



**Veränderungen des Phänotyps und des
Differenzierungspotentials von
unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) aus
Nabelschnurblut nach
Behandlung mit epigenetischen Modifikatoren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Foued Ghanjati

aus Jendouba, Tunesien

Düsseldorf, November 2015

aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ)
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: **Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Simeon Santourlidis**

Koreferent: **Prof. Dr. Frank Wunderlich**

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2016

*„wenn du willst, dann kannst du mit dem Kopf
alles erreichen, beachte nur dabei, dass was du
tust, gut für dich und die anderen ist“*

„Rabiha Ouerghui. Meine Mutter“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Vorwort	10
1.2 Stammzellen	11
1.3 Fetale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (USSC)	12
1.4 Epigenetik und Stammzellen	13
1.4.1 Epigenetik	13
1.4.1.1 DNA-Methylierung	14
1.4.1.2 Histon-Modifikationen	17
1.4.2 Epigenetische Regulation in Stammzellen	20
1.4.3 Beeinflussung der zellulären Epigenetik mittels epigenetisch wirkender Agenzien	22
1.4.3.1 Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen	22
1.4.3.2 HDAC-Inhibitoren	24
1.5 Reprogrammierte Stammzellen	26
1.5.1 Somatischer Zellkerntransfer	26
1.5.2 Direkte Reprogrammierung	26
1.5.3 Epigenetische Reprogrammierung	29
1.6 Zielsetzung der Arbeit	32
2. Material und Methoden	34
2.1 Material	34
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	34
2.1.2 Materialien für die Zellkultur.....	35
2.1.3 Oligonukleotidprimer.....	35
2.1.4 Chemikalien und Enzyme	37
2.1.5 Kits.....	38
2.1.6 Bioinformatik	39
2.2 Methoden	40
2.2.1 Klonierungsmethoden	40
2.2.1.1 Herstellung von elektrokompenten E. coli SURE	40
2.2.1.2 Ligation	40
2.2.1.3 Elektroporation.....	40
2.2.1.4 Aufreinigungen der Plasmide	41
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	41
2.2.2.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	41
2.2.2.2 Genomische Sequenzierung	41
2.2.2.3 Reverse Transkription (RT-)PCR.....	42
2.2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
2.2.2.5 Real-Time-PCR.....	44
2.2.2.6 Methylierungsspezifische PCR (MSPCR)	45
2.2.2.7 Bisulfit-Konvertierung	45
2.2.2.8 Bisulfit-Sequenzierung und TA-Cloning	47
2.2.2.9 Agarosegelelektrophorese	48
2.2.2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration	48
2.2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und <i>western-blotting</i>	48

2.2.2.12	Methylierte DNA-Immunpräzipitation (MeDIP)	49
2.2.2.13	Genomweite Amplifikation WGA	49
2.2.2.14	DNA-Markierungen	50
2.2.2.15	Hybridisierung auf NimbleGen-Microarrays	50
2.2.2.16	Telomerlänge-Assay mittels <i>southern-Blot</i>	51
2.2.3	Bioinformatische Analysen	51
2.2.4	Zellkultur	52
2.2.4.1	Mycoplasmentest.....	52
2.2.4.2	Zellkultivierung, Passagieren und Zählung.....	52
2.2.4.3	RNA und DNA-Isolierung aus den Zellkulturen.....	52
2.2.4.4	Epigenetische Behandlung der Zellen	53
2.2.4.5	Kultivierung der Präsphäroiden.....	53
2.2.4.6	Die Kultivierung und Expansion der SpheUSSC	54
2.2.4.7	Seneszenz-Assay	55
2.2.4.8	Oil-red-O Staining.....	55
2.2.4.9	Alizarin red staining.....	55
2.2.4.10	Alcianblau-Färbung.....	55
3.	Ergebnisse	58
3.1	Der Effekt von 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC) und Trichostatin A (TSA) auf die Transkription der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT-1) in USSC-Zellen	59
3.2	Bestimmung der Arbeitskonzentrationen von 5-Aza-dC und TSA in USSC-Zellen	60
3.3	Bestimmung der Behandlungsdauer der USSC-Zellen mit den beiden epigenetischen Agenzien.....	64
3.4	Die epigenetische Behandlung der USSC mit 5-Aza-dC und TSA führt zu erheblichen morphologischen Veränderungen	68
3.5	Entstehung der Sphäroiden Zellen	70
3.6	Optimierung der Subkultivierung.....	71
3.6.1	Mechanische Dissoziation.....	71
3.6.2	Enzymatische Dissoziation	72
3.6.3	Optimierung der Kryokonservierung und des Auftauens der Sphären.....	73
3.7	Molekularbiologische Charakterisierung der SpheUSSC-Zellen.....	76
3.7.1	OCT4-Expression	76
3.7.2	Methylierungsstatus des <i>OCT4</i> -regulatorischen Bereiches in den SpheUSSC.....	80
3.7.3	<i>SOX2</i> -Expression in den SpheUSSC	83
3.7.4	<i>NANOG</i> -Expression	85
3.8	Evaluierung der Proliferationsfähigkeit der SpheUSSC.....	86
3.8.1	Proliferationsparameter	86
3.8.2	Evaluierung der Seneszenz in den SpheUSSC.....	88
3.9	Bestimmung der Länge der Telomere der SpheUSSC.....	89
3.9.1	Bestimmung der Länge der Telomere mittels <i>southern-Blot</i> -Analyse	89
3.9.2	Bestimmung der Telomerlängen der SpheUSSC mittels einer <i>real time PCR</i>	90
3.9.3	Bestimmung der Expression der Telomerase in den SpheUSSC	92
3.10	Evaluierung des Differenzierungspotentials der SpheUSSC-Zellen.....	94
3.10.1	Adipozytendifferenzierung.....	95

3.10.2	Osteodifferenzierung	100
3.10.3	Chondrodifferenzierung.....	103
3.10.4	Neurodifferenzierung.....	105
3.10.5	Kardiomyozyten-Differenzierung.....	108
4.	<i>Diskussion</i>	113
4.1	Vorversuche zur Behandlung der USSC-Zellen mit den epigenetischen Substanzen 5-Aza-dC und TSA.....	113
4.2	Die Behandlung der USSC mit 5-Aza-dC und TSA führt zu gravierenden morphologischen Veränderungen	114
4.3	Molekularbiologische Charakterisierung der SpheUSSC.....	115
4.4	Co-Expression der Pluripotenzfaktoren.....	118
4.5	Evaluierung des Wachstums und der Proliferation der SpheUSSC.....	120
4.6	Evaluierung des Differenzierungspotentials der SpheUSSC.....	124
4.6.1	Adipozytendifferenzierung	124
4.6.2	Chondro- und Osteodifferenzierung der SpheUSSC.....	126
4.6.3	Neuronale Differenzierung der SpheUSSC.....	127
4.6.4	Kardiomyozyten-Differenzierung der SpheUSSC	129
4.7	Eine neue Hypothese zur Entstehung des neuen stabilen Phänotyps	130
4.8	Ausblick.....	133
5.	<i>Anhang</i>	134
5.1	Methylierungsanalysen	134
5.1.1	Globale Methylierungsanalysen.....	134
5.1.2	Fokale Methylierungsanalysen.....	137
5.2	Westerblotanalysen.....	140
5.3	Southern Blot-Analyse	140
5.4	Zellzählungen.....	141
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>	143
7.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	162
8.	<i>Danksagung</i>	164
9.	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	165

Zusammenfassung

Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften stellen die unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC), junge adulte Stammzellen aus dem Nabelschnurblut dar, die ggf. für die Anwendung in der regenerativen Medizin von Bedeutung sein könnten. Diese sich gut vermehrenden Stammzellen könnten für Therapien auf der Basis der zellulären Regeneration eingesetzt werden. Auch in diesen Zellen könnte eine Reprogrammierung zusätzliche Vorteile mit sich bringen. Eine besondere Eigenschaft dieser Zellen liegt darin, dass sie ein bivalentes epigenetisches Muster besitzen. Dies ist sowohl auf der Ebene der Histonmodifikationen als auch der DNA-Methylierung des Genpromotors des zentralen Pluripotenzfaktors *OCT4* zu finden (Santourlidis et al. 2011). Die regulatorischen Bereiche von *SOX2* und *NANOG*, weiterer Master-Transkriptionsfaktor-Gene der Pluripotenz, sind in den USSC partiell methyliert. Eine Reaktivierung dieser Faktoren könnte das Differenzierungsverhalten dieser Zellen ändern. Um dies zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Restmethylierung der Pluripotenzfaktoren aufzuheben und gleichzeitig die Acetylierung der Histone zu fördern. Hierfür wurde ein Behandlungsverfahren mit entsprechenden epigenetisch wirkenden Substanzen für die USSC optimiert. Die Behandlung von einer USSC-Zelllinie mit 5'-Aza-2-deoxycytidin (5-Aza-dC), einen potenten Inhibitor der DNA-Methylierung und Tichstotatin A (TSA), dass die Histon-Acetylierung fördert, führte zur Generierung eines neuen Stamzellphänotyps. Diese epigenetisch erzeugten Zellen, die spontan zu multizellulären Sphäroiden unterschiedlicher Größen aggregieren, haben wir aufgrund dieser Morphologie, „SpheUSSC“ genannt. Die SpheUSSC wurden in dieser Arbeit zuerst molekularbiologisch untersucht, danach wurde ihr Differenzierungspotential evaluiert und mit dem der Ausgangszellen verglichen. Diese Analysen zeigen, dass diese epigenetisch erzeugten Stammzellen eine Modifikation ihres Expressionsprofils erfahren haben, so beispielsweise die Induktion des Hauptpluripotenzfaktors *OCT4*. Das Differenzierungspotential hat sich ebenfalls erweitert. Im Gegensatz zu den Ausgangszellen können die SpheUSSC sich insbesondere sehr effizient und spontan zu Adipozyten differenzieren. Die Fähigkeit zur Chondro- und Osteodifferenzierung haben die SpheUSSC beibehalten. Unter spezifischen Kulturbedingungen, die eine Kardiomyozyten-Differenzierung fördern, konnten aus den SpheUSSC kontrahierende Zellen generiert werden. Darüber hinaus zeigen die SpheUSSC verlängerte Telomeren und keine Seneszenz. Sie konnten über 1,5 Jahre und für über 150 Zellteilungen ununterbrochen gehalten werden und verhielten sich dabei stabil.

Summary

Due to their biological characteristics, the unrestricted somatic stem cells (USSC) represent a stem cell source from umbilical cord blood. These well propagable stem cells could be useful for therapies based on cellular regeneration and could bring additional benefits after a reprogramming process. A particular property of USSC is their bivalent epigenetic pattern. This can be found at the level of histone modifications as well as in DNA methylation of the core gene promoter of pluripotency factors, e.g. *OCT4* (Santourlidis et al., 2011). Regulatory DNA regions of *SOX2* and *NANOG*, further essential pluripotency factors, are partially methylated. Since methylation is generally associated to gene repression, we hypothesize that a reactivation of these factors by demethylation might change the differentiation potential of these cells. In the present work, we tried to remove the rest of methylation of pluripotency factors and concurrently to promote the acetylation of histones. For this purpose, a treatment method with the appropriate epigenetic acting drugs was optimized for USSC. The transient treatment of USSC with 5'-aza-2-deoxycytidine (5-aza-dC), a specific inhibitor of DNA methylation and Trichostatin A (TSA), a potent and specific inhibitor of histone deacetylases (HDAC), led to a new stem cell phenotype. Based on their origin and acquired spheroid morphology, we called these epigenetically generated cells “SpheUSSC”. In this work, the SpheUSSC were studied by diverse molecular biological analyses. We sought additionally to evaluate the *in vitro* differentiation potential of these new cells. Analyses showed that the epigenetic treated cells had undergone modifications of their expression profile such as the induction of main pluripotency factor *OCT4*. The differentiation potential was expanded as well. The SpheUSSC can differentiate spontaneously and very efficiently into adipocytes, that was not possible for the source cell population. They retain their potential for osteogenic and cardiogenic differentiation. Under optimized cardiogenic culture conditions, SpheUSSC are able to differentiate into beating cells within few days. Furthermore, SpheUSSC showed lengthened telomeres while senescence was absent. These new characteristics allow the epigenetically generated cells to be cultivated for a long time while retaining their differentiation potential.

- *Einleitung*

1. Einleitung

1.1 Vorwort

Die regenerative Medizin als neuer Zweig der Biomedizin gewinnt immer mehr an Bedeutung. Denn die Aussicht, ein Gewebe oder gar ein ganzes „Organ“ ersetzen zu können, verspricht eine Heilung für alle mannigfaltigen Erkrankungen des Menschen, die auf eine Degeneration von Zellen zurückzuführen sind. Schon Ende der 1960er-Jahre konnte man erfolgreich hämatopoetische Stammzellen transplantieren und Leukämien hierdurch mit Erfolg behandeln (Edward Donnall Thomas, 1975). Neben den technischen und biologischen Herausforderungen ist die regenerative Medizin auch mit ethischen Aspekten konfrontiert. Denn bis vor wenigen Jahren galten die embryonalen Stammzellen, welche nur aus Embryonen gewonnen werden und sich dann nicht mehr weiterentwickeln können, als Hauptquelle für die möglichen therapeutischen Regenerationsansätze. Diese Bedenken waren ein Antrieb für die Suche nach anderen Zellquellen, die dieses Problem nicht mit sich bringen. Während der letzten Jahre hat sich die Forschung in dieser Richtung intensiviert, sodass eine ganze Reihe von Zellen identifiziert und charakterisiert worden sind, die ein Differenzierungspotential besitzen. Die adulten bzw. gewebespezifischen oder somatischen Stammzellen rücken in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Stammzellforschung. Eine wesentliche Limitierung der somatischen Stammzellforschung liegt darin, dass hochspezifische Stammzellmarker fehlen und dass die isolierten Stammzellen aus dem gesunden Spender eine niedrige Proliferationsfähigkeit besitzen (Stellungnahme der Deutschen Forschungsgemeinschaft, 2006).

Eine neue innovative Technologie, die verspricht auf einen Schlag die technischen und ethischen Probleme beseitigen zu können, wurde 2012 mit dem Nobelpreis gewürdigt. In diesem Verfahren, der „Reprogrammierung“, werden differenzierte, spezialisierte Zellen mittels zugeführter, basaler Transkriptionsfaktoren der embryonalen Stammzellen, zu induzierten pluriotenten Stammzellen (iPS) reprogrammiert. Diese iPS sind genauso wie die embryonalen Stammzellen in der Lage sich zu beliebigen Geweben zu differenzieren. Doch um die reprogrammierten Zellen für die regenerative Medizin einsetzen zu können, sind gewaltige Hürden zu überwinden. So muss beispielsweise die Reprogrammierung so erreicht werden, dass die später therapeutisch beim Menschen zu verwendenden Zellen nicht mit transgenem Material belastet sind, so z. B. retrovirale Nukleinsäure oder Plasmid-DNA. Daher intensiviert sich die Forschung in Richtung einer

Reprogrammierung, ohne beispielsweise Retroviren und andere Vektoren, die genetisches Material mitbringen. Die wesentlichen Techniken basieren auf die Verwendung von Proteinen, mRNA und/oder *small molecules*. Eine weitere, aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften taugliche Stammzellquelle, stellen Nabelschnurblut-Stammzellen dar. Bei der Geburt befinden sich vermehrungsfähige Stammzellen, die in der Lage sind sich zu verschiedenen Geweben auszubilden im Nabelschnurblut. Diese „jungen“ Zellen können ebenfalls für Therapien auf der Basis der zellulären Regeneration eingesetzt werden. Auch in diesen Zellen könnte eine Reprogrammierung zusätzliche Vorteile mit sich bringen.

In dieser Arbeit ist der Versuch unternommen worden das Differenzierungspotential einer Nabelschnurblut-Stammzelle ohne die Verwendung von genetischem Material epigenetisch zu beeinflussen.

1.2 Stammzellen

Seit der Entdeckung der Stammzellen vor mehr als drei Dekaden hat sich die Forschung in diesem Feld kontinuierlich verstärkt. Die hieraus entstandene rasche Entwicklung ist überwiegend auf die zwei Hauptcharakteristika von Stammzellen zurückzuführen. Stammzellen können fortdauernd teilungsfähig sein und sind dabei auch in der Lage, sich asymmetrisch zu teilen (Thomson et al., 2000). Diese beiden Eigenschaften sind entscheidend für die Nützlichkeit der Stammzellen in der regenerativen Medizin. Der Begriff „Stammzelle“ umfasst eine Vielzahl an Zelltypen, die unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Je nach biologischer Quelle der Stammzellen bzw. je nach Methode ihrer Erzeugung unterscheidet man heutzutage mehrere Stammzellarten. Zu den Hauptstammzellen gehören sowohl adulte Stammzellen wie die hämatopoetischen Stammzellen, die mesenchymalen Stammzellen und die fetalen Stammzellen als auch embryonale Stammzellen (ESC) und reprogrammierte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) (Schöler et al., 2008). Die Anwendung embryonaler Stammzellen birgt allerdings wesentliche Nachteile. Ein fundamentales ethisches Bedenken ergibt sich daraus, dass bei der Gewinnung solcher Zellen ein Embryo daran gehindert wird sich weiterzuentwickeln. Darüber hinaus zeigen Experimente mit Mäusen, dass die embryonalen Stammzellen *in vivo* Teratome bilden können (Brivanlou et al., 2003; Thomson et al., 1998). Aufgrund dieser ethischen Aspekte ist die Verwendung solcher Methoden in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz streng geregelt (Embryonenschutzgesetz – EschG, 1990).

So wird die Herstellung von ESC aus abgetriebenen Föten nur unter bestimmten strengen Voraussetzungen gestattet. Adulte Stammzellen könnten eine gute Alternative bieten, da deren Gewinnung keine Vernichtung von Embryonen verlangt. Adulte Stammzellen können einfach von Patienten selbst gewonnen werden. Darüber hinaus können sie autolog wieder eingesetzt werden, was das Problem der Abstoßungsreaktion löst.

1.3 Fetale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (USSC)

Adulte Stammzellen lassen sich aus vielen Geweben eines adulten Organismus gewinnen. Sie besitzen die Möglichkeit sich in mehreren Gewebearten zu differenzieren. Sie werden daher als multipotente Stammzellen angesehen. Im Nabelschnurblut sind solche Stammzellen ebenfalls zu finden. Eine wichtige Besonderheit dieser aus dem Nabelschnurblut gewonnenen Zellen, im Vergleich zu anderen adulten Stammzellen liegt darin, dass sie noch jung und ggf. belastbarer in der Zellkultur sind, aber auch *in vivo* sein könnten (Kögler et al., 2004). Unter ihnen befinden sich Zellpopulationen, die keine hämatopoetischen Zellen sind und als unrestringierte somatische Stammzellen (USSC) (unrestricted somatic stem cells) bezeichnet werden. Die USSC wachsen in der Zellkultur als adhärenente Monolayer. Morphologisch weisen sie eine spindelförmige Gestalt mit einer Größe von 20 bis 25 μm auf (

Abb. 1.1.) USSC sind negativ für die folgenden Oberflächenantigene: CD14, CD33, CD34, CD45, CD49b, CD49c, CD49d, CD49f, CD50, CD62E, CD62L, CD62P, CD106, CD117, Glycophorin A und HLA-DR. Sie exprimieren CD13, CD29, CD44, CD49e, CD90, CD105, Vimentin, Cytokeratin 8 und 18, niedrige Level an CD10 sowie FLK1 (KDR) und zeigen eine variable, aber schwache Expression von HLA-ABC (Kögler et al., 2004).

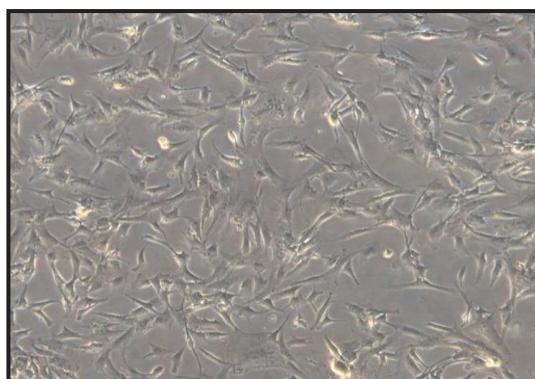


Abb. 1.1: Morphologie adhärenter USSC aus Nabelschnurblut. USSC wachsen als adhärenente Monolayer und haben eine spindelförmige Morphologie mit einer Größe der Einzelzelle von 20 bis 25 μm .

Die USSC können sich *in vitro* unter geeigneten Bedingungen in Chondrozyten, Osteoblasten und Astrozyten differenzieren (Kluth et al. 2010). *In vivo* konnten USSC Knochen regenerieren (Koegler, 2004). Die USSC besitzen Stammzellcharakteristika und lassen sich ohne ethische Bedenken gut aus dem Nabelschnurblut gewinnen. Diese Eigenschaften machen USSC Zellen zu einer realistischen Quelle für die regenerative Medizin. Mehrere etablierte USSC-Linien sind in unserem Institut verfügbar. So stellen sie ein gutes Modell für die Untersuchung der Multipotenz und der Differenzierungsprozesse auf genetischer und epigenetischer Ebene dar. In unserem Fall wurden die Linien SA8/25 und SA5/73 als Modelle verwendet. Die Kulturbedingungen für diese Linien sind über viele Jahre in unserem Institut optimiert worden.

1.4 Epigenetik und Stammzellen

1.4.1 Epigenetik

Die Genetik beruht auf die DNA-Sequenz und ihrer Nutzung für die Genexpression. Die klassische Genetik kann allerdings wichtige biologische Aspekte nicht ausreichend erklären. Zwei Beispiele dafür sind zum einen die dynamischen Zelltypveränderungen in der frühen Ontogenese bei unveränderlicher genetischer Ausstattung der Zellen, aber auch die morphologischen und physiologischen Unterschiede zwischen Bienenarbeiterinnen und der Königin trotz gleicher genetischer Ausstattung (Kucharski et al., 2008).

Während die Genetik sich mit den DNA-Sequenzen beschäftigt, beschäftigt sich die Epigenetik mit Mechanismen der Regulation der Genexpression, die zwar vererbbar, aber von der DNA-Sequenz selbst unabhängig sind (Kiefer, 2007). Viele Studien liefern deutliche Evidenz dafür, dass epigenetische Mechanismen eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Transkription zahlreicher Gene spielen (Rodenhise et al., 2006). So sind sie auch von zentraler Bedeutung für die Kontrolle des zellulären Wachstums und der Entwicklung der Zellen (Allis et al., 2006; Reik, 2007). Um ein normales und gesundes Funktionieren des Organismus sicherzustellen, müssen spezifische Untergruppen der ca. 25.000 Gene des menschlichen Genoms am richtigen Ort und zur richtigen Zeit exprimiert werden. Um diese Funktionalität zu gewährleisten, ist die DNA so angeordnet, dass ein derartiges Ein- und Ausschalten möglich wird. Die DNA ist um die kugelförmigen Histon-Proteine gewickelt. Diese DNA-Protein-Cluster werden als Nukleosomen bezeichnet (Peterson et al., 2004). Die DNA-Methylierung und spezielle molekulare Modifikationen an den Histonen gehören zu den zentralen epigenetischen Mechanismen.

1.4.1.1 DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine Übertragung einer Methylgruppe (CH_3) auf ein CpG-Dinukleotid, Cytosin-Phosphat-Guanin (Ehrlich et al., 1981; Laird et al., 1994). Die Methylierung der DNA wird durch spezifische Enzyme, die DNA-Methyltransferasen (DNMTs) gewährleistet (Abb. 1.2), welche bestimmte CpG-Stellen erkennen und an dem 5'-Kohlenstoff des Cytosins eine Methylgruppe übertragen (Yokochi et al., 2002).

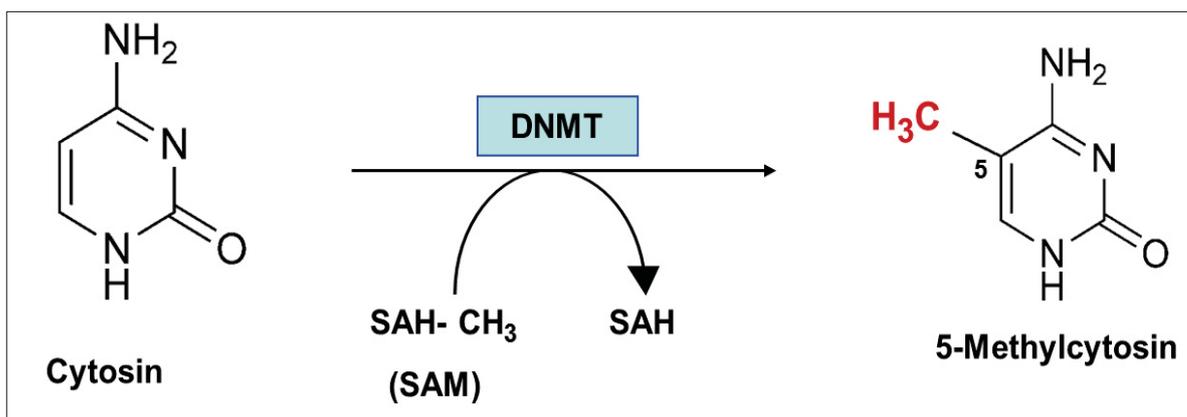


Abb. 1.2: Umwandlung von Cytosin zum 5-Methylcytosin durch Methyltransferase (DNMT). DNMT katalysiert den Transfer einer Methylgruppe (CH_3) aus S-Adenosylmethionin (SAM) an der 5-Kohlenstoff-Position von Cytosin. Die katalytische Reaktion generiert einen 5-Methylcytosin und dabei entsteht eine S-Adenosylhomocystein (SAH).

Ungefähr 70 % der CpG-Positionen auf der DNA der Säugetiere sind methyliert (Ehrlich, 1982). Methyliert werden überwiegend repetitive Elemente, DNA-Satelliten, intergenische DNA und Gene (Allis et al., 2007).

Die Sequenzinformation des genetischen Materials belegt, dass viele methylierte Regionen CG-reich sind. Solche CG-dichten Regionen werden als CG-Inseln bezeichnet. Im humanen Genom werden ca. 60 % dieser Inseln methyliert (Allis et al., 2007). Gene, deren regulatorische Bereiche bzw. Promotoren methyliert sind, sind in der Regel langfristig stillgelegt (Kass et al., 1997). Ein bekanntes Beispiel dafür stellt die X-Chromosom-Inaktivierung dar (Payer et al., 2008). Nicht benötigte Gene auf dem X-Chromosom werden auf diese Weise stillgelegt (Rodenhise et al., 2006).

Für die Methylierung der CpG-Nukleotide sind hoch spezifische Enzyme, die sogenannten Methyltransferasen verantwortlich. Man unterscheidet zwischen zwei Typen von

Methyltransferasen: die *de-novo*-Methyltransferasen (DNMT3a und DNMT3b) und die Erhaltungsmethyltransferase (DNMT1) (Bestor et al., 2000).

Unmethylierte DNA wird durch *de-novo*-Methyltransferasen an bestimmte CpGs symmetrisch methyliert, wobei es bisher völlig unbekannt ist, wie diese Enzyme ihre Zielsequenzen erkennen. Während der DNA-Replikation wird der neu synthetisierte Strang durch die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 methyliert. Dabei dient das Methylierungsmuster des alten DNA-Strangs als Matrize (Bestor et al., 1992; Pradhan et al., 1999).

