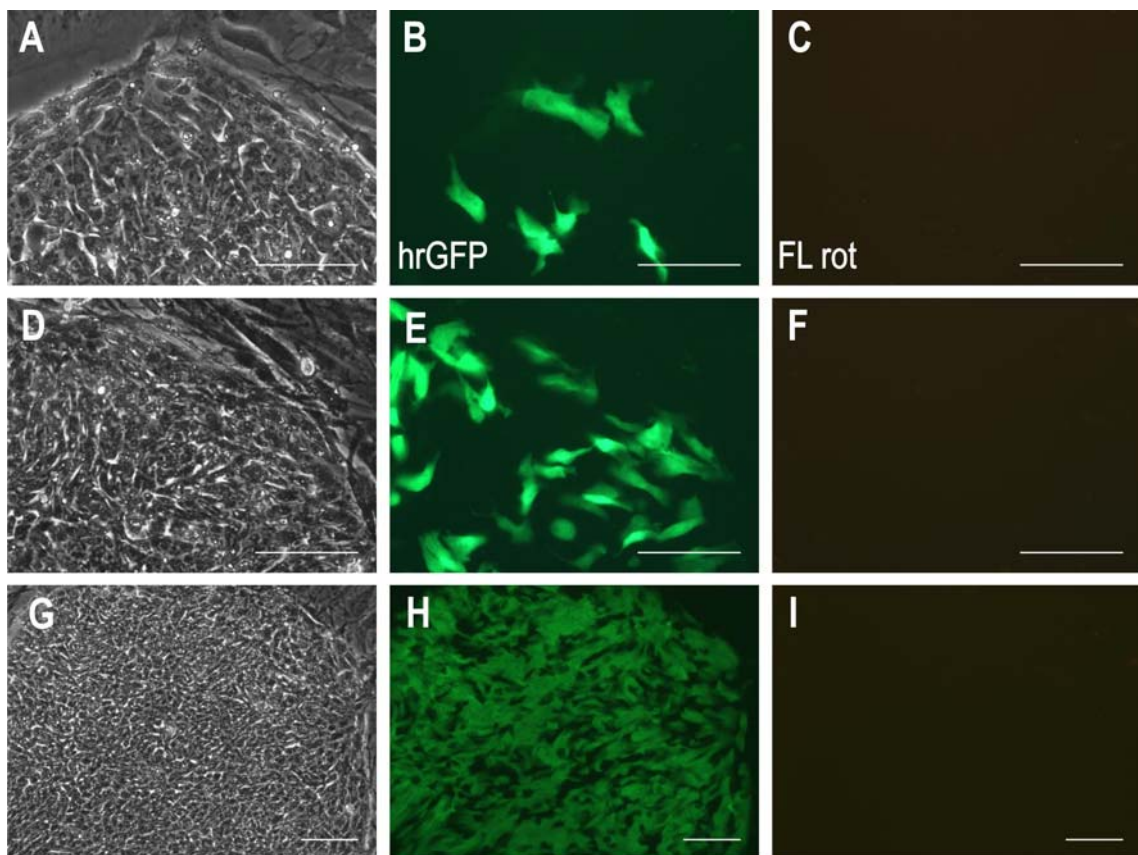
Abgebildet ist die FACS-Analyse in Form von Dot-Plots. Obere Reihe: Negativkontrolle in Form von untransduzierten RESCs; Untere Reihe: Austestung der verschiedenen Promotoren in RESCs. $n = 1$

3.7.1. Anreicherung von GFP^{pos} RESCs

Für die RESCs konnten im Verlauf der Arbeit zwar nahezu reine Kulturen GFP^{pos} Zellen etabliert werden, aufgrund der dabei angewandten Methodik konnten allerdings keine Einzelklone isoliert werden. Kolonien, die GFP^{pos} Zellen enthielten und morphologisch den Kriterien undifferenzierter ESCs entsprachen, wurden nach der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop markiert und dann anschließend mit einer modifizierten Glaskapillare ausgeschnitten. Dieser Vorgang musste im Laufe kontinuierlicher Kultur einschließlich des Kollagenase-basierten Zellsplittens mindestens zehnmal wiederholt werden, um zu Kulturen mit nahezu 100% GFP^{pos} Zellen zu erhalten (Abb. 28). Neben der Tatsache, dass auf diese Art und Weise keine definierten Zellklone erhalten werden, besteht ein weiterer großer Nachteil dieser Methode darin, dass sie sich ausschließlich zur Anreicherung von ESCs mit ubiquitären oder spezifisch in undifferenzierten ESCs exprimierten Transgenen geeignet ist. Bedingt durch die

schwierige Kultivierbarkeit und die bisher nicht gegebene Möglichkeit vereinzelte RESCs undifferenziert kultivieren zu können, konnte keine *limiting dilution* oder durchflusszytometrische Vereinzelung durchgeführt werden.

Nichtsdestotrotz konnte unter Verwendung eines lentiviralen Vektors mit dem Reporter gen hrGFP unter Kontrolle des EF1 α -Promoters unter Anwendung der oben beschriebenen Anreicherungsstrategie, eine nahezu reine GFP^{pos} RESC Kultur erzielt werden: Die durchflusszytometrische Analyse ergab 94% GFP^{pos} Zellen. (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 28 sind repräsentative Kolonien von verschiedenen Zeitpunkten der Anreicherung gezeigt. Selbstverständlich war bis zum Erreichen der zu 94% aus GFP^{pos} Zellen (Abb. 28, J-R) bestehenden und mikroskopisch sehr homogen erscheinenden Kultur immer eine gewisse Heterogenität zwischen den vorhandenen Kolonien zu beobachten.



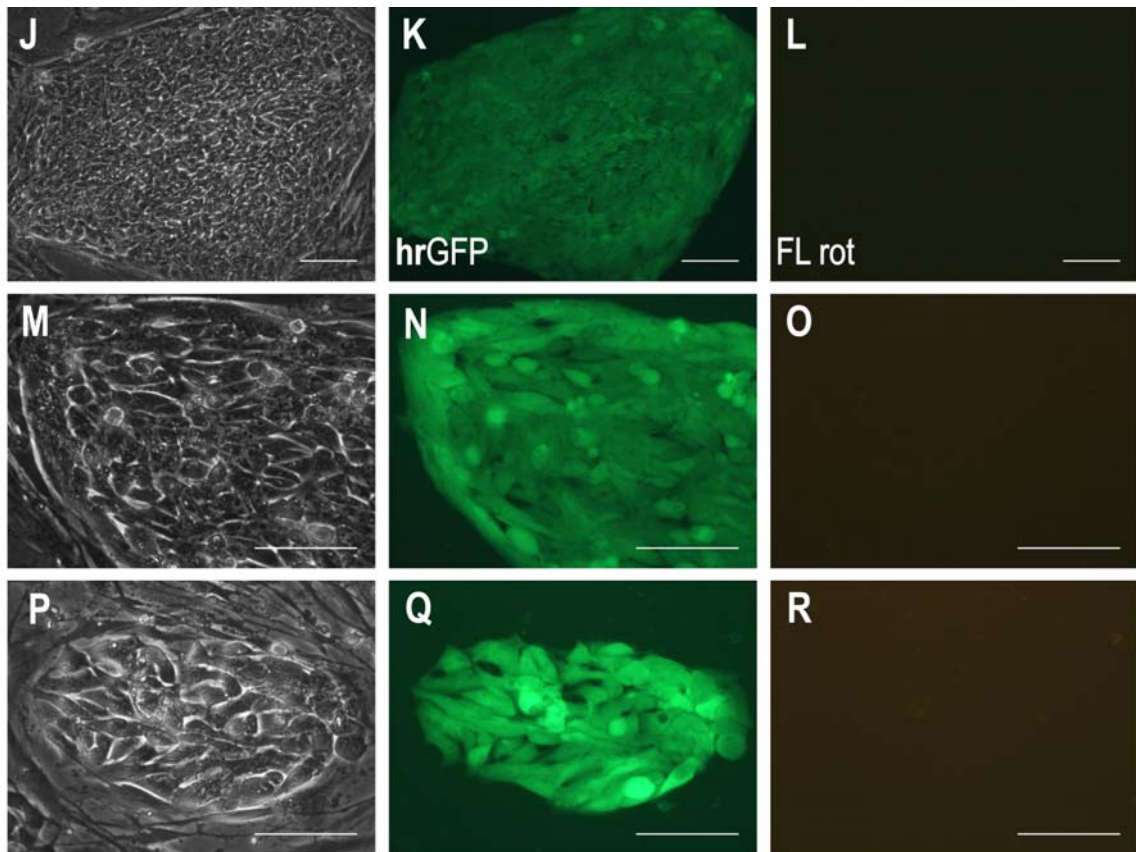


Abb. 28: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von transduzierten RESCs im Verlauf der Anreicherung
 Dargestellt sind RESCs in Passage 45 (A.-C.), in Passage 47 (D.-F.), in Passage 53 (G.-I.) und in Passage 55 (J.-R.). Die Transduktion mit dem SIV_{mac} abgeleiteten Konstrukt pISh S E hG W erfolgte in Passage 41. B., E., H., K., N., Q. Fluoreszenz im grünen Bereich (hrGFP); C., F., I., L., O., R. Fluoreszenz im roten Bereich; A., D., G., J., M., P. Korrespondierende Phasenkontrastbilder. Skalierung 100 µm.

3.7.2. Charakterisierung der angereicherten GFP^{pos} RESC Massenkultur (RESC EF1α hG W)

3.7.3. Nachweis des undifferenzierten Zustands der angereicherten GFP^{pos} RESCs

Nach der Anreicherung der transduzierten RESCs sollte überprüft werden, ob die Zellen, die morphologisch nicht von typischen RESCs unterscheidbar waren, auch entsprechende Pluripotenzmarker exprimieren. Hierzu wurde eine immunhistologische Färbung gegen das Oberflächenantigen SSEA-4 durchgeführt. Die immunhistologische Färbung zeigte das erwartete Muster des Oberflächenantigens SSEA-4 (Abb. 29) und untermauerte so die morphologische Auswertung. Die während der Differenzierung durchgeführte mRNA Analyse bestätigte darüber hinaus

den undifferenzierten Status durch Expression der Pluripotenzmarker Sox 2, Oct3/4 und Nanog (Abb.30).

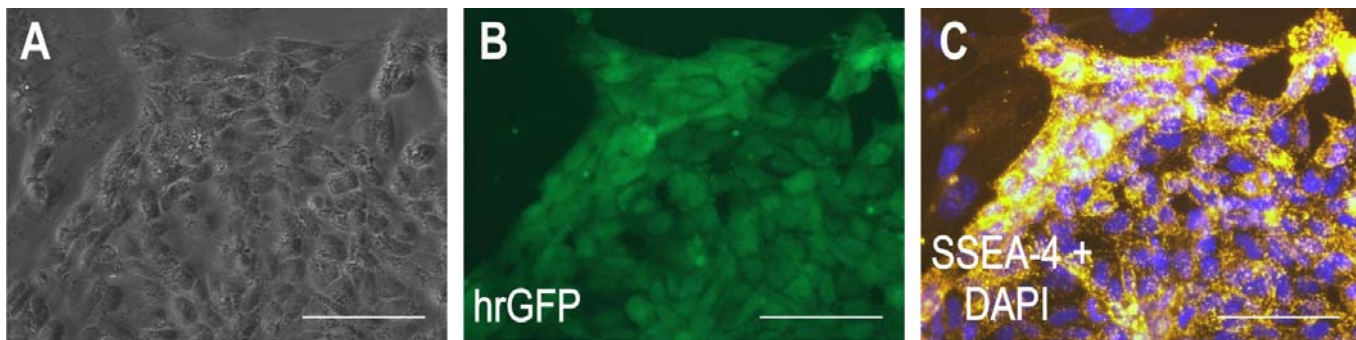


Abb. 29: Nachweis des Oberflächenantigens SSEA-4 (ein wichtiger Marker undifferenzierter RESCs) durch immunhistologische Analyse von transduzierten und angereicherten RESCs (Passage 65).

Immunhistologische Analyse von transduzierten und angereicherten RESCs (Passage 65) auf SSEA-4. B. hrGFP; C. SSEA-4; A. Korrespondierendes Phasenkontrastbild. Die Gegendarstellung der Zellkerne erfolgte durch die Anfärbung mit DAPI. Skalierung 100µm.

3.7.4. Kardiale Differenzierung der angereicherten GFP^{pos} Massenkultur (RESC EF1α hG W)

Neben der Expression von Pluripotenzmarkergenen sollte auch gezeigt werden, dass lentivirale Transduktion und der anschließende Anreicherungsprozess sich nicht negativ auf das Differenzierungspotential der pluripotenten RESCs ausgewirkt hatte. Im Hinblick auf den Hauptforschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe wurde deshalb eine kardiale Differenzierung der transduzierten und angereicherten GFP^{pos} RESCs nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten und bereits publizierten Protokoll durchgeführt.

Dabei wurde zum einen die GFP-Expression sowie die Morphologie der während des Differenzierungsvorganges entstehenden EBs im Zeitverlauf beobachtet, zum anderen wurden an Tag 0, Tag 2, Tag 4, Tag 7 und Tag 17 mRNA Analysen durchgeführt. Die kardial differenzierten Zellen wurden außerdem immunhistologisch gegen sarkomerisches α-Aktinin gefärbt.

Die kardiale Differenzierung verlief vergleichbar zu nicht transduzierten RESCs und führte auch zu einer sehr ähnlichen Ausbeute an kontrahierenden EBs. Die mRNA Analyse zeigte einen zu nicht transduzierten RESCs vergleichbaren Verlauf der Expression von verschiedenen Markern (Abb. 30; siehe für den Vergleich des Genexpressionsmusters nicht transduzierter RESCs Abbildung 2 aus Schwanke *et al.* 2006 [203]). In undifferenzierten RESCs konnte die Expression der Pluripotenzmarker, wie Sox 2, Nanog und Oct3/4 nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Differenzierung folgte die Entwicklung des frühen Mesendoderms, was durch die Expression von Brachyury und Gooseoid

gezeigt werden konnte. Das frühe Mesoderm entwickelte sich weiter zum kardialen Mesoderm, was durch die Expression von FOG 2, GATA 4, Nkx2.5, Tbx5 und Tbx20 zu erkennen war. Außerdem waren die Marker ANF, MLC2a und α MHC während der Differenzierung nachzuweisen, welche das Entstehen früher Kardiomyozyten anzeigen.

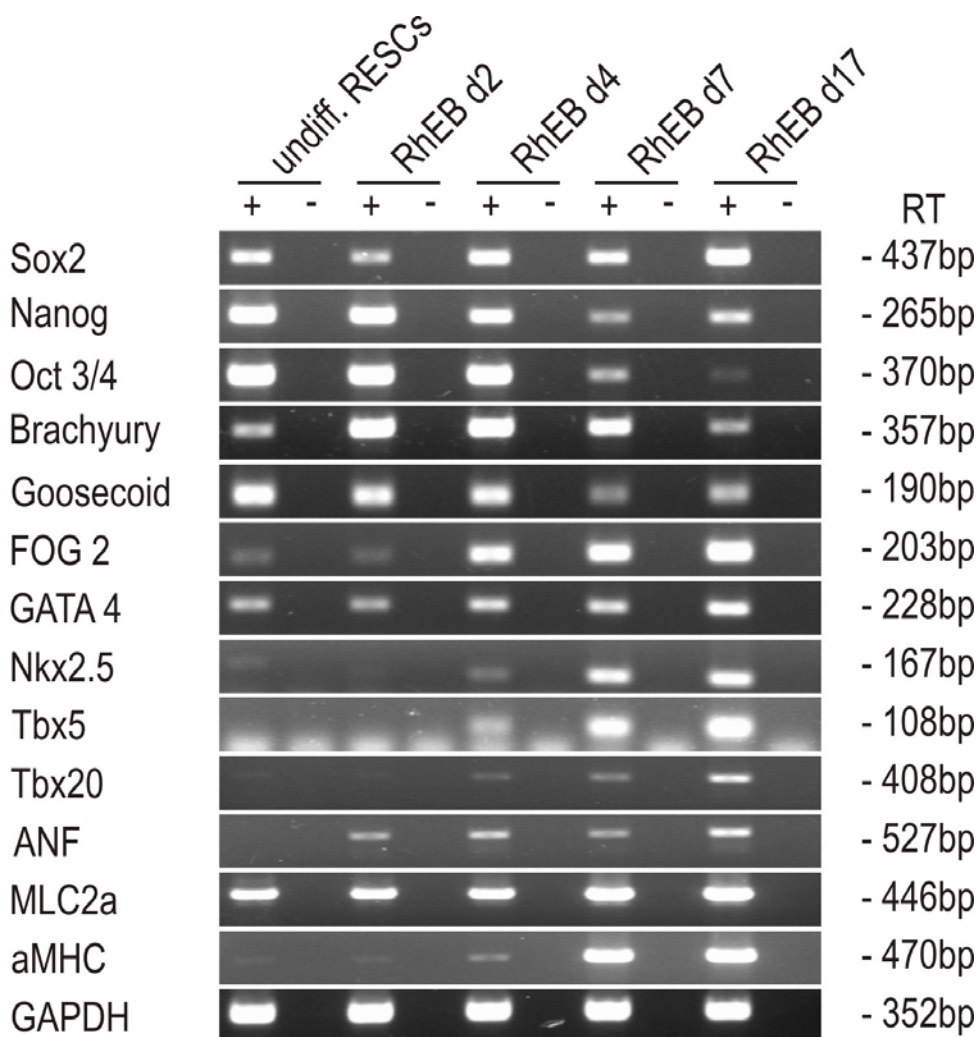


Abb. 30: Die transduzierten REsCs zeigten im Verlauf einer kardialen Differenzierung eine mit undifferenzierten REsCs vergleichbare mRNA Expression.

mRNA Analyse von transduzierten REsCs im Verlauf einer kardialen Differenzierung Darstellung von transduzierten und angereicherten REsCs im undifferenzierten Stadium und an Tag 2, 4, 7 und 17 der kardialen Differenzierung. Die REsCs befanden sich in Passage 59 an Tag 0 der Differenzierung. Diese mRNA Analyse wurde freundlicherweise von Frau Jennifer Beier durchgeführt.

Sox 2, Nanog, Oct3/4 repräsentieren Marker für undifferenzierte ESCs; Brachyury und Goosecoid repräsentieren Marker für frühes Mesoderm; FOG 2, GATA 4, Nkx2.5, Tbx5 und Tbx20 repräsentieren Marker für die Differenzierung zu kardialem Mesoderm; ANF, MLC2a und α MHC repräsentieren Marker für frühe Kardiomyozyten.

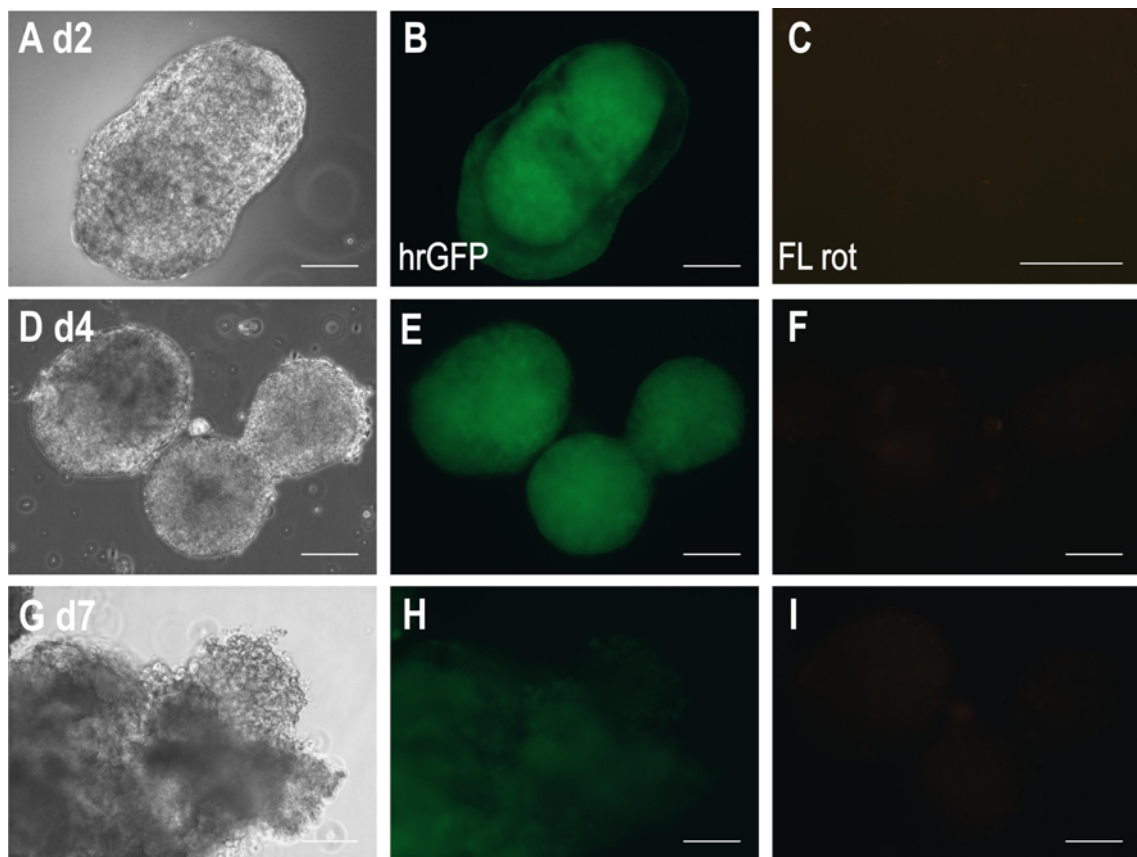


Abb. 31: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von transduzierten und angereicherten RESCs im Verlauf einer kardialen Differenzierung.

Darstellung von transduzierten und angereicherten RESCs an Tag 2, 4 und 7 der kardialen Differenzierung. Die RESCs zeigen Bilder, der für Abbildung 20 verwendeten RESCs. Die RESCs befanden sich an Tag 0 der Differenzierung in Passage 59. Die RESCs sind transduziert mit pSh S E hG W in Passage 41.

B., E., G. hrGFP (grün); C., F., H. Fluoreszenz im roten Bereich; A., D., F., I. Korrespondierende Phasenkontrastbilder. Skalierung 100 μ m.

Die Transgenexpression vermittelt durch den EF1 α Promotor blieb während der ersten Zeit der kardialen Differenzierung ähnlich zu der in undifferenzierten RESCs beobachteten GFP Expression. Nach dem Ausplattieren der EBs konnte jedoch eine inhomogene GFP-Expression beobachtet werden (Abb. 32).

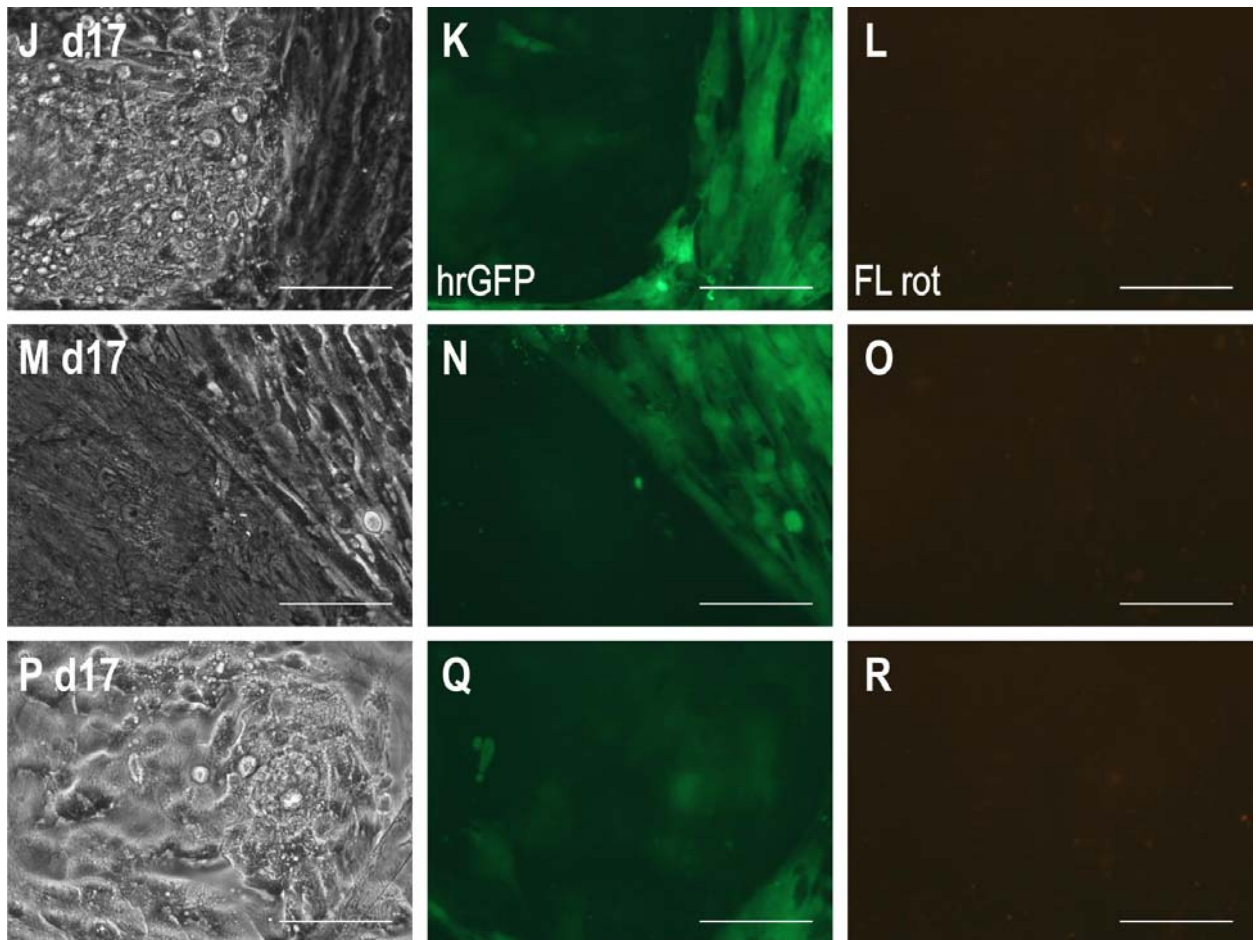


Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von transduzierten und angereicherten RESCs an Tag 17 einer kardialen Differenzierung.

Darstellung von transduzierten und angereicherten RESCs an Tag 17 der kardialen Differenzierung. Die RESCs befanden sich an Tag 0 der Differenzierung in Passage 59. Die RESCs sind transduziert mit pSh S E hG W in Passage 41. K., N., Q. hrGFP (grün); L., O., R. Fluoreszenz im roten Bereich; J., M., P. Korrespondierende Phasenkontrastbilder. Skalierung 100 μm .

Die kardial differenzierten Zellen wurden mit einem Antikörper gegen das sarkomerische- α -Aktinin gefärbt. Wie auch schon bei den mESCs zu beobachten war, zeigten sich unterschiedliche stark Aktinin^{pos} Zelltypen, welche zum Teil schon quergestreifte Fibrillen aufwiesen, z.T. aber auch nicht. Vermutlich stellen diese Zelltypen verschiedene Reifestadien von Kardiomyozyten dar. Zellen mit noch unorganisierten Aktinfasern waren eher rundlicher und flächiger als die weiter entwickelten embryonalen Kardiomyozyten, bei denen die typische Querstreifung sichtbar war (Abb. 33.) [203]. Im Unterschied zu den mESCs wurde ein höherer Anteil dieser möglicherweise frühere Stadien darstellenden Zelltypen beobachtet, was sich vermutlich auf die unterschiedlich lange Embryonalentwicklung der beiden Spezies zurückführen lässt. Für eine genauere Charakterisierung wären auch hier weitere Untersuchungen nötig gewesen, die aber aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden konnten.

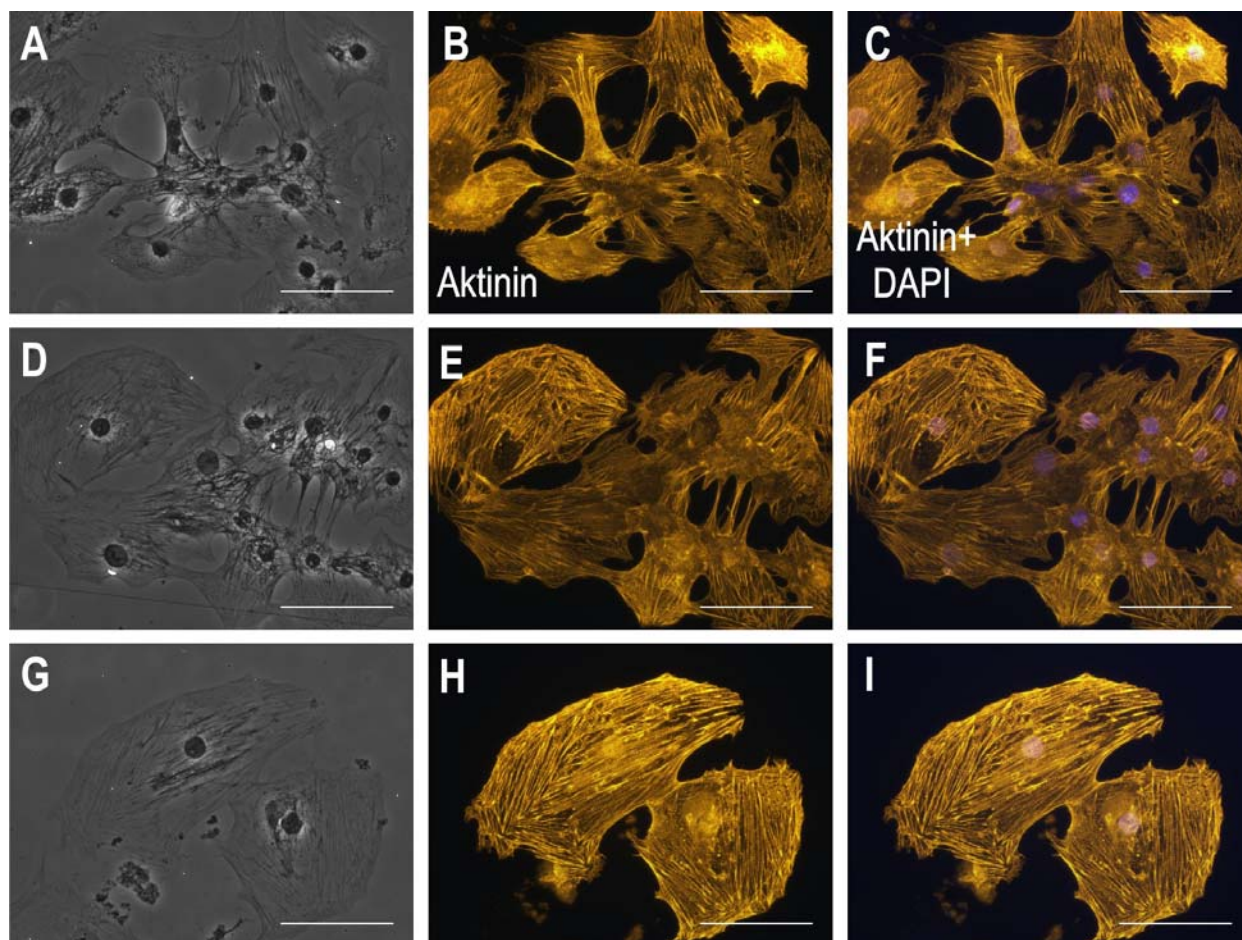


Abb. 33: Nachweis von sarkomericem α Aktinin (unter anderem ein Marker für Kardiomyozyten) durch immunhistologische Analyse von transduzierten und kardial differenzierten RESCs.

Darstellung kardial differenzierter und transduzierter RESCs am Tag 21 (d21). Die entstandenen kardial differenzierten Zellen stammen aus der Differenzierung, der für Abbildung 20 und 21 verwendeten Zellen. Die RESCs befanden sich an Tag 0 der Differenzierung in Passage 59.

B., C., E., H. I., F. sarkomerisches- α -Aktinin (rot); A., D., G. Korrespondierende Phasenkontrastbilder. Die Färbung der Zellkernung erfolgte durch DAPI. Skalierung 100 μ m.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung HIV-1-abgeleiteter lentiviraler Vektoren für die zelltypspezifische Transgenexpression

4.1.1. Lentivirale Vektoren zur kardiomyozytenspezifischen Transgenexpression

Die derzeit verfügbaren Protokolle zur Differenzierung von Herzmuskelzellen aus embryonalen Stammzellen sind leider nicht effizient bzw. spezifisch genug um hochangereicherte Kardiomyozytenpopulationen herstellen zu können. Aufgrund fehlender spezifischer Oberflächenmarker ist eine Aufreinigung von aus Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten bzw. Kardiomyozytensubtypen über *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) nicht möglich [11]. Aus diesem Grunde wurden in früheren Arbeiten Transgene in ES-Zellklone eingeführt, die eine Expression von Reportergenen unter Kontrolle zelltyp- bzw. subtypenspezifischen Promotoren ermöglichten. Neben den allgemeinen für Kardiomyozyten bzw. Kardiomyozytenvorläuferzellen spezifischen Promotoren, wie dem α -Aktinin Promotor [213] oder dem Nkx2.5 Promotor [214], wurden auch subtypenspezifische Promotoren verwendet [6, 35, 46, 215-217].

In der vorliegenden Dissertation wurden für eine herzspezifische Transgenexpression die Promotoren für den humanen natriuretischen Faktor (hANF) und der humane Promotor für die leichte Kette des Myosins (myosin light chain; MLC2v) verwendet. Der MLC2v Promotor stellt einen der bestcharakterisierten Promotoren für eine herzspezifische Transgenexpression dar [130, 218, 219]. Der hANF Promotor wurde bisher nur in nicht-viralen Konstrukten verwendet [130, 220], verspricht aber auch ein geeigneter Promotor für eine auf atriale Kardiomyozyten begrenzte Expression zu sein.

Die o.g. Promotoren wurden mit der Absicht ausgewählt, eine jeweils auf atriale bzw. ventrikuläre Kardiomyozyten beschränkte Transgenexpression zu erzielen und damit die Aufreinigung von atrialen bzw. ventrikulären Kardiomyozyten zu erlauben. Die Verfügbarkeit solcher Zellen in aufgereinigter Form ermöglicht zum einen eine detaillierte molekulare Charakterisierung, zum anderen sind entsprechende Zellpräparationen Grundvoraussetzung für die Entwicklung und Realisierung zellbasierter regenerativer Therapien im Bereich des Myokards [6, 215].

Für murine embryonale Stammzellen (mESCs) ist bereits gezeigt worden, dass sich im Laufe der Differenzierung verschiedene Stadien von Kardiomyozyten entwickeln, aber auch verschiedene Subtypen wie Sinusknoten-, Atrium- und Ventrikel- ähnliche Kardiomyozyten nebeneinander

vorkommen [10, 41, 221-223]. Die Expression von kardiomyozytenspezifischen Genen sowie das Vorkommen bestimmter Proteine während der Differenzierung *in vitro* verläuft in vieler Hinsicht vergleichbar mit der Herzentwicklung *in vivo* [10, 41, 224-226]. Vermutlich wird die Determination auf bestimmte Kardiomyozytensubtypen schon früh eingeleitet, obwohl in Analogie zur Embryonalentwicklung terminal differenzierte Kardiomyozytensubtypen erst in einem relativ späten Stadium der Differenzierung nachweisbar sind [214].

Auch für humane embryonale Stammzellen (hESCs) konnten im Verlauf einer Differenzierung verschiedene Subtypen von Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Dazu zählen embryonale Sinusknoten-, embryonale Atrium- und embryonale Ventrikel- ähnliche Kardiomyozyten [46, 227]. Anders als bei den mESCs konnten im Verlauf einer Differenzierung von hESCs nur den embryonalen Kardiomyozyten ähnliche Subtypen identifiziert werden, also nicht die den adulten Subtypen ähnlichen Kardiomyozyten, wie bei den mESCs [6, 214, 224]. Dies wird vermutlich auf die unterschiedlich lange Embryonalentwicklung der unterschiedlichen Spezies zurückzuführen sein. Obwohl zurzeit völlig unklar ist, welche Entwicklungsstufen für therapeutische Applikationen überhaupt anzustreben sind, sollte es jedoch möglich sein, unter Verwendung geeigneter und wesentlich längerer Differenzierungsprotokolle auch eine Reifung humaner ESC-abgeleiteter Kardiomyozyten zu adulten Phänotypen zu erzielen [228]. Alle Veröffentlichungen zeigten, dass die verschiedenen Subtypen gleichzeitig in einem *embryoid body* (EB) vorkommen können.

Der MLC2v Promotor wird, anders als der ANF-Promotor, auch während der Herzentwicklung nur in ventrikulären Zellen exprimiert [229] und eignet sich daher besonders für die Aufreinigung von ventrikulären Kardiomyozyten [136]. Dieser Promotor konnte auch schon erfolgreich zur Herstellung transgener Mäuse verwendet werden [217] sowie für die Markierung von Ventrikel ähnlichen Kardiomyozyten in EBs [35]. Müller *et al.* konnte mithilfe des MLC2v Promotors der Ratte in Kombination mit dem CMV Enhancer morphologisch, histologisch, immunhistologisch und elektrophysiologisch ventrikelähnliche Kardiomyozyten aus differenzierten mESCs aufreinigen. Huber *et al.* konnte durch den Einsatz eines lentiviralen Vektors, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des humanen MLC2v Promotors trägt, kardiale Zelltypen aus differenzierten hESCs aufreinigen [216].

Gassanov *et al.* zeigte, dass der humane ANF-Promotor zu einer Aufreinigung von schrittmacher- und atriumähnlichen Kardiomyozyten führt [215]. Obwohl ANF in den frühen Phasen der Herzentwicklung auch in ventrikulären Zellen exprimiert wird [136, 230], konnten anhand der Beurteilung der Aktionspotentiale keine ventrikulären Zellen innerhalb der durch den Vektor aufgereinigten Kardiomyozyten festgestellt werden [215].

Im Vorfeld dieser Dissertation hatten Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Martin jedoch feststellen müssen, dass beide Promotoren alleine zu schwach sind, um in lentiviralen Vektoren unabhängig von benachbarten Enhancersequenzen eine ausreichend hohe Transgenexpression zu erzielen. Die oben diskutierten Arbeiten hatten zwar klar gezeigt, dass die beiden ausgewählten Promotoren grundsätzlich in der Lage sind, eine zelltypspezifische Transgenexpression zu vermitteln, allerdings waren bei den bisherigen Arbeiten jeweils ES-Zellklone bzw. transgene Mausklone selektiert worden, bei denen das genomische Umfeld des Transgenintegrationsortes für eine hohe und dabei noch zelltypspezifische Expression sorgt. Um eine ausreichend hohe, zelltypspezifische und von der Integrationsstelle eines lentiviralen Vektors weitgehend unabhängige Expression zu erzielen, mussten bei der Vektorentwicklung zusätzliche Strategien in Betracht gezogen werden.

Eine Möglichkeit der verstärkten Transgenexpression wurde von Nettelbeck *et al.* beschrieben [145]. In dieser Veröffentlichung nutzten die Autoren einen chimären Transkriptionsfaktor, um die transkriptionelle Aktivität des endothelzell-spezifischen bzw. gastrointestinal- spezifischen Promotor in nicht viralen Vektoren zu verbessern [145]. De Palma *et al.* brachten zusätzliche gewebespezifische Enhancer in ihre Konstrukte, um die Transgenexpression zu verstärken [231].

Im Zusammenhang mit der Selektion von ventrikulären Kardiomyozyten aus differenzierten mESCs mithilfe eines nichtviralen Vektors beschrieb Müller *et al.*, dass durch die Kombination des MLC2v Promotors mit dem CMV Enhancer eine entscheidende Verbesserung der Transgenexpression erzielt werden könnte [6]. Auch in anderen Veröffentlichungen wurden verschiedene zelltypspezifische Promotoren ohne den Verlust an Spezifität mit dem CMV Enhancer kombiniert [151, 152, 232], allerdings bisher nicht im viralen Kontext. Um dieses Konzept auch im lentiviralen Kontext zu testen, wurde das Enhancerelement des Cytomegalievirus außerhalb der „*Multiple Cloning Site*“ in die eigenen lentiviralen Vektoren eingefügt und mit verschiedenen Expressionskassetten kombiniert.

Um dabei die Expressionshöhe und –spezifität beurteilen zu können, bzw. um die generierten Vektoren auch für die fluoreszenzmikroskopische und durchflusszytometrische Analyse differenzierter Stammzellen nutzen zu können, wurden dabei unterschiedliche Promotoren mit fluoreszierenden Reportergenen kombiniert. Üblicherweise wird für entsprechende Studien das Fluorophor eGFP oder modifizierte Varianten verwendet. Für das sehr häufig verwendete eGFP war in jüngerer Zeit allerdings von einigen negativen Auswirkungen berichtet worden. So scheint die Überexpression diese Transgens Auswirkungen auf die Genexpression und die Kontraktilität von Herzmuskelzellen zu haben [233, 234]. Navarro-Galve *et al.* zeigte, dass keine Langzeitexpression des eGFP in humanen neuronalen Stammzellen erreicht werden konnte [235]. Im Gegensatz dazu war dies jedoch mit einem anderen

grünen Fluorophor, dem humanisierten, aus *Renilla reniformis* isolierten hrGFP, möglich. Die Expression des hrGFPs hatte zudem keinen Einfluss auf das Differenzierungspotential der Zellen [235]. Gleiches wurde auch durch Duisit *et al.* gezeigt. Hier musste aufgrund von zytotoxischen Effekten des verwendeten eGFPs für eine Langzeitexpression auf einem hohen Level im pigmentierten Epithel der Retina der Ratte das eGFP gegen das hrGFP für diese Langzeitversuche ausgetauscht werden [236]. Vallier *et al.* testete unter anderem verschiedene GFP Varianten in embryonalen Stammzellen. Es stellte sich heraus, dass das hrGFP welches die höchste Fluoreszenzintensität besaß, am wenigsten zytotoxisch war, *gene silencing* nur in geringem Maße zu beobachten war und das hrGFP gegenüber Paraformaldehyd, welches zur Fixierung vor der immunhistologischen Analyse verwendet wurde, unempfindlich war [237]. Bei *Microarray* Versuchen der Firma Stratagene konnte festgestellt werden, dass die Expression des eGFP bei über 3000 von 10800 untersuchten Genen zu einer Veränderung der Genexpressionshöhen innerhalb von HeLa Zellen führt [238]. Die Veränderungen, die durch das hrGFP verursacht wurden, lagen mit einigen hundert betroffenen Genen unter denen des eGFPs [238]. Aufgrund dieser Veröffentlichungen wurde für die Herstellung der lentiviralen Vektoren innerhalb dieser Dissertation anstatt eGFP das anscheinend weniger expressionsmodifizierende bzw. toxische hrGFP verwendet.

Wie schon oben kurz angedeutet, wurden, um systematisch den Einfluss des CMV Enhancers auf die ANF- und MLC2v-Promoter- vermittelte Transgenexpression zu untersuchen, Expressionskassetten mit dem hANF-, dem MLC2v- und dem murinen Phosphoglyceratkinase Promotor (mPGK) jeweils in 2 Vektorplasmide kloniert, welche bis auf die Insertion des verwendeten CMV-Enhancer-Elementes identisch waren. Im Hinblick auf die Tatsache, dass die Menge an Vektor RNA, die für die Verpackung der lentiviralen Vektoren in den Virus produzierenden Zellen einen maßgeblich limitierenden Schritt darstellt [80], wurde unter Verwendung der resultierenden Vektoren zuerst der Einfluss des CMV Enhancers auf die Höhe der erzielten Titer der lentiviralen Vektoren überprüft. Es erschien durchaus denkbar, dass die Integration des CMV-Enhancers zu einer verstärkten Transkription der proviralen RNA und damit möglicherweise zu erhöhten Titern führen könnte. Allerdings ist andererseits auch ein negativer Effekt auf die resultierenden Titer durch die Insertion eines zusätzlichen Sequenzelementes nicht ungewöhnlich. Beim direkten Vergleich der resultierenden infektiösen Titer konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen entsprechenden Vektoren mit und ohne CMV-Enhancer festgestellt werden (Abb. 10). Obwohl die Expression von proviraler RNA innerhalb der Verpackungszelllinie nicht auf einer quantitativen Ebene verglichen wurde, scheint der CMV Enhancer die LTR-vermittelte

Transkription des proviralen Plasmides nicht zu beeinflussen. Ob dieses Ergebnis darauf beruht, dass das verwendete CMV-Enhancerelement enhanceruntypisch nur auf *downstream* gelegenen Bereiche wirkt, oder ob die in der LTR gelegenen viralen Promotorsequenzen nicht durch den CMV-Enhancer beeinflussbar sind, wurde nicht weiter untersucht. Die Möglichkeit, dass der fehlende Einfluss des CMV-Enhancers auf den Vektortiter in einer grundsätzlichen fehlenden Aktivität der inserierten Enhancersequenz begründet liegt, konnte in Kombination mit den ubiquitären mPGK Promotor ausgeschlossen werden: Eine gesteigerte Expression des Transgens konnte für eine ganze Reihe von Zelltypen beobachtet werden.