Die DNA-Methyltransferase 1, auch DNA-(cytosine-5)-Methyltransferase 1 genannt, wurde erstmalig von Bestor und Ingram 1983 extrahiert (Bestor et al., 1983). Das Enzym DNMT1 ist besonders aktiv wenn hemimethylierte DNA vorliegt. Dabei konnte gezeigt werden, dass DNMT1 eine etwa zehn- bis 40-fach erhöhte Affinität zu hemimethylierter DNA als zu unmethylierter DNA hat (Pradhan et al., 1999). Demzufolge wird die DNMT1 als Erhaltungsmethyltransferase bezeichnet. Studien von Li und Kollegen zeigen, dass eine Inaktivierung der DNMT1 in ESC in der Maus zu einer genomweiten Hypomethylierung führt und schließlich zum Absterben der Embryonen (Li et al., 1992), was dafür spricht, dass dieses Enzym eine Schlüsselrolle bei der Erhaltung der Methylierung der DNA und die Entwicklung des Organismus spielt (Abb. 1.3). Völlig unmethylierte DNA wird durch die DNMT3-Familie methyliert (Abb. 1.3). Diese Familie ist sehr gut charakterisiert und sowohl in Pflanzen als auch in Tieren hoch konserviert (Hsieh et al., 1999). Die beiden wichtigen Mitglieder dieser Familie sind DNMT3A und DNMT3B (Yoder et al., 1998; Okano et al., 1999). Das Genom der reifen Eizellen und Spermien ist im Vergleich zu adulten somatischen Zellen stark methyliert (Bestor et al., 2000). Unmittelbar nach der Befruchtung erfolgt eine genomweite Demethylierung (Reik et al., 2001). Im Anschluss an diese frühe Entwicklungsphase wird die erforderliche DNA-Methylierung durch die *de-novo*-Methyltransferase DNMT3A und DNMT3B wieder etabliert (Okano et al., 1999). Im Gegensatz zur DNMT1 brauchen die Enzyme, DNMT3A und DNMT3B keine DNA-Methylgruppenvorlage, sondern sie verwenden die unmethylierte DNA als Substrat (Okano et al., 1998).

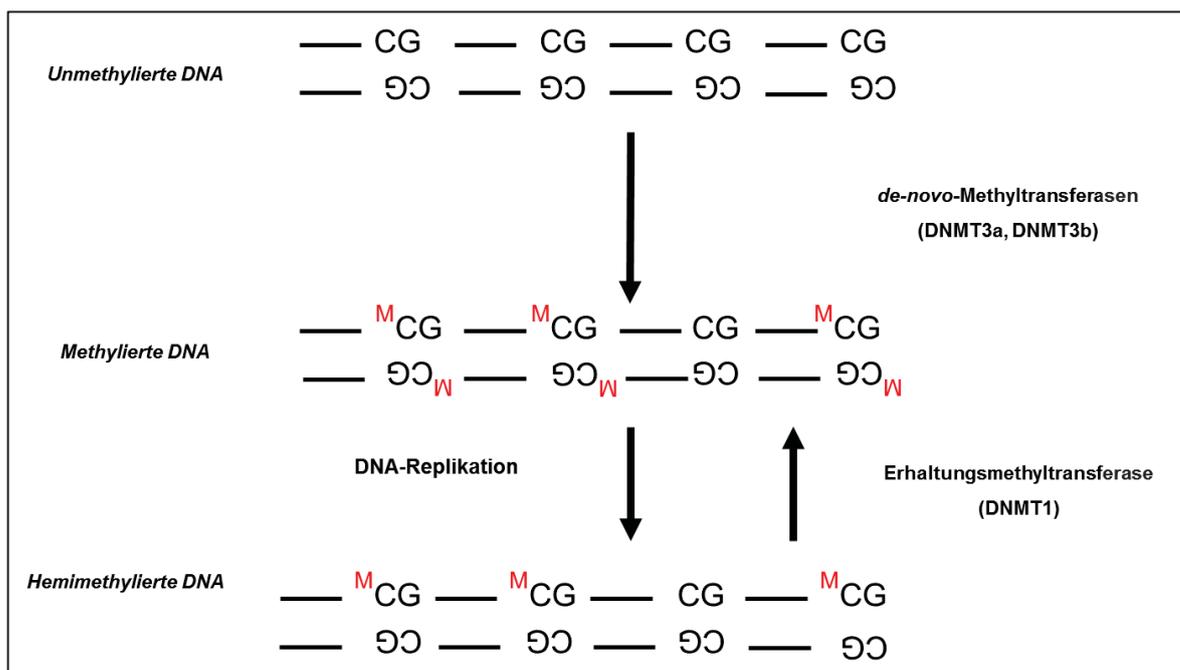


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der DNA-Methylierung. Die unmethylierte DNA wird mittels *de-novo*-Methyltransferasen (DNMT3a, DNMT3b) an bestimmten CpGs symmetrisch methyliert. Während der Replikation wird der neu synthetisierte Strang durch die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 methyliert. Hierbei dient der alte DNA-Strang als Matrize.

Weniger charakterisiert ist das Enzym DNMT2 (Abb. 1.4). Das Enzym ist stark konserviert und besitzt wie die anderen DNA-Methyltransferasen ein Motiv, das für eine Methylgruppen-transferierende Funktion bekannt ist (Jeltsch et al., 2006). Anders als DNMT1, DNMT3A und DNMT3B, welche katalytische und regulatorische Domänen aufweisen (Abb. 1.4), besitzt DNMT2 nur eine katalytische Domäne (Allis et al., 2006). Die Stilllegung von DNMT2 bewirkt weder einen Einfluss auf die globale CpG-Methylierung noch einen sonstigen phänotypischen Effekt (Okano et al., 1998). Es ist für dieses Enzym bisher keine Methylgruppen-transferierende Funktion nachgewiesen. Jedoch zeigen neuere Arbeiten, dass Dnmt2 RNA methyliert, obwohl die Aminosäuresequenz und die Reihenfolge der katalytischen Motive von Dnmt2 eher für DNA- anstatt RNA-Methyltransferasen charakteristisch sind (Goll et al., 2006).

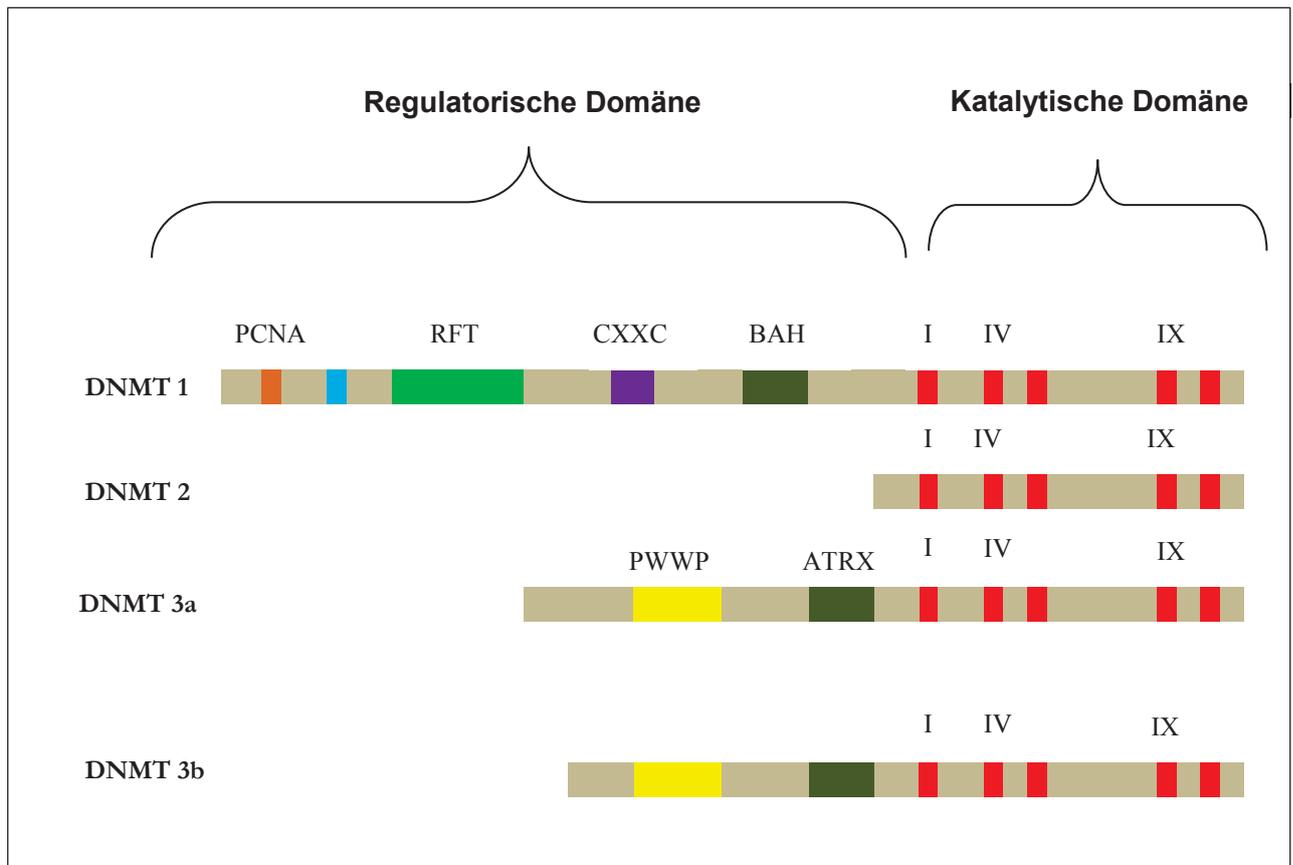


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der DNA-Methyltransferasen. DNMT1, DNMT2, DNMT3a und DNMT3b. Die katalytischen Domänen aller DNMTs sind hoch konserviert. PCNA: PCNA-interactiondomain; RFT: replikationsfoci-targeting domain; CXXC: cysteinreiche Domäne, beteiligt an der DNA-Bindung; BAH: bromo-adjacent homology domain, beteiligt an Protein-Protein-Interaktion; PWWP: Domäne reich an „proline-tryptophan-proline“-Motiv, involviert in der Heterochromatin-Assoziation. ATRX: cysteinreiche Region, enthält C2-C2-Zinkfinger (modifiziert nach Allis et al., 2007).

1.4.1.2 Histon-Modifikationen

Im Vergleich zur DNA-Methylierung sind die molekularen Modifizierungen der Histone weniger gut verstanden und komplexere Prozesse. In einer „geschlossenen“ und Gen-reprimierenden Konformation des Chromatins weisen die basischen Aminosäurereste (z. B. Lysin, Arginin und Serin) der N-terminalen Enden der Histonproteine eine höhere Bindungsaffinität an die negativ geladene DNA auf (Zhang et al., 2006).

Histon-Modifikationen wie die Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung der N-terminalen Aminosäurereste der Histone können die DNA-Histon-Wechselwirkung ändern (Nightingale et al., 2007). Sie sind in der Lage die Affinität des Histons stark zu beeinflussen und dadurch auch die Chromatinstruktur selbst und die Gentranskription. Beispielsweise ist die Histon-Acetylierung mit aktiven Genen korreliert, während die

Entfernung der Acetylgruppen durch Histon-Deacetylasen (HDACs) zur Repression der Genexpression beiträgt (Garcia-Manero et al., 2005; Ng et al., 1999).

Durch die Histonmethylierung wird die transkriptionelle Aktivität eines Gens oder sogar einer ganzen Chromatinregion positiv oder negativ beeinflusst (Allis et al., 2006). Der aktive oder inaktive Zustand kann nach der Zellteilung vererbt werden und so längerfristig aufrechterhalten werden. Methylierungen sind vorwiegend an den Histonen H3 und H4 sowie auch an H1 zu finden (Kuzmichev et al., 2004). Dabei werden die Histon-N-Termini methyliert. Die Histonmethylierung befindet sich an Lysin- und auch an Arginin-Residuen (Migliori et al., 2010). Die beiden Aminosäuren werden von spezifischen Enzymen modifiziert: Die HKMTs (Histon-Lysin-Methyltransferasen) methylieren Lysin-Aminosäuren, während die PRMTs (Protein-Arginin-Methyltransferasen) spezifisch für die Arginin-Aminosäure sind.

Die Kombination von Histon-Modifikationen (Histon-Code) und die Synergie mit der DNA-Methylierung bestimmen die Chromatinstruktur und folglich die Aktivierung bzw. Inaktivierung des Genexpressionszustands (Kouzarides et al., 2007). DNA-Methylierung und Histon-Modifikation sind voneinander abhängige Prozesse. Drei mögliche Modelle, wie sie sich einander beeinflussen, sind schematisch dargestellt (Abb. 1.5).

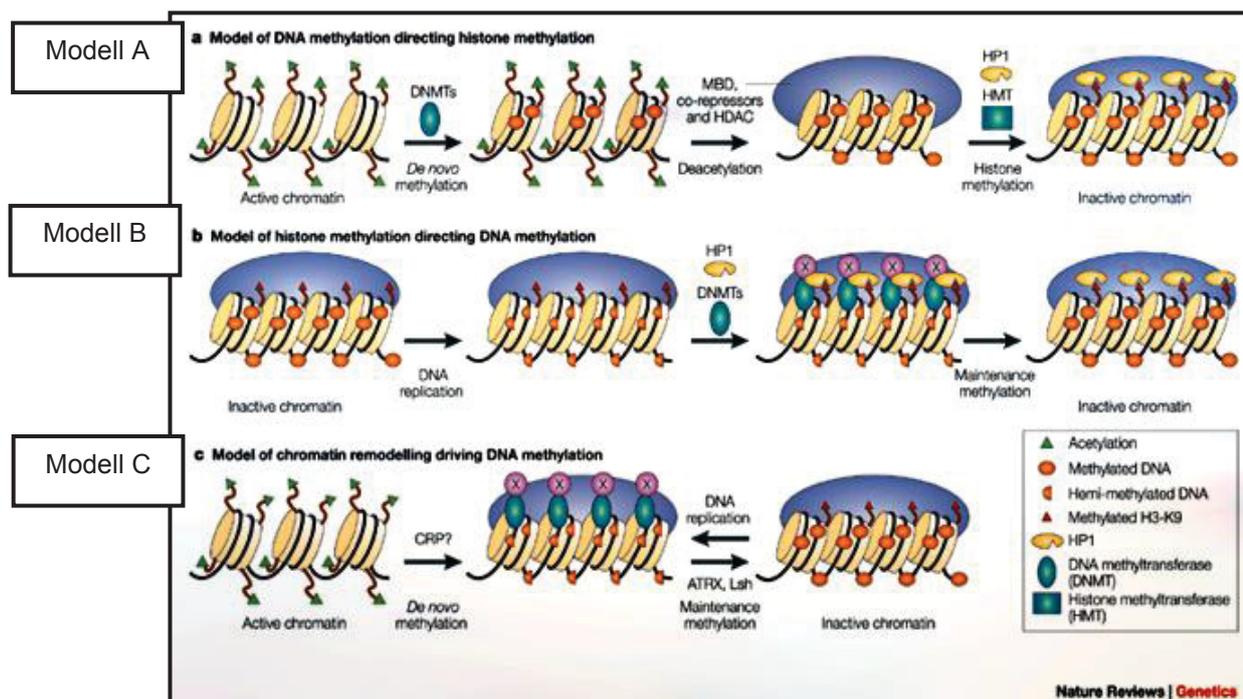


Abb. 1.5: Modelle der Wechselwirkung zwischen DNA Methylierung und Histonmodifizierung (modifiziert nach Li, E., 2002).

Modell (A): DNA-Methylierung steuert die Histon-Methylierung. Methylierungsmuster werden durch *de-novo*-DNA-Methylierung mittels DNMT3A und DNMT3B etabliert und durch die DNMT1 auch nach der Zellteilung beibehalten. Es wird angenommen, dass die Methyl-CpG-Bindeproteine (MBD) und Histon-Deacetylase-(HDAC)-Komplexe, wie der MeCP2-Sin3A-HDAC-Komplex, die Histon-Deacetylierung und die Inaktivierung des Chromatins induzieren. Das Chromatin zieht Histon-Methyltransferasen (HMTs) wie Suv39h oder G9a an, die das Lysin 9 des Histons H3 (H3-K9) methylieren, sodass der inaktive Zustand des Chromatins stabilisiert wird.

Modell (B): Die Histon-Methylierung steuert die DNA-Methylierung. Methyl-H3 K9 wirkt als Signal für inaktives Chromatin durch die Rekrutierung von HP1 an die methylierten Histone, die wiederum DNA-Methyltransferasen auf das stille Chromatin rekrutieren, um die DNA-Methylierung aufrechtzuerhalten und das inaktive Chromatin zu stabilisieren.

Modell (C): Ein Modell der Chromatin-Remodeling steuernden DNA-Methylierung. Die ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling und DNA-Helikase-Aktivitäten von Proteinen wie ATRX und LSH können die DNA-Methylierung und die Histon-Modifikation durch die Abwicklung der nukleosomalen DNA und ihre Zugänglichkeit zu DNMTs, HDACs und HMTs erleichtern. Eine Blockade der Funktion dieser Proteine beeinträchtigt sowohl die DNA-Methylierung als auch die Histon-Methylierung, wie in Pflanzen gezeigt worden ist. Das Chromatin-Remodeling-Protein (CRP), das an der *de-novo*-DNA-Methylierung beteiligt ist, konnte noch nicht identifiziert werden.

1.4.2 Epigenetische Regulation in Stammzellen

Die beiden wichtigsten Merkmale der Stammzellen, die Erhaltung der Pluripotenz und die Fähigkeit sich zu differenzieren, werden unter anderem epigenetisch bestimmt (Lunyak et al., 2008). Diese Eigenschaften sind sowohl das Ergebnis der selektiven Expression von spezifischen Transkriptionsfaktoren als auch eines spezifischen Chromatin-Remodeling-Prozesses, einer molekularen Modifikation der Histone, der Methylierung der DNA, aber auch der funktionellen Lokalisierung des Chromatins in distinkten Kerndomänen (Li, 2002). Das damit assoziierte epigenetische Gedächtnis ist notwendig für die Erhaltung der Pluripotenz der Stammzelle und die Weitergabe ihrer Identität.

Kovalente Modifikationen an den Enden von Histonen, einschließlich Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung, regulieren die Verpackung des Chromatins und seine Unterteilung in eine transkriptionell aktive und eine transkriptionell inaktive Form (Jenuwein und Allis, 2001). Histon-Acetyltransferasen (HAT) katalysieren das Hinzufügen von Acetylgruppen an hoch konservierten Aminosäureresten, was die Transkription des Chromatins fördert. Im Gegensatz dazu katalysieren Histon-Deacetylasen (HDACs) die entgegengesetzte Reaktion und sind mit Transkriptionsrepression verbunden. Die Blockierung globaler HDAC-Aktivität kann die Differenzierung von ES-Zellen hemmen (Lee et al., 2004), was die Rolle dieser epigenetischen Komponente für den Differenzierungsprozess unterstreicht.

Klassischerweise induziert die Methylierung von Lysin 27 des Histons H3, H3K27me3, die Stilllegung des Chromatins und somit die Repression der Transkription. Die Methylierung von Lysin 4 des Histon H3 (H3K4me2/3) ist mit aktivem Chromatin korreliert. Neben den Histon-Modifikationen spielt die DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle in der Genregulation der Stammzellen. Die DNA-Methylierung und die Histon-Modifikation sind voneinander abhängige Prozesse. Mehrere Studien legen nahe, dass die DNA-Methylierung den Zeitpunkt der Differenzierung und die Aufrechterhaltung der zellulären Identität regelt (Shiota et al., 2002; Bibikova et al., 2006). Neben den Histonmodifikationen und der DNA-Methylierung wurden bestimmte Proteine entdeckt, die ebenfalls eine wesentliche Rolle in der Regulation der Genexpression spielen. Diese Proteine bilden eine Gruppe, die Polycomb-Gruppe (PcG), die überwiegend während der Entwicklung für Transkriptionsrepression der Zelldifferenzierung verantwortlich ist (Aloia et al., 2013). Einige PcG-Proteine erreichen diese Kontrolle der Genexpression über die Katalyse der H3K27-Methylierung. Die meisten PcG-Proteine sind in zwei Subgruppen zu klassifizieren: polycomb repressive Komplexe (PRC): PRC1 und PRC2

(Jones et al., 2010). Die beiden Gruppen sind in der Lage im Chromatin zu wechselwirken und es zu regulieren. Gene, die eine bestimmte Differenzierung steuern müssen ausgeschaltet werden, wenn eine Stammzelle einen anderen Differenzierungsweg einschlägt. Somit müssen beispielsweise neuronale Gene solange gehemmt werden, bis der Beginn der Neurogenese einsetzt und die Adipogenese fördernde Gene müssen während der Neurogenese gehemmt werden. Dies wird sowohl durch Transkriptionsfaktoren als auch durch epigenetische Veränderungen erreicht. Durch epigenetische Modifikationen kann die Expression der wichtigen Pluripotenzgene von Stammzellen beeinflusst werden, was wiederum das Differenzierungspotential der Zellen bestimmt (Boland et al., 2014). Diese epigenetischen Regulationsmechanismen können durch mehrere Faktoren initiiert werden (Abb. 1.6). Im Fall der mesenchymalen Stammzellen in Kultur belegen Studien die Heterogenität der Zellen bezüglich der Differenzierungsfähigkeit (Phinney et al., 2012). Während der Zellkultur können durch die epigenetischen Veränderungen bestimmte Phänotypen der Zellen selektiert werden.

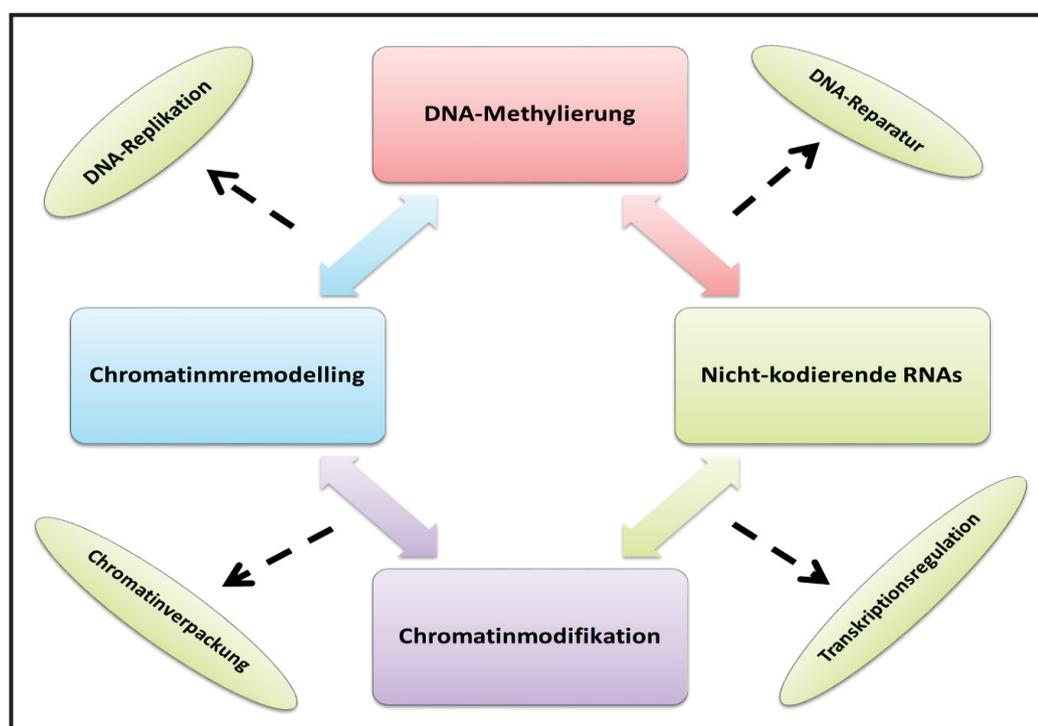


Abb. 1.6: Netzwerk der epigenetischen Regulation in Stammzellen. Aus Positionseffekt, DNA-Methylierung, Histonmodifikationen sowie miRNA bildet sich eine komplexe Regulationsmaschinerie, welche das Zellschicksal der Stammzelle kontrolliert. Diese Faktoren wechselwirken mit den exogenen Noxen und steuern zahlreiche Transkriptionsfaktoren, die Gene entweder aktivieren oder stilllegen.

1.4.3 Beeinflussung der zellulären Epigenetik mittels epigenetisch wirkender Agenzien

Das Epigenom, die Gesamtheit aller genomweit agierenden epigenetischen Mechanismen der Genregulation, ist in der Lage, sowohl mit endogenen als auch mit exogenen Noxen zu wechselwirken. Diese Eigenschaft wird bereits in der Krebstherapie zu Nutze gemacht. Zum Beispiel ist die Wirksamkeit von Decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine) und 5-Azacytidin (beide Inhibitoren der DNA-Methyltransferase) in der Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms und der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) gut bekannt. Diese Agenzien wurden ursprünglich 1960 entwickelt und für die zytotoxische Chemotherapie getestet (Sorm et al., 1964). Anfang der 1980er-Jahre wurde entdeckt, dass sie eine DNA-Demethylierungsaktivität besitzen (Jones et al., 1980). Andere Studien zeigen, dass Decitabine in Kombination mit anderen epigenetisch wirkenden Substanzen Effekte auf die Genregulation behandelter Zellen haben kann (Cameron et al., 1999). Beispielsweise führt eine Kombination von Decitabine und Trichostatin A, ein HDAC-Inhibitor, zu einer verringerten Expression des Multidrug-Resistenz-Transporters ATP-Bindungs-Cassette-Unterfamilie G Element 2 (ABCG2) in Ovarien-Krebszellen (Meng et al., 2013).

1.4.3.1 Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen

5-Azacytidine und 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC), Pyrimidinenukleoside, wurden erstmalig 1964 von Piskala und Sorm synthetisiert (Piskala und Sorm, 1964). Azacytidine und deren verschiedenen Analoga sind in der Abbildung 1.7 dargestellt. Azanucleoside sind eher instabil (Rogstad et al., 2009). In alkalischen Lösungen unterliegen Azanucleoside einer schnellen und reversiblen Öffnung des 5-Ring-Azacytosin, gefolgt von einer irreversiblen Dekomposition. In sauren Lösungen wird die glycosidische Bindung der Azanucleoside gespalten (Notari et al., 1975).

Nachdem Azanucleoside zu 5-Aza-2'-Desoxycytidin-Triphosphat umgewandelt wurden, können sie als Substrate für die DNA-Replikationsmaschinerie verwendet werden und in die DNA eingebaut werden, wobei Azacytosin Cytosin ersetzt. Azacytosin-Guanin-Dinukleotide werden durch die DNA-Methyltransferasen als natürliches Substrat erkannt. Die Enzyme initiieren danach eine Methylierungsreaktion durch einen nucleophilen Angriff. Dies geschieht durch die Etablierung einer kovalenten Bindung zwischen dem Kohlenstoffatom C6 des Cytosin-Rings und dem Enzym (Santi et al., 1984).