Für die Untersuchung der zelltypspezifischen Transgenexpression des hANF Promotors wurden verschiedene Kontrollzellen mit lentiviralen Vektoren, die eine Expressionskassette unter Kontrolle des hANF Promotors mit und ohne den CMV Enhancer (pSh H hANF hG W bzw. pSh H Ce hANF hG W) enthielten, transduziert. Für den hANF-Promoter konnte neben Präparationen primärer neonataler Rattenkardiomyozyten, welche den Nachteil haben, dass sie neben unterschiedlichen, nicht genau definierten Kardiomyozytensubpopulationen auch kontaminierende Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen enthalten, auch die atriale Zelllinie HL-1 als Positivkontrolle verwendet werden [183].

Da leider keine ventrikuläre Kardiomyozytenzelllinie existiert wurde getestet, ob trotz anders lautender Berichte auch HL-1-Zellen MLC2v exprimieren, sodass diese Zelllinie evtl. auch als Positivkontrolle für die Vektoren mit MLC2v-Promoter (pSh H MLC2v hG W bzw. pSh H Ce MLC2v hG W) verwendet werden könnte. Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte tatsächlich eine endogene MLC2v Expression in den HL-1 Zellen nachgewiesen werden. Deren Transduktion mit lentiviralen Vektoren, die eine Expressionskassette unter Kontrolle des MLC2v-Promotors enthielten, führte jedoch weder mit (pSh H Ce MLC2v hG W) noch ohne den CMV Enhancer (pSh H MLC2v hG W) zu einer detektierbaren Transgenexpression. Die Tatsache, dass im Gegensatz dazu die Transduktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem pSh H Ce hG W zu einer deutlich sichtbaren GFP-Expression führte lässt den Schluss zu, dass die in HL-1-Zellen über RT-PCR nachgewiesene endogene MLC2v-Expression relativ schwach ist, und dass die Aktivierung des MLC2v-Promotors in HL-1-Zellen nicht für eine sichtbare GFP-Expression ausreicht.

Zusammenfassend kann betont werden, dass die kardialen zelltypspezifischen Promotoren mit dem CMV Enhancer in den ausgewählten Positivkontrollzellen zu einer effizienten GFP-Expression führten. Die Transduktion führte zu einer nahezu ausschließlich auf Kardiomyozyten beschränkten, kardialen GFP Expression (Abb. 13 und Abb. 14). Ob die hergestellten Vektoren auch die erhoffte Spezifität für

atriale bzw. ventrikuläre Kardiomyozyten zeigen, konnte im Rahmen der Dissertation nicht mehr geklärt werden. Die Tatsache, dass der den MLC2v-Promoter enthaltende Vektor keine GFP-Expression in HL-1-Zellen hervorruft, deutet allerdings darauf hin, dass zumindest dieses Konstrukt die erhoffte Spezifität für ventrikuläre Zellen zeigt. Eine geringe GFP-Expression konnte für den lentiviralen Vektor, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des hANF Promotors mit dem CMV Enhancer (pISh H Ce hANF hG W) enthielt, in isolierten humanen vaskulären Fibroblasten und den die neonatalen Rattenkardiomyozyten kontaminierenden Nicht-Kardiomyozyten (vermutlich ebenfalls Fibroblasten) festgestellt werden. Da diese unspezifische Expression deutlich schwächer war, als die spezifische Expression in Kardiomyozyten, sollte diese tolerierbar sein und der geplanten Verwendung der Vektoren nicht im Wege stehen. Diese unspezifische GFP-Expression war stark abhängig von der verwendeten MOI. Vermutlich steigt mit erhöhter MOI die Wahrscheinlichkeit, dass Vektoren in genomische Loci integrieren, an denen umliegende Regulatorsequenzen für eine weniger spezifische Transgenexpression sorgen.

4.1.2. Lentivirale Vektoren zur Typ II Pneumozyten-spezifischen Transgenexpression

Neben der gut untersuchten Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten konnte unter anderem auch in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden (Winkler/Mauritz et al. „Serum-free differentiation of murine embryonic stem cells into alveolar type II epithelial cells“ Cloning and Stem Cells, in press), dass embryonale Stammzellen zu Typ II Alveolarepithelzellen (AT2 Zellen oder Typ II Pneumozyten) differenziert werden können. Leider ist gerade in diesem Fall die Ausbeute an Zielzellen noch sehr gering, sodass geeignete Aufreinigungsmethoden für eine detailliertere Charakterisierung von AT2-Zellen essenziell ist.

Für die geplante durchflusszytometrische Aufreinigung von AT2-Zellen wurden lentivirale Konstrukte abgeleitet vom HIV-1, die eine Expressionskassette unter Kontrolle des Surfactant Protein C Promotors (SP-C) beinhalten (pISh H SpC-hG W und pISh H SpC hG W) hergestellt. Für die Austestung der Zelltypspezifität mussten zuvor geeignete Zielzellen identifiziert werden, da primäre AT2 Zellen nach der Transduktion ihre typischen Eigenschaften meist sehr schnell verlieren. Um einen geeigneten Ersatz zu finden, wurden die Zelllinien MLE-12, ML-15, M3E3/C3, RLE-6TN und A549 auf AT2 ähnliche Eigenschaften hin untersucht. Im Gegensatz zu verschiedenen Veröffentlichungen [193-197], allerdings im Einklang mit anderen Veröffentlichungen [239-243], konnte für die Zelllinien M3E3/C3, RLE-6TN und A549 keine Ähnlichkeit mit AT2 Zellen nachgewiesen werden. Für die Austestung der lentiviralen Konstrukte mit dem SpC Promotor war es essenziell, dass die Zellen SpC exprimieren. Im Einklang mit

früheren Beobachtungen wurde diese Eigenschaft nur in MLE-12 und MLE-15 Zellen nachgewiesen [184], die im weiteren Verlauf als Positivkontrolle für die Vektorcharakterisierung dienten.

Für die Austestung der lentiviralen Vektoren zur AT2-spezifischen Transgenexpression wurden aufgrund der Ergebnisse der erfolgten Zellcharakterisierung MLE-12-Zellen und MLE-15 Zellen als Positivkontrolle sowie A549 Zellen, humane Fibroblasten, humane glatte Muskelzellen (SMCs) und humane Endothelzellen, die aus der Nabelschnurvene isoliert wurden (HUVECs) als Negativkontrollen transduziert.

Obwohl im Gegensatz zum vollen 3,7 kb langen SpC Promotor [202] für das verwendete 2,0 kb Promoterfragment bisher keine Expression im bronchialem Epithel nachgewiesen worden war, wurden als weitere Negativkontrolle bronchiale H441 Zellen eingesetzt. Diese Zellen sind morphologisch den Clara-Zellen sehr ähnlich [244] und exprimieren kein SpC (Abb. 15) [239].

Die Transduktion der Kontroll- sowie Zielzellen mit dem lentiviralen Vektor, der eine Expressionskassette mit dem SP-C Promotor enthielt (pISh H SP-C hG W), führte zu einer AT2 spezifischen GFP Expression, die nur in den MLE-12 und MLE-15 Zellen beobachtet werden konnte. Allerdings war die beobachtete GFP-Expression sehr niedrig und die Anzahl GFP^{pos} Zellen sehr gering (Abb. 17). Da niedrige Transduktionseffizienzen als Grund für dieses Ergebnis ausgeschlossen werden konnten, ist die wahrscheinlichste Erklärung, dass ausschließlich in Zellklonen, in denen dem Integrationsort benachbarte Enhancerelemente die Transgenexpression unterstützen, eine sichtbare GFP-Expression auszumachen war. Um unabhängig vom Integrationsort eine Verstärkung der GFP-Expression zu erreichen, wurde, wie auch schon bei den kardialen Konstrukten erwähnt, der CMV Enhancer in den lentiviralen Vektor eingebracht.

Die Transduktion von MLE-15 Zellen mit dem lentiviralen Vektor, der eine Expressionskassette unter Kontrolle des SP-C Promotors in Kombination mit dem CMV Enhancer enthält (pISh S Ce SpC hG W), führte mit einer MOI von 5 zu nicht mehr als 15% GFP^{pos} Zellen, obwohl durch die Real Time PCR $2,1 \pm 0,5$ Vektorkopien pro Zelle nachgewiesen werden konnten. Dies kann zumindest teilweise durch Integrationsorte erklärt werden, an denen starke Repressorelemente die GFP-Expression negativ beeinflussen. Weiterhin könnte die heterogene endogene SpC Expression in MLE-15 Zellen, die über immunhistologische Färbung (Abb. 16) nachgewiesen werden konnte, für dieses Ergebnis verantwortlich sein, obwohl die SP-C-Promotor-vermittelte Transgenexpression nicht notwendigerweise mit SP-C-Proteinexpression sondern eher mit der endogenen SPC-mRNA-Expression korrelieren müsste.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnten lentivirale Vektoren, die ein hohes Level an Transgenexpression ausschließlich in AT2 Zellen vermitteln, hergestellt werden. Anhand der Ergebnisse lässt sich hervorheben, dass die Transgenexpression sich mit der endogenen SP-C Expression deckt. Die Vektoren sollten eine stabile AT2 Zellen spezifische Transgenexpression in AT2 Zelllinien und in primären AT2 Zellen erlauben. Transduktionen von somatischen oder embryonalen Stammzellen sollte die Detektion von Zellklonen, die in Typ II Alveolar Epithelzellen differenzieren erleichtern. Des Weiteren stellt die lentivirale AT2 spezifische Transgenexpression ein ausgesprochen nützliches Hilfsmittel für weitere Untersuchungen zu Funktion und Regeneration des alveolären Epithels dar.

4.2. Gentransfer in embryonale Stammzellen

Um die entwickelten zelltypspezifischen lentiviralen Vektoren in embryonalen Stammzellen anwenden zu können, war als Grundvoraussetzung die Etablierung geeigneter Transduktionsprotokolle notwendig. Ein Ziel der vorliegenden Dissertation war es deshalb, ein Transduktionsprotokoll für mESCs, insbesondere aber auch für die in der Arbeitsgruppe verwendeten embryonalen Stammzellen des Rhesusaffen (RESCs) zu etablieren.

Veröffentlichungen hatten gezeigt, dass HIV-1-basierte Vektoren für die Anwendung auf Rhesusaffen-Zellen nicht oder nur sehr schlecht geeignet sind [182, 245, 246]. Es wurde gezeigt, dass ein speziesspezifischer Faktor, das TRIM5 α , in Rhesusaffen nach Eintritt des HIV-1-Virus zu einem intrazellulären Block der reversen Transkription führt [121, 247-249] und das *gag* Protein degradiert [121, 250]. Außerdem wurde ein weiterer Faktor beschrieben, das Apolipoprotein B mRNA-*editing enzyme catalytic polypeptide-like* (APOBEC3G) 3 Protein, welches im Falle von APOBEC3G des Affen die viralen Sequenzen des HIV-1 hypermutiert bzw. degradiert [121].

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Zelltypen des Rhesusaffen, wie z. B. hämatopoetische Stammzellen, primäre Lungenfibroblasten sowie die Zelllinien LLC-MK2 und FRhK4, die aus der Niere des Rhesusaffen isoliert wurden, nur sehr schlecht durch HIV-1 abgeleitete lentivirale Vektoren transduziert werden können [182, 249, 251, 252].

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde in initialen Experimenten versucht, RESCs mit HIV-1 abgeleiteten Vektoren zu transduzieren. Die Transduktionen führten zu keiner detektierbaren Transgenexpression. Für diese Versuche wurden lentivirale Vektoren, die eine Expressionskassette unter Kontrolle des ubiquitären Promotors mPGK enthielten, verwendet. Da dieser Promoter, wie wir zu

einem späteren Zeitpunkt feststellen mussten, in RESCs nur eine sehr schwache Transgenexpression vermittelt, könnten die negativen Ergebnisse auch auf einer fehlenden bzw. schwachen Transgenexpression beruhen. Die Detektion schwach exprimierter Transgene, in diesem Fall des verwendeten hrGFP, könnte darüber hinaus auch durch das zu diesem Zeitpunkt noch verwendete Fluoreszenzmikroskop älteren Baujahrs, welches eine relativ schlechte Sensitivität aufwies, erschwert worden sein. Zudem war zum derzeitigen Stand noch keinerlei Optimierungsarbeit in Bezug auf das Transduktionsprotokoll und die Problematik der schnellen Differenzierung der RESCs nach der Transduktion erfolgt. Obwohl die eigenen Ergebnisse deshalb keine definitiven Schlüsse zuließen, wurde aufgrund der erwähnten Veröffentlichungen für die Etablierung von Transduktionsprotokollen für ESCs ein lentivirales Vektorsystem, welches auf einer aus Makaken isolierten Variante des Affenimmundefizienzvirus (SIV_{mac}) basiert, verwendet.

Im Gegensatz zu HIV-1, dessen reverse Transkription durch das TRIM5α des Rhesusaffen und der grünen Meerkatze blockiert wird [249], werden SIV_{mac} abgeleitete Vektoren nicht durch das TRIM5α des Menschen, des Rhesusaffen oder der grünen Meerkatze (*Ceropithecus aethiops pygerythrus*) reprimiert [249]. Owens *et al.* zeigte darüber hinaus, dass HIV-1 aufgrund seiner Capsid Proteine Rhesusaffenzellen nicht oder nur sehr schlecht transduziert, dass aber SIV_{mac} Capsid Proteine zu keiner Repression der Transgenexpression in humanen und Rhesusaffenzellen führen [251].

SIV-basierte lentivirale Vektoren wurden ursprünglich aufgrund der mit HIV-1 verbundenen Sicherheitsbedenken entwickelt. Im Gegensatz zu HIV-1 ist das nahe verwandte „Simian Immunodeficiency Virus“ für Menschen nicht pathogen. Bisher wurden als Basis dieser Vektorsysteme verschiedene SI-Viren, wie z. B. die SI-Viren des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*, mac) [182, 253, 254], der afrikanischen grünen Meerkatze (agm) [255, 256] oder der grauen Schopfmangabe (Sooty mangabey monkey; smm) [257] verwendet. Mit diesen Vektoren konnten verschiedene Zelltypen wie das Pigmentepithel der Retina der Ratte [236], hämatopoetische Stammzellen der Maus [258] und nicht proliferierende terminal differenzierte humane dendritische Zellen [253] erfolgreich transduziert werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Transduktion von mESCs mit SIV abgeleiteten Vektoren möglich ist, beschrieben ist allerdings nur eine möglicherweise methodisch bedingte relativ geringe Transduktionseffizienz [255]. Prinzipiell sind SIV-basierte Vektoren nach dem gleichen Schema aufgebaut wie die klassischen sicherheitsoptimierten HIV-1-basierten Vektoren.

Der für die vorliegende Arbeit verwendete Transfervektor wurde durch Mangeot *et al.* etabliert und ist abgeleitet von einem aus Rhesus-Affen isolierten SIV-Klon SIV_{mac}251. Mangeot *et al.* konnte zeigen,

dass unter Verwendung dieser Vektoren, ausreichend hohe Titer zwischen $2,2 \times 10^7$ +/- 2×10^6 IU/ml bis $2,8 \times 10^7$ +/- $2,5 \times 10^6$ IU/ml erzielt [259], und Zellen, wie z. B. schwer zu transduzierende, terminal differenzierte humane dendritische Zellen *in vitro* [259], das Pigmentepithel der Retina der Ratte *in vivo* [236], erfolgreich transduziert werden können. Die Tatsache, dass SIV_{mac}251 in der Lage ist, effizient in Primatenzellen zu replizieren [182, 260, 261] ließ es als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass davon abgeleitete Vektoren auch in der Lage sind, effizient RESCs zu transduzieren.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde unter Verwendung der lentiviralen Ausgangsvektoren (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jean-Luc Darlix der Unité de Virologie Humaine Inserm ENS, Lyon, France), aber auch unter der Verwendung der durch das Übertragen des Shuttle Systems modifizierten lentiviralen Ausgangsvektoren, Endothelzellen des Rhesusaffen erfolgreich transduziert. Dies bestätigten zuvor veröffentlichte Berichte, dass das SIV_{mac}-System im Gegensatz zu HIV-1-basierten Vektoren neben humanen und murinen Zellen auch effizient Rhesusaffenzellen transduzieren kann. Daher wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin konsequenterweise das bis zu diesem Zeitpunkt verwendete HIV-1-basierte LentiShuttle-System komplett auf das SIV_{mac}-basierte Vektorsystem umgestellt. Die Übertragung des in HIV-1 abgeleiteten Vektoren etablierten Shuttle Systems auf SIV-basierten Vektors ermöglichte die Übertragung der schon zuvor für die HIV-Vektoren hergestellten Expressionskassetten in nur einem Klonierungsschritt. Nachdem gezeigt worden war, dass mit dem neuen System vergleichbare infektiöse Titer produziert werden konnten, wurden Transduktionsprotokolle für RESCs genauso wie für ES-Zellen der Maus basierend auf SIV_{mac}-Vektoren etabliert.

Erst jetzt wurden die für die Etablierung eines Transduktionsprotokolls in ESCs benötigten Vektoren hergestellt. Entscheidend neben der Wahl des Vektorsystems war außerdem auch die Auswahl geeigneter Promotoren.

Für die Expression von Transgenen in ESCs wurden in früheren Publikationen in der Hauptsache vier ubiquitäre Promotoren verwendet. Dazu zählen der Elongationsfaktor 1 α Promotor (EF1 α), der zusammen mit dem Enhancer des Cytomegalievirus verwendete beta Aktin Promotor des Hühnchens (CeCBA oder CBA), der Phosphoglyceratkinase Promotor (PGK) und der Cytomegalievirus Promotor (CMV).

Für den EF1 α Promotor war gezeigt worden, dass er in undifferenzierten mESCs [153, 155, 208, 262], hESCs [13, 14, 160, 210] zu einer sehr guten Transgenexpression führt. Außerdem konnte in mESCs und hESCs eine Langzeitexpression ohne eine Verminderung der Transgenexpression festgestellt werden [13, 14, 208]. Der EF1 α Promotor ist einer der am häufigsten in ESCs verwendeten ubiquitären

Promotoren. Die Verwendung des CeCBA Promotors, der neben dem EF1 α Promotor der in undifferenzierten ESCs am häufigsten verwendete ubiquitäre Promotor ist, führte in undifferenzierten mESCs [153, 155, 263] und hESCs [155, 160, 264] zu einer moderaten bis guten Transgenexpression. Auch eine Langzeitexpression eines Transgens ist mit diesem Promotor möglich [264]. Der PGK-Promotor wird neben dem vorher genannte EF1 α - oder dem CeCBA Promotor auch für die Transgenexpression in undifferenzierten ESCs verwendet und führte nach Berichten verschiedener Arbeitsgruppen in mESCs [155, 161] und hESCs [211] zu einer moderaten bis guten Transgenexpression. Über die Funktionalität des in dieser Arbeit für die Transduktion von ESCs nicht verwendeten CMV Promotors wird kontrovers diskutiert. Obwohl dies der stärkste bekannte Promoter ist und in sehr vielen Zellen zu einer starken Transgenexpression führt [156, 157], erscheint seine Eignung aufgrund der sehr geringen Expression für embryonale Stammzellen eher fraglich. Einige Veröffentlichungen zeigen eine gute Transgenexpression in undifferenzierten ESCs des Menschen [160, 211] oder des Javaneraffen [255]. Andere Veröffentlichungen berichten über gar keine bis hin zu einer moderaten Transgenexpression in hESCs [210, 262, 264] und mESCs [153, 155, 208, 262], die aber wesentlich niedriger liegt, als die meist parallel analysierte Transgenexpression von z. B. dem EF1 α Promotor [208, 210, 262, 265]. Auch die Möglichkeit eine stabile Transgenexpression mithilfe des CMV Promotors zu erzielen wird kontrovers diskutiert [14, 208, 255, 262, 264].

Über die Gründe der z.T. schwachen Transgenexpression in undifferenzierten Zellen wird bisher nur spekuliert. Es wäre möglich, dass die für die Funktionalität der Promotoren benötigten Transaktivatoren in den undifferenzierten ESCs fehlen, sodass z. B. die Transgenexpression durch den CMV Promotor durch das Fehlen solcher Faktoren verhindert wird [153]. Auch Repressorproteine undifferenzierter ESCs scheinen zumindest im Fall des CMV-Promotors eine Rolle zu spielen [148, 149, 158, 159]. Bei inserierten Transgenen einschließlich gammaretroviraler und lentiviraler Vektoren kommt es aufgrund einer oder verschiedener epigenetischer Faktoren zu einer Modifikation der viralen DNA nach der Integration [266-269], welche zu einem Verlust der Genexpression führen könnte. Außerdem scheinen lentivirale Vektoren bevorzugt in inaktive Regionen des Genoms von hESCs zu integrieren, was einen Einfluss auf die Transgenexpression haben könnte [265]. Eine stärker ausgeprägte promotorabhängige Suppression der Transgenexpression in hESCs im Vergleich zu mESCs könnte vielleicht für diese Annahme sprechen [265]. Zu berücksichtigen ist bei vielen der bisherigen Publikationen, dass entweder nur bestimmte Zellklone oder nur Transgen-exprimierende Zellen für die Beurteilung der Promoteraktivität in ESCs analysiert wurden. Zum einen führt eine solche Auswahl sicherlich zu keinem repräsentativen Ergebnis, zum anderen kann die Transgenexpression an bestimmten Expressionsorten

stark vom genomischen Umfeld geprägt sein, sodass sie kaum die Aktivität des im Transgen vorhandenen Promoters widerspiegelt.

Aufgrund der moderaten bis sehr guten Transgenexpression in ESCs wurden die drei häufig verwendeten Promotoren EF1 α , CeCBA und PGK zusammen mit dem hrGFP und dem WPRE in das SIV_{mac}-System kloniert.

4.2.1. Transduktion von mESCs

Im Verlauf der Promotion konnte angelehnt an verschiedene Veröffentlichungen [13, 14, 70] ein Transduktionsprotokoll für mESCs etabliert werden.