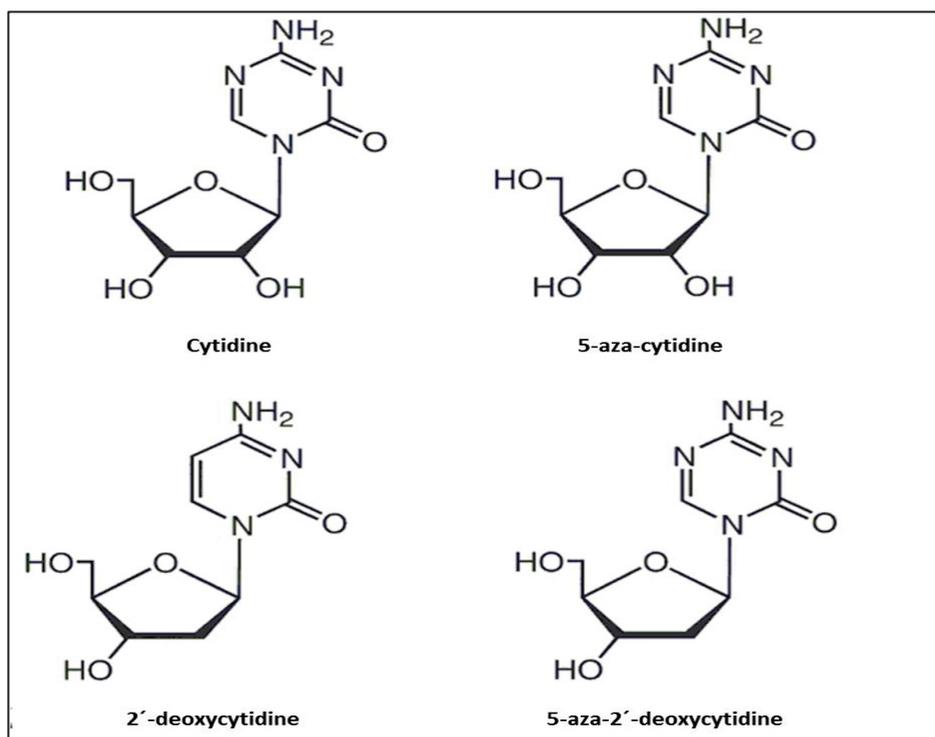


Abb. 1.7: Azacytidine und die verschiedenen Analoga. Die Analoga sind strukturell, metabolisch und pharmakodynamisch verwandt. Sie weisen vielfältige biologische und therapeutische Wirkungen auf.

Die Bindung wird normalerweise durch Beta-Eliminierung über das Kohlenstoffatom 5 gelöst, aber die Reaktion mit Azacytosin wird blockiert, wenn das Kohlenstoffatom C5 durch Stickstoff substituiert. Somit bleibt das Enzym kovalent an die DNA gebunden und die Funktion der DNA-Methyltransferase wird blockiert. Darüber hinaus ist die kovalente Proteinadduktion beeinträchtigt. Die Funktionalität von DNA und DNA-Schädigungs-Signalisierung wird ausgelöst, was zu einer Verschlechterung der eingefangenen DNA-Methyltransferasen führt. Als Folge geht die Methylierung während der DNA-Replikation verloren (Stresemann et al., 2008).

Niedrige Konzentrationen, welche keine Apoptose bewirken, können zur Abnahme der Methyltransferase-Aktivität führen. Dies ist auf eine irreversible Bindung des Azacytidin mit der DNA-Methyltransferase zurückzuführen (Christman et al., 2002). Da die Erhaltung der Methylierung in Mammalia während der Replikation erfolgt, ist eine Inhibierung der DNA-Methyltransferase erst nach zwei Teilungen möglich (Davidson et al., 1992). So kann die Methylierung der CpG-Dinukleotiden auf beiden DNA-Strängen über zwei sukzessive Teilungen aufgehoben werden. Diese Eigenschaft ermöglicht konsequenterweise einen genomweiten Effekt auf die DNA-Methylierung (Abb. 1.8).

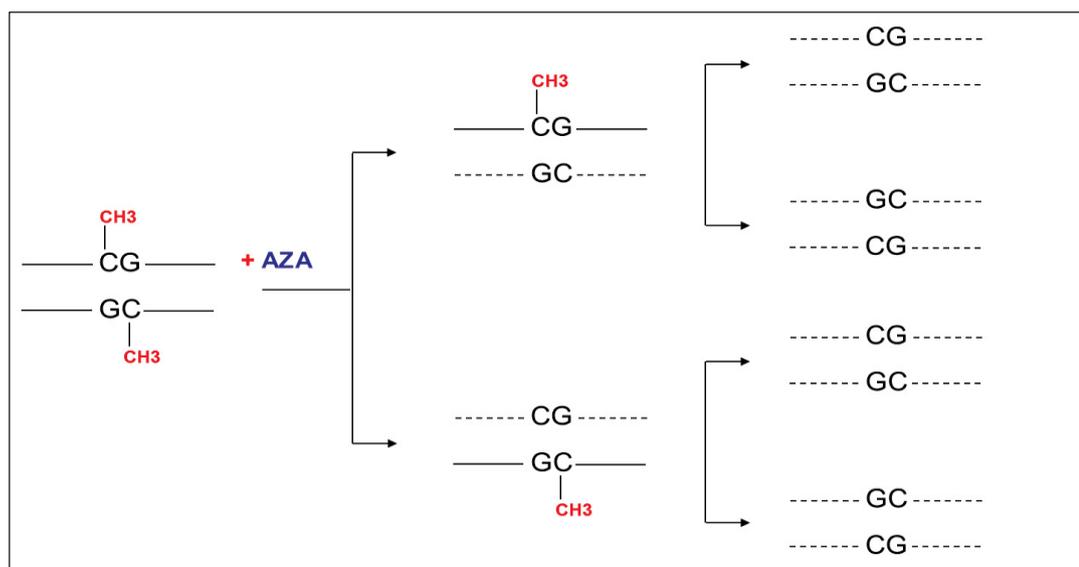


Abb. 1.8: DNA-Demethylierung eines CpG-Dinukleotids durch die Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin. Eine Erhaltung der Aktivität des 5-Aza-2'-deoxycytidins über zwei Zellteilungen führt zur Aufhebung der Methylierung der CpG-Dinukleotiden auf beiden DNA-Strängen.

1.4.3.2 HDAC-Inhibitoren

Natürliche sowie synthetische HDAC-Inhibitoren (HDACi) sind sehr interessante Agenzien für die Pharmaunternehmen wegen ihrer potenziellen Wirkung gegen Krebs und andere Erkrankungen des Menschen. Die biochemische Struktur der HDAC-Inhibitoren ist extrem heterogen, von einfachen Strukturen wie Valproat bis zu komplexeren wie z. B. MS-275 (Qian et al., 2005). Mit wenigen Ausnahmen wirken HDACi gegen fast alle HDAC-Typen (Marks et al., 2004). Sie können nach ihrer chemischen Natur und dem Mechanismus der Hemmung klassifiziert werden. Die bekanntesten sind: Hydroxamsäuren, Carbonsäuren, Epoxide, Benzamide

- **Hydroxamsäuren**

Diese Klasse ist die breiteste und am meisten verwendete der HDAC-Inhibitoren. Die allgemeine Struktur dieser Stoffe besteht aus einem hydrophoben Linker, der es der Hydroxamsäureeinheit ermöglicht an das Kation an der Unterseite der HDAC-katalytischen Tasche zu binden. Hauptvertreter dieser Gruppe ist das Trichostatin A (Bauer und Exner, 2003).

- **Carbonsäuren**

Es gibt nur wenige Agenzien in dieser Gruppe: Buttersäure, 29 valproic 30, 31 und 4-Säuren phenylbutanoic 32. Obwohl sie viel weniger wirksam sind als Hydroxamsäuren und ihre pleiotropen Effekte, gehören diese derzeit zu den am besten untersuchten HDAC-

Inhibitoren. Valproinsäure und Phenylbutyrat sind bereits für die Verwendung bei der Behandlung von Epilepsie zugelassen (Haynes, 2011).

- **Benzamide**

MS-275 und einige seiner Derivate hemmen HDACs *in vitro* bei mikromolaren Konzentrationen. Der Mechanismus wird nicht völlig verstanden. Es wird angenommen, dass die Diaminophenylgruppe für das hemmende Verhalten sehr wichtig ist; wahrscheinlich chelatisieren beide Aminofunktionen das Metallion an der katalytischen Stelle.

- **Epoxide**

Diese Chemikalien sind in der Lage, HDACs zu inhibieren, indem die Reaktion der Epoxidgruppe mit dem Zink-Kation oder einer Aminosäure durch Bildung einer kovalenten Bindung baut. Die Labilität der Epoxid-Funktionalität verhindert jedoch erheblich die *in vivo*-Aktivität, was wenig pharmakologisches Interesse hervorruft (Miller et al., 2003).

Trichostatin A (Abb. 1.9), bekannt auch unter dem Namen „Antibiotikum A300“, ist ein aus *streptomyces plaensis* gewonnenes Antibiotikum (Bauer und Exner, 2003). In nanomolaren Konzentrationen kann TSA Histon-Deacetylasen inhibieren. Klasse-I- und Klasse-II-HDACs sind sensitiv gegenüber dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A, während die Klasse III unempfindlich gegenüber diesem Inhibitor ist und das Coenzym NAD⁺ als Cofaktor erfordert (Esteller et al., 2006). Die daraus resultierende Histon-Hyperacetylierung des Chromatins kann in der Aktivierung der Genexpression beteiligt sein. Daher kann TSA einen Effekt auf den Zellzyklus und das Wachstum von mehreren Zelltypen bewirken. Die reversible (De)acetylierung der N-terminalen Histone mittels spezifischer Histon-Deacetylasen und -Acetylasen (HDAC) ist in der Regulation der Genexpression involviert. Eine Korrelation zwischen Histon-Acetylierung und erhöhter Genexpression wurde bereits in den 1960er-Jahren nachgewiesen (Allfrey et al., 1964).

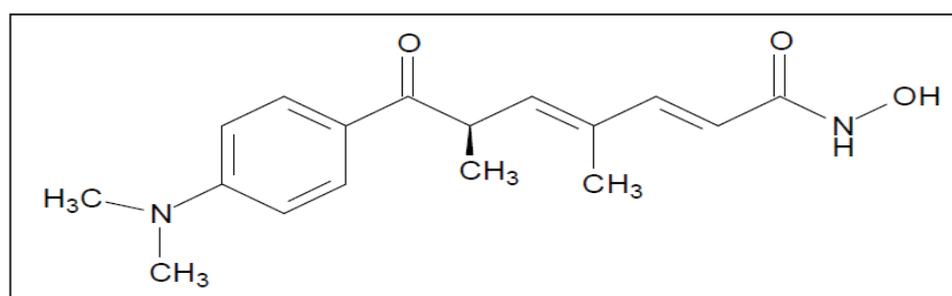


Abb. 1.9: Trichostatin A. TSA, R-(E, E)-7-[4-(Dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxo-2,4-heptadienamide: Das Molekül wird aus *Streptomyces* gewonnen.

1.5 Reprogrammierte Stammzellen

1.5.1 Somatischer Zellkerntransfer

Die Grundtechnik des Kerntransfers benötigt eine somatische Spenderzelle und eine unbefruchtete, entkernte Eizelle (Gurdon, 1964). Die Kern-DNA aus der somatischen Spenderzelle wird in die entkernte Eizelle initiiert. Um daraus einen Embryo zu entwickeln, ist eine Stimulation notwendig. Dies wird oft durch eine transiente Erhöhung der intrazellulären freien Kalziumkonzentration durch einen elektrischen Impuls oder auch durch chemische Agenzien bewirkt. Diese Technik wurde erfolgreich bei vielen Zellarten praktiziert. Epithelzellen, Kumuluszellen, Leukozyten, Hepatozyten, Epithelzellen, Keimzellen, Nervenzellen, Muskelzellen, Lymphozyten und Eileiterzellen wurden erfolgreich als Spenderzellen eingesetzt (Brem und Kuhholzer, 2002; Hochedlinger und Jaenisch, 2002; Jaenisch, 2004). Allerdings weist aufgrund der Differenzierung der Kern der somatischen Spenderzelle ein anderes epigenetisches Muster im Vergleich zu den Kernen der normalen embryonalen Zellen auf. Aufgrund der sehr niedrigen Effizienz und der berechtigten ethischen Barriere, zumal gespendete Eizellen benötigt werden, stellt diese Methode keine echte Lösung für die Regenerative Medizin dar.

1.5.2 Direkte Reprogrammierung

2006 ist es zum ersten Mal gelungen, somatische Zellen mittels einer bestimmten Kombination an Transkriptionsfaktoren, die vorrangig in der frühen Embryogenese als Masterregulatoren der Genexpression agieren, zu reprogrammieren (Takahashi und Yamanaka, 2006). Die wichtigsten Faktoren der Reprogrammierung waren Oct4, Sox2, c-myc, klf4 Fbx15 und Nanog. Mittels viraler Transduktion konnten diese Pluripotenzfaktoren somatisch sowohl Maus- als auch humane Zellen zu einer sogenannten induzierten pluripotenten Stammzelle (iPS) reprogrammieren, die einer embryonalen Stammzelle gleicht (Takahashi et al., 2007). Die meisten iPS-Zelllinien wurden aus Fibroblasten generiert. Andere somatische Zellen konnten ebenfalls mittels derselben Transkriptionsfaktoren reprogrammiert werden. Erfolgreich reprogrammiert sind neuronale Vorläuferzellen, Keratinozyten, Hepatozyten, B-Zellen, Fibroblasten der Mausschwanzspitzen, Nieren, Nebennieren und Muskeln (Jiing-Kuan Yee et al., 2010). Diese Erfolge zeigen die hohe Reprogrammierungswirksamkeit der vier Transkriptionsfaktoren unabhängig von dem Differenzierungsstadium und dem epigenetischen Status der Ausgangszelle.

Die Effizienz der Reprogrammierung ist von der Ausgangszelle abhängig. So weisen beispielsweise Keratinozyten eine höhere Reprogrammierungseffizienz auf als die Fibroblasten. Dieser Unterschied ist auf die endogene Expression von sowohl c-myc als auch Klf4 in Keratinozyten zurückzuführen. Bei manchen Vorläuferzellen, z. B. der adulten neuronalen Stammzelle, reichte Oct4 allein aus, um vollständige Reprogrammierung zu erreichen (Kim et al., 2009).

Das Hauptproblem dieser Reprogrammierungsmethode ist die Verwendung von retroviralen und lentiviralen Vektoren, welche die vier Reprogrammierungsgene in die somatischen Zellen einführen. Diese viralen Vektoren integrieren vorzugsweise im aktiven Chromatin und besitzen daher das Potential, flankierende zelluläre Gene zu aktivieren. Darüber hinaus besitzen die meisten der vier Transkriptionsfaktoren eine onkogene Wirkung, die mit ihrer konstitutiven Genexpression einhergeht (Miyazaki et al., 2012). Obwohl die Expression der ektopischen vier Gene zum größten Teil in den etablierten iPS-Zelllinien ausgeschaltet ist, bleibt eine Reaktivierung der Expression in iPS-Zellen nicht ausgeschlossen. Dies könnte Tumorbildungen verursachen (Okita et al., 2007). Solche generierten iPS-Zellen können für die Untersuchung von Krankheitsmechanismen und für das Wirkstoffscreening dienen (Inoue und Yamanaka et al., 2011), jedoch stellt die skizzierte transgene Situation die Barriere zur Anwendung in der Regenerativen Medizin beim Menschen dar.

Mehrere alternative Strategien sind gerade wegen dieser Nachteile der viralen Reprogrammierung verfolgt worden. Diese beinhalten die Verwendung von episomalen Vektoren, nicht-integrierenden viralen Vektoren, die transiente DNA-Transfektion, Transposons und direkte Proteineinschleusung. Das gemeinsame Prinzip dieser Strategien ist die transiente Expression der vier Transkriptionsfaktoren unter Vermeidung transgener Rückstände. Diese Faktoren sollen die Reprogrammierung ohne eine dauerhafte Integration der vier Gene in das Wirtsgenom initiieren. Obwohl diese Strategien in den meisten Fällen funktionieren, ist die Effizienz der Generierung von iPS-Zelllinien signifikant niedriger im Vergleich zu den retroviralen und lentiviralen Vektoren. Vorteile und Nachteile der angewandten Methoden sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht der angewandten Methoden zur direkten Reprogrammierung somatischer Zellen zu pluripotenten Zellen

Viral od. nicht viral	Art des Vektors	Genomische Integration	Vorteile	Nachteile
Viral	Retrovirus	Ja	Stabile Integration in das Wirtsgenom; hohe Effizienz	Zu riskant wegen insertionaler Tendenzen; Tumorbildung
	Lentivirus	Ja	Reduziert das Risiko der transgenen Expression; hohe Effizienz	Zu riskant wegen insertionaler Tendenzen
	Adenovirus	Nein	Ohne virale Integration; hohe Effizienz	Könnten Virusgenom tragen
	Sendai virus	Nein	Ohne virale Integration; hohe Effizienz	Könnten Virusgenom tragen
Nicht viral	<i>piggyBac</i> -Transposon	Nein	Virusfrei	Arbeitsintensiver Prozess
	Plasmid	Nein	Virusfrei; keine Integration des Plasmids in das Wirtsgenom	Niedrige Effizienz, vier Runden der Transfektion
	Episomale Vektoren	Nein	Virusfrei; eine einzige Transfektion	Niedrige Effizienz
	Minicirclevector	Nein	Virusfrei; hohe Transfektionseffizienz	Lange ektopische Expression
	Protein	Nein	Virusfrei	Niedrige Effizienz
	RNA	Nein	Virusfrei; hohe Effizienz	Intensives Verfahren
	Small molecule	Nein	Virusfrei	Niedrige Effizienz

Die Anwendung von kleinen Molekülen um Pluripotenz in somatischen Zellen zu induzieren, kann eventuell eine sichere Methode sein um virenfreie iPS-Zellen zu generieren. Diverse kleine Moleküle wurden bereits in mehreren Arbeiten einzeln verwendet und konnten einige der Reprogrammierungsfaktoren ersetzen (Shi et al., 2008; Lyssiotis et al., 2009). Allerdings ist es bisher nicht möglich nur kleine Moleküle zu verwenden, um somatische Zellen zu reprogrammieren. Das Screening von kleinen Molekülen zur Zellreprogrammierung ist in vielen Laboren im Gange. Das ultimative Ziel wäre es iPS-Zellen herzustellen, die frei von jeglichen exogenem zugeführtem DNA-Material sind.

1.5.3 Epigenetische Reprogrammierung

Eine vollständige Reprogrammierung somatischer Zellen zu pluripotenten Zellen setzt eine komplette Reprogrammierung der DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Chromatinstruktur voraus (Mattout et al., 2011).

Die Reprogrammierung somatischer zu pluripotenten Zellen ist ein komplizierter Prozess, welcher eine ganze transkriptionelle Maschinerie involviert. Immer mehr Arbeiten zeigen, dass diese Maschinerie einer epigenetischen Regulation unterliegt (Heng et al., 2010). Die Fähigkeit der Transkriptionsfaktoren ihre Bindungsstellen zu binden, ist unter anderem durch epigenetische Mechanismen reguliert. Diese Mechanismen sind überwiegend die DNA-Methylierung, Histonmodifikationen, Histonvarianten und das ATP-abhängige Chromatin-remodeling (Lunyak et al., 2008).

Während der direkten Reprogrammierung werden beispielsweise viele fibroblastenspezifische Promotoren und Enhancer in einer frühen Phase stillgelegt. Diese Stilllegung erfolgt früh durch den Verlust der aktivierenden H3K4-Methylierung. Eine Reaktivierung findet erst am Ende der Reprogrammierung statt. Ein Teil der ESC-spezifischen Enhancer und Genpromotoren unterliegt früh in dem Reprogrammierungsprozess eine deutliche epigenetische Veränderung, noch vor ihrer transkriptionellen Aktivierung (Koche et al., 2011). Ein anderer Teil wird erst in einer späten Phase der Reprogrammierung umstrukturiert. Die frühen epigenetischen Umgestaltungen während der Reprogrammierung sind mit drastischen zellulären Veränderungen korreliert. So führen aktivierte epitheliale Marker wie Cdh1 zur Transition vom mesenchymalen zum epithelialen Phänotyp. Dieses Ereignis ist durch morphologische Veränderungen und eine erhöhte Proliferationsrate gekennzeichnet. Der schrittweise erfolgende Reprogrammierungsprozess ist auf eine graduelle Aktivierung der

Pluripotenzgene zurückzuführen (Abb. 1.10). So wird beispielsweise *NANOG* früher als *SOX2* aktiviert.

Zahlreiche Arbeiten zeigen mittels genomweiter Analysen eine globale Histonumstrukturierung nach der Induktion der Reprogrammierungsfaktoren (Koche et al., 2011, Sridharan et al., 2009). Dieses Histon-Remodeling ist von keinerlei Wirkung auf die Transkription. Pluripotenzspezifische Faktoren sind erst spät in dem Reprogrammierungsprozess aktiviert. Die entsprechenden Promotoren bleiben am Anfang der Reprogrammierung hypermethyliert. Eine vollständige Demethylierung ist erst in der späten Phase der Reprogrammierung zu sehen (Mikkelsen et al., 2008). Die Demethylierung der Pluripotenzschlüsselfaktoren wie Oct4 und Nanog ist ein stufenweiser Prozess, der während der Zellproliferation stattfindet (Polo et al., 2012).

Während der Reprogrammierung werden vor allem die *de-novo*-DNA-Methylierung und selektive Demethylierung für die Stilllegung der transduzierten retroviralen Promotoren bzw. die Aktivierung der endogenen Pluripotenzgene benötigt (Maherali et al., 2007). Die Demethylierung während der Reprogrammierung kann entweder passiv oder aktiv erfolgen. Während der passiven DNA-Demethylierung können die Reprogrammierungsfaktoren direkt an Genpromotoren oder Enhancer binden, um die Bindung von Dnmt1 an die hemimethylierte DNA während der Replikation zu verhindern (Teperek-Tkacz et al., 2011).

DNA-Demethylierung kann auch durch aktive Demethylierung erfolgen. Hierbei können Enzyme direkt die Methylgruppe von methylierten Cytosinen unabhängig von der DNA-Replikation aktiv entfernen (Bibikova et al., 2006).

Mehrere Studien liefern Evidenz dafür, dass klare epigenetische Unterschiede zwischen ESCs und induzierte pluripotente Stammzellen vorliegen. Die Studien zeigen ebenfalls, dass die iPS in fortgeschrittenen Passagen eher den ESCs als den frisch reprogrammierten IPS-Zellen ähneln. Dies deutet auf eine fortdauernde epigenetische Reprogrammierung jenseits ihrer Induktion hin.

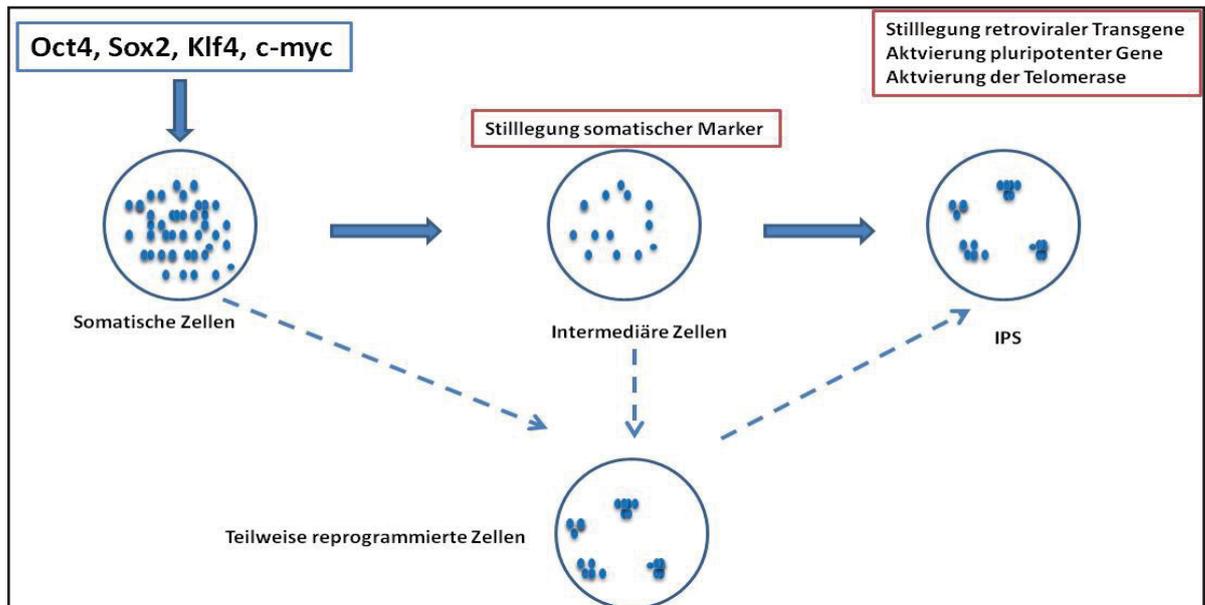


Abb. 1.10: Schritte der direkten Reprogrammierung. Die Ausgangszelle, „somatische Zelle“, weist nach Einführung der Reprogrammierungsfaktoren ein intermediäres Stadium auf. „Intermediäre Zellen“ verlieren bereits die ursprünglichen somatischen Marker sind aber noch keine pluripotenten Zellen. Nach erfolgreicher epigenetischer Umwandlung werden am Ende des Reprogrammierungsprozesses die Pluripotenzenmarker exprimiert. Immerhin schafft ein Teil der behandelten Zellen die vollständige Reprogrammierung nicht. Es wird angenommen, dass IPS-Zellen ebenfalls aus den „teilweise reprogrammierten Zellen“ stammen können.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die USSC-Zellen besitzen epigenetisch ein bivalentes epigenetisches Muster. Dies ist sowohl auf der Ebene der Histonmodifikationen als auch der DNA-Methylierung des Genpromotors des zentralen Pluripotenzfaktors *OCT4* zu finden (Santourlidis et al., 2011). *SOX2* und *NANOG* sind weitgehend unmethyliert. Eine Reaktivierung dieser Faktoren könnte das Differenzierungsverhalten der Stammzellen ändern. Um dies zu erreichen sollte versucht werden die Restmethylierung der Pluripotenzfaktoren aufzuheben und gleichzeitig die Acetylierung ihrer Histone zu fördern. Hierfür ist es erforderlich gewesen ein effizientes Behandlungsprotokoll mit epigenetisch wirkenden Substanzen zu optimieren. Hierbei ist die Wirksamkeit von 5'-Aza-2-deoxycytidine (5-Aza-dC) in der DNA-Demethylierung und Tichstotatin A in der Förderung der Histon-Acetylierung von Nutzen gewesen.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst die Methylierung der Pluripotenzfaktoren in den USSC Zellen weiter zu reduzieren, die Acetylierung ihrer Histone zu erhöhen und dann die Auswirkung dieser Behandlung auf die Differenzierungsfähigkeit der Zellen auf mehrere Ebenen zu untersuchen.