Erste initiale Versuche (Daten nicht gezeigt) deuteten darauf hin, dass unter Verwendung des EF1 α Promotors in mESCs die größte Anzahl an GFP^{pos} Zellen und auch die höchste Fluoreszenzintensität erzielt werden kann. Daher wurde für die Etablierung eines Transduktionsprotokolls für mESCs der EF1 α Promotor verwendet.

Im Rahmen der Etablierung wurden zwei verschiedene Möglichkeiten der Transduktion und zwei verschiedene chemische Zusätze ausgetestet. Im Falle der mESCs war es bereits möglich, diese über Trypsinierung zu vereinzeln, was zumindest theoretisch einen besseren Kontakt der Viren zu den einzelnen Zellen gewährleisten sollte. Daher wurde aufgrund der besseren Transduktionseffizienz die Transduktion in Suspension mit dem Transduktionszusatz Polybrene gewählt.

Nach der Transduktion war eine verstärkte Tendenz zur spontanen Differenzierung zu beobachten. Die Zellen durften für die zwei nach der Transduktion folgenden Splitvorgänge nur eine geringe Koloniegröße erreichen. Die transduzierten mESCs mussten ca. doppelt so oft, wie nicht transduzierte mESCs gesplittet werden. Nach dieser Phase waren die Zellen von ihrem Kultivierungsverhalten her mit nicht transduzierten mESCs zu vergleichen.

Außerdem wurden zwei verschiedene Transgene in den mESCs ausgetestet. Dies erwies sich als notwendig, da in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin, basierend auf einer mESC Linie, die bereits ein eGFP im Brachyury Locus und das lacZ Gen im ROSA26 Locus trägt (freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Fehling zur Verfügung gestellt) [270] triple-transgene ES-Zelllinien hergestellt werden sollten, bei denen ein zusätzliches Markergen unter Kontrolle kardialer und pulmonaler Promotoren exprimiert wird. Da in diesen Zellen im Verlauf der Differenzierung eine deutliche Brachyury-Promoter-abhängige GFP Expression sichtbar wird, war es notwendig für eine weitere Markierung, die die

Identifikation und Aufreinigung ESC-abgeleiteter Kardiomyozyten und Pneumozyten erlauben soll ein andersfarbiges Transgen zu verwenden.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich zum hrGFP eine optimierte DsRed-Variante, das RedStar [180], in diesen Zellen ausgetestet. Die Transduktion führte zu einer ausreichenden, wenn auch deutlich geringeren Fluoreszenzintensität in den mESCs (Abb. 22).

Im Verlauf der Promotion konnten drei mESC-Zellklone generiert werden. Die Klone entstanden unter der Verwendung der eGFP-Brachyury mESC-Linie [185] (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hans-Jörg Fehling). Als lentiviraler Vektor wurde das Konstrukt EF1 α RS W verwendet. Da die Transduktionseffizienz trotz einer verwendeten MOI von 25 bei unter 10% lag und im Gegensatz zu kardialen oder pulmonalen Promotoren in diesem Fall aufgrund der Expression in undifferenzierten ESCs RedStar^{pos} Klone direkt über Fluoreszenz identifizierbar waren, wurde die Einzelklonselektion mithilfe eines FACS durchgeführt.

Die in der Literatur beschriebenen Transduktionseffizienzen mit lentiviralen Vektoren liegen mit bis zu 99% z.T. deutlich über denen während der Arbeit erzielten Effizienzen. Im Fall der hier beschriebenen Versuche ist nicht genau zu sagen, ob nur ein relativ geringer Anteil von Zellen überhaupt infiziert worden war, oder ob Zellen trotz erfolgreicher Transduktion kein Transgen exprimieren. Aufgrund der existierenden Literatur ist eine Kombination von beidem zu erwarten. Für eine weitere Untersuchung dieser Fragestellung könnte man mithilfe einer *Real Time* PCR die durchschnittliche Zahl von Vektorkopien / Zelle bestimmen. Eine weitere Optimierung des Transduktionsprotokolls genauso wie ein direkter Vergleich unterschiedlicher Promotoren ist an diesem Punkt sicherlich notwendig, konnte im Rahmen der Promotion aus zeitlichen Gründen aber nicht weiter verfolgt werden.

Einer der über FACS selektierten Zellklone wurde auf die Expression von Pluripotenzmarkergenen und in Bezug auf dessen kardiales Differenzierungspotential untersucht. Dies war von Bedeutung, da zum einen durch die Integration des lentiviralen Partikels im Wirtsgenom Gene in ihrer Expression beeinflusst werden können, zum anderen aber auch, da sich während des Selektionsvorganges auch spontan mutierte Klone mit verändertem Phänotyp durchsetzen können.

Der untersuchte Zellklon konnte positiv auf den Oberflächenmarker SSEA-1 getestet werden (Abb. 24), was ein Indiz für den undifferenzierten Zustand der mESCs ist. An diesem Punkt wäre eine weitere Charakterisierung wichtig gewesen, da die Expression des SSEA-1 nur einen Anhaltspunkt für den undifferenzierten Zustand des Zellklons darstellt. Die Etablierung der mESC Zellklone konnte jedoch

erst zum Ende der Promotion abgeschlossen werden. Daher war eine genauere Charakterisierung aus zeitlichen Gründen nicht möglich.

Die kardiale Differenzierung des Einzelklons verlief vergleichbar den nicht transduzierten bzw. klonierten mESCs. Auch war die Bildung und Morphologie der EBs vergleichbar mit EBs von nicht transduzierten mESCs.

Obwohl das Transgen in dem analysierten Zellklon im undifferenzierten Zustand über mindestens mehrere Wochen stabil exprimiert wurde, zeigte sich im Verlauf der Differenzierung ein weitgehender Verlust der Transgenexpression. Dies korreliert mit Daten von Hong *et al.* [155]. Die Autoren konnten bei der Verwendung des EF1 α Promotors eine Abnahme der Transgenexpression während der Differenzierung von transduzierten mESCs in bestimmte Zelltypen beobachten. Andere Arbeiten demonstrierten, dass die Transgenexpression vermittelt durch den EF1 α Promotor im Laufe der neuronalen Differenzierung abnimmt [208, 271]. In für Tyrosin Hydroxylase (TH) -positiven Zellen (Neuronen) konnte schließlich keine Transgenexpression mehr beobachtet werden [208]. Andere Arbeitsgruppen berichteten allerdings von einer stabilen durch den EF1 α Promotor gesteuerten Expression auch während der Differenzierung. So konnte in Zellen, die positiv für mesodermale Marker, wie muskuläres Aktin und Desmin [14] sind oder auch für endodermale Marker wie α -Fetoprotein und Laminin [14], sowie auch in Nestin positiven Zellen und morphologisch reifen Neuronen und Astrozyten ähnlichen Zellen [14], Hämatopoetischen Zellen [13] und während der Thymopoese [209] eine Transgenexpression durch den EF1 α Promotor beobachtet werden. Zu berücksichtigen ist dabei allerdings, dass sich klassische Plasmid-basierte Transgene in Bezug auf potenzielles „Silencing“ möglicherweise anders verhalten als lentivirale Transgene.

Eine genauere Analyse des beobachteten weitgehenden Verlustes der EF1 α -Promoter-gesteuerten Transgenexpression während der Differenzierung ist in naher Zukunft geplant. Dabei soll die Abhängigkeit von bestimmten Differenzierungsrichtungen und resultierenden Zelltypen untersucht werden. Neben reinen *in vitro*-Analysen kann hier sicherlich auch die Analyse der Transgenexpression nach Transplantation undifferenzierter transgener Zellen in SCID-Mäuse in sich bildenden Teratomen weitere Aufschlüsse geben.

Der Erfolg der Differenzierung des eGFP-Brachyury/RedStar^{pos} Klons wurde basierend auf der im Zeitverlauf zu beobachtenden Entstehung spontan kontrahierender Areale, aber auch über

immunhistologische Färbung gegen sarkomerisches α -Aktinin (Abb. 25) beurteilt. Die beobachtete Effizienz der kardialen Differenzierung entsprach der von nicht transduzierten mESCs.

Auch an dieser Stelle wären detaillierte Charakterisierungen der Differenzierung und Untersuchungen zur Funktionalität der aus dem transgenen mESC-Klon differenzierten Kardiomyozyten interessant gewesen. Aufgrund ökonomischer Erwägungen, welche auf den langfristigen Zielen der Arbeitsgruppe beruhen, sowie im Hinblick auf die zeitlichen Limitationen der Promotion wurden jedoch innerhalb der Dissertation auf derartigen Untersuchungen verzichtet.

4.2.2. Transduktion von RESCs

Für die Etablierung eines Transduktionsprotokolls für RESC konnten die Erfahrungen im Umgang mit mESCs nur schwer übertragen werden. RESCs sind um ein Vielfaches problematischer zu kultivieren als mESCs, da sie auf Veränderungen bzw. Abweichungen vom etablierten Protokoll sehr empfindlich reagieren. RESCs konnten nicht wie mESCs in Einzelzellform transduziert werden. Obwohl RESCs innerhalb der Kolonie eher in die Breite wachsen und anders als mESCs nur wenige Zellschichten übereinander ausbilden, wurde darauf Wert gelegt, möglichst kleine Kolonien mit wenigen übereinander liegenden Zelllagen zu transduzieren. Um dies zu erreichen, wurden die Kolonien einen Tag vor der Transduktion gesplittet und wieder ausgesät. Daher konnte auch keine exakte MOI für die Transduktionen berechnet werden, was eine exakte Bestimmung der geeignetsten MOI praktisch unmöglich machte.

Die ersten Versuche, die RESCs zu transduzieren, mussten früh nach der Transduktion abgebrochen werden, da die Zellen nach dem ersten, manchmal auch nach dem zweiten Mal Splitten vollständig differenziert waren (Abb. 26). Die spontane Differenzierung dieser Zellen zeigte sich z. B. durch die Bildung neuronaler Rosetten und einer zunehmenden Strukturbildung innerhalb der Kolonien. Im Verlauf der Promotion konnte durch einen routinierteren Umgang mit RESCs und eine genauere Beurteilung der Zellen diese schnelle Differenzierung weitgehend vermieden werden. Da RESCs sehr empfindlich auf alle Schwankungen innerhalb des Kultivierungsmediums reagieren, wurden die hergestellten lentiviralen Partikel direkt in dem zur Kultivierung undifferenzierter RESCs verwendeten Medium aufgenommen. So war es möglich, die Schwankungen während der Transduktion so gering wie möglich zu halten. Durch diese Verbesserungen konnte im weiteren Verlauf in der Regel 5-6 Passagen nach der Transduktion eine undifferenzierte Kultur von transduzierten RESCs etabliert werden. In dieser initialen Phase nach der Transduktion bedurften die transduzierten RESCs sehr genauer

morphologischer Begutachtung und mussten in kürzeren Abständen gesplittet werden, ohne die einzelnen Kolonien zu stark mechanisch zu zerkleinern.

Trotz dieser Optimierungen führten die Transduktionen zu diesem Zeitpunkt nicht zu befriedigenden Fluoreszenzintensitäten. Dieses lag in der Hauptsache in den damals verfügbaren Vektoren begründet. Verwendet wurden bei den initialen Transduktionen Vektoren, die die ubiquitären Promotoren mPGK und CeCBA enthielten. Nur mit dem CeCBA konnten überhaupt positive Kolonien mithilfe des zur Verfügung stehenden Fluoreszenzmikroskops detektiert werden. Die Transduktionseffizienz lag bei unter 5%.

Die Auswertung von Transduktionsversuchen mit dem zur Verfügung stehenden Fluoreszenzmikroskop älteren Baujahrs stellte sich für Versuche, in denen keine hohen Fluoreszenzintensitäten zu erwarten sind, als ausgesprochen schwierig heraus. Das verwendete Fluoreszenzmikroskop ließ Zellen, die nur schwach fluoreszieren, als negativ erscheinen, daher ist die fluoreszenzmikroskopische Ermittlung der Transduktionseffizienz mit Vorsicht zu bewerten.

Für eine Verbesserung der lentiviralen Transgenexpression in RESCs wurden verschiedene ubiquitäre Promotoren ausgetestet. Wie schon für mESCs beschrieben wurden aufgrund der publizierten Daten der EF1 α , der CeCBA und der mPGK Promotor getestet. Betont werden muss allerdings, dass das entsprechende Experiment aufgrund zeitlicher Limitationen der Promotion nur einmal durchgeführt werden konnte. Das Ergebnis der Transduktion wurde mittels FACS ausgewertet. Nach lentiviraler Transduktion konnten zwar mit CeCBA und dem EF1 α Promotor vergleichbare Anteile GFP-exprimierender Zellen detektiert werden, die Fluoreszenzintensität lag jedoch beim EF1 α Promoter zehn Mal höher als bei der Verwendung des CeCBA Promoters (Abb. 27). Diese Beobachtung entspricht den durch die von Hong *et al.* veröffentlichten Daten [155]. Mit dem mPGK Promotor konnten keine positiven Zellen detektiert werden (Abb. 27), was im Gegensatz zu einigen anderen Veröffentlichungen steht, in denen mESCs und hESCs eine gute PGK Promotor-vermittelte Transgenexpression zeigten [211, 265]. Andere Veröffentlichungen wiederum bestätigen die innerhalb dieser Dissertation erzielten Ergebnisse und weisen auf eine geringere Aktivität des PGK Promotors in ESCs hin [155, 272]. Im Hinblick auf die Tatsache, dass das entsprechende Experiment wie oben erwähnt nur einmal durchgeführt worden ist und *Real Time* PCR-Analysen zur Zahl der Vektorkopien / Zelle fehlen, ist natürlich die Möglichkeit nicht auszuschließen, dass das Fehlen von GFP^{pos}-Zellen auf eine schlechte Transduktionsrate durch den Vektor mit PGK-Promotor zurückzuführen ist. Wie bei den transduzierten mESCs sind auch hier weitergehende Analysen einschließlich der Bestimmung der Transduktionsrate über Real Time PCR geplant.

Nichtsdestotrotz wurde aufgrund der Ergebnisse des oben diskutierten Experimentes weitere Experimente zur Etablierung und Optimierung des Transduktionsprotokolles ausschließlich unter Verwendung des Vektors mit dem EF1 α Promoter durchgeführt. Obwohl diesbezügliche quantitative Analysen noch fehlen, gab es im Verlauf der weiteren Kultivierung der transduzierten RESCs bisher keinerlei Anzeichen für einen fortschreitenden Verlust der GFP-Expression bzw. für einen sinkenden Anteil GFP exprimierender Zellen. Im Verlauf der Dissertation konnten die transduzierten RESCs über ein wiederholtes Ausschneiden GFP-positiver Kolonien nach einigen Passagen bis auf 94% GFP^{pos} Zellen angereichert werden. Die Anreicherung mittels FACS oder *limiting dilution* war bis zum derzeitigen Zeitpunkt nicht möglich, da die Zellen eine Vereinzlung zu Einzelzellen nicht tolerierten.

Als Beleg für den Erhalt der Pluripotenz nach Transduktion und Anreicherung wurde auf den angereicherten GFP^{pos} RESCs immunhistologisch das Oberflächenantigen SSEA-4 nachgewiesen (Abb. 29). Zusätzlich konnten auf mRNA Ebene weitere Marker für eine undifferenzierte RESC-Kultur detektiert werden (Abb. 30). Außerdem wurde erfolgreich eine kardiale Differenzierung mit diesen Zellen durchgeführt. Die Ausbeute an kontrahierenden Arealen war vergleichbar mit der nicht transduzierter RESCs. Eine immunhistologische Färbung gegen das sarkomerische- α -Aktinin und RT-PCR Analysen im Verlauf der kardialen Differenzierung untermauerten diesen Befund. Diese mRNA Analyse der angereicherten RESC-Kultur wurde mit Analysen von nicht transduzierten RESCs verglichen und zeigte ein vergleichbares Ergebnis (Abb. 30).

Ähnlich wie bei mESCs beobachtet, kam es auch in RESCs während der Differenzierung zu einem weitgehenden Verlust der GFP-Expression vergleichbar auch mit den von Hong *et al.* in Versuchen mit mESCs gemachten Beobachtungen [155]. Der EF1 α Promotor vermittelt augenscheinlich eine starke Transgenexpression in undifferenzierten Zellen, aber die Fluoreszenz nimmt bei der Differenzierung in den meisten Zelltypen dramatisch ab [155].

Zusammenfassend kann betont werden, dass die Transduktion von RESCs mit SIV_{mac} abgeleiteten Vektoren erfolgreich war, im Verlauf der Promotion jedoch nur zu geringen Transduktionseffizienzen unter 5% führte. Diese niedrigen Effizienzen lassen sich vermutlich zum großen Teil darauf zurückführen, dass die Transduktion nicht in Suspension durchgeführt werden konnte und RESCs als Kolonien transduziert werden mussten. Nachdem jedoch in der Endphase dieser Dissertation basierend auf einer aktuellen Publikation [273] ein geeignetes Vereinzlungsprotokoll etabliert worden war, konnte die Transduktionsrate von Frau Jennifer Beier bereits auf ca. 30% gesteigert werden. Unterdessen konnten die in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse zur Transduktion von RESCs mit SIV_{mac}-abgeleiteten Vektoren auch von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden [212].

5. Perspektiven

Die im Rahmen der Dissertation etablierten Methoden zur kardiomyozyten- und pneumozyten-spezifischen lentiviralen Genexpression in Verbindung mit den für mESCs und RESCs etablierten Transduktionsprotokollen haben enorme Bedeutung für zukünftige Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe von Prof. Martin. Besondere Bedeutung hat dabei die Möglichkeit ES-Zellen aus Maus und Rhesusaffe genetisch manipulieren zu können.

Im Laufe der Doktorarbeit konnten Transduktionsprotokolle für mESCs und RESCs etabliert werden. Auch wenn die erzielten Transduktionseffizienzen im Falle von mESCs für eine Isolierung von Einzelklonen über FACS durchaus ausreichend waren und im Falle von RESCs eine Anreicherung transgener Zellen auf nahezu 100% möglich war, ist es sicherlich notwendig, die im Vergleich zu anderen Zelltypen eher niedrigen Transduktionseffizienzen weiter zu optimieren. Gerade im Bereich der RESCs scheint in dieser Hinsicht in der Arbeitsgruppe ein wichtiger Durchbruch erzielt worden zu sein. Ein im Sommer 2007 von Watanabe *et al.* veröffentlichtes Vereinzlungsprotokoll [273] unter Verwendung eines speziellen Apoptoseinhibitors konnte erfolgreich auf die RESCs übertragen werden. Dieses Protokoll erlaubt nun die Dissoziation von RESCs zu Einzelzellen sowie die Kultivierung unter *Feeder*-freien Bedingungen. Erste Transduktionsexperimente innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Martin unter Verwendung von *Feeder*-frei-ausplattierten Einzelzellen führten zu stark erhöhten Transduktionseffizienzen. Außerdem sollte nun auch eine Selektion von Einzelklonen für die Herstellung von stabilen RESC Linien über „*Limiting Dilution*“ oder FACS möglich sein.

Des Weiteren dürfte aufgrund eines neuen Fluoreszenzmikroskops eine zuverlässigere Beurteilung von Transgen exprimierenden Zellen möglich werden. Die Optimierung der Transduktionsprotokolle sowie die eindeutigeren fluoreszenzmikroskopischen Beurteilungen der transduzierten Zellen sollten zu einer schnellen Verbesserung der bisherigen Ergebnisse führen.

Vektoren zur kardiomyozytenspezifischen Transgenexpression sollen in Zukunft als wichtiges Werkzeug zur Charakterisierung kardialer Differenzierungsvorgänge *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden. Für die Analyse des Einflusses von modifizierten Differenzierungsprotokollen können stabil transduzierte ESC-Linien einen großen Vorteil bieten. Dabei wird auch die Möglichkeit, verschiedene Reportergene in Kombination mit verschiedenen zelltypspezifischen Promotoren einsetzen zu können eine wichtige Rolle spielen.

Für die Markierung von terminal differenzierten atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten konnten Konstrukte mit dem hANF bzw. MLC2v Promotor etabliert werden. Diese Konstrukte müssen im Weiteren auf kardial differenzierten ESCs ausgetestet werden. Für den MLC2v Promotor konnte bereits durch Müller *et al.* gezeigt werden, dass eine Aufreinigung von Ventrikel ähnlichen Kardiomyozyten aus mESCs möglich zu sein scheint [6]. Ventrikuläre Kardiomyozyten sind vor allem von Bedeutung für die Myokardregeneration und das kardiale *Tissue Engineering*.

Für den hANF-Promotor konnte bisher durch Gassanov *et al.* gezeigt werden, dass eine Aufreinigung von Schrittmacher- und Atrium ähnlichen Zellen möglich ist. Die Aufreinigung von Schrittmacherzellen könnte von großer Bedeutung für die Entwicklung eines biologischen Herzschrittmachers sein.

Ein anderer potenziell nützlicher Promotor zur Aufreinigung von Kardiomyozyten Subtypen wäre der α -MHC (*myosin heavy chain*) Promotor, der schon erfolgreich in mESCs [274] und hESCs [275] zur Selektion von Kardiomyozyten verwendet wurde.

Eine Verstärkung dieses Promotors mit einem CMV Enhancer führt jedoch zu einer unspezifischen Transgenexpression, wie in Versuchen der Arbeitsgruppe von Prof. Martin gezeigt werden konnte. Aus diesem Grund wird in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin schon an alternativen Enhancern gearbeitet. Es wird versucht, kardiomyozytenspezifische Enhancer mit dem α -MHC Promotor zu kombinieren, um eine verstärkte, aber spezifische Transgenexpression zu erzielen.

Ein anderer Ansatz ist es, Kardiomyozyten in einem früheren Vorläufer-Stadium zu selektieren. Als ein früher Marker kommt hier das Nkx2.5 in Betracht. Nkx2.5 wird während der Herzentwicklung sowohl im Primordium des Herzens als auch in den Kardiomyozyten exprimiert [276, 277]. In der Maus beginnt die Nkx2.5 Genexpression im kardialen Mesoderm an Tag 7.5, viele Stunden bevor das α -Aktinin oder die β schwere Kette des Myosins exprimiert wird [277]. Nkx2.5 wird auch während früher Entwicklungsstadien im Endoderm exprimiert, aber am stärksten in den sich entwickelnden Kardiomyozyten im Herzschlauch. Gegenüber anderen frühen Markern, wie z. B. Tbx5 oder Irx2, hat Nkx2.5 den Vorteil, dass es ein fast gleichmäßiges Genexpressionsmuster im gesamten Herzschlauch besitzt [136]. Aus Nkx2.5 positiven Zellen können sinoatrial (SA)-, atrial- und ventrikelähnliche Zelltypen entstehen [214]. Die Selektion von Kardiomyozytenvorläufern würde möglicherweise die Vereinzelung dieser Zellen aus den differenzierten *embryoid bodies* (EBs) vereinfachen. In diesem Stadium ist der Zellverband noch nicht so stark ausgeprägt. Die Bildung von extrazellulärer Matrix wird im Verlauf der Differenzierung immer ausgeprägter und macht die Vereinzelung der Zellen wesentlich schwieriger. Außerdem könnte sich im Hinblick auf Zelltransplantationsaspekte die Verwendung von Kardiomyozytenvorläufern gegenüber der Transplantation von ausgereiften Kardiomyozyten als

überlegen erweisen. Möglicherweise führt nach intrakardialer Transplantation von Kardiomyozytenvorläufern die „kardiale Nische“ zu einer optimalen Differenzierung und Zellintegration. Ein lentivirales Konstrukt mit dem Nkx2.5 Promotor konnte im Verlauf der Doktorarbeit hergestellt, aber bisher noch nicht ausgetestet werden.

Mithilfe der etablierten kardiomyozytenspezifischen Konstrukte ist geplant, nach der Generierung geeigneter ES-Zellklone sowohl in mESCs, als auch in RESCs automatisierte fluoreszenzbasierte Screeningsysteme zur Identifizierung von Differenzierungsfaktoren zu entwickeln.

Ein weiterer wichtiger Einsatzbereich der kardiomyozytenspezifischen Konstrukte ist sicherlich das stammzellbasierte kardiale *Tissue Engineering*. Hier wird es der Einsatz der entwickelten Reporterkonstrukte es erlauben, die Differenzierung, Reifung und Integration von Stammzellen und daraus abgeleiteten Kardiomyozyten im 3-dimensionalen lebenden bioartifiziellen Gewebe zu verfolgen. Der Einsatz verschiedener Konstrukte mit verschiedenen kardialen Promotoren bzw. verschiedenen Fluoreszenzmarkern stellt in diesem Zusammenhang einen großen Vorteil dar. Man könnte zum einen bioartifizielle Konstrukte mit einem angereicherten Kardiomyozytensubtyp herstellen. Zum anderen könnte für ein Monitoring des Differenzierungsverhaltens von Kardiomyozyten bzw. Kardiomyozytenvorläufern in diesen bioartifiziellen Geweben mehrfach transgene embryonale Stammzelllinien als Grundlage verwendet werden. So könnte z. B. eine Aufreinigung von sehr frühen Kardiomyozyten über ein Konstrukt mit einem Nkx2.5 Promotor erfolgen und die weitere Differenzierung in die Kardiomyozyten Subtypen durch die MLC2v- bzw. ANF-Promotor vermittelte Transgenexpression verfolgt werden. Ein großer Vorteil hierbei wäre der Einsatz verschiedener Fluoreszenzmarker.

Für *in vivo* Anwendungen im Kleintiermodell ist die Verwendung von Luciferase geplant, für MRI (*magnetic resonance imaging*)-basierte Detektion ist ein System zur zelltypspezifischen Expression von Ferritin, einem Protein, welches bei Überexpression zur Eisenanreicherung in der Zelle führt [278-280], in Entwicklung.

Eine andere Möglichkeit der nicht invasiven Darstellung von transplantierten Zellen ist die Expression von Ferritin. In der Natur produzieren viele Organismen intrazelluläre biomineralisierte superparamagnetische Nanokristalle, wie z. B. das Metalloprotein Ferritin. Ferritine sind ubiquitär vorkommende und hochkonservierte Proteine in vielen Organismen, die als die wichtigsten Eisenbindenden Proteine bekannt sind [280]. Ferritine von Säugetieren bestehen aus zwei Untereinheiten [280]. Aufgrund einer kristallinen Ferrihydrithülle hat Ferritin einen sehr hohen Superparamagnetismus

[278]. Daher ist Ferritin ein geeignetes Molekül, um es in *in vivo* MRI-Studien einzusetzen. Durch die Expression eines Reportergens, wie z. B. der leichten oder auch der schweren Kette des Ferritins, reichert die Zelle endogenes Eisen aus dem Organismus an [278]. Bei der Expression von Ferritin unter Kontrolle zelltypspezifischer Promotoren sollte es möglich sein, nach Transplantation selektiv entsprechend differenzierte und vitale Stammzellderivate *in vivo* ohne invasive Eingriffe mithilfe eines MRI zu detektieren.

Der Einsatz des Luciferase Reportergens stellt neben dem Einsatz von Ferritin eine weitere Möglichkeit der Detektion von transplantierten Zellen *in vivo* dar, ohne einen invasiven Eingriff vorzunehmen [281, 282]. Im Falle der Luciferase kann mithilfe von Biolumineszenzdarstellung die Lokalisation transplantierte Zellen *in vivo* identifiziert werden [281]. Diese Methode der Markierung wurde auch schon erfolgreich für die Darstellung von lentiviral transduzierten und Luciferase exprimierenden mESCs, die in das Myokard einer Ratte injiziert wurden, verwendet [281].

Der Einsatz von Reportergenen, deren Expression auf bestimmte Zellkompartimente beschränkt ist, wie z. B. das Kernmembran- assoziierte Venus, einer optimierten mit einem Kernlokalisationspeptid versehenen Variante des YFP [283, 284], bietet wichtige Kombinationsmöglichkeiten mit anderen Reportergenen. So können mehrere Reportergene mit gleichen Extinktions-/Emissionsspektren in fluoreszenzmikroskopischen Analysen gleichzeitig verwendet werden [284]. Der Einsatz eines kernmembranassoziierten Venus in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin verdeutlichte darüber hinaus einen weiteren Vorteil. Die Lokalisation in der Kernmembran bietet eine sehr einfache Möglichkeit, die Transgenexpression von unspezifischen Fluoreszenzartefakten, welche z. B. häufig in absterbenden Zellen zu beobachten sind, zu unterscheiden.

Für die Aufreinigung von stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten, insbesondere in RESCs, in denen solche Strategien mit konventionellen nichtviralen Technologien bisher unmöglich waren [6], ist die Selektion über zelltypspezifische Expression von Antibiotikaresistenzen geplant. Obwohl eine Aufreinigung mittels FACS für ESC-abgeleitete Kardiomyozyten bereits erfolgreich durchgeführt worden ist [6], wird diese Methode im Hinblick auf die resultierende Zellvitalität als suboptimal angesehen. Ausdifferenzierte Kardiomyozyten sind relativ groß und empfindlich gegenüber Scherrstress, welcher bei einer durchflusszytometrischen Aufreinigung unvermeidlich ist. Die Selektion von Kardiomyozyten mithilfe einer Antibiotikaresistenz ist, in geeigneter Weise durchgeführt, demgegenüber wesentlich zellschonender. Um gleichzeitig eine sichtbare Expressionskontrolle und Möglichkeit zur Detektion der Zielzellen zu haben, würde sich ein bicistronisches Konstrukt anbieten.

Um neben der Antibiotikaresistenz gleichzeitig auch Fluorochrome exprimieren zu können, sollen diese Proteine entweder bicistronisch über eine IRES-Sequenz [285] gekoppelt oder über eine 2A-Schnittstelle, welche im Encephalomyokarditis Virus und Maul und Klauenseuche Virus identifiziert worden ist [286-289], exprimiert werden.

Ein Problem bei der Verwendung von IRES-Sequenzen ist, dass Transgene *Upstream* der IRES in der Regel hoch exprimiert werden, während es *downstream* häufig zu niedrigeren Expressionshöhen kommt [290, 291]. Des Weiteren wurde mehrfach aus persönlichen Gesprächen mit anderen Arbeitsgruppen deutlich, dass IRES-Sequenzen im lentiviralen Kontext bzw. auch in embryonalen Stammzellen weniger gut funktionieren. Die 2A Sequenz ist deutlich kleiner als IRES-Sequenzen, hat aber den Nachteil, dass sie im Leserahmen kloniert werden muss. Die Expressionshöhe von *downstream* gelegenen Transgenen scheint besser vorhersagbar und häufig höher als im Falle von IRES-Sequenzen zu sein [289]. Die 2A Sequenz wurde außerdem schon erfolgreich in embryonalen Stammzellen verwendet [286].

Innerhalb dieser Doktorarbeit wurde ein Konstrukt unter der Kontrolle des ubiquitären EF1 α Promotors hergestellt, das als Transgen ein Puromycinresistenzgen und hinter der dann folgenden 2A Sequenz das hrGFP zusammen mit dem WPRE besitzt. Dieses Konstrukt konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit hergestellt, aber nicht mehr ausgetestet werden. Erste Daten, die zumindest eine Expression des enthaltenen Puromycinresistenzgens bestätigen, liegen bereits vor.

Eine weitere Anwendung der etablierten lentiviralen Vektortechnologien ist die Expression von z. B. differenzierungsfördernden Transkriptionsfaktoren [292] oder miRNAs [293-296].

Bereits in der Arbeitsgruppe fertig gestellt wurden z. B. lentivirale Konstrukte zur Überexpression von Nkx2.5 oder zur Expression der miRNA1. Für die miRNA-1 konnte z. B. gezeigt werden, dass sie spezifisch in Herzmuskelzellen und Muskelvorläuferzellen exprimiert wird [297], eine Deletion in *Drosophila* zu Defekten in der Differenzierung von kardialen oder somatischen Muskelvorläuferzellen führt [295] und die Überexpression eine effizientere kardiale Differenzierung humaner ES-Zellen erlaubt [298].

Mit Hilfe von für AT2 Zellen spezifischen lentiviralen Konstrukten sollen nach dem erfolgreichen Nachweis der Differenzierung mESCs-abgeleitete AT2-Zellen aufgereinigt werden. Die Aufreinigung der Zellen soll dabei mittels FACS erfolgen.

Für die bereits erfolgreiche Differenzierung zu AT2 ähnlichen Zellen (Mauritz et al. „Serum-free differentiation of murine embryonic stem cells into alveolar type II epithelial cells“ Cloning and Stem Cells, in press) soll eine triple-transgene mESC-Linie verwendet werden, die lacZ im ROSA26 Locus trägt, GFP unter Kontrolle des endogenen Brachyury Promotors und RedStar unter Kontrolle des SP-C-Promotors exprimiert [270]. Nach der Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls, soll ein Transplantationsmodell in SP-B [299] bzw. SP-C defizienten [300] Mäusen mit den aufgereinigten AT2 ähnlichen Zellen etabliert werden. Außerdem soll die Differenzierung von RESCs zu AT2 Zellen etabliert werden. Die Etablierungsarbeiten genauso wie eine spätere Aufreinigung der resultierenden Zellen würden durch eine stabil mit einem AT2 spezifischen Konstrukt transduzierter RESC Klon deutlich erleichtert werden.

Die sich durch die im Rahmen der Dissertation etablierten Vektortechnologien ergebenden Möglichkeiten sollen in Zukunft nicht nur für ES-Zellen, sondern auch für die Differenzierung der von Takahashi und Yamanaka beschriebenen *induced pluripotent stem cells*, den sogenannten iPS Zellen, angewendet werden [189]. Die iPS Zellen sind aus Fibroblasten reprogrammierte Zellen. Unterdessen wurden iPS-Zellen nicht nur aus murinen sondern auch aus humanen Zellen hergestellt [301, 302]. Die durch retrovirale Überexpression von vier Faktoren, dem Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 [189] generierten Zellen bilden Teratome und differenzieren in Zellderivate aller drei Keimblätter [189]. Die Möglichkeit durch Reprogrammierung Zellen mit den Eigenschaften von pluripotenten ESCs aus differenzierten Zellen herzustellen, stellt im Bereich der Regenerativen Therapie eine neue viel versprechende Zellquelle dar.

Die im SIV_{mac}- System etablierten Vektoren sollen im Rahmen von Kooperationen zukünftig auch in hESCs Anwendung finden. Eine effiziente Transduktion von hESCs durch SIV_{mac} abgeleiteten Vektoren sollte aufgrund der bisher veröffentlichten Daten möglich sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des humanen TRIM5 α keinen negativen Einfluss auf die Transduktion und die Transgenexpression von SIV_{mac} basierten Vektoren haben [248, 249]. Auch die erfolgreiche Transduktion von humanen Zellen wie T-Lymphozyten (C8166) [251] und dendritischen Zellen [259] mit SIV_{mac} basierten Vektoren sprechen dafür, dass die hergestellten SIV_{mac} basierten Vektoren auch in hESCs effizient angewendet werden können.

Neben humanen ESCs und RESCs soll das SIV_{mac} System in Kürze in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin auch auf embryonalen Stammzellen des Javaneraffen angewandt werden. Die Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) gehören wie die Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) zur Teilordnung der Altweltaffen

(*Catarrhin*), der Familie der Meerkatzenverwandten (*Cercopithecidae*), der Unterfamilie der Backentaschenaffen (*Cercopithecinae*) und der Gattung der Makkaken (*Macaca*). Die Eignung der SIV_{mac} basierten Vektoren für Zellen des Javaneraffen wird durch die Veröffentlichung von Sandrin *et al.* belegt, in der gezeigt wurde, dass eine Transduktion von CD34⁺ Zellen des Javaneraffen mit SIV_{mac} abgeleiteten Vektoren erfolgreich durchgeführt werden konnte [303]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das TRIM5 α Protein des Javaneraffen eine Infektion durch SIV_{mac} nicht verhindern kann [304].

Eine weitere sich in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin befindliche Anwendung für die etablierten lentiviralen Technologien ist die Expansion und Differenzierung von embryonalen Stammzellen in einem größeren Maßstab. Im Falle der *large scale* Kultur undifferenzierter Stammzellen würde die Verwendung von Zellklonen, die nur in undifferenziertem Zustand Reportergene z. B. unter Kontrolle des Oct4 Promotors exprimieren, von großem Nutzen sein. Auch solche Vektoren werden derzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin hergestellt bzw. sind bereits verfügbar.

Möglicherweise können zu diesem Zweck auch einfache Vektoren mit Reportergenen unter Kontrolle des EF1 α -Promoters eingesetzt werden. Eigene Beobachtungen, dass die Transgenexpression während der kardialen Differenzierung von transduzierten RESCs abnimmt, bestätigen kürzlich publizierte Ergebnisse zu mESCs [155]. Zurzeit ist basierend auf den im Rahmen der vorliegenden Daten zur Funktion unterschiedlicher Promotoren in lentiviral transduzierten RESCs eine weitere Publikation in Arbeit.

Sowohl für die Unterstützung des undifferenzierten Zustandes durch Überexpression von Pluripotenzfaktoren als auch für die Expression von Differenzierungsfaktoren wären embryonale Stammzelllinien, die eine zeitlich begrenzte Expression der verwendeten Faktoren erlauben, von Nutzen. Hier ist es notwendig Systeme wie das tet-off oder tet-on System in den in der Arbeitsgruppe verwendeten Vektoren zu etablieren. Durch die Zugabe oder den Entzug von Tetracyclin ist in solchen Systemen eine regulierte Expression z.B. von Transkriptionsfaktoren oder miRNAs möglich.

Zusammenfassend kann betont werden, dass die etablierten lentiviralen Vektortechnologien, welche unterdessen eine der Schlüsseltechnologien der Arbeitsgruppe von Prof. Martin darstellen, eine wichtige Grundlage für weitere zurzeit geplante oder in Arbeit befindliche Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe bilden.

6. Literatur

1. Lutgens E, D.M., de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF., *Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 586-593.
2. Nakatsuji S, Y.J., Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S., *In vivo responses of macrophages and myofibroblasts in the healing following isoproterenol-induced myocardial injury in rats*. Virchows Arch, 1997. **430**(1): p. 63-69.
3. Nadal-Ginard, B., *Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis*. Cell, 1978. **15**(3): p. 855-864.
4. Carbone A, M.M., Sampaolesi M, Fiaccavento R, De Feo A, Cesaroni P, Peruzzi G, Di Nardo P., *Hamster cardiomyocytes: a model of myocardial regeneration?* Ann N Y Acad Sci, 1995. **752**: p. 65-71.
5. Anversa P, F.D., Argani S, Capasso JM., *Myocyte mitotic division in the aging mammalian rat heart*. Circ Res, 1991. **69**(4): p. 1159-1164.
6. Müller M, F.B., Selbert S, Ji GJ, Endl E, Middeler G, Müller OJ, Schlenke P, Frese S, Wobus AM, Hescheler J, Katus HA, Franz WM., *Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2540-2548.
7. Laflamme MA, C.K., Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J and Murry CE, *Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts*. Nat Biotechnol, 2007: p. 1-10.
8. Boheler KR, C.J., Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM., *Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes*. Circ Res, 2002. **91**(3): p. 189-201.
9. Kehat I, K.-K.D., Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L., *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 407-414.
10. Hescheler J, F.B., Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K., *Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis*. Cardiovasc Res, 1997. **36**(2): p. 149-162.
11. Keller, G., *Embryonic stem cell differentiation: emergence of new era in biology and medicine*. Genes and Development, 2005. **19**: p. 1129-1155.
12. Xu C, P.S., Rao N and Carpenter M, *Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells*. Circ Res, 2002. **91**: p. 501-508.
13. Ma Y, R.A., Lewis R, Hawley RG, Thomson JA., *High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors*. Stem cells, 2003. **21**(1): p. 111-117.
14. Gropp M, I.P., Singer O, Ben-Hur T, Reinhartz E, Galun E, Reubinoff BE., *Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors*. Mol. Ther., 2003. **7**(2): p. 281-287.
15. Jung-Eun Jang, K.S., Xiao-Jin Yu, Denise Peterson, Karen Pepper, Carolyn Lutzko and Donald B. Kohn, *Specific and stable gene transfer to human embryonic stem cells using pseudotyped lentiviral vectors*. Stem cells and Development, 2006. **15**: p. 109-117.
16. Wobus AM, R.J., Maltsev V, Hescheler J., *Development of cardiomyocytes expressing cardiac-specific genes, action potentials, and ionic channels during embryonic stem cell-derived cardiogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **752**: p. 460-469.
17. Evans MJ, K.M., *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-156.

18. Martin, G., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. PNAS, 1981. **78**(12): p. 7634-7638.
19. Ginis I, L.Y., Miura L.Y., Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter M, Itskovitz-Eldor J and Rao M, *Differences between human and mouse embryonic stem cells*. Dev Biol, 2004. **269**(2): p. 360-380.
20. Thomson JA, I.-E.J., Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-1147.
21. Thomson JA, K.J., Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP., *Isolation of a primate embryonic stem cell line*. PNAS, 1995. **92**(17): p. 7844-7848.
22. Schöler HR, H.A., Balling R, Suzuki N, and Gruss P, *A family of octamer proteins present during mouse embryogenesis for germline specific expression of an Oct factor*. EMBO, 1989. **8**(9): p. 2543-2550.
23. Cavalveri F, S.H., *Nanog: a new recruit of the stem cell orchestra*. Cell, 2003. **113**(5): p. 551-552.
24. Avilion AA, N.S., Pevney LH, Perez L, Vivian N and Lovell-Badge R *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 126-140.
25. Cai J, W.Y., Mirua T, Pierce JL, Lucero MT, Albertine KH, Spangrude GJ, Rao MS and Rao MS *Properties of fetal multipotent neural stem cells* Dev Biol, 2002. **251**(2): p. 221-240.
26. Ben-Shushan E, T.J., Gudas LJ and Bergmann Y, *Rex-1 a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein* Mol Cell Biol, 1998. **18**(4): p. 1866-1878.
27. Rosfjord E, R.A., *The octamer motif present in the Rex-1 promotor binds to the Oct-1 and Oct-3 expressed by EC cells and ES cells*. Biochem Biophys Res Comm, 1994. **203**(3): p. 1795-1802.
28. Henderson JK, D.J., Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW., *Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens*. Stem Cells, 2002. **20**(4): p. 329-337.
29. Berstine EG, H.M., Grandchamp S, Ephrussi B., *Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma*. PNAS, 1973. **70**(12): p. 3899-3903.
30. Armstrong L, L.M., Lincoln J, Cairns PM and Hole N, *mTERT expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells*. Mech Dev, 2000. **97**(1-2): p. 109-116.
31. Evans MJ, K.M., *Pluripotential cells grown directly from normal mouse embryos*. Cancer Surv, 1983. **2**: p. 185-208.
32. Beddington RSP, R.E., *An assesment of developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo*. Development, 1989. **105**(4): p. 733-737.
33. Doetschman TC, E.H., Katz M, Schmidt W, Kemler R., *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. J Embryol Exp Morphol, 1985. **87**: p. 27-45.
34. Gepstein, L., *Derivation and potential applications of human embryonic stem cells*. Circ Res, 2002. **91**(10): p. 866-876.
35. Wobus AM, S.J., Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM., *Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(1525-1539).
36. Kanno S, K.P., Sallam K, Lei J, Billiar TR and Shears LL, *Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells*. PNAS, 2004. **101**: p. 12277-12281.