- *Material und Methoden*

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Name	Firma
CO ₂ Brutschrank	I G150	Jouan
Elektroporationsgerät	Pulse Contoller Plus Capacitance Extender Plus Gene Pulser ® II	Bio RAD
Inkubationsschüttler	Schüttelapparate 3005-3020 Modell G25	GFL Gesellschaft für Labortechnik
Inkubator	Certomat H	B. Braun
Küvetten (Elektroporation)	2-mm- Elektroporationsküvetten	peqLab
Platten für Zellkultur	100mmx20mm Corning® CellBind	Corning
Wellplatten	TC-Plate	Cellstar
Nanodrop	NanoDrop® N-1000 Spectrophotometer	PeqLabBiotechniques
Photometer	DU 640 Spectrophotometer	Beckman
Realtime PCR-Maschine	ABI PRISM™ Sequence Detector 7700	PE Applied Biosystems
Realtime PCR-Maschine	Stepone Plus	Applied Biosystems
96-Well PCR-Platten	Microamp Fast optical 96 well plate	Applied Biosystems
Thermocycler	GeneAmpPCR System 9700 und 2700	Applied Biosystems
Wasserbad	Model 1007	GFL
Vakuumentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf
Hybridisierungsgerät	Hybridisation 4	NimbleGen (Roche)
Array- Zentrifuge	Micoarray High Speed Centrifuge 220 V	Array It
Array-Scanner	GenePix 4000B	Axon Instruments
PCR-Maschine	GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems
Themomixer	Themomixer Comfort	Eppendorf
Sonifikator	VibraCell Model 75022	BioblockScientific
Tischzentrifuge	Universal 30 RF	Hettich
Standzentrifuge	ROTIXA P	Hettich
Lichtmikroskop	Leica Typ 090-135-002	Leica microsystem bWetzlar GmbH
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan2	Zeiss

2.1.2 Materialien für die Zellkultur

Tabelle 3: Verwendete Materialien und Reagenzien für die Zellkultur

Material	Firma
DMEM	Gibco
FCS	Perbio
Penicillin/Strepomycin	Invitrogen
Trypanblau	Sigma
PBS	
Trypsin	Gibco
G418 sulfat	Roth
RPMI 1640	Lonza
FCS	Biochrom
Mercaptoethanol	Gibco
Aza-2'-deoxycytidine	Invitrogen
Trichostatin A	Invitrogen
KO DMEM/F12	Gibco
Knockout serumreplacement	Gibco
Non-essential aminoacids	Invitrogen
Osteogenic Differentiation Medium SH30881	Thermo
AdvanceSTEM Cell Growth Nr. SH30878.02	Thermo
Neural Differentiation Medium, SH30889.02	Thermo
AdvanceSTEM Cell Growth Medium SH30878.02.	Thermo
AdvanceSTEMChondrogenic Differentiation Medium SH30889.02	Thermo

2.1.3 Oligonukleotidprimer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (Tab. 4) wurden mit dem Programm „Oligo 4.1“ entwickelt und thermodynamisch analysiert. Anschließend wurden die entsprechenden Sequenzen bei der Firma Thermo Scientific[®] synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Nach Auflösung in Wasser-Stocklösungen von 100 pmol wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4: Verwendete Primer.

	Gene	Sens-Primer	Antisens-Primer
Transkripte	<i>BETA-AKTIN</i>	gcactctccagccttc	ctagaagcatttcggtg
	<i>GAPDH</i>		
	<i>OCT4</i>	Gcccgaaagagaaagcgaaccag	tgacggagacaggggaaaggc
	<i>SOX2</i>	gcggaatagcatggcgag	ccgaacctatggagccaag
	<i>NANOG</i>	cagcttcacgttgctctgc	ccgaccactcatctagcccc
	<i>DNMT1</i>	cttctcagcacaaccgtcacc	ggtgcttgccaggatgtg
	<i>hTERT</i>	agagtgtctggagcaagttgc	cgtagtccatgttcacaatcg
	β - <i>TUBULIN</i>	atggacgagatggagttcacc	ggtgtcggcagcaagatg
Bisulfit-Konvertierung	<i>OCT4</i> Prom	gaggggagagaggggtgagtagttt	actccaacttctcttccaacttc
	<i>OCT4</i> Enhancer1	atgggtagtagggatttttggga	cctttaactacccaaaaaacaataaat
	<i>OCT4</i> Enhancer2	atagattttgaagggagtttag	ccaaaaaaaacaacttaacc
Sequenzierung	T3	attaaccctcactaaagg	-
	T7	taatacactcactatagg	-
Telomerenlänge	Telomerstandard	ttaggg ttagggtagggtagggtagggtagg gggttagggtagggtagggtagg gtagggtagggtagggtaggg	-
	36B4 standard	cagcaagtgggaaggtgtaatccgtc tccacagacaaggccaggactcgttg g taccggtgatgataatggg	-
	teloF	gttgggttgggttgggttggg ttgggtt	-
	teloR	ggcttgcttaccctaccctacc ttaccctaccct	-
	36B4F	cagcaagtgggaaggtgtaatcc	-
	36B4R	cccattctatcatcaacgggtacaa	-
	b-globinF	gcttctgacacaactgttccactagc	-
	b-globinR	caccaacttcatccacgttcacc	-

2.1.4 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme	Firma
Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect GmbH
DNA-Leiter, 100 bp (0,5 mg/μl)	peqLab
DNA-Leiter, 1 kb (0,1 μg/μl) Invitrogen	Invitrogen
DNase	Qiagen
dNTPs (10 mM)	peqLab
Ethidiumbromid (1 mg/ml)	Sigma
M-MLV reverseTranskriptase (200 U/μl) und 5x Puffer	Promega
Advantge 2 Polymerase	
Oligo (dT) 15 Primer (300 μg/ml)	Promega
PBS	SeragWiessner
RNase A (100 mg/ml)	Qiagen
Taq DNA Polymerase (250 U)	Qiagen
rRNasin [®] , RNaseInhibitor (40 U/μl)	Promega
RNase-freies Wasser	Qiagen
Sequencing RR-100 BigDye [®] Terminator und 5x Puffer	Applied Biosystems
Taq Polymerase (5 U/μl) und 10x Puffer	Qiagen
T4-DNA Ligase und 5x Puffer	Invitrogen
Fugene HD [®]	Roche
XtremeGene [®]	Roche
QuantiTect [®] SYBR [®] Green PCR Mastermix	Qiagen
EcoRI	Invitrogen
ClaI	Invitrogen
Mlu	Invitrogen
XhoI	Invitrogen
XbaI	Invitrogen
Ethanol absolut 2,5 L	Roth
≥99,5 %, zur Synthese, iso-Propanol, Dimethylcarbinol, 2-Hydroxypropan 2,5 L	Roth

2.1.5 Kits

Tabelle 6: Kits

Kit	Firma
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprepMiniprep Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAamp DNA Blood Mini Kit (250)	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen
EpiTectBisulfite Kit (48)	Qiagen
Power SYBR [®] Green PCR Master Mix, 1-Pack (1 x 5 ml)	Applied biosystems
MeDIPkit x10	Diagenode
MicroAmp Fast opticalAdhesive Film (100 Stück)	Applied biosystems
Fast Optical 96w plates barcoded 20/Pkg	Applied biosystems
GenomePlex [®] Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit	SigmaAldrich
Dual-Color DNA Labeling Kits	Roche
Hybridization Kit	Roche
Custom Sequence Capture 385K Array	Roche
NucleoBondXtra Maxi	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
TA Cloning [®] Kit (with pCR [®] 2.1 vector) <i>with One Shot[®] aTOP10 Chemically Competent E. coli</i>	Invitrogen
Senescence β -GalactosidaseStaining Kit	Cellsignalingtechnology
TeloTAGGGTelomereLength Assay	Roche

2.1.6 Bioinformatik

Tabelle 7: verwendete Logarithmen und Datenbanken

Programm	Firma bzw. Webseite
ABI PRISMTM Sequence Detection Systems Version 1.7 a	Applied Biosystems
ABI PRISMTM Sequence NavigatorTM Version 1.0.1	Perkin Elmer
ABI PRISMTM Sequence Sequence Analysis Version 3.7	Applied Biosystems
Chromas 1.0.0.1	Chromas MFC Application
Clone Manager Suite	Scientific&Educationalsoftware
ClustalW	www.ebi.ac.uk/clustalw/
DNA Duster	www.soe.ucsc.edu/~kent/dnaDust/dnadust.html
Lalign	www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html
NCBI-Server	www.ncbi.nlm.nih.gov
Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Oligo 4.1	Oligo
RepeatMasker	www.repeatmasker.org
Conservedregions	http://genome.ucsc.edu/
NimbleScan Version 2.5	Roche
SignalMap Version 1.9	Roche

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierungsmethoden

2.2.1.1 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* SURE

Gefrorene Bakterien aus der Stocklösung wurden auf einer Agarplatte (30 µg/ml Kanamycin (Kan); 12,5 µg/ml Tetracyclin (Tet)) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach ca. zwölf Stunden wurden einzelne Kolonien gepickt und in einer 25-ml-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einen Tag darauf wurde 1 l LB-Medium mit Kan/Tet mit 1/100 Volumen der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD von 0,5 bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden sie in einem Eisbad abgekühlt und 15 min lang bei 4000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen auf Eis in einem Liter kaltem 10%igem Glycerin resuspendiert und anschließend wie oben abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal mit 500 ml kaltem, 10%igem Glycerin wiederholt. Danach wurden die Zellen in 20 ml kaltem, 10%igem Glycerin resuspendiert und noch einmal bei 4000 x g und 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Glycerin aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension auf 40 µl Aliquots verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit einem linearisierten Vektor erfolgte in 20 µl-Ansätzen in Ligationspuffer. Verwendet wurden 100 ng linearisierter Vektor und die fünf- bis zehnfache Anzahl an DNA-Fragmenten (*insert*). Es wurden 4 U T4-DNA-Ligase pro 100 ng Gesamtmaterial eingesetzt. Der linearisierte Vektor und die DNA-Fragmente wurden zusammen mit dem T4-Ligase-Puffer für 5 min bei 65 °C inkubiert, damit sich die *Sticky ends* lösen. Nach Zugabe der Ligase erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 16 °C.

2.2.1.3 Elektroporation

Bei der Elektroporation wurden 50 bis 100 µl Aliquot von kompetenten *E. coli*-Zellen (*E. coli* SURE) auf Eis angetaut und mit 1 bis 2 µl des Ligationsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt. Die Zellsuspension wurde kurz auf Eis inkubiert, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und am Elektroporationsgerät einem elektrischen Puls (2,5 kv; 200 ohms; 25 µF; 5 ms) ausgesetzt. Danach wurde der Ansatz sofort in 1 ml Antibiotikum-freiem LB-Medium aufgenommen und 30 min bei 37 °C

geschüttelt. Der Ansatz wurde auf einer LB-Amp-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.4 Aufreinigungen der Plasmide

Für die Aufreinigung der Plasmide wurde je ca. 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Kolonie angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C und Schütteln bei 110 rpm wurde die Bakteriensuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen wurden durch dreiminütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend wurde die Präparation mit dem QIAprep Miniprep Kit entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die aufgezeigten Plasmide wurden in 35 µl Elutionspuffer aufgenommen. Für die Maxipräparationen wurden je 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Kolonie, die das erwartete Insert enthielt, angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Bakteriensuspensionen 5 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert und die Maxipräparation mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob der Vektor das erwartete Insert enthält, wurde je 1 µg Plasmid enzymatisch verdaut. Hierbei wurden dieselben Enzyme verwendet, die auch für die Klonierung eingesetzt wurden. Nach ca. dreistündigem Verdau bei 37 °C wurden die Proben auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch analysiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration wässriger DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch unter Verwendung eines Spektrophotometers „NanoDrop“ bestimmt. Dabei wurde jeweils 1,5 µl unverdünnter Probenlösung auf die Messvorrichtung aufgetragen und das Verhältnis der Absorption der Lösung von 260 nm zu 280 nm bestimmt. Der Vorteil der Messung mit diesem Gerät gegenüber einer Bestimmung der Konzentration mit einem herkömmlichen Photometer ist die geringe einzusetzende Menge an Probenflüssigkeit, die bei diesem Gerät auf 1 µl begrenzt werden kann.

2.2.2.2 Genomische Sequenzierung

Die Sequenzierungsmethode nach Sanger-Primzip basiert auf einer enzymatischen Reaktion. Die zu sequenzierende, doppelsträngige DNA wird zunächst thermisch in zwei Einzelstränge gespalten. Ausgehend von einer bekannten Sequenz, Primer, der sich an

einen Einzelstrang bindet, verlängert die DNA-Polymerase den fehlenden Strang der beiden komplementären gespalteten DNA-Stränge. Während der Reaktion werden Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) für die Synthese der entstehenden DNA benötigt. Diese Kettenabbruch-ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxylgruppe, welche für die Verbindung mit dem folgenden Nukleotid erforderlich ist. Unter Verwendung der der Elektrophoretische Mobilität werden die Kettenabbruchprodukte aufgetrennt und zur Fluoreszenz angeregt. Die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen dadurch Fluoreszenz unterschiedlicher Wellenlängen und können somit von einem Detektor gelesen werden. Mit Hilfe eines Chromatogramms kann nun die DNA-Sequenz wiedergegeben. Um die positiven Proben, welche den erwarteten Schnittmustern nach dem Kontrollverdau entsprachen, zu überprüfen, wurden diese sequenziert. Dafür wurde der folgende Reaktionsansatz eingesetzt:

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>		
1 µl	Big Dye Puffer	1 min		
			96 °C	
1 µl	Sequenziermix	} 10 sec	96 °C	
1 µl	Primer		5 sec	52 °C
1 µl	Plasmid-DNA		3 min	60 °C
6 µl	Wasser	∞	4 °C	
10 µl	Total			

2.2.2.3 Reverse Transkription (RT-)PCR

Die Reverse Transkription ermöglicht RNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umzuschreiben. Dies dient als Template für die Messungen der Transkription anhand der PCR oder auch *real time* PCR.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>	
10 µl	M-ML-Puffer (5 x)	60 min	42 °C
5 µl	dNTPs (10 mM)		
2 µl	Oligo dT Primer (0,5 µg/µl)		
x µl	RNA (1,5 µg)		
1,5 µl	M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µl)		
1 µl	RNasin (40 U/µl)		
ad 50 µl	dH ₂ O (RNase frei)		

2.2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um die durch die reverse Transkription gewonnene cDNA zu amplifizieren, wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) in 1 x PCR-Puffer durchgeführt. Das Reaktionsgemisch von 25 µl enthielt 10 mol/l dNTPs, 10 pmol von jedem Primer, 2,5 U Taq-Polymerase und 1,5 µl von der synthetisierten cDNA. Die PCR-Reaktion erfolgte unter den folgenden Bedingungen:

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>			
10 X	PCR-Puffer	13 min	95 °C	Initiale Denaturierung	
10 mol/l	dNTPs	35 x {	1 min	95 °C	Denaturierung
10 pmol	SensPrimer		30 sec	Primer-TM	Primer-Annealing
10 pmol	Antisens-Primer		25 sec	72 °C	Elongation
1,5 µl	cDNA	7 min	72 °C	Finale Elongation	
2,5 U	Taq-Polymerase				
ad 25 µl	dH ₂ O (DNase-frei)				

Bei der Verwendung von *Advantage 2*, *Proofreading*-Polymerase wurde folgender Reaktionsansatz eingesetzt:

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>			
2,5 µl	PCR-Puffer 10 X	5 min	95 °C	Initiale Denaturierung	
0,5 µl	dNTPs 10 mol/l	35 X	30 sec	95 °C	Denaturierung
1 µl	SensPrimer 10 pmol		30 sec	Primer-TM	Primer-Annealing
1 µl	AS-Prime 10 pmol		1min/Kb	72 °C	Elongation
40 ng	cDNA		7 min	72 °C	Finale Elongation
2,5 U	Advantage 2 Polymerase				
ad 25 µl	dH ₂ O (DNase-frei)				

2.2.2.5 Real-Time-PCR

Das Real time-PCR-Verfahren ermöglicht die direkte Detektion der PCR-Produkte mittels Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierter Sonden. Die synthetisierten Produkte bzw. die entsprechenden Signale können somit in Echtzeit visualisiert werden. Dabei werden unterschiedliche Sonden und Fluoreszenzfarbstoffe und zum Einsatz kommen. In dieser Arbeit wurde SYBR Green hierfür eingesetzt. SYBR GREEN ist ein nicht-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff und interkaliert an jede doppelsträngige DNA. Die Berechnung der Werte der detektierten Produkte erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Für jede Probe wird der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des Zielgens abgezogen. Das „ $\Delta\Delta\text{CT}$ “-Berechnungsmodell wird für die Bestimmung des Werts der Expression verwendet. Dabei wird der ΔCT -Wert der Kontrolle vom ΔCT -Wert der behandelten Proben abgezogen. Aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ergibt sich die relative Expressionsdifferenz zwischen den zwei Proben, welche auf das Referenzgen normalisiert und auf eine Kontrollprobe bezogen. Der Wert der Expression ist gegeben durch:

$$\Delta\text{CT} = \text{Ct}_{(\text{Zielgen})} - \text{Ct}_{(\text{Referenz})}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{(\text{behandlet})} - \Delta\text{CT}_{(\text{Kontrolle})}$$

Der Wert der Expression ist gegeben bei: $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$

Für solche quantitative Transkriptanalyse wurde in dieser Arbeit eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Normierung erfolgte über GAPDH (*housekeeping gene*). Anschließend wurden alle Werte auf einen Referenzwert wie die unbehandelte Probe bezogen. Die PCR-Reaktion erfolgte unter den folgenden Bedingungen:

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>	
1 µl	cDNA	1 min	96 °C
12,5 µl	Syber Green	35 x {	10 sec 96 °C
1 µl	SPrimer		5 sec Tm-Primer
1 µl	AS-Primer		3 min 60 °C
9,5 µl	dH ₂ O	∞	4 °C
10 µl	Total		

2.2.2.6 Methylierungsspezifische PCR (MSPCR)

Um den Methylierungsstatus spezifischer Cytosine eines DNA-Einzelstranges mit limitierter Länge zu bestimmen, wurde 1996 von Herman und Kollegen eine entsprechende Methode entwickelt (Herman et al., 1996). Die chemische Modifizierung von Cytosin in Uracil durch Bisulfit-Behandlung stellt ein effizientes Verfahren für die Untersuchung von DNA-Methylierung dar. Bei der Bisulfit-Behandlung werden alle Cytosine in Uracil umgewandelt, aber diejenigen, die methyliert (5-Methylcytosin) kann resistent zu der Konvertierung sein (Frommer et al., 1992). Die konvertierte DNA dann amplifiziert und analysiert werden. Die Primer für die MSPCR werden dann für entweder den methylierten oder unmethylierten Fall konzipiert Die Effizienz der MSPCR ist somit von dem Ausgangsstatus der Sequenz, methyliert oder nicht methyliert, abhängig .

2.2.2.7 Bisulfit-Konvertierung

Die sogenannte Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung beruht auf die Tatsache, dass mit Hilfe von Natriumbisulfit unmethyliertes Cytosin effizient in Uracil umwandelt werden kann, während 5-Methylcytosin vor dieser Modifikation weitgehend geschützt ist.

Um die Spezifität der Reaktion von Natriumbisulfit mit Cytosin der einzelsträngigen DNA zu erhöhen, ist eine alkalische Denaturierung der DNA erforderlich. Das Bisulfit-Ion wird unter Inkubation mit Natriumbisulfit an das Kohlenstoffatom C-6 des Cytosinrings addiert.

Abb.2.1: Schritt 1: Dadurch entsteht ein Cytosin-Sulfonat, welches durch hydrolytische Desaminierung in Uracil-Sulfonat umgewandelt wird

Schritt 2: Durch alkalische Desulfonierung der modifizierten Base (Uracil-Sulfonate) wird das Uracil desulfoniert

Abb.2.1: Schritt 3: Einschließlich wird die Reaktion neutralisiert. Demzufolge werden alle unmethylierten Cytosine in Uracile konvertiert. Der nukleophile Angriff des Bisulfit-Anions auf das 5-Methyl-Cytosin ist sehr ineffizient.

Als Produkt der Konvertierung entstehen zwei nicht mehr zueinander komplementäre Einzelstränge. Anstelle des Uracils wird in der PCR Thymin eingebaut. Um die Sequenzänderungen zu determinieren, werden Primer für den methylierten bzw. für den unmethylierten Fall entwickelt.

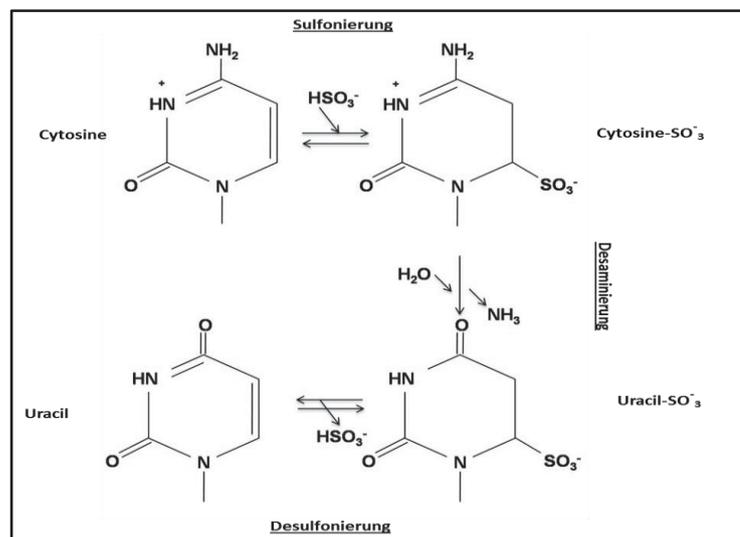


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konvertierung

Schritt 1: Addition des Bisulfitions an das Kohlenstoffatom C-6 des Cytosinrings.

Schritt 2: Cytosin-Sulfonat wird durch hydrolytische Desaminierung in Uracil-Sulfonat umgewandelt.

Schritt 3: Uracil-Sulfonat wird im alkalischen Schritt zu Uracil desulfoniert.

Die Verwendung bisulfit-konvertierter DNA in *Real time*-PCRs benötigt eine Bisulfit-Konvertierung der DNA. Es wurde dabei nach dem Protokoll EpiTect[®] Bisulfite von Qiagen vorgegangen. Dabei wurde 1 µg DNA eingesetzt und mit 85 µl Bisulfit-Lösung sowie 35 µl DNA Protect-Buffer, der die DNA-Degradation minimiert, versetzt. Der Reaktionsansatz wurde gründlich gemischt und in den folgenden Thermobedingungen konvertiert:

Denaturierung	99 °C	5 min
Inkubation	60 °C	25 min
Denaturierung	99 °C	5 min
Inkubation	60 °C	85 min
Denaturierung	99 °C	5 min
Inkubation	60 °C	175 min
Inkubation	20 °C	∞

Anschließend wurde der Ansatz an eine Säule gebunden und gewaschen. Zur Desulfonierung der DNA wurde NaOH-Lösung auf die Filtermembran gegeben und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen wurde die DNA in 20 µl Wasser eluiert.

2.2.2.8 Bisulfit-Sequenzierung und TA-Cloning.

Aus der Bisulfit-konvertierten DNA wurden die zu sequenzierenden Zielregionen mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf eine Gel-Elektrophorese aufgetragen und die entsprechenden Banden daraus isoliert und aufgereinigt. Das PCR-Produkt bzw. *Insert* wurde anschließend mittels TA-Cloning-Kit in einem Vektor nach den Herstellerangaben kloniert. Positive Klone wurden dann gepickt und angereichert. Die nicht modifizierte Cytosine (C) ist durch Thymin (T) ersetzt. Die verbleibenden Cytosine weisen auf die Positionen hin, an denen 5 mC vorlag. Jede Sequenz spiegelt dabei den Methylierungsstatus in einem einzelnen Klon wider. In dieser Arbeit wurden für jede Methylierungsanalyse durchschnittlich 30 Klone verwendet.

2.2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Um die DNA-Fragmente bzw. PCR-Produkte zu analysieren, wurden je nach DNA-Größe 1%ige bzw. 1,5 %ige Agarosegele verwendet. Die Gele wurden mit etwa. 30 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Als Marker dienten abhängig von der erwarteten DNA-Größe die 100 bp Leiter bzw. 1 kb Leiter. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte in einem elektrischen Feld mit einer Spannung von ca. 4 V/cm. Anschließend wurden die Gele unter dem UV-Licht fotografiert.

2.2.2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Hierbei wurde das DC Protein-Assays von BioRad[®] angewendet. Das Prinzip der Methode beruht auf dem Proteinnachweis nach Lowry. Der Proteinnachweis nach Lowry wird mit einem alkalischen Kupferreagenz durchgeführt, in dem sich auch präzipitierte Proteine rasch auflösen und folglich gut nachweisbar sind. Die Farbreaktion beruht auf der Bindung des Farbstoffs an Tryptophan und Tyrosin im Protein und läuft in zwei Schritten ab. Zuerst reagiert das Protein in dieser alkalischen Lösung mit dem Kupfer, anschließend wird das Folinreagenz durch das kupferbehandelte Protein reduziert (Lowry et al., 1951). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Bezug auf eine Standardkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen von 0,125 bis 2 mg/ml.

Zunächst wurde der Puffer A'(20 µl Puffer S + 1 ml Puffer A) vorbereitet. Anschließend wurden 5 µl von dem Protein-Lysat, 25 µl Puffer A' und 200 µl Puffer B zusammengegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 750 nm im Photometer gemessen. Als Leerwert wurde statt des Lysats 1 µl Wasser verwendet.

2.2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und *western-blotting*

Anhand der SDS-PAGE können verschiedene Proteine eines Gemisches (Proteinlysats) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch Inkubation der Proteine mit SDS- und S-S-reduzierenden Mitteln werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Die stark negative Ladung von SDS gleicht alle Ladungen der Proteine aus, sodass i.d.R. alle Proteine gleich stark negativ geladen sind. Mit dieser Methode erhält man Informationen über das Molekulargewicht von Proteinmonomeren. Hierbei ereignet sich die Trennung der untersuchten Proteine mittels eines Acrylamid-Bisacrylamid-Gels. Die Gele bestehen aus

zwei verschiedenen Schichten, dem Sammel- und dem Trenngel. Das Sammelgel unterscheidet sich vom dem Trenngel durch größere Poren und den pH-Wert. Die Proteine wandern somit, ohne Auftrennung, zunächst schneller. Erreichen die Proteine das Trenngel wandern die Proteine deutlich langsamer und erfolgt dadurch, abhängig von deren Größe, eine Auftrennung in einzelne Banden. Die Zusammensetzungen der Gele sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

Komponenten	Sammelgel (10 %)	Trenngel (4 %)
Wasser	4,9 ml	6,4 ml
40 % Bis/Acrylamid	2,5 ml	1 ml
1,5 M Tris-HCl	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	50 µl	50 µl
Temed	5 µl	10 µl

2.2.2.12 Methylierte DNA-Immunpräzipitation (MeDIP)

Methylierte DNA-Regionen können gezielt mittels spezifischen Antikörpers angereichert werden. Das monoklonale 5-Methylcytosin Antikörper bindet spezifisch an das 5-methylierte Cytosin. Ein Mikrogramm der genomischen DNA aus den kultivierten Zellen wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl zu 300 bp–1000 bp geschert. Hierfür wurde das Bioruptor-System verwendet. Folgende optimierte Einstellungen wurden gewählt: Power Low; 15 Sek. ON/OFF 15 sek.; 20 Zyklen. MeDIP wurde in Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers unter Verwendung des MagMeDIP-Kits durchgeführt. Die gescherte DNA wurde mit Anti-5-Methylcytosin-Antikörpern über Nacht rotierend immunpräzipitiert und anschließend gewaschen. Eine interne Kontrolle, *input*, jeder Probe wurde aufgehoben und nicht mit dem Antikörper inkubiert.

2.2.2.13 Genomweite Amplifikation WGA

Die MeDIP liefert relativ geringe Mengen an DNA. Um aus dieser limitierten Menge Methylierungsanalysen prozessieren zu können, war es notwendig, die präzipitierte DNA genomweit anzureichern. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion. Während der Reaktion wird die DNA ähnlich wie bei konventionellen PCR enzymatisch katalysiert. Die Besonderheit der WGA liegt darin, dass

die Anreicherung unspezifisch ist, sodass die gesamte DNA relativ gleichmäßig amplifiziert wird. Die Methode besteht aus drei wichtigen Schritten:

- Fragmentierung
- Erstellung einer DNA-Library
- Isothermale Amplifikation

In dieser Arbeit wurde das GenomePlex[®] Complete WGA Kit verwendet, welches auf dem oben beschriebenen Verfahren basiert.

2.2.2.14 DNA-Markierungen

Die Methode basiert auf der Hybridisierung aller möglichen Hexanukleotide an die zu markierende DNA. Alle Sequenzkombinationen sind in dem Hexanukleotide-Primer anwesend. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass alle DNA-Vorlagen statistisch gleich amplifiziert werden. Der komplementäre Strang wird von 3'-OH der Hexanukleotide mittels Klenow-Enzym synthetisiert.

Die Methode lässt sich in folgenden Schritten darstellen:

- Denaturierung der DNA. Für die Hybridisierung der hexanucleotide primer muss die DNA-Vorlage einzelsträngig vorliegen.
- Hybridisierung der Hexanukleotide primer an die DNA-Vorlage.
- Synthese des komplementären Strangs von the 3'OHä-des Random Hexanukleotide primer mittels Klenow-Enzym.
- Modifizierte Deoxynucleoside werden inkorporiert in den neuen synthetisierten komplementären DNA-Strang.
- Stopp der Reaktion durch Zugabe von EDTA oder durch Erhitzen.
- Entfernung der nicht inkorporierten Deoxynucleoside.

2.2.2.15 Hybridisierung auf NimbleGen-Microarrays

Die Hybridisierung bezeichnet den Prozess der Inkubation der markierten DNA mit den auf Microarray annotierten Sonden. Während der Inkubation wird die DNA komplementär zur Sonde hybridisiert. Gebundene fluoreszierende DNA kann anschließend anhand der emittierten Fluoreszenz quantifiziert werden. 1 µg DNA jeder amplifizierten DNA-Probe wurde auf NimbleGen-Array (385K RefSeq Promoter Array Roche, Basel, Schweiz) mit allen bekannten RefSeq Genen aufgetragen. Die Promotorregionen auf diesen Arrays

werden durch 50–75mer-Sonden mit einem mittleren Abstand der Sonde von 100 bp mit einem Promotor „upstream tiling“ von 2.200 bp und einem „downstream tiling“ von 500 bp bedeckt. Insgesamt sind 18.028 Promotorregionen abgedeckt. Das Hybridisierungsverfahren wurde angewendet wie vom Hersteller beschrieben.

2.2.2.16 Telomerlänge-Assay mittels *southern-Blot*

Die Methode beruht darauf, die verdauten „of terminal restriction fragments“ TRF der Telomere mittels southern-Blot zu analysieren. Das Verfahren besteht aus drei wesentlichen Schritten:

- **Schritt 1: Verdau der genomischen DNA**

Gereinigte genomische DNA wird durch eine optimierte Kombination von häufig schneidenden Restriktionsenzymen verdaut. Die Enzyme wurden so selektiert, dass Telomer-DNA und subtelomerische DNA, welche ein repetitives Muster aufweisen, nicht geschnitten werden können. Nicht-Telomer-DNA wird dann zu kleinen Fragmenten geschnitten.

- **Schritt 2: Gel-Elektrophorese und Southern-Blot**

Nach dem DNA-Verdau werden die DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese getrennt, dann auf eine Nylonmembran durch Southern-Blotting übertragen.

- **Schritt 3: Hybridisierung und Detektion durch Chemilumineszenz**

Die geblotteten DNA-Fragmente werden zu einer Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde, die spezifisch für Telomere ist, hybridisiert. Die hybridisierte DNA wird dann mit einem DIG-spezifischen Antikörper, der kovalent an eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, inkubiert. Schließlich wird die immobilisierte Telomerasequenzsonde durch ein hochempfindliches Chemilumineszenz-Substrat für alkalische Phosphatase, CDP-Star, detektiert. Die durchschnittliche Länge der TRF wird durch Vergleich der Signale mit einem Standardmarker bestimmt.

2.2.3 Bioinformatische Analysen

Die hybridisierten Arrays wurden mittels Axon 4000B microarray scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) gescannt. Die generierten Bilder wurden mit NimbleScan Version 2.5 verarbeitet. Das Verhältnis (*ratio*) methylierte DNA zur internen Kontrolle (IP/input) wurde unter Verwendung der „Quantil method“ nach Varianzstabilisierung

durch log₂-Skalierung normalisiert. Der Hierarchical Clustering der Proben wurde mit einer Minus-Korrelationsmetrik und der ungewichteten durchschnittlichen Entfernung (auch als Gruppendurchschnitt bekannt) der log₂ quantiled normierten Methylierungsverhältnisse aller Sonden durchgeführt. Die gesamte Datenverarbeitung einschließlich der Abbildung der Microarray-Sonden an Promotoren, Genannotation, Datennachbearbeitung, Hauptkomponentenanalyse, Identifizierung von differenziell methylierten Regionen und alle Grafiken wurden mit in-house entwickelten Funktionen in Matlab durchgeführt.

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Mycoplasmentest

Die verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen getestet. Der Mycoplasmentest (VenorE[®] GeM) war stets negativ.

2.2.4.2 Zellkultivierung, Passagieren und Zählung

Die Kultivierung der USSC-Zellen fand im Brutschrank bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % statt. Frühe Passagen (P5-P6) von USSC wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und proliferiert. Die Zusammensetzung des Medium bestand aus DMEM Glutamax[®] (Fa. Gibco) unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin (50.000 IE, Fa. Gibco) und 30% FCS (Fa. Cambrex). Bei einer Konfluenz von ca. 70 bis 80% wurde die USSC nach dem Spülen mit PBS (Fa. Invitrogen) mit Trypsin/EDTA (Fa. Gibco) vereinzelt und passagiert. Die vereinzelt Zellen wurden in einer Konfluenz von ca. 30 % wieder ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 60 bis 70% wurden wieder passagiert oder mit den epigenetischen Agenzien behandelt.

Die Zellzählung erfolgte in der Neubauerzählkammer. Hierfür wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau vermischt und vier Großquadrate ausgezählt. Zur Berechnung der Zellzahl wurde die folgende Formel angewandt:

$$\text{Zellzahl (104 Zellen/ml)} = \text{Gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10 : 4$$

2.2.4.3 RNA und DNA-Isolierung aus den Zellkulturen

Das Kultivierungsmedium wurde abgesaugt, die Zellen ein Mal vorsichtig mit PBS gewaschen. Zellen, aus denen DNA isoliert wird, wurden in 200 µl PBS aufgenommen und entweder lysiert oder eingefroren. Zellen, aus denen RNA isoliert wird, wurden in 200 µl

RLT-Puffer enthaltend β -Mercaptoethanol aufgenommen und lysiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy und die DNA mit Hilfe vom Blood Kit von Qiagen isoliert. Die Konzentration der Nukleinsäure wurde photometrisch unter Verwendung eines Spektrophotometers „Nano Drop“ bestimmt.

2.2.4.4 Epigenetische Behandlung der Zellen

Die USSC wurden in dieser Arbeit epigenetisch behandelt. Zum einen sollte die Methylierung bzw. Rest-Methylierung aufgehoben und zum anderen die Acetylierung gefördert werden. Hierfür wurden die Agenzien 5-Aza-dC bzw. TSA angesetzt. Lyophilisierte 5-Aza-dC wurde in Wasser aufgelöst. Aufgrund der schnellen Degradation des Agenzes wurden bei jeder Behandlung neue Lösungen angesetzt. Die Lösungen wurden auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Trichostatin A wurde in DMSO gelöst, in 2 mg/ml aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. 100.000 USSC SA 8/25 und SA 5/73 wurden ausgesät und bei einer 60- bis 70% Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen von 5-Aza-dC (0 μM ; 0,5 μM ; 1,5 μM ; 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 5 μM) bzw. von Trichostatin A (0 nm, 10 nm, 25 nm, 50 nm, 75 nm und 100 nm) behandelt. Das Wachstum und die Sterblichkeit wurden während der Kultur bewertet. Jede Konzentration wurde in drei unabhängigen Experimenten getestet. Im zweiten Schritt wurden die Zellen gleichzeitig mit 5-Aza-dC und Trichostatin behandelt. Aufgrund des Wirkungsmechanismus von 5-Aza-dC, welches an die DNA-Replikation gekoppelt ist, und dem Proliferationsverhalten der USSC dauerte die epigenetische Behandlung der Zellen einen bis drei Tage.

2.2.4.5 Kultivierung der Präsphäroiden

Um die entstandenen Präsphäroid-Kolonien expandieren zu können, war es nötig sie zu isolieren und unter passenden Bedingungen zu kultivieren. In einem ersten Schritt wurden die Kolonien unter dem Lichtmikroskop lokalisiert und mit Hilfe eines Stifts auf dem Boden der Platte gekennzeichnet. Im zweiten Schritt wurden sie einzeln mit Hilfe einer sterilen 200 μl -Pipettenspitzen gepickt. Die gepickten Präsphäroide-Kolonien wurden zunächst vereinzelt und dann in 6 cm Petrischalen in 3 ml des unten beschriebenen Sphäroid-Mediums eingesetzt:

- * DMEM 20 % FCS
- * 1 % Penicillin/Streptomycin
- * 100 ng/ml Recombinant Human Stem Cell Factor
- * 2 mM L-Glutamat
- * Penicillin/Streptomycin

Jeweils nach 48 Stunden der Inkubation wird das Medium durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und die Zellen in neuem Medium inkubiert, das zu 15 Vol.-% aus dem konditionierten und filtrierten vorherigen Medium und zu 85% aus frischem Pluripotenz-Medium besteht. Nach ca. zehn Tagen erscheint makroskopisch sichtbar eine große Anzahl eines neuen Zelltyps.

2.2.4.6 Die Kultivierung und Expansion der SpheUSSC.

Die SpheUSSC wurden im USSC-Medium, wie von Kögler et al. 2004 beschrieben, kultiviert und das Medium wird in einem Rhythmus von drei Tagen gewechselt. Die kugelige Zellaggregatform wird somit beibehalten. Die Zellkolonien wachsen hierbei einheitlich in Suspension.

Zusätzlich zu dem USSC-Medium wurde ebenfalls Medium verwendet, welches undifferenzierte Zellen sowie die Pluripotenz fördert. Dieses Expansionsmedium wurde aus dem basalen Medium Knockout DMEM/F12 zusammengesetzt. Dieses Medium ist optimiert zur Erhaltung und zum Wachstum von embryonalen Stammzellen in einer Kokultivierung mit Feeder-Zellen. Um das Kultur-Milieu weiter zu optimieren, wurde das so hergestellte Medium mit den Sphären selbst konditioniert. Hierfür wurde das basale Medium für 48 Stunden zusammen mit den Sphären in Flaschen gehalten und danach durch einen 0,45 µm-Filter filtriert. Dieses konditionierte Medium wurde anschließend zu 15 Vol.-% mit dem basalen Medium versetzt. So besteht das Expansionsmedium aus 85% basalem Medium und 15 % konditioniertem Medium.

Basales Spheroid-Medium

- 390 ml Knockout DMEM/F12 (Fa. Gibco)
- 100 ml Knockout serum replacement (Fa. Gibco)
- 5 ml Non-essential aminoacids
- 5 ml Pen/Strep/Glu
- 100 µM β-Mercaptoethanol

2.2.4.7 Seneszenz-Assay

Die Detektion seneszenten Zellen basiert auf der erhöhten Aktivität der lysosomalen β -Galaktosidase (Kurz et al., 2000). Zellen unter normalen Kulturbedingungen exprimieren in Lysosomen die β -galactosidase. Die enzymatische Aktivität kann bei pH 4 detektiert werden. Eine Seneszenz der Zellen ist mit einer erhöhten Aktivität der β -galactosidase korreliert. Die erhöhte Menge des Enzyms lässt sich bei pH 6 messen. Mittels des chromogenischen Substrats 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β D-galactopyranoside (X-gal) lassen sich seneszente Zellen detektieren. Unter dem Mikroskop scheinen seneszente Zellen grün-blau.

2.2.4.8 Oil-red-O Staining

Die Fettrotfärbung ermöglicht die optische Detektion von Neutralfett, Triglyzeriden und Cholesterolestern im Zytoplasma von differenzierten Adipozyten (Proescher et al., 1946; Ramirez-Zacarias et al., 1992). Die differenzierte Adipozyten wurden vorher mit Formalin fixiert und PBS gewaschen. Danach folgte ein Waschschrift mit Isopropanol 60 % und eine Inkubation mit frisch angesetzter Oil red O-Lösung für ca. 15 min. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit Isopropanol 60 % gewaschen. Unter dem Mikroskop wurden die rot gefärbten Zellen gezählt.

2.2.4.9 Alizarin red staining

Alizarin rot ist ein Anthrachinon-Derivat. Er wird oft verwendet, um Kalzium in Gewebeschnitten zu detektieren (Hoyte et al., 1960). Kalzium bildet einen Alizarin-red-S-Calcium-Komplex in einem Chelat-Verfahren. Diese Eigenschaft wurde genutzt um die Osteodifferenzierung der Zellen zu evaluieren. Nach Osteoinduktion und Differenzierung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurde 70 % eiskaltes Ethanol zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der fixierten Zellen mit destilliertem Wasser wurde die Alizarin-Lösung zugegeben und für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen dreimal mit Wasser gewaschen und unter Mikroskop bewertet.

2.2.4.10 Alcianblau-Färbung

Alcianblau ist in der Lage, die polyanionischen Proteoglykane der Extrazellulärmatrix zu binden. Gebundene Proteoglykane scheinen unter dem Mikroskop blau (Bjornsson et al., 1993). Die Stärke der Färbung ist von der gebundenen Menge abhängig. Eine starke Färbung deutet also auf eine effiziente Chondrozyten-Differenzierung. Nach

Chondroinduktion und Differenzierung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurde 70 % eiskaltes Ethanol zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der fixierten Zellen mit destilliertem Wasser wurde 1 % Alcianblau-Lösung zugegeben und für 60 min inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen dreimal mit Wasser gewaschen und unter dem Mikroskop bewertet.

- *Ergebnisse*

3. Ergebnisse

In einer vorausgegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die USSC-Zellen eine bivalente epigenetische Konformation der wichtigsten Pluripotenzmarker aufweisen (Santourlidis et al., 2011). Dies könnte bedeuten, dass beispielsweise eine Aufhebung der DNA-Methylierung der regulatorisch wichtigen Genbereiche dieser Pluripotenzinduktoren ggf. zu ihrer transkriptionellen Aktivierung führen könnte. Eine gezielt genspezifische, fokale Demethylierung ist methodisch noch nicht möglich. Eine DNA-Demethylierung kann allerdings gelingen, indem man die Methylierung der DNA durch die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) während der Replikation inhibiert (Creusot et al., 1982). Einer der gut etablierten Hemmer von DNA-Methyltransferasen ist das 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC). So ist 5-Aza-dC als Hemmer beispielsweise der Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 gut beschrieben (Carpinelli et al., 1993). 5-Aza-dC ist in der Lage, in bestimmten Konzentrationen eingesetzt zu werden und nach einer definierten Anwendungsdauer, globale sowie fokale Demethylierung der DNA während der DNA-Replikation zu bewirken (Patra et al., 2009). Interessanterweise wurde für das Gen *SOX2*, einen weiteren zentralen Co-Masterregulator der Pluripotenz, eine bivalente Histon-Signatur, bestehend aus der „aktivierenden“ dimeH3K4 und der „reprimierenden“ Histonmodifikation trimeH3K27 in den USSC-Zellen nachgewiesen (Santourlidis et al., 2011). Auch eine artifiziell erzeugte Acetylierung kann eine Aktivierung des Chromatins bewirken (Bohm et al., 1997). Ein bekanntes Agens, das in der Lage ist die Histondeacetylase zu hemmen und somit das Chromatin zu aktivieren, ist das epigenetisch wirkende Agens Trichostatin A (Yoshida et al., 1990).

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst der Effekt der beiden Agenzien auf die USSC getestet und evaluiert werden. Im zweiten Schritt sollte ein optimiertes Behandlungsverfahren etabliert werden, das zu einer Veränderung der USSC führen könnte. Hierfür wurden die USSC-Zelllinien und verschiedene Agenzien-Konzentrationen und Kombinationen getestet. Die optimalen Konzentrationen und Kombinationen wurden dann für die folgenden Versuche verwendet. Die daraus generierten Zellen wurden abschließend molekularbiologisch charakterisiert und ihr Differenzierungspotential evaluiert.

3.1 Der Effekt von 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC) und Trichostatin A (TSA) auf die Transkription der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT-1) in USSC-Zellen

Um den Effekt der beiden Agenzien auf die zu untersuchenden USSC-Zellen zu prüfen, wurden USSC-Zellen sowohl mit 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) als auch mit TSA und mit der Kombination der beiden Substanzen behandelt.

Es ist bekannt, dass die Methylierung des neu entstehenden DNA Doppelstrangs während der Replikation der DNA durch die Blockade der DNMT1 mit 5-Aza-dC inhibiert wird. Andere Studien belegen, dass 5-Aza-dC auch indirekt zur einer Degradation der DNMT1 führen kann (Ghoshal, et al., 2005). Um den Effekt von 5-Aza-dC auf die Erhaltungsmethyltransferase DNMT1 in USSC einzeln bzw. in Kombination mit dem HDAC-Inhibitor TSA zu ermitteln, wurden die USSC (Linie SA 8/25) für zwei Tage mit frisch angesetzten Agenzien behandelt. So wurden 60 bis 70 % konfluente Zellen mit den in der Literatur für andere Zellen beschriebenen Konzentrationen behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen mit DMSO behandelt.

Nach ca. 48 Stunden wurde RNA aus den behandelten Zellen extrahiert und zur cDNA umgeschrieben um die Transkription der *DNMT1* messen zu können. Mittels der relativ quantifizierenden *real time* PCR (RT-PCR) wurde die Transkription der DNMT1 festgestellt. Eine Reduktion der Transkription der *DNMT1* um ca. 40%, verglichen mit den nicht behandelten Zellen, wurde dann gemessen, wenn die Zellen zuvor mit der Kombination der beiden Substanzen behandelt worden waren. Hingegen führt die Einzelbehandlung mit entweder 5-Aza-dC oder TSA zu keiner signifikanten Abnahme der *DNMT1*-Transkription (Abb. 3.1). Dieses Ergebnis zeigt eine synergistische Wirkung der beiden Agenzien auf die Transkription von *DNMT1*. Es ist bekannt, dass 5-Aza-dC und TSA eher eine aktivierende Funktion auf Genpromotoren haben (Ghoshal et al., 2002). Es ist möglich, dass im Fall der behandelten Zellen die epigenetischen Agenzien eine indirekte reprimierende Wirkung auf die Transkription von *DNMT1* induziert haben.

Für die folgenden Experimente mit den USSC werden verschiedene Kombinationen und Konzentrationen von 5-Aza-dC und TSA über unterschiedliche Behandlungszeiten eingesetzt.

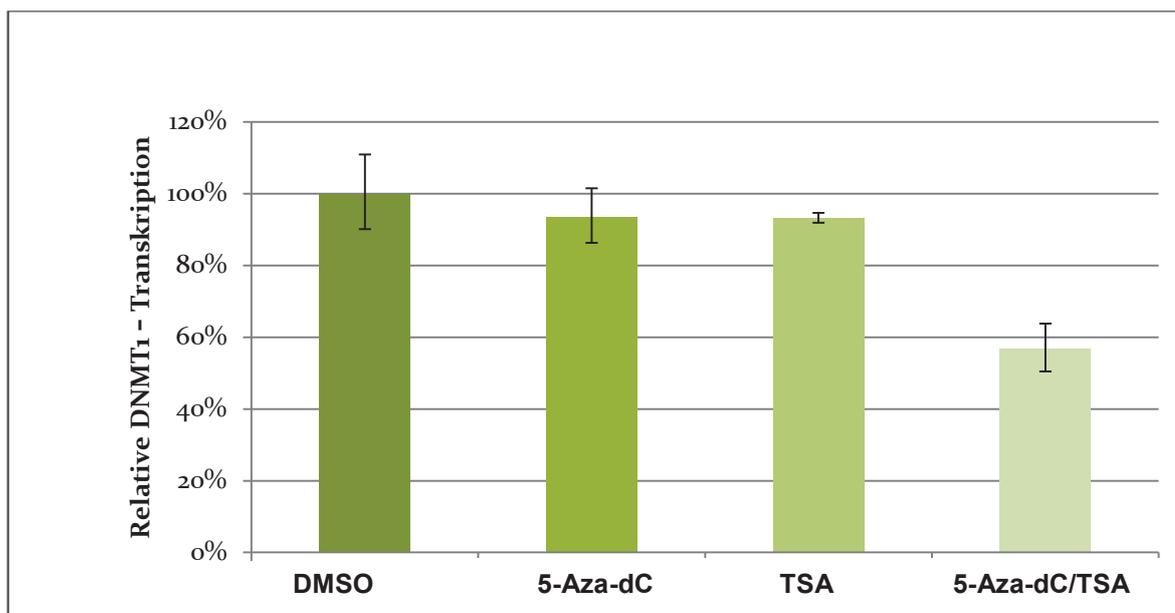


Abb. 3.1: Relative Quantifizierung der *DNMT1*-Transkription nach der epigenetischen Behandlung. Die Balken präsentieren die relative *DNMT1*-Transkription. Die USSC (Linie SA 8/25) wurde mit 5-Aza-dC (1 μ M) oder TSA (25 nM) bzw. mit der Kombination aus 5-Aza-dC und TSA in denselben Konzentrationen über einen Zeitraum von 48 Stunden behandelt. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte USSC verwendet. Die Messung erfolgte 48 Stunden nach Einsatz der epigenetischen Agenzien.

3.2 Bestimmung der Arbeitskonzentrationen von 5-Aza-dC und TSA in USSC-Zellen

Es ist gut beschrieben, dass 5-Aza-dC *in-vitro* einen starken zytotoxischen Effekt auf die Zellen hat (Momparker et. al., 1977). Die Zytotoxizität des Agens in Mammalia-Zellen ist u. a. auf die Blockade der DNMTs und den inhibierenden Effekt auf die DNA-Methylierung zurückzuführen (Jüttermann und Jaenisch, 1994). Die Effizienz der Inhibition ist allerdings nicht nur von der eingesetzten Konzentration abhängig, sondern auch von den behandelten Zellen selbst. So sind embryonale Stammzellen resistenter bzw. ist deren Sterblichkeit durch 5-Aza-dC geringer als differenzierte Zellen (Jüttermann et al., 1994). Studien über den zytotoxischen Effekt epigenetischer Agenzien auf adulten Stammzellen bzw. den USSC-Zellen sind nicht bekannt. Daher war es zunächst erforderlich die Zytotoxizität dieser Substanzen auf die USSC-Zellen zu untersuchen.

Um den Einfluss der epigenetischen Agenzien 5-Aza-dC und TSA auf die USSC festzustellen, wurde eine Reihe verschiedener Konzentrationen eingesetzt und dann der Effekt auf den Phänotyp der Zellen mikroskopisch untersucht.

Die Kriterien der Zytotoxizität der Agenzien auf die USSC-Zellen waren die Morphologie der Zellen sowie das Ausmaß der Zellsterblichkeit. Die Ausgangskonzentrationen wurden zunächst anhand der in der Literatur für andere Zellen beschriebenen Konzentrationen festgelegt (Patra et. al, 2009).

Für dieses Ziel wurden zwei gut charakterisierte USSC-Zelllinien eingesetzt, die USSC 8/25 und die USSC 5/73 (Kögler et al., 2004). Diese USSC-Zelllinien entstammten der Passage 6 und deren Kultivierung erfolgte wie von Kögler et al. beschrieben ist (Kögler et.al, 2004). In 6-well-Platten wurden die beiden USSC-Zelllinien ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % weiterkultiviert. Dann wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 5-Aza-dC und TSA behandelt (Abb. 3.2).

48 Stunden nach einer Behandlung mit einer Konzentration von 0,5 μM 5-Aza-dC waren keine abgestorbenen Zellen zu beobachten. Weder makroskopisch noch mikroskopisch sind morphologische Veränderungen beider Zelllinien zu sehen. Die USSCs 8/25 sowie 5/73 waren nach der Behandlung noch adhärent und die Konfluenz nahm kontinuierlich zu. Die relativ hohen Konzentrationen von 3 und 5 μM hingegen führten zu einer hohen Sterblichkeit der beiden USSC-Zelllinien. Hingegen fand bei den Konzentrationen 1,5 und 2 μM eine geringere Sterblichkeit der Zellen statt. Bei diesen Konzentrationen waren nur ca. 20% der behandelten Zellen untergegangen. Morphologische Veränderungen waren auch nach längerer Kultivierung nicht zu sehen.

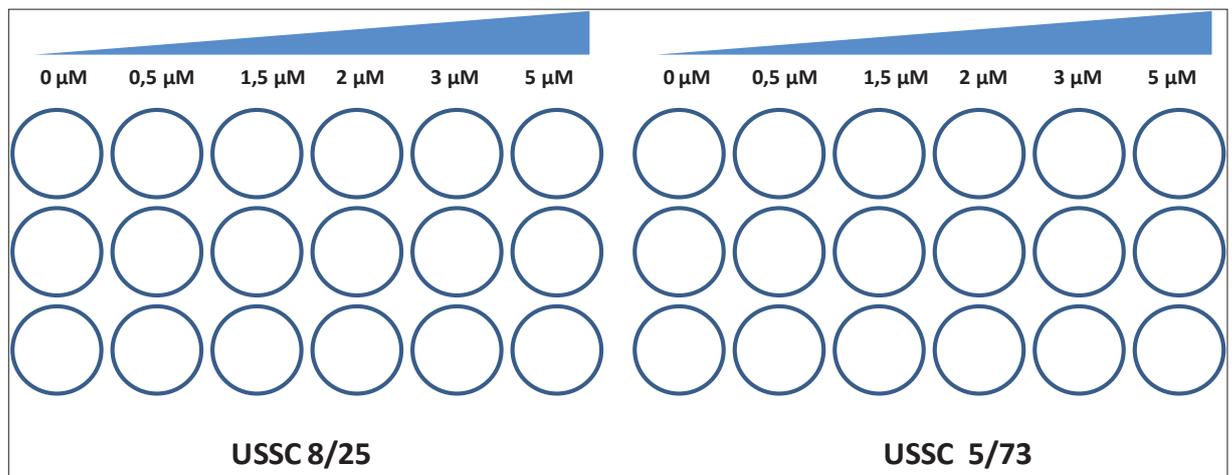
Analog zu 5-Aza-dC zeigen mehrere Studien, dass auch TSA eine bestimmte Zytotoxizität in der Zellkultur zur Folge hat (Drummond, D. C. et al., 2005). Für eine sinnvolle Behandlung der USSC mit TSA war es nötig im Vorfeld die optimale und gleichzeitig nicht-zytotoxische Konzentration zu bestimmen. Dieselben Zelllinien wurden unter den gleichen Bedingungen ebenfalls mit TSA inkubiert.