37. Takahashi T, S.P., Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR and Lee RT, *Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes*. *Circ Res*, 2003. **107**: p. 1912-1916.
38. Behfar A, H.D., Rauzier JM, Kane GC, Terzic A and Puceat M, *Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart*. *FASEB J*, 2002. **16**: p. 1558-1566.
39. Kawai T, T.T., Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H and Kosai K, *Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein2*. *Circ J*, 2004. **68**: p. 691-702.
40. Rudy-Reil D, L.J., *Avian precardiac endoderm/mesoderm induces cardiac myocyte differentiation in murine embryonic stem cells*. *Circ Res*, 2004. **94**: p. 107-116.
41. Maltsev VA, W.A., Rohwedel J, Bader M, Hescheler J., *Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents*. *Circ Res*, 1994. **75**(2): p. 233-244.
42. Passier R, M.C., *Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair*. *Cardiovasc Res*, 2003. **58**(2): p. 324-335.
43. Mummery CL, v.A.T., van den Eijnden-van Raaij AJ, van Haaster L, Willemse A, de Laat SW, Piersma AH., *Visceral-endoderm-like cell lines induce differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells*. *Differentiation*, 1991. **46**(1): p. 51-60.
44. Sachinidis A, K.E., Fleischmann BK, Hescheler J., *Generation of cardiomyocytes from embryonic stem cells experimental studies*. *Herz*, 2002. **27**(7): p. 589-597.
45. Sauer H, R.G., Hescheler J, Wartenberg M., *Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells*. *J Cell Biochem*, 1999. **75**(4): p. 710-723.
46. Mummery C, W.D., van den Brink CE, Bird SD, Doevendans PA, Opthof T, Brutel de la Riviere A, Tertoolen L, van der Heyden M, Pera M., *Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells*. *J Anat*, 2002. **200**(Pt 3): p. 233-242.
47. Klug MG, S.M., Koh GY, Field LJ., *Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(1): p. 216-224.
48. Korfhagen T, G.S., Wert S, Bruno M, Daugherty C, McNeish J, J. and P.S.a.W.J. Stock J, *Cis-acting sequences from human surfactant protein gene confer pulmonary-specific gene expression in transgenic mice*. *Dev Biol*, 1990. **87**: p. 6122-6126.
49. IL., W., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 157-168.
50. Ali NN, E.A., Samadikuchaksaraei A, Timson CM, Romanska HM, Polak JM, Bishop AE, *Derivation of type II alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells*. *Tissue Eng*, 2002. **8**(4): p. 541-550.
51. Rippon HJ, P.J., Qin M, Bishop AE., *Derivation of distal lung epithelial progenitors from murine embryonic stem cells using a novel three-step differentiation protocol*. *Stem Cells*, 2006. **24**(5): p. 1389-1398.
52. D'Amour K, A.A., Eliazar S, Kelly OG, Kroon E and Baetge EE, *Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**: p. 1534-1541.
53. Kubo A, S.J., Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ and Keller G, *Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture*. *Development and Disease*, 2004. **131**: p. 1651-1662.
54. Yasunaga M, T.S., Torikai-Nishikawa S, Nakano Y, Okada M, Jakt LM, Nishikawa S, Chiba T, Era T, and Nishikawa S, *Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**: p. 1542-1550.
55. Tada S, E.T., Furusawa C, Sakurai H, Nishikawa S, Kinoshita M, Nakao K, Chiba T and Nishikawa S, *Characterization of mesoderm: a divergent point of the definitive endoderm and*

- mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture*. Development, 2005. **132**: p. 4363-4374.
56. Ninomiya H, T.S., Tanegashima K, Yokota C and Asashima M, *Endoderm differentiation and inductive effect of activin-treated ectoderm in Xenopus*. Dev Growth Differ, 1999. **41**: p. 391-400.
57. Denham M, C.T., Mollard R., *Embryonic stem cells form glandular structures and express surfactant protein C following culture with dissociated fetal respiratory tissue*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(6): p. L1210-1215.
58. Wang D, H.D., Burns AR, Zsigmond E and Wetsel RA, *A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci, 2007. **104**: p. 4449-4454.
59. Samadikuchaksaraei A, C.S., Isaac K, Rippon HJ, Polack JM, Bieby RC and Bishop AE, *Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells*. Tissue Eng, 2006. **12**: p. 867-875.
60. Whitsett JA, C.J., Picard L, Tichelaar JW, Wert SE, Itoh N, Perl AK and Stahlman MT, *Fibroblast growth factor 18 influences proximal programming during lung morphogenesis*. J Biol Chem, 2002. **277**: p. 22743-22749.
61. Belusci S, G.J., Emoto H, Itoh N and Hogan BL, *Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**: p. 87-92.
62. Hyatt BA, S.X.a.S.J., *BMP4 modulates fibroblast growth factor-mediated induction of proximal and distal lung differentiation in mouse embryonic tracheal epithelium in mesenchyme-free culture*. Dev Dyn, 2002. **225**: p. 153-165.
63. Perl AK, a.J.W., *Molecular mechanisms controlling lung morphogenesis*. Clin Genet, 1999. **56**: p. 14-27.
64. Shannon, J., *Induction of alveolar type II cell differentiation in fetal tracheal epithelium by gravted distal lung mesenchyme*. Dev Biol, 1994. **166**: p. 600-614.
65. Shannon JM, G.S.a.N.L., *Induction of alveolar type II cell differentiation in embryonic tracheal epithelium in mesenchyme-free culture*. Development, 1999. **126**: p. 1675-1688.
66. Shannon JM, N.L., Gebb SA and Randell SH, *Mesenchyme specifies epithelial differentiation in reciprocal recombinants of embryonic lung and trachea*. Dev Dyn, 1998. **212**: p. 482-494.
67. Wartburton D, B.S., De Langhe S, Del Moral PM, Fleury V, Maxilleux A, Tefft D, Wang K and Shi W, *Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis*. Pediatr Res, 2005. **57**: p. 26R-37R.
68. R., T.a.C.M., *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryonic-derived stem cells*. Cell, 1987. **51**: p. 503-512.
69. Rachel Eiges, M.S., Micha Drukker, Ofra Yanuka, Joseph Itskovitz-Eldor and Nissim Benvenisty, *Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells*. Current Biology, 2001. **11**: p. 514-518.
70. Takayuki Asano, Y.h., Yasuji Ueda, Shin-ichi Muramatsu, Akihiro Kume, Hirofumi Suemori, Yutaka Suzuki, Yasushi Kondo, Kiyonori Harii, Mamoru Hasegawa, Norio Nakatsuji and Keiya Ozawa, *Highly efficient gene transfer into primate embryonic stem cells with a simian lentivirus vector*. Molecular Therapy, 2002. **6**(2): p. 162-168.
71. Lakshimpathy U, P.B., Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Kaufman DS, *Efficient transfection of embryonic and adult stem cells*. Stem cells, 2004. **22**: p. 531-543.
72. Lorenz P, H.U.a.M.R., *Efficient gene transfer into murine stem cells by nucleofection*. Biotechnol Lett, 2004. **26**: p. 1589-1592.
73. Furuya M, Y.K., Mizutani K, Yoshimura Y, Nakatsuji N and Suemori H, *Electroporation of cynomolgus monkey embryonic stem cells*. Genesis, 2003. **37**: p. 180-187.

74. JA, Z.T.a.T., *Homologous recombination in human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2003. **21**: p. 319-321.
75. Liu JW, P.G., Dunoyer-Geindre S, Fish RJ, Yang H, Bounameaux H, Kruthof EK., *Promoter dependence of transgene expression by lentivirus-transduced human blood-derived endothelial progenitor cells*. Stem Cells, 2006. **24**(1): p. 199-208.
76. Van Damme A, T.L., Ma L, Vandeburgh H, Eyckmans J, Dell'Accio F, De Bari C, Luyten F, Lillicrap D, Collen D, VandenDriessche T, Chuah MK, *Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells*. Stem Cells, 2006. **24**(4): p. 896-907.
77. Jakobsson J, R.N., Thompson L, Barraud P, Lundberg C., *Dynamics of transgene expression in a neural stem cell line transduced with lentiviral vectors incorporating the cHS4 insulator*. Exp Cell Res, 2004. **298**(2): p. 611-623.
78. Limón A, N.N., Lu R, Ghory HZ, Engelman A., *Wild-type levels of nuclear localization and human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of the central DNA flap*. Journal of Virology, 2002. **76**(23): p. 12078-12086.
79. Case SS, P.M., Jordan CT, Yu XJ, Wang L, Bauer G, Haas DL, Xu D, Stripecke R, Naldini L, Kohn DB, Crooks GM., *Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors*. PNAS, 1999. **16**(6): p. 2988-2993.
80. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
81. Barré-Sinoussi F, C.J., Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. 1983. Science, 1983. **220**: p. 868-871.
82. Gallo RC, S.P., Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M., *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 865-867.
83. Levy JA, H.A., Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. **225**(4664): p. 840-842.
84. Clavel F, G.D., Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. **233**(4761): p. 343-346.
85. RC., D., *HIV-1 origins. A finger on the missing link*. Nature, 1990. **345**(6273): p. 288-289.
86. Hirsch VM, D.G., Goldstein S, McClure H, Emau P, Fultz PN, Isahakia M, Lenroot R, Myers G, Johnson PR., *A distinct African lentivirus from Sykes' monkeys*. Journal of Virology, 1993. **67**(3): p. 1517-1528.
87. Nermut MV, G.C., Hashmi S, Hockley DJ., *Further evidence of icosahedral symmetry in human and simian immunodeficiency virus*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993. **9**(10): p. 929-938.
88. Marx PA, M.R., Joy KI., *Computer emulation of thin section electron microscopy predicts an envelope-associated icosahedral capsid for human immunodeficiency virus*. Lab Invest, 1988. **58**(1): p. 112-118.
89. Modrow S, a.F.D., *Molekulare Virologie*. Spektrum Verlag, 1998.
90. Edward A. Berger, P.A.M.a.J.M.F., *Chemokine receptors as HIV-1 Coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease*. Annu. Rev. Immunol., 1999. **17**: p. 657-700.
91. Feng, Y., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G Protein-coupled* Science, 1996. **272**(5263): p. 872-877.

92. Alkhatib, G., *CC CKR5:A RANTES, MIP-1 alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1* Science, 1996. **272**(5270): p. 1955-1958.
93. Zhiwei Chen, P.Z., David D. Ho, Nathaniel R. Landau and Preston A. Marx, *Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry.* Journal of Virology, 1997. **71**(4): p. 2705-2714.
94. Wong-Staal, J.R.G.a.F., *HIV-2 and SIV vector systems.* Somatic Cell and Molecular Genetics, 2001. **26**(1/6): p. 83-98.
95. HongKui Deng, D.U., Vineet N. KewalRamani and Dan R. Littman, *Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses* Nature, 1997. **388**: p. 296-300.
96. al., E.A.B.e., *Unwelcomed guests with master keys: How HIV uses chemokine receptors for cellular entry* Virology, 1997. **235**(2): p. 179-190.
97. Robert Doms, a.S.C.P., *Unwelcomed guests with master keys: How HIV uses chemokine receptors for cellular entry* Virology, 1997. **235**(2): p. 179-190.
98. William A. O'Brien, Y.K., Ali Namazie, Ji-Qi Zhao, Amadou Diagne, Ken Ldler, Jerome A. Zack and Irvin S. Y. Chen, *HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding doain.* Nature, 1990. **348**: p. 69-73.
99. Peterlin, W.C.G.a.B.M., *Charting HIV's remakable vayage through the cell:basic science as a passport to future therapy* Nature Medicine, 2002. **8**(7): p. 673-680.
100. Michael D. Miller, C.M.F., and Frederic D. Bushman, *Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition.* Journal of Virology, 1997. **71**(7): p. 5382-5390.
101. Gallay P, H.T., Chin D, Trono D., *HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway.* PNAS, 1997. **94**(18): p. 9825-9830.
102. Heinzinger, N.K., et al., *The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7311-5.
103. Haffar Omar K., P.S., Dubrovsky Larisa, Agostini Isabelle, Tang Hao, Pushkarsky Tatiana, Nadler Steven G. and Bukrinsky Michael, *Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex.* Journal of Molecular Biology, 2000. **299**: p. 359-368.
104. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.* Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
105. T., K., *Lentivirus vectors: difficulties and hopes before clinical trials.* Curr. Opin. Mol. Ther., 2001. **3**(4): p. 316-326.
106. Pfeifer A, I.M., Dayn Y, Verma IM., *Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos.* PNAS, 2002. **99**(4): p. 2140-2145.
107. Vigna, E. and L. Naldini, *Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy.* J Gene Med, 2000. **2**(5): p. 308-16.
108. Naldini, L., *Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells.* Curr. Opin. Biotechnol., 1998. **9**(5): p. 457-463.
109. Zufferey R, N.D., Mandel RJ, Naldini L, Trono D., *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo.* Nat. Biotechnol., 1997. **15**(9): p. 871-875.
110. Zufferey, R., et al., *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery.* J Virol, 1998. **72**(12): p. 9873-80.
111. Bukovsky AA, S.J., Naldini L., *Interaction of human immunodeficiency virus-derived vectors with wild-type virus in transduced cells.* Journal of Virology, 1999. **73**(8): p. 7087-7092.

112. Antonia Follenzi, L.E.A., Silvia Bakovic, Massimo Geuna and Luigi Naldini, *Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences*. *Nature Genetics*, 2000. **25**: p. 217-222.
113. Bonci, D., *'Advanced' generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction in vitro and in vivo*. *Gene Therapy*, 2003. **96**(8): p. 630-636.
114. Massimiliano Manganini, M.S., Federica Bambacioni, Chiara Casati, Eugenio Erba, Antonia Follenzi, Luigi Naldini, Sergio Bernasconi, Giuseppe Gaipa, Alessandro Rambaldi, Andrea Biondi, Josee Golay and Martino Introna, *A human immunodeficiency virus type 1 pol gene-derived sequence (cPPT/CTS) increases the efficiency of transduction of human nondividing monocytes and T lymphocytes by lentiviral vectors*. *Human Gene Therapy*, 2002. **13**: p. 1793-1807.
115. Aude Sirven, F.P., Véronique Zennou, Monique Titeux, William Vainchenker, Laure Coulombel, Anne Dubart-Kupferschmitt, and Pierre Charneau, *The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells*. *Blood*, 2000. **96**(13): p. 4103-4110.
116. Christopher M. Owens, P.C.Y., Heinrich Göttlinger and Joseph Sodroski, *Human and simian immunodeficiency virus capsid proteins are major viral determinants of early, postentry replication blocks in simian cells*. *Journal of Virology*, 2003. **77**(1): p. 726-731.
117. Carsten Münck, S.M.B., Ginger Lucero and Nathaniel R. Landau, *A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells*. *PNAS*, 2002. **99**(21): p. 13843-13848.
118. Simone Cowan, T.H., Tsahaka Cunningham, Mark A. Muesing, Heinrich G. Gottlinger and Paul D. Bieniasz, *Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism*. *PNAS*, 2002. **99**(18): p. 11914-11919.
119. Neeltje A. Koostra, C.M., Nina Tonnu, Nathaniel R. Landau and Inder M. Verma, *Abrogation of postentry restriction of HIV-1-based lentiviral vector transduction in simian cells*. *PNAS*, 2002. **100**(3): p. 1298-1303.
120. Matthew Stremlau, C.M.O., Michel J. Perron, Michael Kiessling, Patrick Autissier and Joseph Sodroski, *The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in old world monkeys*. *Nature*, 2004. **427**: p. 848-853.
121. R. Sakuma, J.N., S. Ohmine and Y. Ikeda, *Inhibition of HIV-1 replication by simian restriction factors, TRIM5 alpha and APOBEC3G*. *Gene Therapy*, 2007. **14**: p. 185-189.
122. Riri Shibata, H.S., Meiko Kawamura, Kenzo Tokunaga and Akido Adachi, *Early replication block of human immunodeficiency virus type 1 in monkey cells*. *Journal of General Virology*, 1995. **76**: p. 2723-2730.
123. Wolfgang Hofmann, D.S., Jason LaBonte, Linda Munson, Susan Gibson, Jonathan Scammell, Paul Ferrigno and Joseph Sodroski, *Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection*. *Journal of Virology*, 1999. **73**(12): p. 10020-10028.
124. Laura M. J. Ylinen, Z.K., Sam J. Wilson, Srinika Ranasinghe and Greg J. Towers, *Differential restriction of human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVmac by TRIM5alpha alleles*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(18): p. 11580-11587.
125. Gruh, I., et al., *Shuttle system allowing simplified cloning of expression cassettes into 'advanced' generation lentiviral vectors*. *Biotechniques*, 2005. **38**(4): p. 530-534.
126. D. Nègre, P.-E.M., G. Duisit, S. Blanchard, P.-O. Vidalain, P. Leissner, A-J Winter, C. Rouboudin-Combe, M. Mehtali, P. mouiller, J-L. Darlix and F-L. Cosset, *Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells*. *Gene Therapy*, 2000. **7**: p. 1613-1623.

127. KR Boheler, a.A.W., *Myocardial aging and stem cell biology*. In: Mattson MP, van Zant G, eds. *Stem Cells: A Cellular Foundation of Youth?* New York, NY: Elsevier Science 2002: p. 141-177.
128. Kolossov E, F.B., Liu Q, Bloch W, Viatchenko-Karpinski S, Manzke O, Ji GJ, Bohlen H, Addicks K and Hescheler J, *Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein*. J Cell Biol, 1998. **143**: p. 2045-2056.
129. Meyer N, J.M., Landopoulou A, Fort P, Pucéat M., *A fluorescent reporter gene as a marker for ventricular specification in ES-derived cardiac cells*. FEBS Letters, 2000. **478**(1-2): p. 151-158.
130. Shubeita HE, M.E., Van Bilsen M, Chien KR, Brown JH., *Transcriptional activation of the cardiac myosin light chain 2 and atrial natriuretic factor genes by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes*. PNAS, 1992. **89**(4): p. 1305-1309.
131. Glasser SW, B.M., Eszterhas SK, Bruno MD, Korfhagen TR., *Human SP-C gene sequences that confer lung epithelium-specific expression in transgenic mice*. 2000, 2000. **278**(5): p. L933-L945.
132. Zang MX, L.Y., Wang H, Wang JB, Jia HT., *Cooperative interaction between the basic helix-loop-helix transcription factor dHAND and myocyte enhancer factor 2C regulates myocardial gene expression*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54258-54263.
133. Stennard FA, C.M., Elliott DA, Rankin S, Haast SJ, Lai D, McDonald LP, Niederreither K, Dolle P, Bruneau BG, Zorn AM, Harvey RP., *Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart*. Dev Biol, 2003. **262**(2): p. 206-224.
134. Atlas SA, K.H., Camargo MJ, Volpe M, Laragh JH, Lewicki JA and a.M. T, *Atrial natriuretic factor (auriculin): structure and biological effects*. Journal of Clinical Hypertension, 1985. **1**(2): p. 187-198.
135. Durocher D, C.C., Ardati A, Schwartz RJ and Nemer M, *The atrial natriuretic factor promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium*. Molecular and Cellular Biology, 1996. **16**(9): p. 4648-4655.
136. Christoffels VM, H.P., Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, Bao ZZ, Palmer S, Biben C, Harvey RP, Moorman AF., *Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart*. Dev Biol, 2000. **223**(2): p. 266-278.
137. K., F., *Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering*. Artif Organs, 2001. **25**(3): p. 187-193.
138. Lyons I, P.L., Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP., *Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5*. Genes Dev, 1995. **9**(13): p. 1654-1666.
139. Zhu H, G.A., Ross RS, Evans SM, Chien KR., *A conserved 28-base-pair element (HF-1) in the rat cardiac myosin light-chain-2 gene confers cardiac-specific and alpha-adrenergic-inducible expression in cultured neonatal rat myocardial cells*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(4): p. 2273-2281.
140. Zou Y, C.K., *EFIA/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(6): p. 2972-2982.
141. Shen RA, G.S., Mascareno E, Kumar A, Siddiqui MA., *Tissue-specific transcription of the cardiac myosin light-chain 2 gene is regulated by an upstream repressor element*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1676-1685.
142. Glasser SW, K.T., Bruno MD, Dey C, Whitsett JA., *Structure and expression of the pulmonary surfactant protein SP-C gene in the mouse*. J Biol Chem, 1990. **265**(35): p. 21986-21991.
143. Aurisicchio L, D.L.R.a.Z.M.I., *Identification of the thyroid*

- transcription factor-1 as a target for rat MST2 kinase. J Biol Chem, 1998. 273(3): p. 1477-1482.*
144. Wert SE, G.S., Korfhagen TR, Whitsett JA., *Transcriptional elements from the human SP-C gene direct expression in the primordial respiratory epithelium of transgenic mice. Dev Biol, 1993. 156(2): p. 426-443.*
 145. Nettelbeck DM, J.V.a.M.R., *A strategy for enhancing the transcriptional activity of weak cell type-specific promoters. Gene Ther, 1998. 5: p. 1656-1664.*
 146. Boshart, M., et al., *A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell, 1985. 41(2): p. 521-30.*
 147. Kothary R, B.S., Franz T, Norris ML, Hettle S, Surani MA, *Unusual cell specific expression of a major human cytomegalovirus immediate early gene promoter-lacZ hybrid gene in transgenic mouse embryos. Mech dev, 1991. 35(1): p. 25-31.*
 148. Bain M, M.M., Sinclair J., *Ets-2 Repressor Factor (ERF) mediates repression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter in undifferentiated non-permissive cells. J Gen Virol, 2003. 84(Pt 1): p. 41-49.*
 149. Liu Ru, B.J., Sissons JG Patrick and Sinclair John, *The transcription factor YY1 binds to negative regulatory elements in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter and mediates repression in nonpermissive cells. Nucleic Acid Research, 1994. 22(13): p. 2453-2459.*
 150. Liu BH, W.X., Ma YX and Wang S, *CMV enhancer/human PDGF- β promoter for neuron-specific transgene expression. Gene Ther, 2004. 11: p. 52-60.*
 151. Li X, E.E., Schwartz RJ and Draghia-Akli R, *Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. Nat Biotechnol, 1999. 17: p. 241-245.*
 152. Kobayashi, M., Tanaka A, Hayashi Y and Shimamura S *The CMV enhancer stimulates expression of foreign genes from human EF-1 α Promoter. Analytical Biochemistry, 1997. 247: p. 179-181.*
 153. Chung S, A.T., Sonntag KC, Bjorklund L, Isacson O and Kim KS, *Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. Stem Cells, 2002. 20: p. 139-145.*
 154. Ward, C.M.a.S., P.L, *The human cytomegalovirus immediate-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse embryonic stem cells. Stem Cells, 2002. 20(5): p. 472-475.*
 155. Hong S, H.D., Yoon S, Isacson O, Ramezani A, Hawley RG, Kim KS., *Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. Mol Ther, 2007. 15(9): p. 1630-1639.*
 156. Keating A, H.W.a.H.R., *Effect of different promoters on expression of genes introduced into hematopoietic and marrow stromal cells by electroporation. Experimental Hematology, 1990. 18: p. 99-102.*
 157. Makrides, S., *Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. Protein Expr Purif, 1999. 17: p. 183-202.*
 158. Kothari S, B.J., Sissons JGP and Sinclair JH, *The 21bp repeat element of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer is a negative regulator of gene expression in undifferentiated cells. Nucleic Acid Research, 1991. 19(8): p. 1767-1771.*
 159. Shelbourn SL, K.S., Sissons JGP and Sinclair JH, *Repression of human cytomegalovirus gene expression associated with a novel immediate early region binding factor. Nucleic Acid Research, 1989. 17(22): p. 9165-9171.*
 160. Kim JH, D.H., Choi SJ, Cho HJ, Park KH, Yang HM, Lee SH, Kim DK, Kwack K, Oh SK, Moon SY, Cha KY and Chung HM, *Efficient gene delivery in differentiated human embryonic stem cells Exp and Molec Med, 2005. 37(1): p. 36-44.*

161. Hamaguchi I, W.N.-B., Panagopoulos I, Andersson E, Mikkola H, Fahlman C, Zufferey R, Carlsson L, Trono D and Karlsson S, *Lentivirus gene expression during ES cell-derived hematopoietic development in vitro*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10778-10784.
162. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 509-544.
163. Prasher DC, E.V., Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ., *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene, 1992. **111**(2): p. 229-233.
164. Chalfie M, T.Y., Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-805.
165. Zhang J, C.R., Ting AY, Tsien RY., *Creating new fluorescent probes for cell biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(12): p. 906-918.
166. Heim, R., A.B. Cubitt, and R.Y. Tsien, *Improved green fluorescence*. Nature, 1995. **373**(6516): p. 663-664.
167. Hanazono Y, Y.J., Dunbar CE and Emmons RV, *Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage*. Hum Gene Therapy, 1997. **8**(11): p. 1313-1319.
168. Ormö M, C.A., Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1392-1395.
169. Matz MV, F.A., Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA., *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Athozoa species*. Nature Biotechnology, 1999. **17**(10): p. 969-973.
170. Labas YA, G.N., Yanushevich YG, Fradkov AF, Lukyanov KA, Lukyanov SA, Matz MV., *Diversity and evolution of the green fluorescent protein family*. PNAS, 2002. **99**(7): p. 4256-4261.
171. Wall, M.A., M. Socolich, and R. Ranganathan, *The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(12): p. 1133-1138
172. Yang F, M.L., Phillips GN Jr., *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nature Biotechnology, 1996. **14**(10): p. 1246-1251.
173. Yarbrough D, W.R., Kallio K, Matz MV, Remington SJ, *Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0 Å resolution*. PNAS, 2001. **98**(2): p. 462-467.
174. Cormack BP, B.G., Egerton M, Gow NA, Falkow S, Brown AJ., *Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in Candida albicans*. Microbiology, 1997. **143**(Pt2): p. 303-311.
175. Cramer A, W.E., Tate E, Stemmer WP., *Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling*. Nature Biotechnology, 1996. **14**(3): p. 315-319.
176. Más P, D.P., Panda S, Kay SA., *Functional interaction of phytochrome B und cytochrome 2*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 207-211.
177. Pereira G, T.T., Nasmyth K, Schiebel E., *Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex*. EMBO, 2001. **20**(22): p. 6259-6370.
178. Rodrigues F, v.H.M., Steensma HY, Côte-Real M, Leão C., *Red fluorescent protein (DsRed) as a reporter in Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 2001. **183**(12): p. 3791-3794.
179. Verkhusha VV, O.H., Awasaki T, Oda H, Tsukita S, Ito K., *An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 29621-29624.
180. Knop M, B.F., Riedel GC, Heckel T and Reichel C, *Improved version of the red fluorescent protein (drFP583/DsRed/RFP)*. Biotechniques, 2002. **33**: p. 592-602.