Sechs verschiedene Konzentrationen wurden getestet: 0, 5, 10, 25, 50 und 100 nM. Bei allen verwendeten Konzentrationen waren nach einer Woche keine morphologischen Veränderungen der beiden Zelllinien zu sehen. Bei den Konzentrationen 50 und 100 nM ist die Mehrheit der Zellen gestorben und hat die Adhärenz verloren. Bei den nicht behandelten Zellen sowie bei Konzentrationen des TSA von 5 und 10 nM war die Zellsterblichkeit gleich null. Ein geringer Anteil der Zellen, welche mit 25 nM TSA behandelt wurden, verlor die Adhärenz, während die Mehrheit der Zellen einen normalen Phänotyp aufwies.

Diese Reihe der durchgeführten Experimente zeigte wiederholt, dass die hohen Konzentrationen von 5-Aza-dC und TSA zum Tod der Zellen innerhalb weniger Tage

führen. Die Verwendung von geringen Konzentrationen beider Agenzien hatten weder einen Effekt auf die Sterblichkeit der Zellen noch auf die Veränderung ihres Phänotyps. Im Gegensatz zur den hohen und niedrigen Konzentrationen induzieren die mäßigen Konzentrationen, 1,5 μM 5-Aza-dC und 25 nM TSA, eine geringe Sterblichkeit der behandelten Zellen, während der große Teil resistent bleibt und sich problemlos weiterkultivieren ließ.

- **5-Aza-dC**



- **TSA**

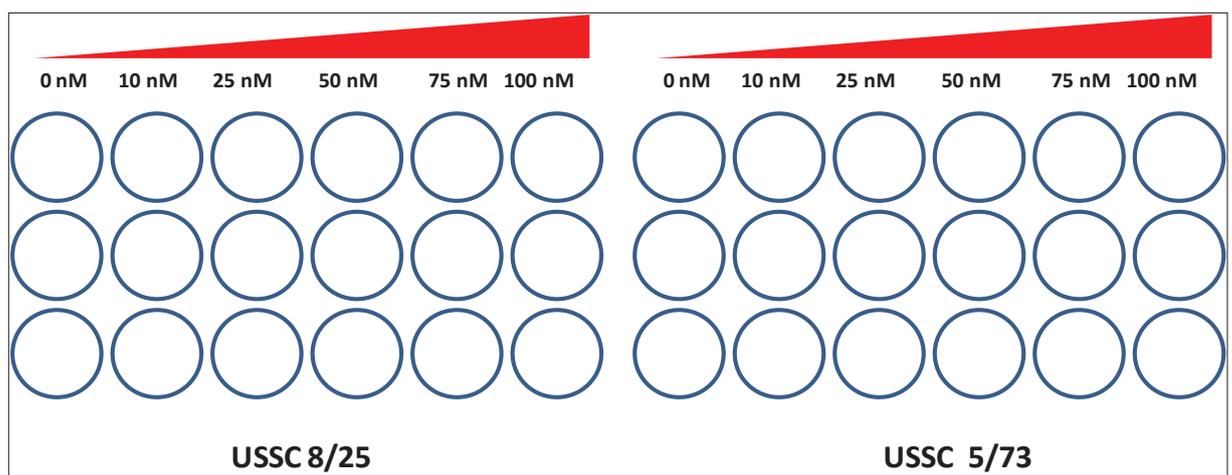


Abb. 3.2: Schema der Toxizitätsbestimmung von 5-Aza-dC und TSA in den USSC SA 8/25 und SA 5/73 Zellen. Ca. $100 \cdot 10^3$ USSC SA 8/25 und SA 5/73 Zellen wurden in jedem Well ausgesät und bei einer 60–70 %-Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen von 5-Aza-dC (0, 0,5, 1,5, 2, 3, 5 μM) bzw. von TSA (0, 10, 25, 50, 75, und 100 nM) behandelt. Das Wachstum und die Sterblichkeit der Zellen wurden nach einer Woche festgestellt. Jede Konzentration wurde in drei unabhängigen Experimenten getestet.

3.3 Bestimmung der Behandlungsdauer der USSC-Zellen mit den beiden epigenetischen Agenzien

Der Effekt dieser epigenetisch wirkenden Agenzien ist abhängig von den Konzentrationen, die eingesetzt werden. Die Dauer der Behandlung der Zellen ist ebenfalls maßgeblich für ihre Wirkung. Um sinnvolle Behandlungszeiten zu bestimmen, wurden analog zur Optimierung der Konzentrationen verschiedene Behandlungszeiten getestet. Während der Replikation wird die Methylierung des hemimethylierten neuentstehenden DNA-Doppelstrangs durch die Blockade der DNMT1 mit 5-Aza-dC inhibiert (Abb. 3.3) (Carpinelli et. al., 1993). Da die Verdopplungszeit der USSC ca. 48 Stunden beträgt (Kögler et al., 2004), dauerte die Behandlung bis zu 72 Stunden um ggf. eine signifikante DNA-Demethylierung erzielen zu können. Diese Dauer der Behandlung wurde auch für TSA angewandt.

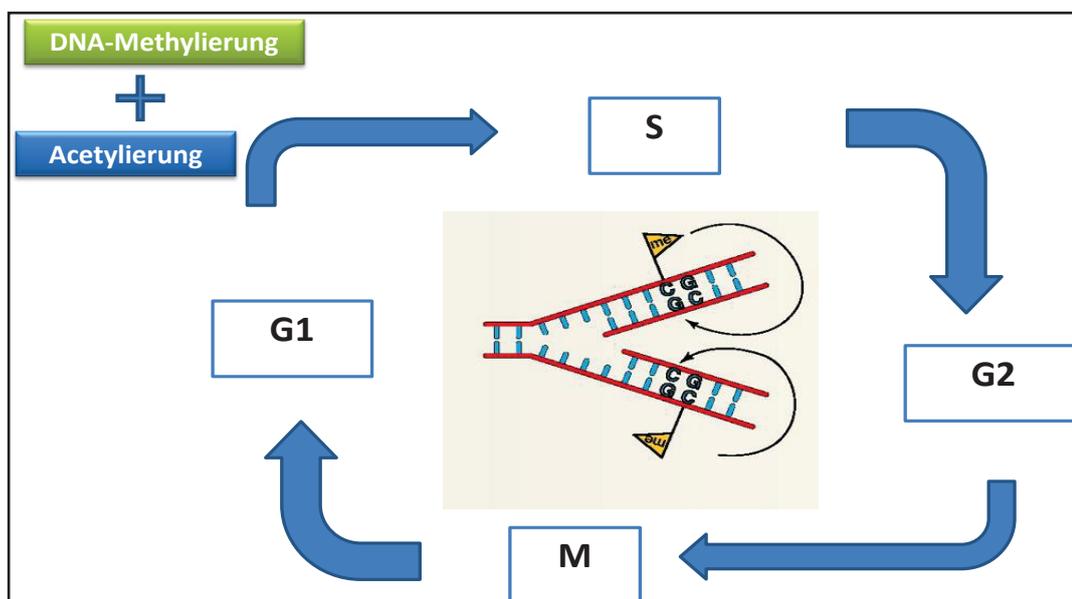


Abb. 3.3: Kontrollstellen und -Mechanismen des Zellzyklus. Die Kontrollstellen des G1-S-Phasenübergangs des Zellzyklus regeln die DNA-Methylierung und die Histon-Modifikationen. Nukleosomen werden auf die replizierte DNA an der Replikationsgabel abgebildet. Die DNA-Methylierung wird auf einer semikonservativen Weise repliziert. Während der S-Phase spielt wahrscheinlich die Replikation des gekoppelten Histon-Ersatzes eine Rolle in der Chromatin-Dynamik (modifiziert nach Dominguez M., und Berger F., 2008).

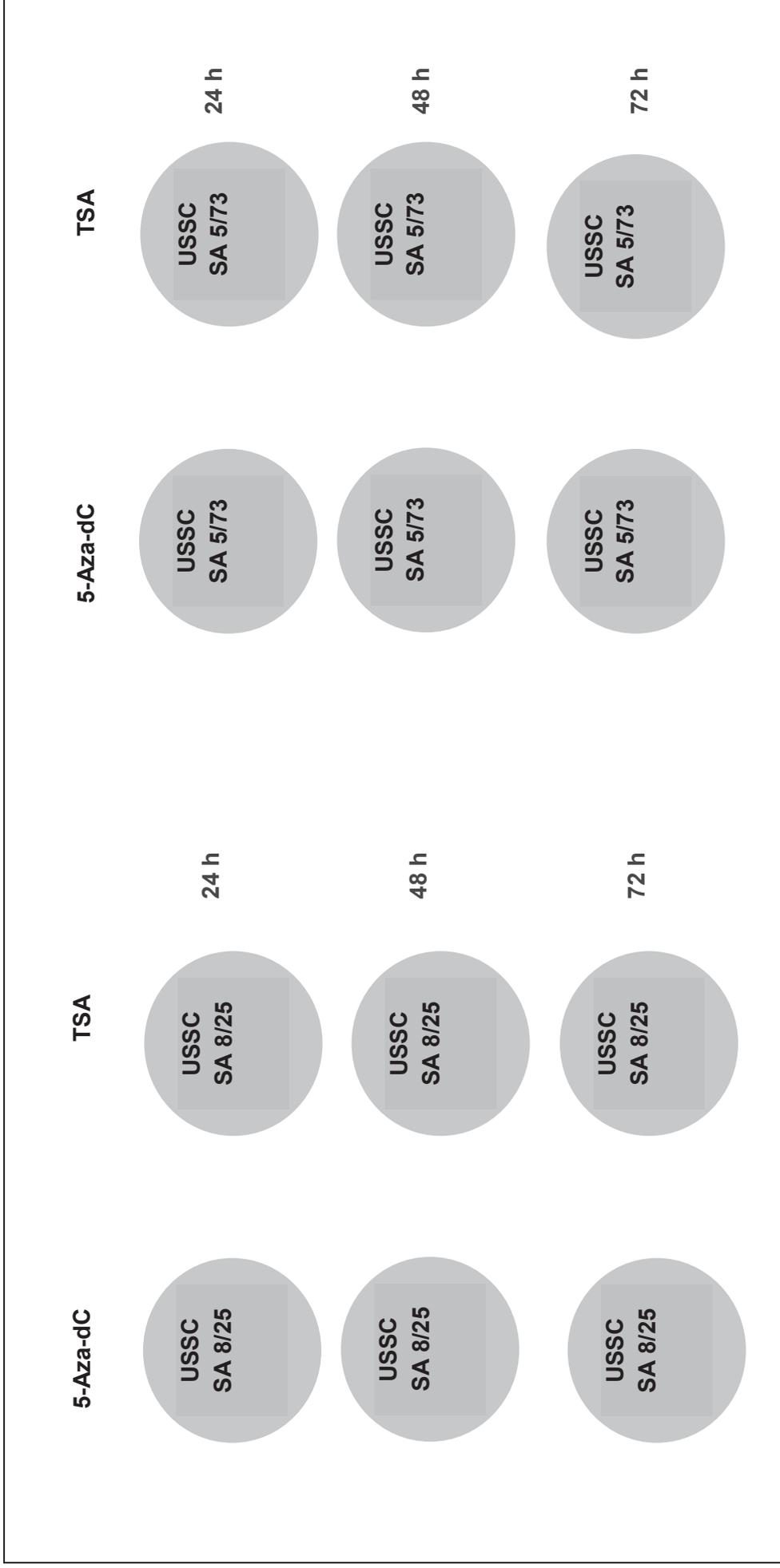


Abb. 3.4: Schema zur Optimierung der Behandlungsdauer der USSC-Zellen mit den epigenetischen Agenzien. 100.10^3 USSC-Zellen SA 8/25 und USSC SA 5/73 wurden in jedes Well ausgesät und bei einer 60- bis 70 %-Konfluenz mit 5-Aza-dC (1,5 μ M) oder TSA (25 nM) für 24 bzw. 48 Stunden und 72 Stunden behandelt. Nach einer 72-stündigen Kultivierung aller Proben wurden die Zellen passagiert und weiter kultiviert.

Es ist gut beschrieben, dass 5-Aza-dC und TSA synergistisch auf die Genexpression bzw. auf die Reaktivierung stillgelegter Gene wirken können (Cameron et al., 1999). Eine Kombination beider epigenetisch wirkender Agenzien bei der Behandlung der USSC könnte den Effekt der Reaktivierung verstärken. Demzufolge wurden die USSC 8/25- sowie 5/73-Zellen drei Tage lang gleichzeitig mit 5-Aza-dC und TSA behandelt (Abb. 3.4). Die optimalen Konzentrationen, die nachgewiesenermaßen nicht zu einer hohen Sterblichkeit führten, aber dennoch einen Einfluss auf die Viabilität zu haben schienen, wurden verwendet. Diese waren 1,5 μ M für das 5-Aza-dC und 25nM für das TSA. Diese Konzentrationen führten bei den USSC vorerst zu keinen morphologischen Veränderungen.

Ein sehr wichtiger Parameter, der ebenfalls in Betracht genommen worden ist, ist die Halbwertszeit der verwendeten Agenzien. In den Zellkulturen weist 5-Aza-dC eine Halbwertszeit von acht bis zwölf Stunden auf (Hollenbach et al., 2010). TSA hingegen ist stabil. Die relativ kurze Halbwertszeit von 5-Aza-dC verlangte eine Auffrischung des Agens alle zwölf Stunden.

Die behandelten Zellen wurden zur Kontrolle für jeweils 24, 48 und 72 Stunden im selben Induktionsmedium ohne diese epigenetischen Agenzien auch subkultiviert (Abb. 3.5).

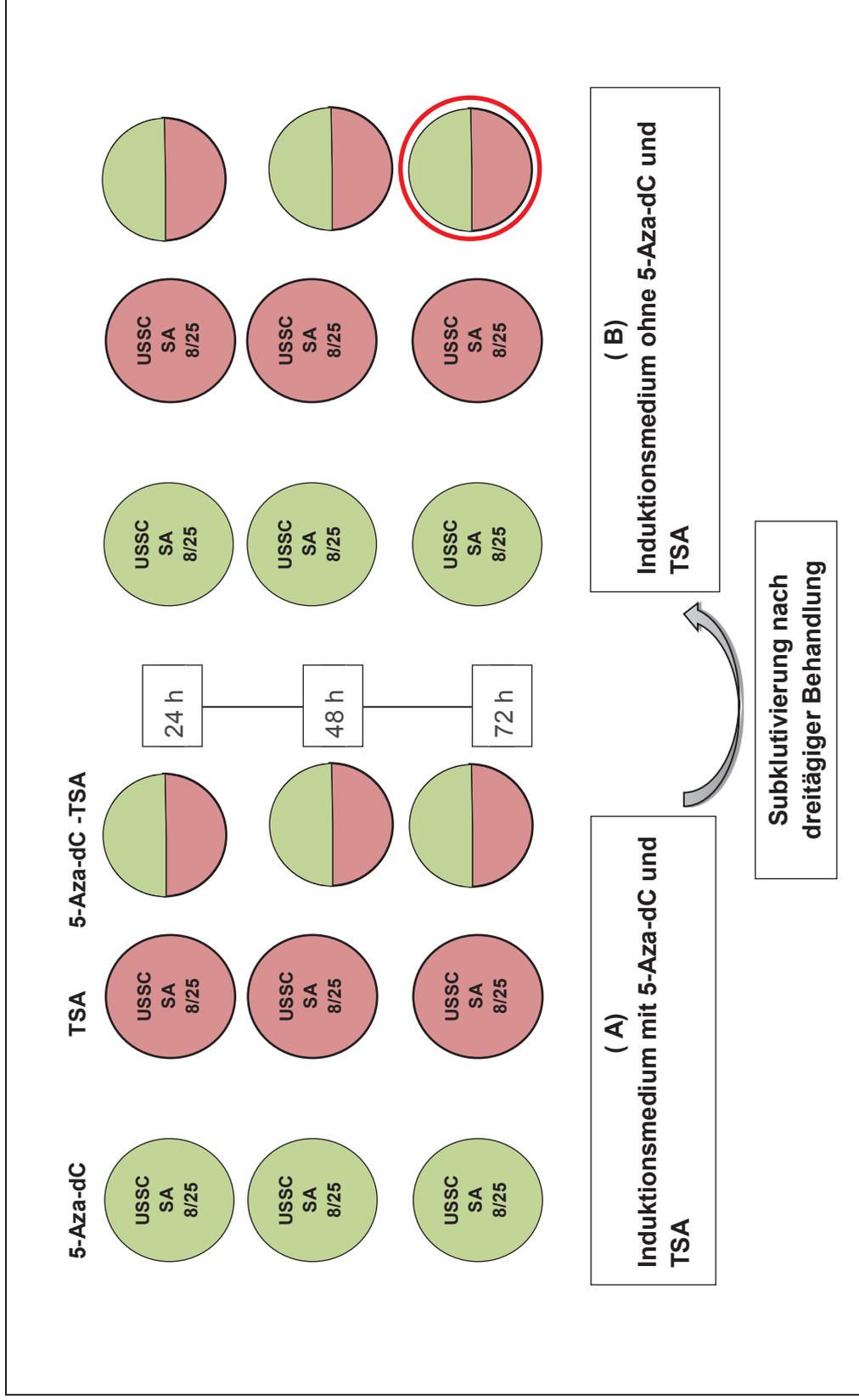


Abb. 3.5: Schema der Optimierung der Behandlungsdauer der USSC mit den epigenetischen Agenzien. $100 \cdot 10^3$ USSC SA 8/25 wurden ausgesät und bei einer 60- bis 70 %-Konfluenz mit 5-Aza-dC ($1,5 \mu\text{M}$) oder/und TSA (25 nM) über 24 bzw. 48 und 72 Stunden behandelt. Nach einer 72-stündigen Inkubation erfolgte eine Subkultivierung. Danach wurden die Zellen in einem unbehandelten Medium, ohne 5-Aza-dC und TSA, weiter kultiviert. Nach ca. zwei Wochen der Subkultivierung erschienen präphäroide Zellen aus den Kulturen, die zuvor drei Tage lang gleichzeitig mit 5-Aza-dC und TSA behandelt worden sind (roter Kreis).

Die optimalen Behandlungsbedingungen der USSC mit den epigenetischen Agenzien 5-Aza-dC und TSA, welche nicht zu einem Absterben der Zellen führen, aber ggf. funktionelle Effekte auf die Zellen zur Folge haben, wurden somit ermittelt. Für die nächsten Versuche werden die USSC mit 5-Aza-dC (1,5 μ M) oder TSA (25 nM) über 72 Stunden behandelt. Nach dieser kontinuierlichen dreitägigen Behandlung werden die Zellen passagiert und ohne Behandlung weiterkultiviert.

3.4 Die epigenetische Behandlung der USSC mit 5-Aza-dC und TSA führt zu erheblichen morphologischen Veränderungen

Am Tag 1 des Versuches wurden die zu ca. 80 % konfluenten USSC SA 8/25 sowie 5/73 Zellen der Passage 6 trypsiniert und auf 6-Well Zellkulturplatten in USSC-Medium überführt und weiterkultiviert. Etwa 100.000 Zellen wurden pro Well eingesetzt. Am zweiten Tag erreichen diese 60 bis 70 % Konfluenz. Am dritten Tag wurde das USSC-Medium abgesaugt und durch Erzeugungsmedium ersetzt. Das Erzeugungsmedium wurde zuvor mit den epigenetisch wirkenden Substanzen 5-Aza-dC (1,5 μ M) und TSA (25 nM) versetzt. Die Herstellung der beiden „*drugs*“ erfolgte kurz vor der Anwendung des Mediums. Das Medium wurde an den Tagen 4 und 5 gewechselt, wobei jeweils das für Tag 3 eingesetzte Erzeugungsmedium mit den frisch hergestellten epigenetischen *drugs* eingesetzt wurde. Während dieser Behandlung waren weder makroskopisch noch mikroskopisch morphologischen Veränderungen der Zellen zu beobachten. Die gestorbenen Zellen, welche die Adhärenz verloren hatten, wurden bei jedem Mediumwechsel entfernt. Am Tag 6 wurden 50.000 bis 100.000 epigenetisch behandelte USSC-Zellen (Abb. 3.6) in neue 6-Well Kulturplatten überführt und anschließend in dem oben verwendeten Erzeugungsmedium ohne Zusätze weiterkultiviert. Nach dieser Überführung wurde also die epigenetische Behandlung gestoppt. Ab dieser Phase wurde das Medium alle drei Tage gewechselt. Präsphäroide-Kolonien erscheinen unter dem Mikroskop nach etwa zehn bis 14 Tagen (Abb. 3.7). Diese Kolonien bestehen aus runden und ovalen, kleinen, adhärennten Zellen. Die Zellen am Rande der Kolonien neigen dazu gestreckte Formen zu bilden. Wichtig ist, dass weder die Zahl noch die Größe der Kolonie im Erzeugungsmedium variiert. Um die generierten Kolonien charakterisieren zu können, war es nötig sie zu expandieren.

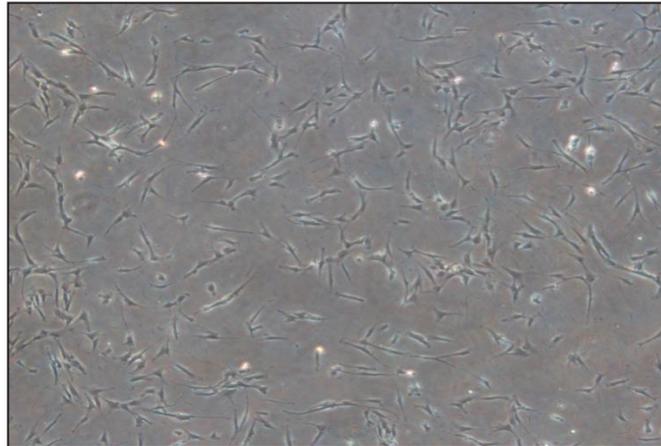


Abb. 3.6: Die behandelten USSC. Behandelt wurden USSC aus frühen Passagen (P5-P6). USSC wachsen als ein adhärenter Monolayer und zeigen eine spindelförmige Morphologie mit einer Größe der Einzelzellen von 20 bis 25.

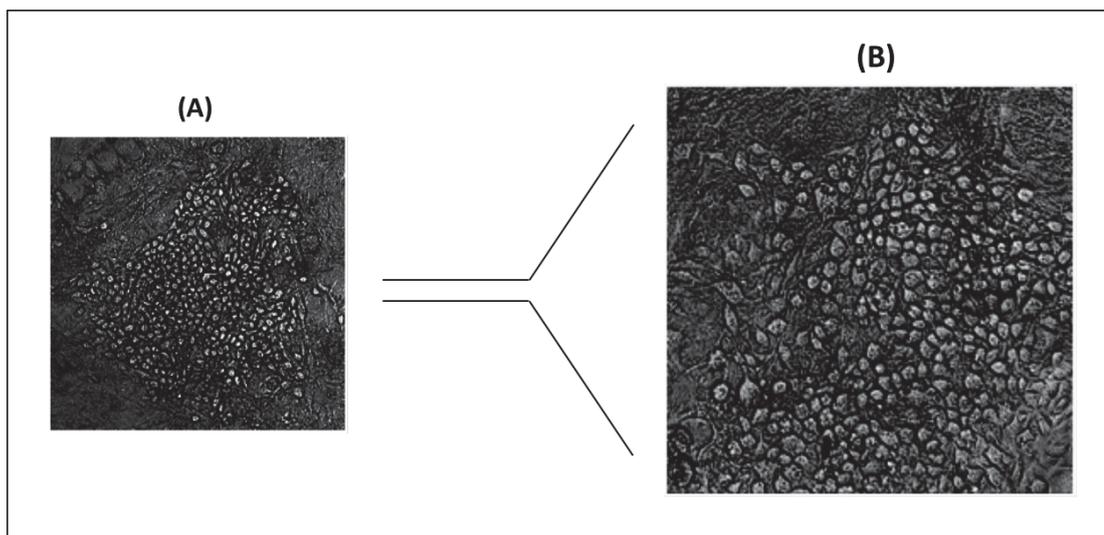


Abb. 3.7: Generierung von koloniebildenden präsphäroiden Zellen. Die Kolonien entstehen ca. zehn bis 14 Tagen nach Beginn der epigenetischen Behandlung der USSC 8/25-Zellen (A). Die Zahl der Kolonien beträgt drei bis sechs Kolonien pro Well. (B) zeigt Vergrößerung einer typischen Kolonie an. Die in einem *Monolayer* wachsenden, spindelförmigen USSC-Zellen haben ihre Morphologie verändert und bilden Kolonien aus kleinen, runden bzw. ovalen Zellen.

3.5 Entstehung der Sphäroiden Zellen

Um die präsphäroiden Kolonien zu expandieren, war es nötig sie zu isolieren und in passenden Kulturbedingungen zu kultivieren. Es ist bekannt, dass eine epigenetische Behandlung von Zellen mit 5-Aza-dC und TSA Dedifferenzierungsprozesse auslösen könnte (El-Serafi et al., 2011). Darüber hinaus kann das kolonieartige Wachstum der epigenetisch behandelten Zellen als ein mögliches Indiz für eine Dedifferenzierung angesehen werden. Mitunter aus diesen Gründen wurde für die nachfolgende Expansion ein Medium gewählt und eingesetzt, das die Pluripotenz fördert.

In einem ersten Schritt wurden die Kolonien unter dem Mikroskop lokalisiert und mit Hilfe eines Stifts auf dem Boden der Platte gekennzeichnet. Im zweiten Schritt wurden sie einzeln mit Hilfe einer sterilen 200 μ l-Pipettenspitzen gepickt. Die gepickten Präsphäroiden-Kolonien wurden zunächst vereinzelt und dann in 6 cm-Petrischalen in 3 ml des oben beschriebenen Sphäroid-Mediums eingesetzt (Abb. 3.8).

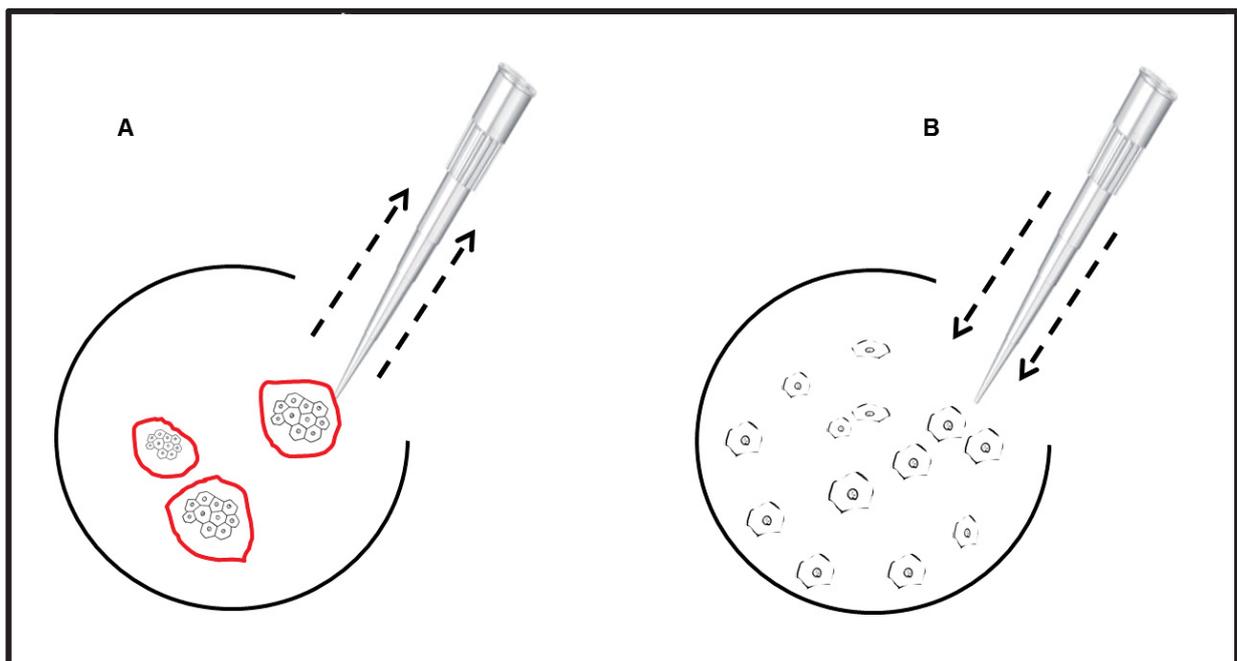


Abb. 3.8: Illustration des Transfervorgangs von Präsphären-Kolonien in das Pluripotenz-fördernde Expansionsmedium. Der Transfer erfolgte manuell mittels einer sterilen 200 μ l-Spitze, nachdem zuvor der Standort einer Kolonie markiert wurde (roter Kreis) (A). Die Zellen wurden unmittelbar vereinzelt und zum neuen Well transferiert.