181. Scherr M, B.K., Blomer U, Ganser A and Grez M, *Quantitative determination of lentiviral vector particle numbers by real-time PCR*. Biotechniques, 2001. **31**: p. 520-524.
182. Hanawa H, H.P., Keyvanfar K, Metzger ME, Krouse A, Donahue RE, and G.J. Kepes S, Dunbar CE, Persons DA, Nienhuis AW., *Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4062-4069.
183. Claycomb, W.C., et al., *HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2979-84.
184. Wikenheiser, K.A., et al., *Production of immortalized distal respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/simian virus 40 large tumor antigen transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11029-33.
185. Fehling HJ, L.G., Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G and Kouskoff V, *Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation*. Development, 2003. **130**: p. 4217-4227.
186. Wernig M, M.A., Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE and Jaenisch R, *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. Nature, 2007. **448**: p. 318-324.
187. Okita K, I.T.a.Y.S., *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**: p. 313-317.
188. Meissner A, W.M.a.J.R., *Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells*. Nature Biotechnology, 2007. **25**: p. 1177-1181.
189. Takahashi K, a.S.Y., *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**: p. 663-676.
190. Maherli N, S.R., Xie W, Utikal J, Eminili S, Arnold K, *Global epigenetic remodeling in directly reprogrammed fibroblasts*. Cell Stem Cell. **1**: p. 55-70.
191. Sawicki JA, M.R., Monks B, Sakai K, Miyazaki J., *A composite CMV-IE enhancer/beta-actin promoter is ubiquitously expressed in mouse cutaneous epithelium*. Exp Cell Res, 1998. **244**(1): p. 367-369.
192. Kumar, M., et al., *Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(15): p. 1893-905.
193. Lieber, M., et al., *A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells*. Int J Cancer, 1976. **17**(1): p. 62-70.
194. Germann, P.G., et al., *In vitro induction of type II pneumocyte-related differentiation in a clonal fetal bronchiolo-alveolar epithelial cell line (M3E3/C3)*. Exp Toxicol Pathol, 1993. **45**(5-6): p. 315-24.
195. Driscoll, K.E., et al., *Establishment of immortalized alveolar type II epithelial cell lines from adult rats*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1995. **31**(7): p. 516-27.
196. Yoshimi, T., et al., *Changes in lung-specific molecular expression during differentiation of hamster embryonic M3E3/C3 cell line*. Biochem Cell Biol, 2000. **78**(6): p. 659-66.
197. Vaporidi, K., et al., *Effects of hypoxia and hypercapnia on surfactant protein expression proliferation and apoptosis in A549 alveolar epithelial cells*. Life Sci, 2005. **78**(3): p. 284-93.
198. Bachurski, C.J., et al., *Nuclear factor I family members regulate the transcription of surfactant protein-C*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32759-66.
199. Bachurski, C.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha inhibits surfactant protein C gene transcription*. J Biol Chem, 1995. **270**(33): p. 19402-7.
200. Kelly, S.E., et al., *Transcription of the lung-specific surfactant protein C gene is mediated by thyroid transcription factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 6881-8.

201. Lin, S., A.K. Perl, and J.M. Shannon, *Erm/thyroid transcription factor 1 interactions modulate surfactant protein C transcription*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16716-26.
202. Glasser, S.W., et al., *Human SP-C gene sequences that confer lung epithelium-specific expression in transgenic mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(5): p. L933-45.
203. Schwanke K, W.S., Reppel M, Winkler ME, Mattzkies M, Itskovitz-Eldor J, Simon AR, Hescheler J, Haverich A, Martin U, *Generation and Characterization of Functional Cardiomyocytes from Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells*. Stem Cells, 2006. **24**(6): p. 1423-1432.
204. Gruh, I., et al., *Shuttle System allowing simplified cloning of expression cassettes into advanced generation lentiviral vectors*. Biotechniques, 2005. **38**(4): p. 530-534.
205. Kumar M, K.B., Makalou N and Sutton RE, *Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2001. **12**: p. 1893-1905.
206. Cornetta K, a.A.W., *Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy*. J of Virological Methods, 1989. **23**(2): p. 187-194.
207. Seitz B, B.E., Gordon E, Anderson W, LaBree L and McDonnell P, *Retroviral vector-mediated gene transfer into keratocytes: in vitro effects of polybrene and protaminsulfate*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998. **236**(8): p. 602-612.
208. Zeng X, C.J., Sanchez JF, Coggiano M, Dillon-Carter O, Petersen J and Freed WJ, *Stable expression of hrGFP by mouse embryonic stem cells: promotor activity in the undifferentiated state and during dopaminergic neural differentiation*. Stem Cells, 2003. **21**: p. 647-653.
209. Galic Z, K.S., Kacena A, Subramanian A, Burke B, Cortado R and Zack JA, *T lineage differentiation from human embryonic stem cells*. PNAS, 2006. **103**(1): p. 11742-11747.
210. Hinton A, F.T.a.H.A., *Transduction of human embryonic stem cells with lentiviral vectors: variable promotor activity in pluripotent cells*. Mol Ther, 2004. **9**: p. 154.
211. Eiges R, S.M., Drukker M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J and Benvenisty N, *Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells*. Curr Biol, 2001. **11**: p. 514-518.
212. Fluckiger A-C, M.G., Marchand M, Nègre D, Cosset F-L, Mitalipov S, Wolf D, Savatier P and Dehay C, *Cell cycle features of primate embryonic stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**: p. 547-556.
213. Kolossov E, F.B., Liu Q, Bloch W, Viatchenko-Karpinski S, Manzke O, Ji GJ, Bohlen H, Addicks K and Hescheler J, *Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein*. J Cell Biol, 1998. **143**: p. 2045-2056.
214. Hidaka K, L.J., Kim HS, Ihm CH, Iio A, Ogawa M, Nishikawa S, Kodama I, Morisaki T., *Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells*. FASEB J, 2003. **17**(6): p. 740-742.
215. Gassanov N, E.F., Zagidullin N and Hoppe UC, *Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype*. FASEB J, 2004. **18**: p. 1710-1712.
216. Huber I, I.I., Caspi O, Arbel G, Tzukerman M, Grepstein A, Habib M, Yankelson L, Kehat I and Grepstein L, *Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation*. FASEB J, 2007. **21**: p. 2551-2563.
217. Franz WM, B.D., Klingel K, Brem G, Hofschneider PH and Randolph R, *Heart specific targeting of firefly luciferase by myosin light chain promoter and developmental regulation in transgenic mice*. Circ Res, 1993. **73**: p. 629-638.
218. Su H, J.S., Huang Y, Barcena A, Arakawa-Hoyt J, Grossman W, Kan YW., *Adeno-associated viral vector delivers cardiac-specific and hypoxia-inducible VEGF expression in ischemic mouse hearts*. PNAS, 2004. **101**(46): p. 16280-16285.

219. Boecker W, B.O., Wu JC, Zhu X, Sawa T, Grazette L, Rosenzweig A, del Monte F, Schmidt U, Hajjar RJ., *Cardiac-specific gene expression facilitated by an enhanced myosin light chain promoter*. Mol Imaging, 2004. **3**(2): p. 69-75.
220. Knowlton KU, B.E., Ross RS, Harris AN, Henderson SA, Evans SM, Glembotski CC, Chien KR., *Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression*. J Biol Chem, 1991. **266**(12): p. 7759-7768.
221. Wobus A M, W.G.a.H.J., *Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers*. Differentiation, 1991. **48**: p. 173-182.
222. Sachinidis A, F.B.K., Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H and Hescheler, *Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells*. Cardiovasc Res, 2003. **58**: p. 278-291.
223. Miller-Hance WC, L.M., Fuller SJ, Evans SM, Lyons G, Schmidt C, Robbins J and Chien KR, *In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is dependent of heart tube formation*. J Biol Chem, 1993. **268**: p. 25244-25252.
224. Maltsev VA, R.J., Hescheler J and Wobus AM, *Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types*. Mech dev, 1993. **44**: p. 41-50.
225. Metzger JM, L.W., Johnston RA, Wetsfall MV and Samuelson LC, *Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis* Circ Res, 1995. **76**: p. 710-719.
226. Doevendans PA, K.S., An RH, Becker DK, Chien KR and Kaas R, *Differentiation of cardiomyocytes in floating embryoid bodies is comparable to fetal cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**: p. 839-851.
227. He J-Q, M.Y., Lee Y, Thomson JA and Kamp TJ, *Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes (Action potential characterization)*. Circ Res, 2003. **93**: p. 32-39.
228. Sartiani L, B.E., Stillitano F, Mugelli A, Cerbai E and Jaconi W, *Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach*. Stem Cells, 2007. **25**: p. 1136-1144.
229. Lee KJ, R.R., Rockman HA, Harris AN, O'Brien TX, van Bilsen M, Shubeita HC, Randolph R, Brem G, Price J and et al., *Myosin light chain-2 luciferase transgenic mice reveal distinct regulatory programs for cardiac and skeletal muscle-specific expression of a single contractile protein gene*. J Biol Chem, 1992. **267**: p. 15875-15885.
230. Zammit PS, K., Franco D, Brown N, Moorman AF and Buckingham ME, *Suppression of atrial myosin gene expression occurs independently in the left and right ventricles of the developing mouse heart*. Dev Dyn, 2000. **217**: p. 75-85.
231. De Palma M, V.M., Roca C and Naldini L, *Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells*. Nat Med, 2003. **9**: p. 789-795.
232. Liu BH, W.X., Ma YX, Wang S., *CMV enhancer/human PDGF-beta promoter for neuron-specific transgene expression*. Gene Ther, 2004. **11**(1): p. 52-60.
233. Badrian B, a.B.M., *Changes in the transcriptional profile of cardiac myocytes following green fluorescent protein expression*. DNA and Cell Biology, 2007. **26**(10): p. 727-736.

234. Nishimura S, N.S., Sata M, Katoh M, Yamashita H, Saeki Y, Nagai R and Sugiura S, *Expression of green fluorescent protein impairs the force-generating ability of isolated rat ventricular cardiomyocytes*. Mol Cell Biochem, 2006. **286**(1-2): p. 59-65.
235. Navarro-Galve B, V.A., Bueno C, Thompson L, Johansen J and Martínez-Serrano A and *Gene marking of human neural stem/precursor cells using green fluorescent proteins* The Journal of Gene Medicine, 2004. **7**(1): p. 18-29.
236. Duisit G, C.H., Saleun S, Folliot S, Provost N, Cosset FL, Sandrin V, Moullier P and Rolling F, *Five Recombinant Simian Immunodeficiency Virus Pseudotypes Lead to Exclusive Transduction of Retinal Pigmented Epithelium in Rat* Mol Ther, 2002. **6**(4): p. 446-454.
237. Vallier L, R.-G.P., Bouhon IA, Andersson FK, Sadler AJ and Pedersen RA, *Enhancing and diminishing gene function in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2004. **22**: p. 2-11.
238. Stratagene, *Don't Let a Toxic GFP Skew Your Results!*. Stratagies.
239. Gazdar, A.F., et al., *Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines*. Cancer Res, 1990. **50**(17): p. 5481-7.
240. Ikeda, K., et al., *Gene structure and expression of human thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(14): p. 8108-14.
241. Beers, M.F., C.A. Lomax, and S.J. Russo, *Synthetic processing of surfactant protein C by alevolar epithelial cells. The COOH terminus of proSP-C is required for post-translational targeting and proteolysis*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 15287-93.
242. Mendelson, C.R., *Role of transcription factors in fetal lung development and surfactant protein gene expression*. Annu Rev Physiol, 2000. **62**: p. 875-915.
243. Fujita, J., et al., *Expression of thyroid transcription factor-1 in 16 human lung cancer cell lines*. Lung Cancer, 2003. **39**(1): p. 31-6.
244. O'Reilly MA, W.T., Pilot-Matias TJ, Sarin VK, Gazdar AF, Whitsett JA., *In vitro translation, post-translational processing and secretion of pulmonary surfactant protein B precursors*. Biochim Biophys Acta, 1989. **1011**(2-3): p. 140-148.
245. An DS, W.R., Agricola BA, Metzger ME, Lu S, Amado RG, Chen ISY and Donahue RE, *Marking and Gene Expression by a Lentivirus Vector in Transplanted Human and Nonhuman Primate CD341 Cells*. J of Virology, 2000. **74**(3): p. 1286-1295.
246. Hofmann W, S.D., LaBonte J, Munson L, Gibson S, Scammell J, Ferrigno P and Sodroski J, *Species-specific postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection*. J of Virology, 1999. **73**(12): p. 10020-10028.
247. Koostra N, M.C., Tonnu N, Landau NR and Verma IM, *Abrogation of postentry restriction in simian cells*. PNAS, 2003. **100**(3): p. 1298-1303.
248. Stremlau M, O.C., Perron MJ, Kiessling M, Autissier P and Sodroski J, *The cytoplasmatic body component TRIM5a restricts HIV-1 infection in old world monkeys*. Nature, 2004. **427**: p. 848-853.
249. Byeongwoon Song, H.J., Michel Perron, Do Hyun Park, Matthew Stremlau and Joseph Sodroski, *Retrovirus restriction by TRIM5 alpha variants from old world and ne world primates*. Journal of Virology, 2005. **79**(7): p. 3930-3937.
250. Chatterji U, B.M., Gaskill P, Sheeter D, Fox H and Gallay PA, *Trim5alpha accelerates degradation of cytosolic capsid associated with productive HIV-1 entry*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 37025-37033.
251. Owens CM, Y.P., Göttlinger H and Sodroski J, *Human and simian immunodeficiency virus capsid proteins are major viral determinants of early, pstentry replication blocks in simian cells*. J Virol, 2003. **77**(1): p. 726-731.

252. Münk C, B.S., Lucero G and Landau NR, *A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells*. PNAS, 2002. **99**(21): p. 13843-13848.
253. Philippe-Emmanuel Mangeot, D.N., Bertrand Dubois, Arend J. Winter, Philippe Leissner, Majid Mehtali, Dominique Kaiserlian, Francois-Loic Cosset and Jean-Luc Darlix, *Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells*. Journal of Virology, 2000. **74**(18): p. 8307-8315.
254. Schnell T, F.P., Wirth M, Munch J and Uberla K, *Development of self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(3): p. 439-447.
255. Asano T, H.Y., Ueda Y, Muramatsu S-I, Kume A, Suemori H, Suzuki Y, Kondo Y, Harii K, Hasegawa M, Nakatsuji N and Ozawa K, *Highly efficient gene transfer into embryonic stem cells with a simian lentivirus vector*. Mol Ther, 2002. **6**(2): p. 162-168.
256. Nakajima T, N.K., Ido E, Terao K, Hayami M and Hasegawa M, *Development of novel simian immunodeficiency virus vectors carrying a dual gene expression system*. Hum Gene Ther, 2000. **11**: p. 1863-1874.
257. Mühlebach M D, W.N., Schüle S, Tschulena U, Sanzenbacher R, Flory E, Cichutek K and Schweizer M, *Stable transduction of primary human monocytes by simian lentiviral vector PBj*. Mol Ther, 2005. **12**: p. 1206-1216.
258. Ohmori T, M.J., Takano K, Madoiwa S, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Niimura M, Mitomo K, Tabata T, Hasegawa M, Ozawa K and Sakata Y, *Efficient expression of a transgene in platelets using simian immunodeficiency virus-based vector harboring glycoprotein Ib alpha promoter: in vivo model for platelet-targeting gene therapy*. FASEB J, 2006. **20**: p. E769-E779.
259. Mangeot PE, D.K., Nègre D, Boson B, Rigal D, Cosset FL and Darlix JL, *High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors*. Mol Ther, 2002. **5**(3): p. 283-290.
260. Yoshioka T, A.N., Shibeta H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K and Hanazono Y, *Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model*. Stem Cells, 2005. **23**: p. 355-364.
261. R Kornfeld, e.a., *Cloning of HTLV-4 and its relation to simian and human immunodeficiency viruses*. Nature, 1987. **326**: p. 610-613.
262. Kim S, K.G., Miyoshi H, Moon S-H, Ahn SE, Lee JH, Lee HJ, Cha K-Y and Chung HM, *Efficiency of the elongation factor-1alpha promoter in mammalian embryonic stem cells using lentiviral gene delivery systems*. Stem Cells and Development, 2007. **16**: p. 537-545.
263. Hadjantonakis A-K, M.S.a.N.A., *Embryonic stem cells and mice expression different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal*. BMC Biotechnology, 2002. **2**: p. 11-19.
264. Liew C-G, D.J., Walsh J, Moore H and Andrews PW, *Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2007. **25**: p. 1521-1528.
265. Xia X, Z.Y., Zieth C and Zhang S-C, *Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner*. Stem Cells and Development, 2007. **16**: p. 167-176.
266. Yao S, S.T., Kean T, Bharadwaj RR, Pasceri P and Ellis J, *Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications*. Mol Ther, 2004. **10**: p. 27-36.

267. Pannell D, O.C., Yao S, Sukonnik T, Pasceri P, Karaiskakis A, Okano M, Li E, Lipshitz HD and Ellis J, *Retrovirus vector silencing is de novo methylase independent and marked by a repressive histone code*. EMBO, 2000. **19**: p. 5884-5894.
268. Li CL, a.E.D., *The cHS4 chromatin insulator reduces gammaretroviral vector silencing by epigenetic modifications of integrated provirus*. Gene Therapy, 2008. **15**(1): p. 49-53.
269. Ellis, J., *Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors*. Hum Gene Ther, 2005. **16**: p. 1241-1246.
270. Vigneau C, P.K., Striker G, Elliot J, Hyink D, Weber O, Fehling H-J, Keller G, Burrow C and Wilson P, *Mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies generate progenitors that integrate long term into renal proximal tubules in vivo*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**: p. 1709-1720.
271. Gauillaume DJ, J.M., Li X-J and Zhang S-C, *Human embryonic stem cell-derived neural precursors develop into neurons and integrate into host brain*. Journal of Neuroscience Research, 2006. **84**: p. 1165-1176.
272. Araki K, I.T., Okuyama K, Oike Y and Yamamura K, *Efficiency of recombination by cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters*. J Biochem, 1997. **122**(5): p. 977-982.
273. Watanabe K, U.M., Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi J, Nishikawa S, Nishikawa A-I, Muguruma K and Sasai Y, *A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells*. Nature Biotechnology, 2007. **25**: p. 681-686.
274. Kolossov E, L.Z., Drobinskaya I, Gassanov N, Duan Y, Sauer H, Manzke O, Bloch W, Bohlen H, Hescheler J and Fleischmann BK, *Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes*. FASEB J, 2005.
275. Anderson D, S.T., Mellor IR, Goh G, Hill SJ and Denning C, *Transgenic enrichment of cardiomyocytes from human embryonic stem cells*. Mol Ther, 2007. **15**(11): p. 2027-2036.
276. Komuro I, I.S., *Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart*. PNAS, 1993. **90**(17): p. 8145-8149.
277. Lints TJ, P.L., Hartley L, Lyons I, Harvey RP., *Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants*. Development, 1993. **119**(2): p. 419-431.
278. Genove G, D.U., Xu H, Goins WF and Ahrens ET, *A new transgene reporter for in vivo magnetic resonance imaging*. Nat Med, 2005. **11**: p. 450-454.
279. Cohen B, D.H., Meir G, Harmelin A and Neeman M, *Ferritin as an endogenous MRI reporter for noninvasive imaging of gene expression in C6 glioma tumors*. Neoplasia, 2005. **7**(2): p. 109-117.
280. Cozzi A, C.B., Levi S, Santambrogio P, Albertini A and Arosio P, *Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells*. J of Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25122-25129.
281. Cao F, L.S., Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, Drukker M, Dylla SJ, Connolly AJ, Chen X, Weissman IL, Gambhir SS and Wu JC, *In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery*. Circ J, 2006. **113**: p. 1005-1014.
282. Wu JC, C.I., Sundaresan G, Min J-J, De A, Qiao J-H, Fishbein MC and Gambhir SS, *Molecular imaging of cardiac cell transplantation in living animals using optical bioluminescence and positron emission tomography*. Circ J, 2003. **108**: p. 1302-1305.
283. Nagai T, K.E., Park M, Kubotak K, Mikoshiba and Miyawaki A, *A variant of yellow fluorescent protein with and efficient maturation for cell-biological applications*. Nat Biotechnol, 2002. **20**: p. 87-90.