Jeweils nach 48 Stunden der Inkubation wird das Medium durch einen 0,45 μm -Filter filtriert und die Zellen in neuem Medium inkubiert, das zu 15 Vol.-% aus dem konditionierten und filtrierten vorherigen Medium und zu 85% aus frischem Pluripotenz-Medium besteht. Nach ca. zehn Tagen erscheint makroskopisch sichtbar eine große Anzahl eines neuen Zelltyps.

Nach weiteren drei bis sieben Tagen in Kultur bilden sich kleine adhärente, kugelförmige Zellaggregate, die zum größten Teil miteinander verbunden sind. Diese kugelförmigen Kolonien weisen zunächst eine heterogene Form auf, aber mit fortgesetzter Kultivierung werden sie abgerundet und weisen dann klar definierte Grenzen auf.

Diese Sphären sind dann von der Form her relativ homogen, allerdings variiert die Größe der Kolonien erheblich (Abb. 3.9). Die Mehrzahl der Kugeln, ca. 70%, haben einen kleinen Durchmesser ($< 90 \mu\text{m}$), ca. 25% weisen eine Mittelgröße (90–170 μm) auf und die übrigen Kugeln, ca. 15% sind relativ groß bis sehr groß ($> 250 \mu\text{m}$). Die kleinste gemessene Sphäre hatte einen Durchmesser von 40 μm , die Größte war 270 μm im Durchmesser.

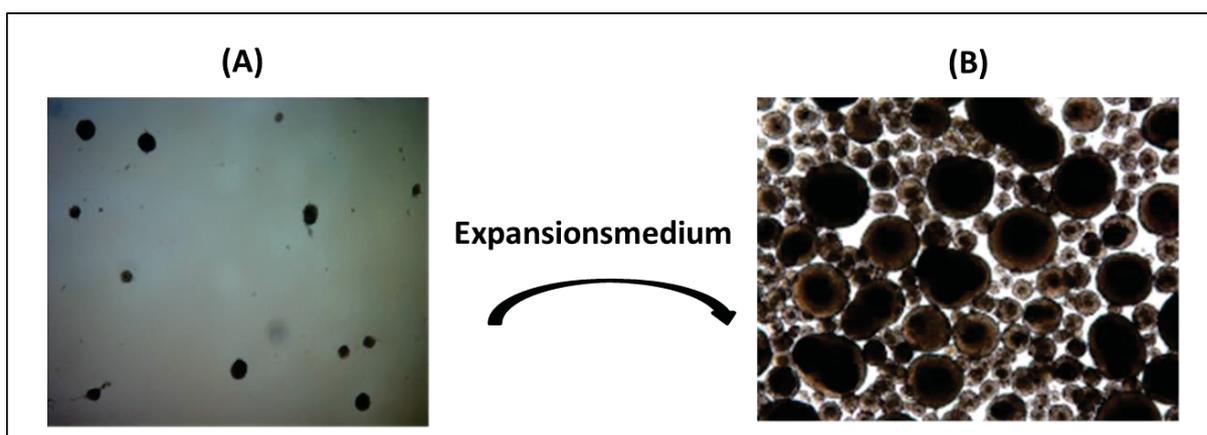


Abb. 3.9: Expansion der SpheUSSC. Nach den ersten zehn bis 14 Tagen nach dem Transfer der Präsphäroiden-USSC in das Expansionsmedium bilden sich homogene Sphären-Zellkolonien unterschiedlicher Größe. Die Größe einer einzelnen Sphäre variiert zwischen 40 μm und 300 μm .

3.6 Optimierung der Subkultivierung

3.6.1 Mechanische Dissoziation

Der Durchmesser der Sphären in Kultur ist heterogen. Sie bestehen aus Tausenden von Zellen, die zusammen liegen. Manche Sphären sind sogar in der Lage miteinander zu fusionieren und bilden dadurch während der Fortsetzung der Kultivierung noch größere Aggregate. Damit die Sphären passagiert werden und expandieren können, müssen sie vorher dissoziiert werden. Der Vorteil der mechanischen Dissoziation liegt darin, dass sie schnell

und effizient ist. Darüber hinaus umgeht man dabei die Beanspruchung der Zellenmembran durch die Einwirkung des proteolytischen Enzyms. Hierfür werden die Sphären mit Hilfe einer 200 µl-Pipette dissoziiert. Dies erfolgt, indem man die Sphären mehrmals sanft mit der Pipette auf- und abpipettiert. Die Dissoziation der Sphären kann allerdings nicht vollständig erfolgen, sodass nach der Dissoziation ein kleinerer Teil vereinzelter Zellen noch vorhanden ist (Abb. 3.10).

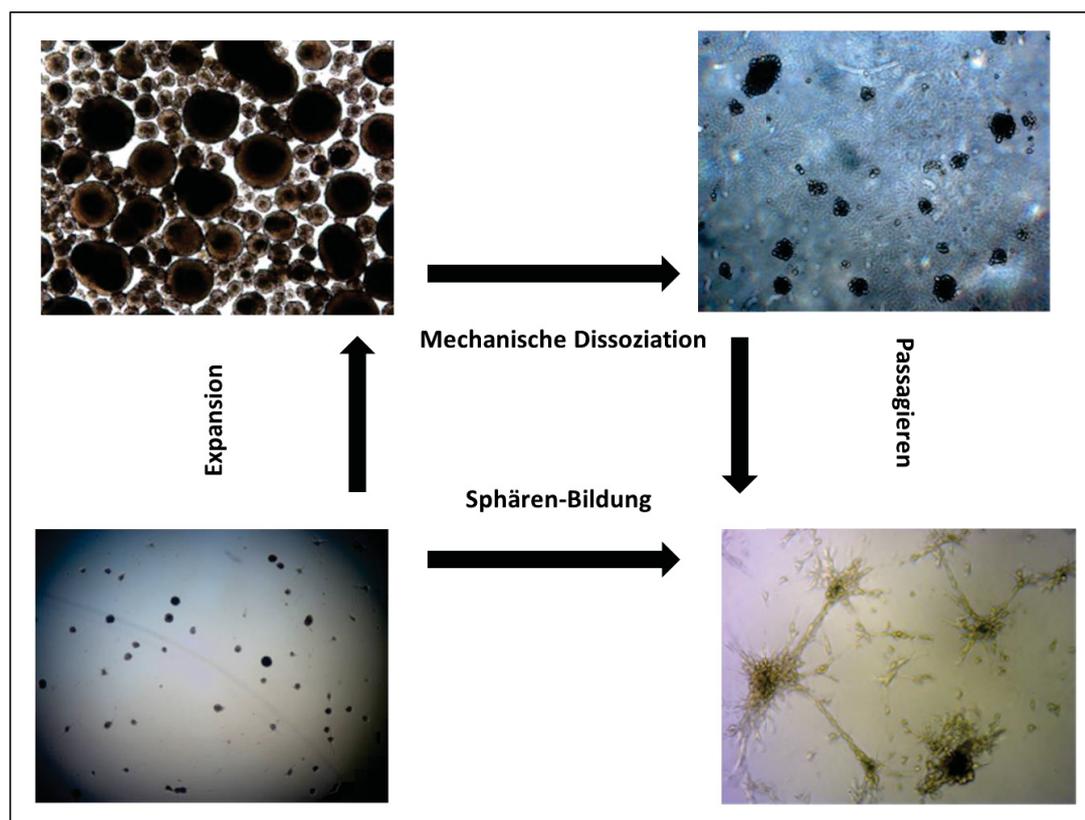


Abb. 3.10: Mechanische Dissoziation der Sphären. Die Sphären wurden mit Hilfe einer 200 µl-Pipette allein mechanisch ohne enzymatische Behandlung dissoziiert. Ein geringer Anteil der Sphären wird nach der mechanischen Dissoziation nicht vereinzelt. Nach einem Tag sind dann bereits neue kleine Sphären zu sehen.

3.6.2 Enzymatische Dissoziation

Um eine vollständige Dissoziation der Sphären zu erreichen, die durch eine allein mechanische Methode nicht erfolgen kann, wurde auch ein enzymatischer Ansatz gewählt. Schon bei sehr geringen Konzentrationen besitzt Trypsin gute Trenneigenschaften bei vielen Zelltypen, die in Kultur eine Einzelschicht, einen sogenannten Monolayer, ausbilden. Da die expandierten Sphären große Zellaggregate bilden, wurden hierfür drei verschiedene Trypsin-EDTA-Konzentrationen getestet. Die Sphären wurden parallel mit Trypsin 1X, 5X und 10X

bei 37 °C inkubiert. Um die optimale Zeit zu bestimmen, wurden die Zellen unter dem Mikroskop 5 min lang beobachtet.

Die Verwendung vom 10X Trypsin/EDTA für 15 Minuten bei 37 °C erzielt eine vollständige Dissoziation der Sphären ohne sie zu beschädigen. Dies ermöglicht eine genaue Zählung der Zellen beim Passagieren (Abb. 3.11).

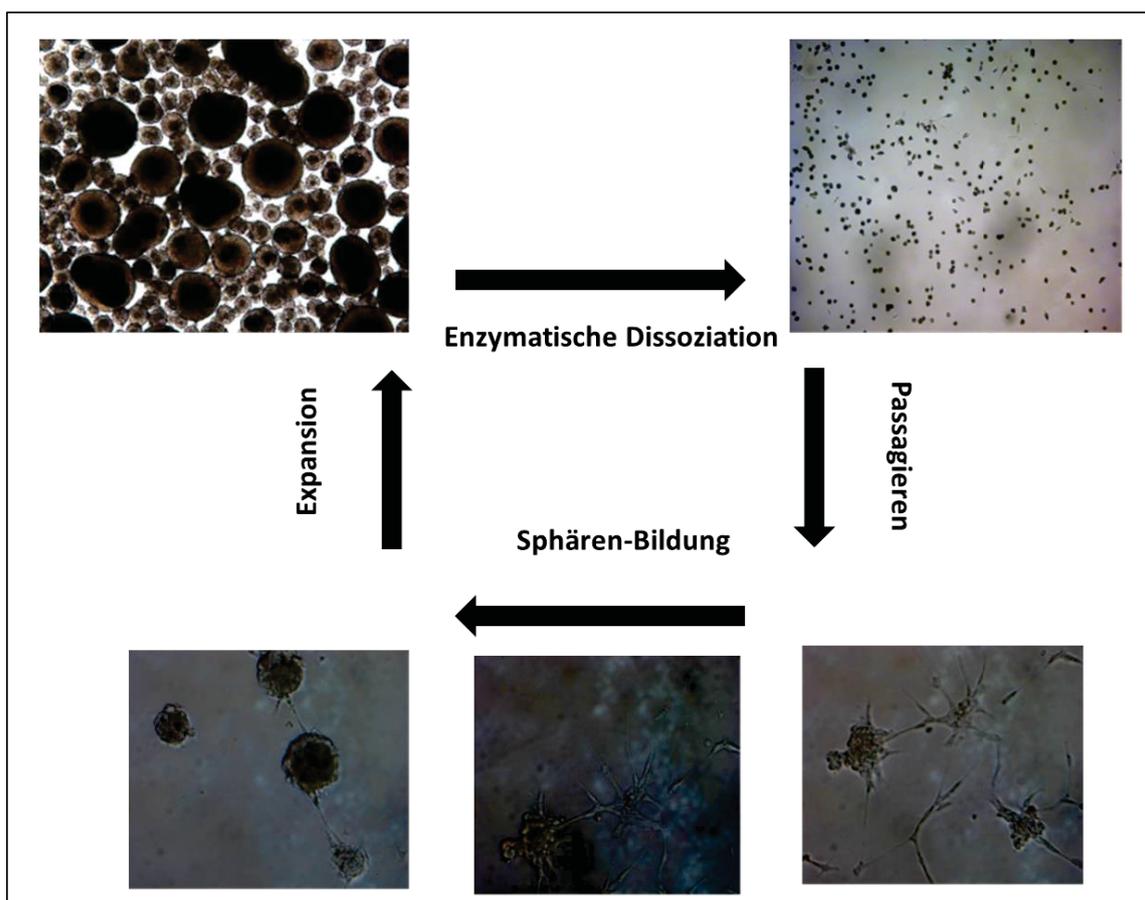


Abb. 3.11: Enzymatische Dissoziation der Sphären. Sphären wurden mit Trypsin 10 X für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Mehrzahl der Sphären-Zellen wird nach der enzymatischen Behandlung vereinzelt. Nach ca. zwei bis drei Tagen sind neue kleine Sphären zu sehen.

3.6.3 Optimierung der Kryokonservierung und des Auftauens der Sphären

Bei der Kryokonservierung der Sphären werden zwei Ziele verfolgt. Das Erste ist das Minimieren der Sterblichkeit der Zellen aufgrund der Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens und das Zweite ist, dass die Zellen die Fähigkeit zur Proliferation auch nach dem Auftauprozess beibehalten. Hierfür wird das Schutzmittel Dimethylsulfoxid DMSO eingesetzt. Es ist nötig die Sphären vor dem Einfrieren zu dissoziieren. Nach der enzymatischen Behandlung mit Trypsin werden die Zellen mit PBS gewaschen und sofort in

DMSO-haltiges Einfriermedium aufgenommen und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Kontrolle wurden undissoziierte Sphären im selben Kryomedium eingefroren. Nach einer Woche wurden beide Zellpopulationen, die Vereinzelten sowie auch die Sphären, aufgetaut und in Expansionsmedium aufgenommen und weiter kultiviert. Die vereinzelteten Zellen waren in der Lage nach ca. einer Woche erneut zu Sphären zu proliferieren und zu aggregieren. Die undissoziierten Zellen hingegen bildeten nach dem Auftauen auch Sphären, allerdings mit eingeschränkter Expansionsfähigkeit. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Sphären bei allen folgenden Kulturen vor jeder Kryokonservierung enzymatisch vereinzelt.

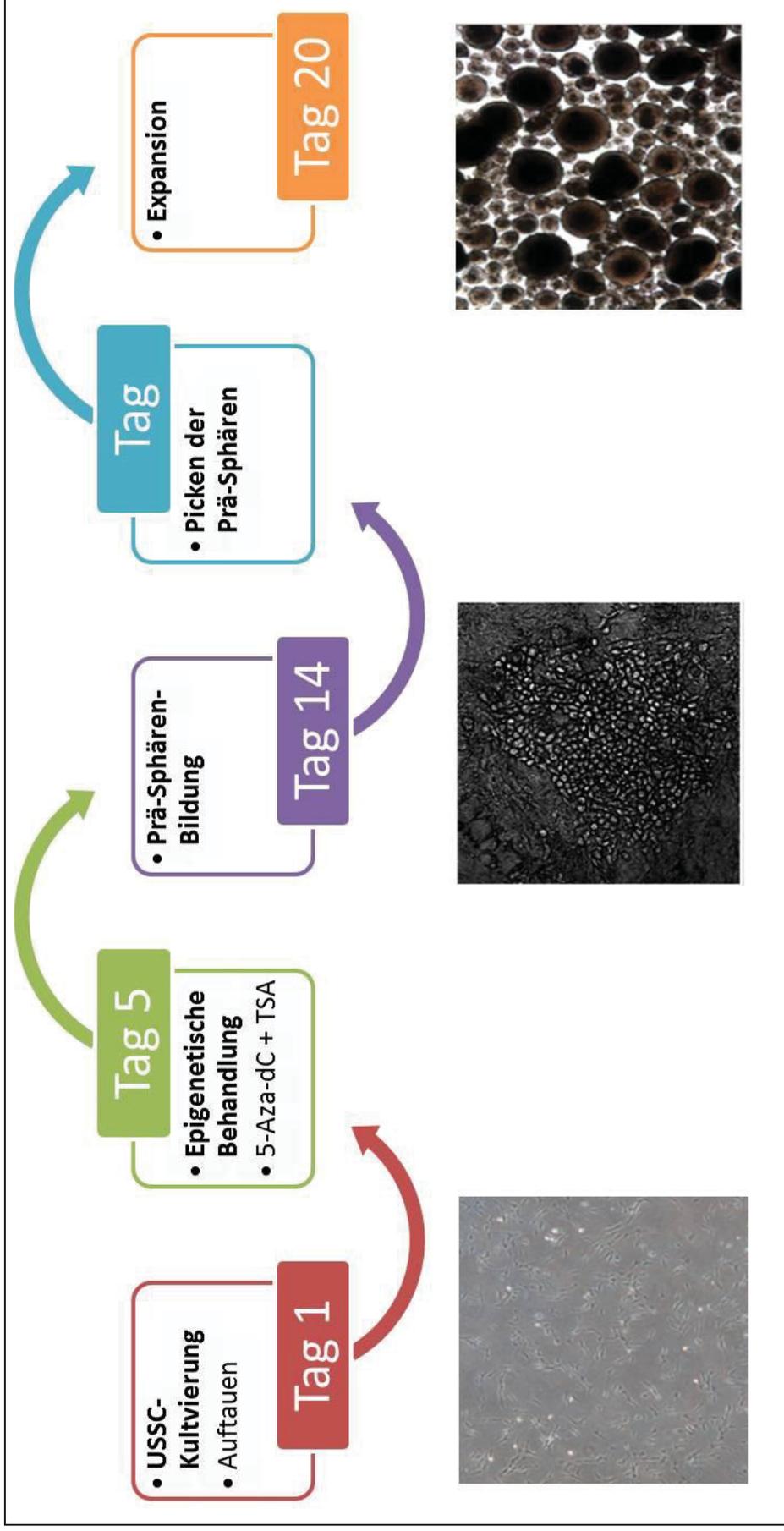


Abb. 3.12: Schematische Darstellung der Chronologie der Generierung und Expansion der Sphären aus den USSC. Die USSC aus frühen Passagen (P6) werden in USSC-Medium in 6-Well-Platten verteilt. Bei einer Konfluenz von 70% wird das USSC-Medium durch Erzeugungsmedium ersetzt, das die frisch angesetzten epigenetischen Agenzien 5-Aza-dC und TSA enthält. Nach dreitägigen kontinuierlichen Behandlungen werden die Zellen wiederum gesplittet und mit Erzeugungsmedium ohne 5-Aza-dC und TSA weiter kultiviert. Nach ca. zwei Wochen sind kleine Prä-sphären-Kolonien mikroskopisch zu sehen. Diese Kolonien wurden anschließend gepickt und in Sphären-Medium expandiert.

3.7 Molekularbiologische Charakterisierung der SpheUSSC-Zellen

3.7.1 OCT4-Expression

OCT4 ist ein Masterregulator der Pluripotenz in embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) (Sterneckert und Schöler, 2012). Bisher ist OCT4 der einzige Faktor, der für den Reprogrammierungsprozess unersetzlich ist (Shi et al., 2008; Feng et al., 2009). Hierbei ist die DNA-Demethylierung der Promotorregion des *OCT4*-Gens ein begleitender Prozess der Reprogrammierung (Wu, S. C. and Y. Zhang, 2010). In zahlreichen Arbeiten über die Reprogrammierung von differenzierten Zellen unter Verwendung verschiedener Transkriptionsfaktorkombinationen wurde mehrfach nachgewiesen, dass eine Demethylierung des endogenen *oct4*-Genpromotors mit der überexprimierten ektopischen Expression von *oct4* einhergeht (Yamanaka et al., 2008). In den nativen USSC konnte die Expression von OCT4 bisher nicht nachgewiesen werden (Kögler et. al., 2004). Allerdings liegt in diesen somatischen Stammzellen ein eigentümliches, z. T. bivalentes epigenetisches Muster vor. So ist beispielsweise eine ungewöhnliche, partielle Methylierung des *OCT4*-Genpromotors in den USSC nachgewiesen und detailliert beschrieben worden (Santourlidis et.al, 2011). Die Demethylierung und eine damit assoziierte Reaktivierung von epigenetisch stillgelegten Genen nach einer erfolgten Behandlung mit 5-Aza-dC konnte bisher in verschiedenen *in-vitro* Zellmodellen nachgewiesen werden (Stresemann et. al., 2006). Die Behandlung der USSC mit 5-Aza-dC und TSA induziert drastische phänotypische Veränderungen und modifizierte Zelleigenschaften, die bereits früh auftauchen, so beispielsweise eine messbar hohe Proliferation. Diese Beobachtungen warfen die Frage auf, ob in den SpheUSSC der Schlüsselfaktor der Pluripotenz, OCT4, eine epigenetisch induzierte Reaktivierung erfahren hatte. Um dies zu prüfen, wurde zuerst die Transkription des *OCT4*-Gens in den stabilen SpheUSSC gemessen.

Die Transkription wurde mittels der *real time* PCR gemessen und mit der in den Ausgangszellen USSC 8/25 und mit der in den, nach der Yamanaka-Methode reprogrammierten, IPS-USSC verglichen. Die Ergebnisse der *real time* PCR zeigten, dass eine erhöhte Transkription des *OCT4*-Gens in den SpheUSSC vorliegt. Das Niveau der *OCT4*-Transkription in den SpheUSSC war ca. 20-fach höher als in den USSC-Zellen. Diese Transkription ist jedoch deutlich geringer als in den IPS-USSC. Die ermittelte Transkription in den IPS-USSC-Zellen war ca. 60-fach höher als in den SpheUSSC (Abb. 3.13)

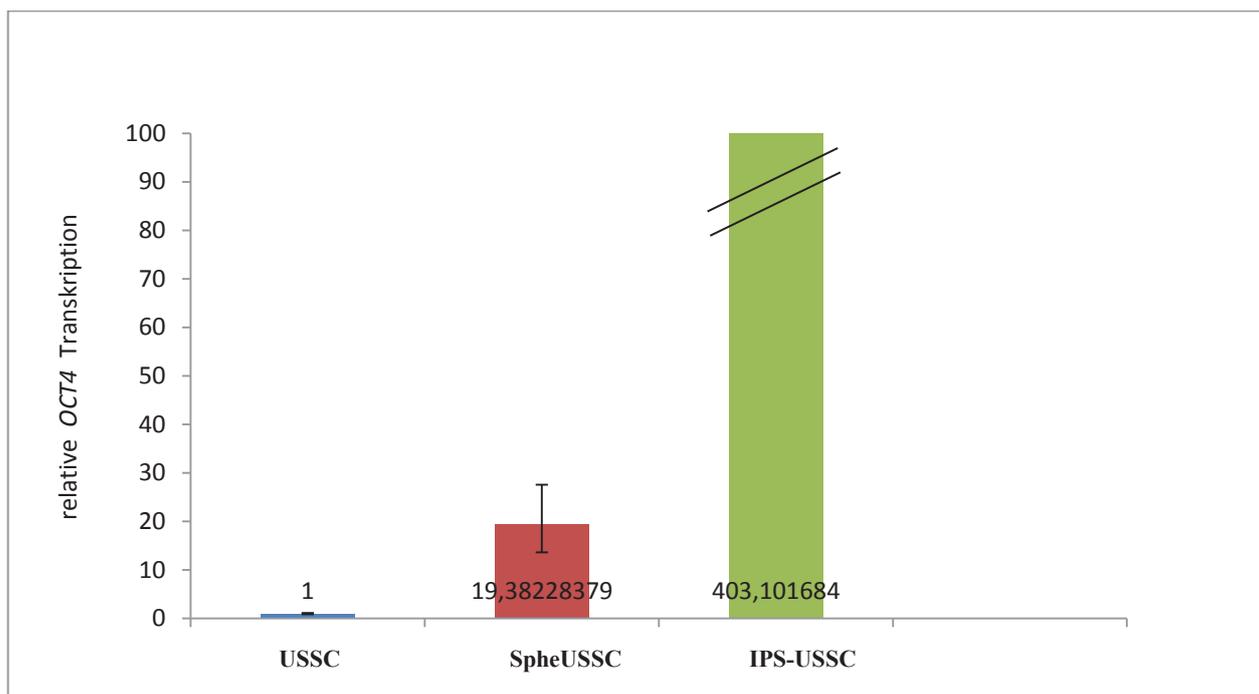


Abb. 3.13: Relativ quantifizierende *real-time* PCR Analyse der mRNA-Transkription des *OCT-4*-Gens in USSC 8/25, SpheUSSC und iPS-USSC. Die Transkription wurde auf die Transkription des *Housekeeping*-Gens *GAPDH* normiert. Die Transkription ist relativ zur USSC-Transkription angegeben. Diese ist mittels des hier verwendeten hochsensitiven *real time PCR* Nachweises gerade noch messbar und als 1 gesetzt.

Um zu überprüfen, ob diese gemessene *OCT4*-Transkription der Sphären auch zum Protein translatiert wird, wurde eine Analyse der Expression mittels eines Western-Blots durchgeführt (Abb. 3.14). Dafür wurden Proteinlysate aus den SpheUSSC-Zellen, den unbehandelten USSC und der embryonalen Stammzelllinie ESC-H9 als Positivkontrolle verwendet. Die Analyse lieferte spezifische Banden bei allen analysierten Zellen. Die mittels des angesetzten Antikörpers der Firma abcam (ab49091) erwartete Größe beträgt 39 kDa. Die Größe der detektierten Banden lag bei ca. 40 kDa. Allerdings war die Intensität der detektierten Banden unterschiedlich. So weisen die SpheUSSC die stärkste Bande auf, während die USSC die schwächste Bande zeigen.

Es ist bereits bekannt, dass das humane *OCT4*-Gen mindestens drei verschiedene Transkripte generieren kann, nämlich das *OCT4A*, *OCT4B* und *OCT4B1*. Daraus können vier verschiedene Proteinisoformen entstehen, welche unterschiedliche Größe aufweisen. Die Isoformen sind die *OCT4A*, *OCT4B-190*, *OCT4B-265* und *OCT4B-16*, die mittels des alternativen *Splicings* und der alternativen Translation generiert werden (Atlasi et al., 2008). Diese unterschiedlichen Formen weisen unterschiedliche Größen auf und somit können in der Western-Blot-Analyse, abhängig von der Spezifität des Antikörpers und dem

erzielten Epitop, verschiedene Größen detektiert werden. Aus diesen Gründen war es wichtig zu prüfen, ob die detektierte Bande in den SpheUSSC-Zellen tatsächlich die Isoform A war.