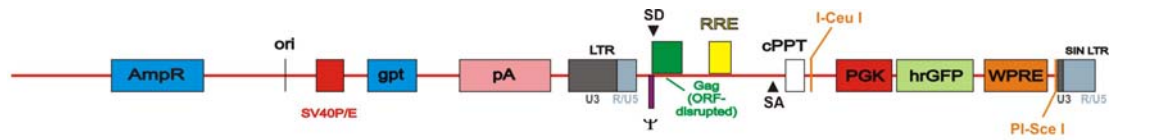
284. Okita C, S.M.a.S.T., *Generation of optimized yellow and red fluorescent proteins with distinct subcellular localization*. Biotechniques, 2004. **36**(3): p. 418-422.
285. Ngoi SM, C.A.a.L.C., *Exploiting internal ribosome entry site in gene therapy vector design*. Curr Gene Ther, 2004. **4**: p. 15-31.
286. Hasegawa K, C.A., Nakatsuji N, Suemori H., *Efficient multicistronic expression of a transgene in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1707-1712.
287. de Felipe P, M.V., Cortés ML, Ryan M, Izquierdo M., *Use of the 2A sequence from foot-and-mouth disease virus in the generation of retroviral vectors for gene therapy*. Gene Ther, 1999. **6**(2): p. 198-208.
288. Klump H, S.B., Vogt B, Ryan M, Ostertag W, Baum C., *Retroviral vector-mediated expression of HoxB4 in hematopoietic cells using a novel coexpression strategy*. Gene Ther, 2001. **8**(10): p. 811-817.
289. Chinnasamy D, M.M., Shaffer J, Neuenfeldt J, Shaaban AF, Margison GP, Fairbairn LJ, Chinnasamy N., *Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI*. Virol J, 2006. **3**(14): p. 1-16.
290. Zhou Y, A.J., Gottesman MM, Pastan I., *Co-expression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(3): p. 287-293.
291. Mizuguchi H, X.Z., Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T., *IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector*. Mol Ther, 2000. **1**(4): p. 376-382.
292. Grépin C, N.G., Nemer M., *Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor*. Development, 1997. **124**(12): p. 2387-2395.
293. Nakajima N, T.T., Kitamura R, Isodono K, Asada S, Ueyama T, Matsubara H and Oh H, *MicroRNA-1 facilitates skeletal myogenic differentiation without affecting osteoblastic and adipogenic differentiation*. Biochem Biophys Res Comm, 2006. **350**(4): p. 1006-1012.
294. Chen J-F, M.E., Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL and Wang D-Z, *The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation*. Nature Genetics, 2005. **38**: p. 228-233.
295. Kwon C, H.Z., Olson EN, Srivastava D., *MicroRNA1 influences cardiac differentiation in Drosophila and regulates Notch signaling*. PNAS, 2005. **27**(102): p. 18986-18991.
296. Zhao Y, R.J., Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D., *Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2*. Cell, 2007. **129**(2): p. 247-249.
297. Yong Zhao, E.S.a.D.S., *Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis*. Nature, 2005. **436**: p. 214-220.
298. Shrivastava, Keystone Meeting, 2007.
299. Ikegami M, W.J., Martis PC and Weaver TE, *Reversibility of lung inflammation caused by SP-B deficiency*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**: p. L962-L970.
300. Glasser SW, B.M., Korfhagen TR, Na C-L, Sly PD, Ross GF, Ikegami M and Whitsett JA, *Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice*. PNAS, 2001. **98**(11): p. 6366-6371.
301. Yu J, V.M., Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II and Thomson JA, *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-1920.
302. Takahashi K, T.K., Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K and Yamanaka S, *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**: p. 1-12.

303. Sandrin V, B.B., Salmon P, Gay W, Nègre D, Le Grand R, Trono D and Cosset F-L, *Lentiviral vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates*. *Blood*, 2002. **100**(3): p. 823-832.
304. Nakayama EE, M.H.a.S.T., *A dominant-negative effect of cynomolgus monkey tripartite motif protein TRIM5alpha on anti-simian immunodeficiency virus activity of an African green monkey orthologue*. *Virology*, 2006. **350**(1): p. 158-163.

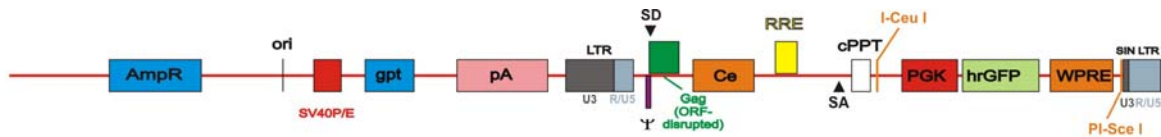
7. Anhang

Maßstabsgetreue Abbildungen der generierten pLentiShuttle-Vektoren zur Herstellung replikationsdefizienter Lentiviren abgeleitet vom HIV-1, die zirkulären Plasmide sind hier linearisiert dargestellt.

Vektoren mit ubiquitären Promotoren:

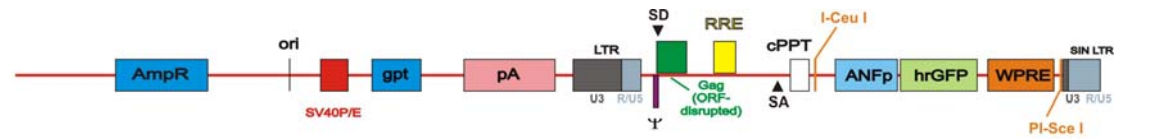


pLentiSh H mPGK hG W 10126 bp

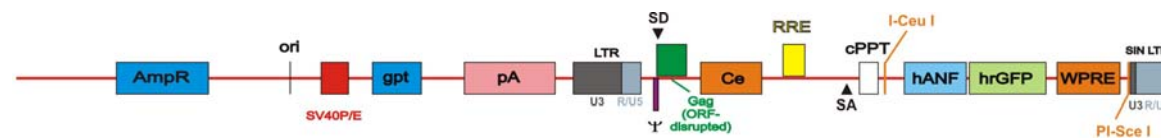


pLentiSh H Ce mPGK hG W 10774 bp

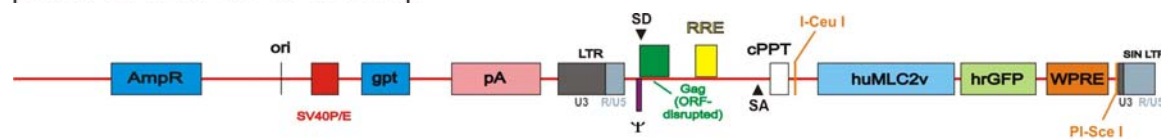
Vektoren mit kardialen Promotoren:



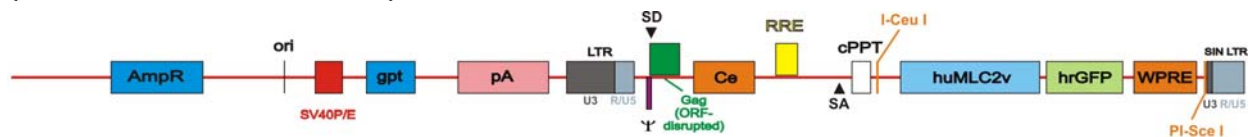
pLentiSh H hANF hAN hG W 10127 bp



pLentiSh H Ce hANF hG W 10765 bp

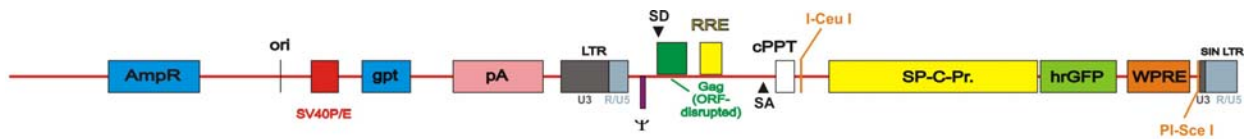


pLentiSh H hMLC2v hG W 10912 bp

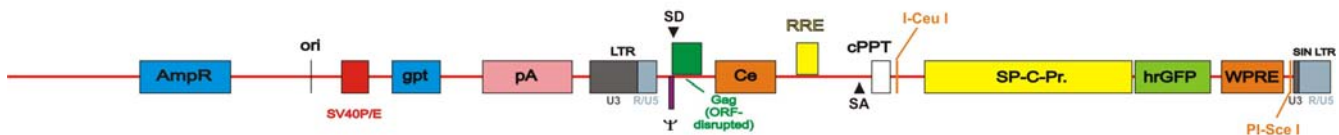


pLentiSh H Ce hMLC2v hG W 11560 bp

Vektoren mit AT2-spezifischem Promotor:

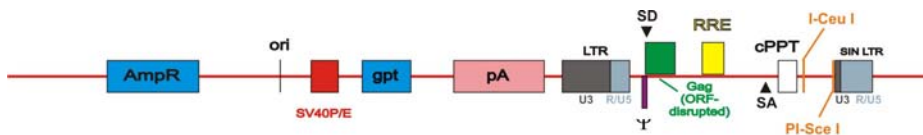


pIsh H Sp-C hGW 11587 bp

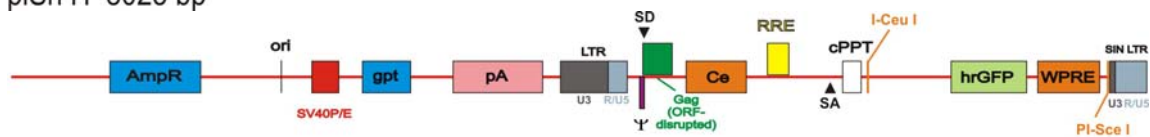


pIsh H Ce Sp-C hGW 12235 bp

Vektoren ohne Promotor:



pIsh H 8025 bp

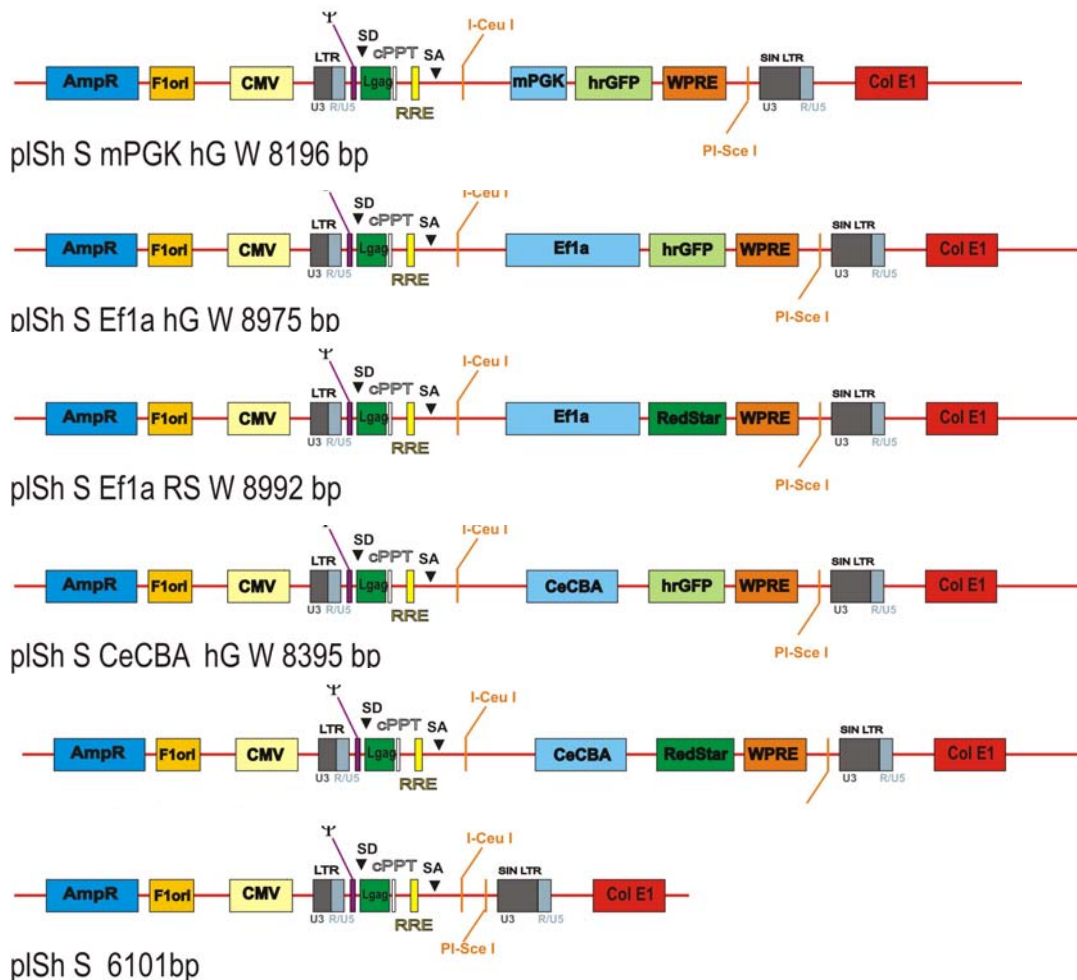


pIsh H Ce hG W

Abkürzungen: Amp^r, Ampicillinresistenz-Gen; cPPT, central polypurine tract; gpt, Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen; LTR, Long terminal repeat; ori, origin of replication / Replikationsstartpunkt; pA, Polyadenylierungssignal; Ψ, psi /packaging signal/Verpackungs-signal; RRE, rev responsive element; SA, Spleissakzeptorstelle; SD, Spleissdonorstellen; SIN LTR, selbst-inaktivierende LTR; SV40/E, simian virus 40 Promotor/Enhancer.

Maßstabsgetreue Abbildungen der generierten pLentiShuttle-Vektoren zur Herstellung replikationsdefizienter Lentiviren abgeleitet vom SIV_{mac}, die zirkulären Plasmide sind hier linearisiert dargestellt.

Vektoren mit ubiquitären Promotoren:



Abkürzungen: Amp^r, Ampicillinresistenz-Gen; cPPT, central polypurine tract; gpt, Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen; LTR, Long terminal repeat; ori, origin of replication / Replikationsstartpunkt; pA, Polyadenylierungssignal; Ψ, psi /packaging signal/Verpackungs-signal; RRE, rev responsive element; SA, Spleissakzeptorstelle; SD, Spleissdonorstellen; SIN LTR, selbst-inaktivierende LTR; SV40/E, simian virus 40 Promotor/Enhancer

8. Lebenslauf

Dipl.-Biol. Stephanie Wunderlich

Studium

<u>Promotion</u>	2004-2008	Promotion im Fachbereich Biologie and der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover zum Thema „Herstellung und Austestung gewebetypspezifischer lentiviraler Vektoren für die Anwendung in embryonalen Stammzellen“ angefertigt in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe -LEBAO- der Medizinischen Hochschule Hannover.
<u>Studium</u>	2001-2003	Studium des Studienganges Biologie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover mit dem Abschluss Dipl. Biologin.
	1998- 2001	Studium des Studienganges Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
<u>Diplomarbeit</u>	11/2003	„Herstellung lentiviraler Vektoren für die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und einer roten GFP-Variante“. Angefertigt in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe -LEBAO- der Medizinischen Hochschule Hannover.

Schulischer Werdegang

1990 – 1997	Mariengymnasium in Jever <u>Abschluss:</u> Allgemeine Hochschulreife
1988 – 1990	Orientierungsstufe in Jever
1986 – 1988	Paul-Sillus-Schule, Grundschule in Jever
1984 – 1986	Brüder- Grimm- Schule, Grundschule in Kronshagen

Ausbildung

1997 – Februar 1998 Ausbildung zur veterinär-medizinisch-technischen Assistentin
an der Staatlichen Berufsfachschule in Oberschleißheim

Praktikum

März 1998 – April 1998 Praktikum am Forschungsinstitut und Naturmuseum
Senckenberg in Wilhelmshaven

Stipendien

September 2003-September 2005 Stipendium des Studien Fonds der Aventis Foundation

9.1. Verzeichnis eigener Veröffentlichungen

9.1.1. Bisherige Publikationen

1. **Schwanke K, Wunderlich S, Reppel M, Winkler ME, Mattzkies M, Itskovitz-Eldor J, Simon AR, Hescheler J, Haverich A, Martin U**
Generation and Characterization of Functional Cardiomyocytes from Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells (**Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-1432**)
2. **Gruh I, Schwanke K, Wunderlich S, Blömer U, Scherr M, Ganser A, Haverich A, Martin U**
Shuttle System allowing simplified cloning of expression cassettes into advanced generation lentiviral vectors (**Biotechniques 2005; 38:530-534**)
3. **Wunderlich S, Gruh I, Winkler ME, Schwanke K, Heinke J, Blömer U, Ruhparwar A, Sohns B, Li R-K, Haverich A, Martin U**
Human CMV immediate-early enhancer: A useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors (**Journal of Gene Medicine 2008, 10(1): 21-32**)

4. **Wunderlich S, Gruh I, Winkler ME, Beier J, Radtke K, Schmiedl A, Groos S, Haverich A, Martin U**

Type II pneumocyte restricted GFP expression after lentiviral transduction of lung epithelial cells
(*Human Gene Therapy* 2008, 19: 39-51)

9.1.2. Abstracts

Schwanke K, Wunderlich S, Beskov A, Chikobava M, Simon AR, Lapin BA, Martin U. Derivation of Trophoectodermal Cells from Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells. Internal Meeting: Socchi, Russia, 2006.

Winkler ME, Kispert A, Menke S, Wunderlich S, Schwanke K, Beier J, Haverich A, Martin U. Differentiation of murine embryonic stem cells into alveolar type II epithelial Cells. Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs: Hanover, 2006; Keystone Symposium "Stem Cells": Colorado, USA, 2006; 3rd International Meeting Stem Cell Network North Rhine Westphalia: Münster, 2006.

Wunderlich S, Gruh I, Winkler ME, Schwanke K, Heinke J, Blömer U, Haverich A, Martin U. Development of lentiviral vectors mediating tissue specific transgene expression. Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs: Hanover, 2006; 4th Dutch-German Joint Meeting of Molecular Cardiology: Utrecht, 2006.

Schwanke K, Wunderlich S, Reppel M, Winkler ME, Mattzkies M, Groos S, Itskovitz-Eldor J, Simon AR, Hescheler J, Haverich A, Martin U. Generation and Characterization of Functional Cardiomyocytes from Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells. Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs: Hannover, 2006; Keystone Symposium "Stem Cells": Colorado, USA, 2006; 3rd International Meeting Stem Cell Network North Rhine Westphalia: Münster, 2006.

Schwanke K, Winkler ME, Wunderlich S, Schmiedl A, Miller K, Haverich A, Martin U. Molecular, ultrastructural and Immunhistological Characterization of Rhesus Monkey derived Stem Cell Line R336.4. Keystone Symposium "Stem Cells": Colorado, USA, 2004; 2nd International Meeting; Stem Cell Network North Rhine Westphalia: Bonn/Bad Godesberg, 2004; Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs: Hannover, 2004

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Martin für die vielen Anregungen, Ratschläge und Gespräche bedanken, die für das Gelingen der Arbeit ausschlaggebend waren. Bei Herrn Prof. Dr. W. Müller möchte ich mich sehr für die Übernahme der Begutachtung meiner Promotion bedanken. Herrn Prof. Dr. A. Haverich danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe an der MHH anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Kristin Schwanke, die über die ganze Zeit immer für mich da war. Vielen Dank für die exzellente Einarbeitung in die Geheimnisse der ESC Kultur und die tolle Betreuung. Was hätte ich nur ohne Dich gemacht! Danke für die vielen Gespräche, die Ausflüge in die Stadt und zu den Reitgeschäften in und um Hannover herum und die tolle Unterstützung in allen Lebenslagen. Und zu guter letzt für das unermüdliche Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Jennifer Beier bedanken. Vielen Dank, dass Du mich durch Deine tolle Zusammenarbeit und Deinen unermüdlichen Arbeitseinsatz so sehr unterstützt hast. Danke für die netten Gespräche und dass Du meine Einsamkeit im S2-Wunderland beendet hast.

Bei Ina Gruh möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, vor allem in Bezug auf die beiden im Verlauf der Promotion entstandenen Veröffentlichungen bedanken.

Bei Sandra Menke möchte ich mich für die vielen, vielen real time PCRs und bei Ruth Olmer und Alexandra Haase für die vielen „Urlaubsvertretungen“ in der Zellkultur bedanken. Allen dreien möchte ich für die Unterstützung während der heißen Phase der „Enhancer und Zelllinien paper“ Versuche danken. Alexandra danke ich zudem noch für das Korrekturlesen der Arbeit. Ingrid Schmidt-Richter möchte ich für die immunhistologischen Färbungen und die Isolation der neonatalen Rattenkardiomyozyten danken. Und ein Dankeschön an Monica Winkler für die nette Zusammenarbeit.

Dem restlichen Team des LEBAOs, danke ich für die abwechslungsreiche Zeit.

Ich bedanke mich bei der Aventis Foundation, die mich während der ersten zwei Jahre meiner Promotion unterstützt hat.

Natürlich haben auch viele Personen in meinem privaten Umfeld sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte Wiebke Ennen, Mirjam Hajen, Ralf Franke und Beate Schieffer dafür danken, dass sie immer für mich da waren und mir bei so vielen Problemen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Mirjam und Ralf möchte ich außerdem für die tolle Unterstützung bei meinem liebsten Hobby danken. In der Zeit mit Witus konnte ich immer wieder neue Kraft für die nicht immer leichte Zeit im Labor schöpfen. Wiebke möchte ich ganz besonders für ihre Freundschaft danken, die vielen vielen aufbauenden Gespräche und die für das Korrekturlesen!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Danke für die unendliche Unterstützung während der ganzen Zeit! Meinem Papa möchte ich danken, dass er immer und immer wieder montags so früh mit mir aufgestanden ist und für die mittlerweile unzähligen Fahrten zum und vom Bahnhof. Danke für Eure Geduld! Ohne Euch wären das Studium und diese Promotion nie möglich gewesen!

DANKE

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation

„Entwicklung und Austestung kardiomyozyten- bzw. pneumozytenspezifischer lentiviraler Vektoren für die Anwendung in embryonalen Stammzellen“

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

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

Hannover im Januar 2008

Stephanie Wunderlich