Abb. 3.14: Analyse der Expression von OCT4 in den SpheUSSC-Zellen mittels eines Western-Blots. Es wurden je 15 µg Proteinlysate aus den SpheUSSC-Zellen, den USSC- und den ESC-H9-Zellen aufgetragen. Die embryonale Stammzelle ESC-H9 diente als Positivreferenz mit einer bereits publikativ, mehrfach nachgewiesenen Expression von OCT4. Eine Endkonzentration von 2 µg/ml wurde eingesetzt. Das OCT-4-Signal liegt bei einer Größe von ca. 40 kDa. Die erwartete Bande mittels des Antikörpers (ab49091) liegt bei 39 kDa.

Um den tatsächlichen Ursprung der detektierten starken Bande der SpheUSSC zu verifizieren, war es notwendig die OCT4-Expression mittels eines weiteren spezifischen Antikörpers, der zwischen den Isoformen (Abb. 3.15) auf Grund ihrer Größe diskriminieren kann, zu prüfen. Dieser Antikörper wurde mir freundlicherweise von Dr. Holm Zaehres MPI Münster (Prof. Schöler) zur Verfügung gestellt. Dieser Antikörper kann nachweislich zwischen den beiden relevanten Isoformen unterscheiden. Es ist der primäre Antikörper OCT3/4 (C-10) (sc5279, Santa Cruz Biotechnology). Der Antikörper hat keine Kreuzreaktivität gegen das OCT4 Isoform B und bindet ausschließlich an die Aminosäuren (AS) 1-134.

Um eine maximale Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen, wurde dasselbe Proteinlysate der SpheUSSC, welches im ersten Western-Blot verwendet wurde, auch für den neuen Western-Blot eingesetzt.

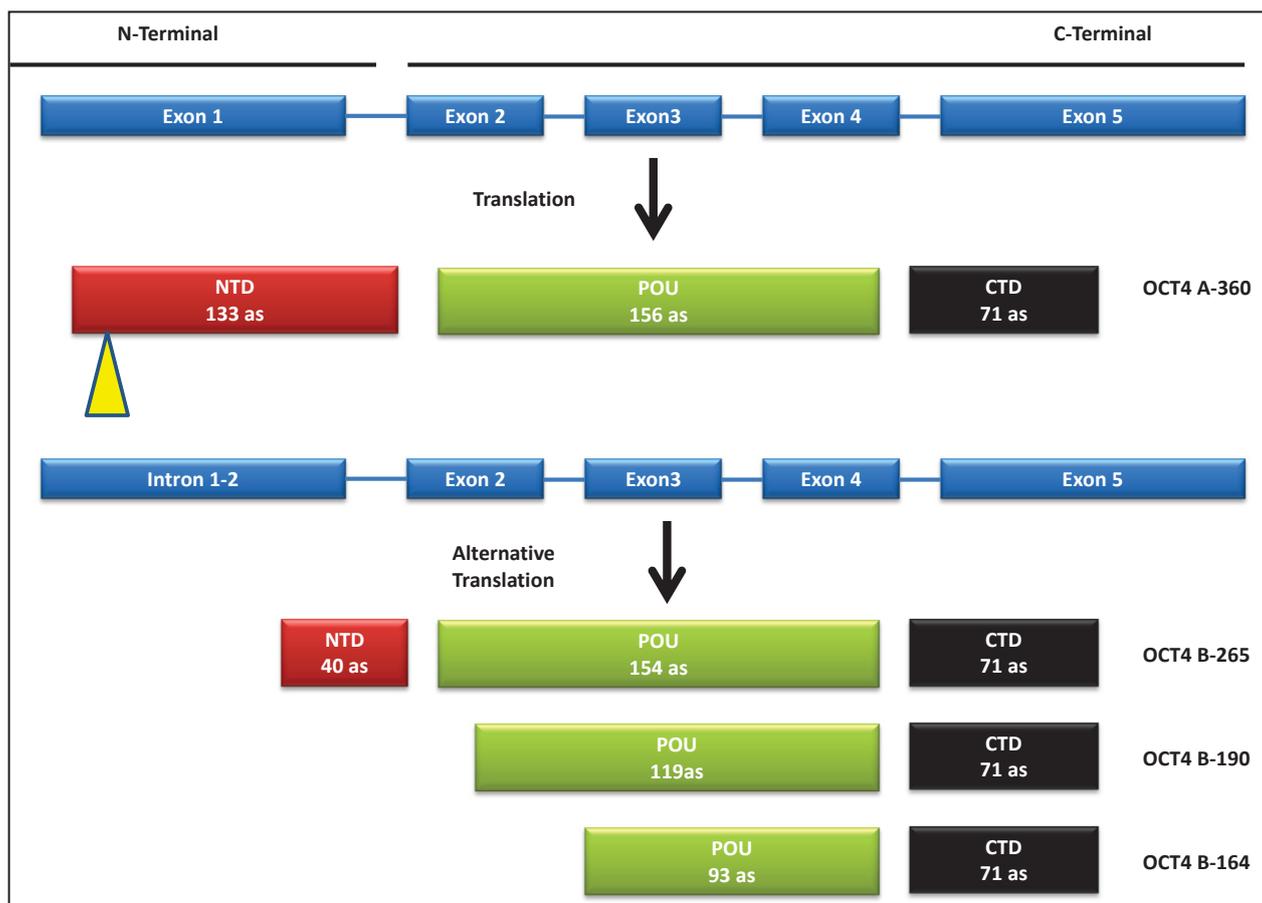


Abb. 3.15: Schematische Darstellung der humanen OCT4-Isoformen. Die beiden Isoformen A und B besitzen dieselben Exons 2,3,4 und 5. Der Unterschied liegt jedoch im Exon 1. Dies ergibt eine lange Isoform OCT4 A (360 Aminosäuren) und nach der alternativen Translation drei kleinere B-Isoformen OCT4 B (265, 190 und 164 Aminosäuren) (Wang et al., 2010). Das Epitop des verwendeten Antikörpers (sc5279) ist mit dem gelben Dreieck angezeigt.

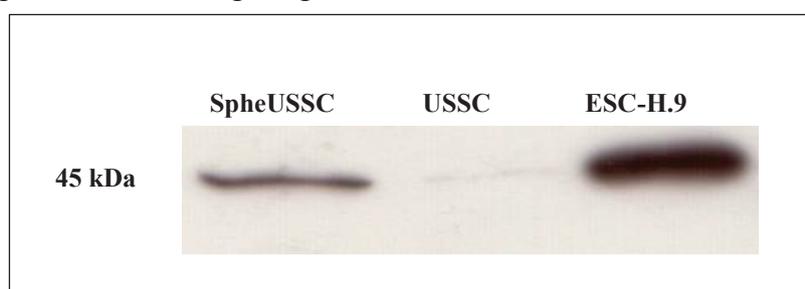


Abb. 3.16: Analyse der Expression von OCT4 in den SpheUSSC-Zellen mittels eines Western-Blots. Es wurden je 15 µg Proteinlysate aus den SpheUSSC-Zellen, den USSC 8/25 und den ESC-H9 den embryonalen Stammzellen aufgetragen. Der primäre Antikörper OCT3/4 (C-10) (sc5279) (Santa Cruz Biotechnology) hat die N-Terminale Region des OCT4-Proteins als Epitop. Eine Endkonzentration von 2 µg/ml wurde eingesetzt. Das OCT-4-Signal der SpheUSSC liegt bei einer Größe von ca. 45 kDa.

Mittels dieses Antikörpers konnte in allen Zellen, SpheUSSC, USSC und ESC-H9, eine spezifische Bande detektiert werden (Abb. 3.16). Die stärkste Bande ist in der embryonalen Stammzelllinie ESC-H9 zu sehen. Am schwächsten ist die Bande der USSC-Zellen. Der verwendete Antikörper SC-5279 war ein OCT4 A N-terminaler Antikörper mit der immunogenen Region AS 1-134 und er sollte hiermit ausschließlich die größere Isoform A, welche die vollständige N-Terminal-Region beinhaltet, erkennen. Diese Größe ist somit nachweislich auf die große Isoform OCT4 Isoform A zurückzuführen (Gao et al., 2010).

3.7.2 Methylierungstatus des *OCT4*-regulatorischen Bereiches in den SpheUSSC

Die Aktivität bzw. die Transkription des *OCT4*-Gens ist epigenetisch reguliert (Feldman et al., 2006). Eine aktive Transkription von *OCT4* ist mit einem unmethylierten Status seines Promotors korreliert (Kimura et al., 2004). Zum einen haben wir in unserer vorausgegangenen Arbeit bereits gezeigt, dass die USSC-Zellen einen bivalenten epigenetischen Status aufweisen (Santourlidis et al., 2010). Zum anderen weisen die epigenetisch behandelten SpheUSSC eine erhöhte Expression von OCT4 im Vergleich zu den Ausgangszellen auf. Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass die Behandlung der USSC durch 5-Aza-dC eine Aufhebung der Methylierung des *OCT4*-Genpromotors bewirkt hat. Um dies zu prüfen, war es nötig den Methylierungsgrad des Promotors zu quantifizieren. Hierfür wurde die Methylierungsspezifischen PCR (MSPCR) eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden spezifische Primer für die methylierte Situation konzipiert.

Die Effizienz der MSPCR ist von dem Methylierungsgrad der amplifizierten DNA-Region abhängig. Da die Primer für den methylierten Fall konzipiert worden sind, ist die Effizienz der PCR-Reaktion mit dem Grad der DNA-Methylierung korreliert. Die MSPCR-Daten (Abb. 3.17) zeigen, dass die USSC den höchsten Methylierungsgrad des *OCT4*-Genpromotors im Vergleich zu den SpheUSSC und den IPS-USSC besitzen. Es ist bekannt, dass diese Form der Analyse dadurch erschwert ist, dass diverse *OCT4*-Pseudogenen existieren, die hoch konserviert und methyliert sind (Liedtke et al., 2010.).

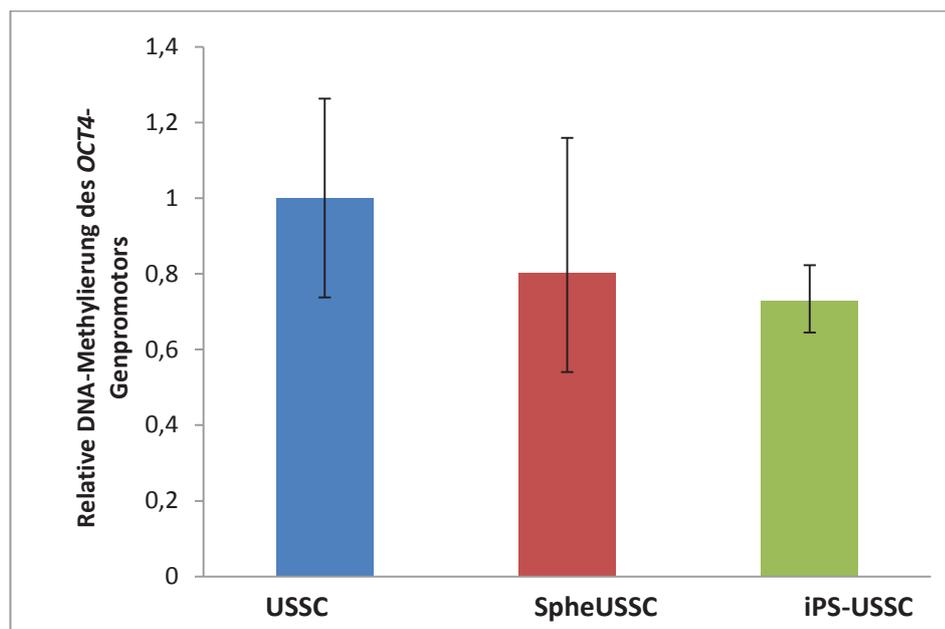


Abb. 3.17: Bestimmung der DNA-Methylierung des *OCT4*-Genpromotors mittels einer MSPCR. Die Balken repräsentieren die relative DNA-Methylierung des *OCT4*-Genpromotors in USSC SA 8/25-Zellen, in den SpheUSSC und in den iPS-USSC. Die Messung erfolgte nach einer Bisulfit-Konvertierung der genomischen DNA. Die Methylierung in USSC diente als Referenz und wurde als 1 gesetzt. Die verwendeten Primer sind spezifisch für den methylierten Fall.

Um die anhand der MSPCR gemessenen DNA-Methylierungsunterschiede zu prüfen bzw. im Detail zu charakterisieren, war es nötig die *OCT4*-Genpromoterregion zu sequenzieren. Hierfür wurde die genomische DNA der USSC-Zellen und der daraus generierten SpheUSSC mit Bisulfit konvertiert und einer genomischen Sequenzierung zugeführt. Auffällig bei den SpheUSSC ist ein uniformes Muster der DNA-Methylierung bei allen sequenzierten Klonen (Abb. 3.18). Die Methode ist beginnend mit der Auswahl eines Sphärenklons dreimal durchgeführt worden. Hingegen weisen die Ausgangszellen USSC 8/25 eine heterogene Methylierung auf, wie sie bereits beschrieben ist (Santourlidis et al., 2011).

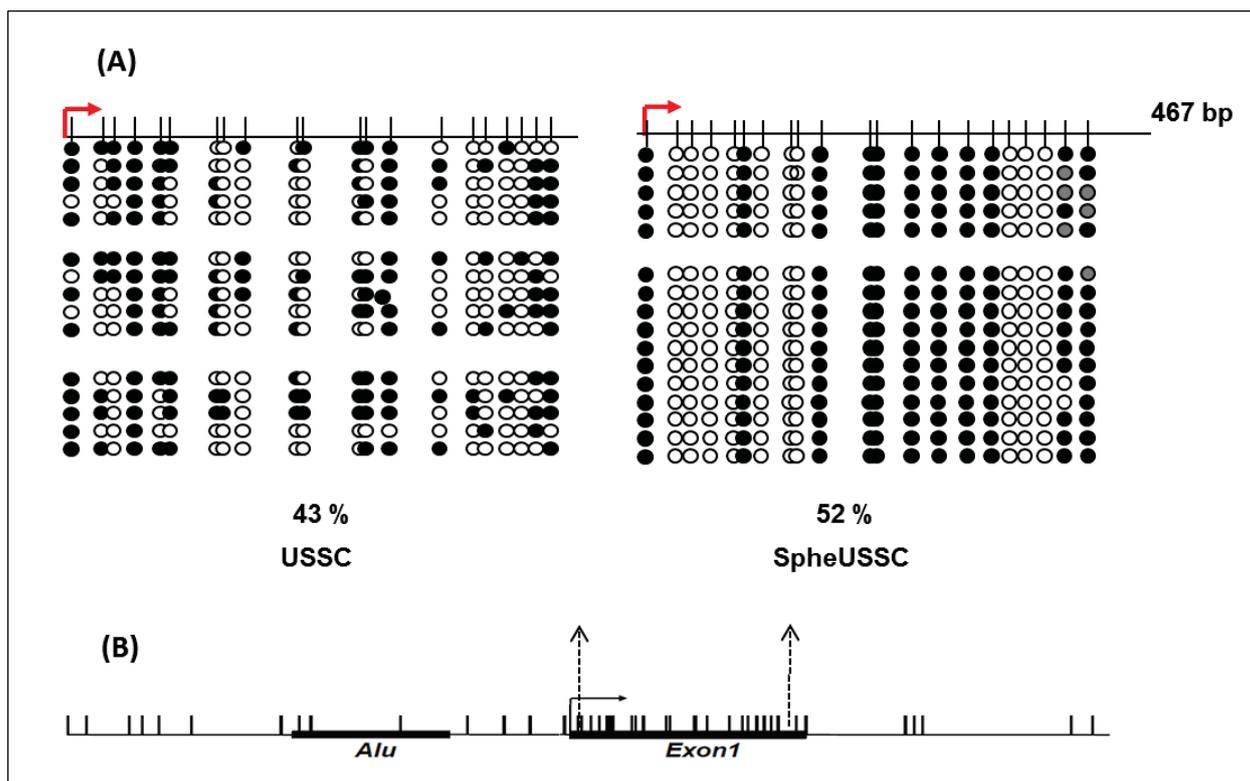


Abb. 3.18: (A) DNA-Methylierungsmuster im 5'-Bereich des *OCT4*-Gens in USSC 8/25 und in den SpheUSSC. Die Sequenzierung erfolgte nach einer Bisulfit-Konvertierung der genomischen DNA. Offene Kreise stehen für unmethylierte CpG-Dinukleotide, schwarze Kreise für methylierte CpG-Dinukleotide. Der gewinkelte Pfeil gibt den Transkriptionsstart des Gens an (B). Schematische Darstellung der genomischen Organisation der *OCT4* 5'-Region einschließlich der relativen Position eines stromaufwärts gelegenen *Alu*-Elements, der Transkriptionsstartstelle (gewinkelter Pfeil), das erste Exon, und die CpG-Dinukleotide (kurze, senkrechte Striche). Die gestrichelten Pfeile kennzeichnen die sequenzierte Region.

Bei der Regulation der Expression des *OCT4*-Gens spielen ebenfalls ein proximaler und ein distaler Enhancer eine wesentliche Rolle (Freberg et al., 2007). Es ist bereits gezeigt, dass in ES-Zellen die Enhancer-/Promotorregionen des transkriptionell aktiven *OCT4*-Gens unmethyliert sind und eine Hypermethylierung dieser regulatorischen Regionen für stillgelegte *OCT4*-Gene vorliegen kann (Pan et al., 2002). Um diesen Methylierungsstatus in den SpheUSSC zu ermitteln, wurde analog wie beim *OCT4*-Genpromoter die genomische DNA nach einer Bisulfit-Konvertierung sequenziert. Anders als im Promoterbereich sind die beiden Enhancer heterogen methyliert, sodass kein einheitliches Methylierungsmuster zu erkennen war, wobei dies in den Ausgangszellen USSC 8/25 als auch in den daraus generierten SpheUSSC der Fall ist (Abb. 3.19). Auffällig ist, dass die

Methylierung der Enhancer in den SpheUSSC höher als in den USSC selbst ist. Beim proximalen Enhancer (Enhancer 1) sind 77 % der sequenzierten CpGs methyliert, während es in den USSC nur 60% sind. Beim distalen Enhancer (Enhancer 2) sind ebenfalls mehr CpGs in den SpheUSSC (37%) als in USSC (30%) methyliert.

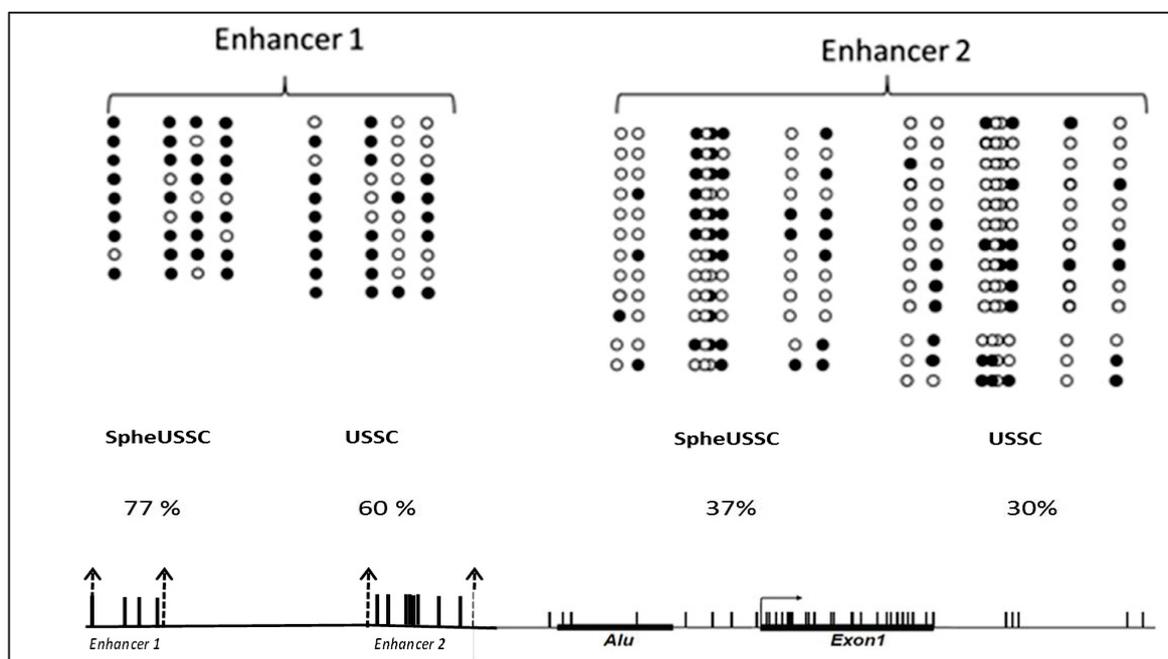


Abb. 3.19: Bisulfit-Sequenzierung der beiden Enhancer des *OCT4*-Gens in den USSC 8/25 und in den SpheUSSC. Die Sequenzierung erfolgte nach einer Bisulfit-Konvertierung der genomischen DNA. Offene Kreise: unmethyliertes CpG-Dinukleotid; schwarze Kreise: methyliertes CpG-Dinukleotid. Der Grad der Methylierung ist in Prozent angegeben.

3.7.3 *SOX2*-Expression in den SpheUSSC

Neben *OCT4*, dem Hauptpluripotenzfaktor, spielt unter anderem *SOX2* (Abb. 3.20) eine wesentliche Rolle bei der Erhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen (Masui et al., 2007; Feng et al., 2008). Es wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass beide gemeinsam in der frühen Ontogenese, *SOX2* und *OCT4*, eine synergistische Wirkung entfalten, um die Genexpression einer Reihe von Entwicklungsgenen zu steuern (Joon-Lin Chew et al., 2004). Ein Beispiel hierfür ist die synergistische Aktivierung des Enhancers des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 4 (*FGF-4*) durch *OCT4* und *SOX2* (DC Ambrosetti et al., 1997).

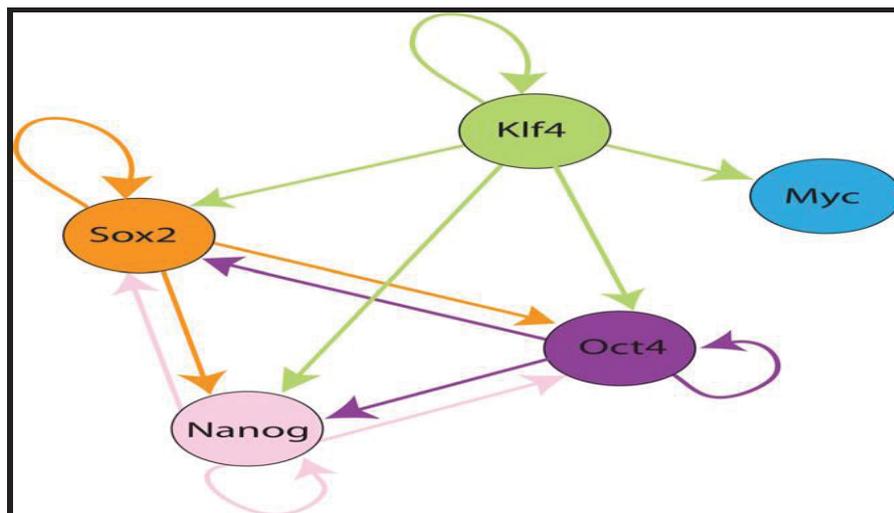


Abb. 3.20: Netzwerk der Pluripotenzfaktoren in embryonalen Stammzellen. Eine Reihe von Proteinen agiert synergistisch in embryonalen Stammzellen. Die Schlüsselfaktoren der Pluripotenz: Oct4, Nanog, sox2, klf4 und c-myc sind in der Lage zahlreicher Gene und sich selbst zu regulieren. Diese Faktoren können Pluripotenz in somatischen Zellen induzieren (modifiziert nach Wang et al, 2006).

Das *SOX2*-Gen ist aktiv in embryonalen, sowie neuronalen Stammzellen (Loh et al., 2011; Wegner et al., 2005). Es hat sich gezeigt, dass die regulatorischen Bereiche von *SOX2*, d.h. dessen Genpromotor und seine beiden SRR- Enhancer unmethyliert und suszeptibel für epigenetische Modifikationen im Verlauf der zellulären Differenzierung sind (Sikorska et al., 2008). In mehreren USSC-Zelllinien weist der distale SRR1 Enhancer und der *SOX2*-Promotor keine Methylierung auf, mit Ausnahme der ersten CpG-Dinukleotiden des Enhancers, auf denen sporadisch Methylierung zu finden ist. Allerdings ist keine *SOX2*-Transkription in mehreren USSC Zelllinien nachzuweisen. Eine ektopische Expression von OCT4 in USSC führt jedoch durchaus zu einer Induktion der *SOX2*-Transkription (Santourlidis et al., 2011).

Es ist auch bekannt, dass OCT4 ein Transkriptionsaktivator für *SOX2* sein kann (Masui et al., 2007). Die nachgewiesene exprimierte OCT4 Isoform in den SpeUSSC könnte daher die Transkription von *SOX2* in den SpeUSSC induzieren. Um dies zu prüfen, war es erforderlich die Transkription des *SOX2*-Gens in den SpeUSSC zu messen. Unter Verwendung derselben RNA, die zuvor für die Messung von *OCT4* eingesetzt worden ist, wurde ebenfalls mittels der *real time* PCR die *SOX2*-Transkription ermittelt. Verglichen zu den Ausgangszellen USSC zeigen die *real time*-Ergebnisse eine erhöhte Transkription in den SpeUSSC im Vergleich zu den USSC. Das Transkriptionsniveau war in den reprogrammierten ipsUSSC wesentlich höher als in den beiden anderen Zelltypen. So

weisen die SpheUSSC eine 60-fach höhere Transkription im Vergleich zu den USSC auf. Die Transkription in den ESC-H9 ist höher, das ca. Dreifache der in den SpheUSSC (Abb. 3.21).

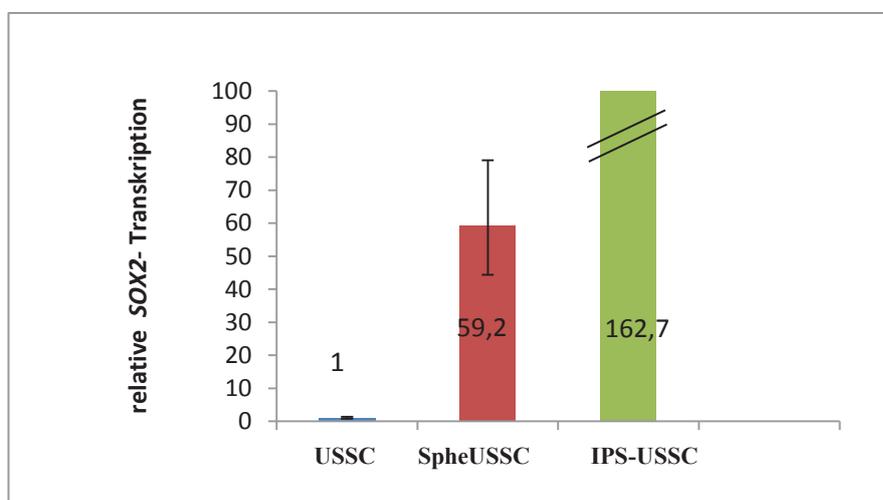


Abb. 3.21: Relativ quantifizierende *real-time*-PCR-Analyse der *SOX2*-Transkription in USSC 8/25, SpheUSSC und iPS-USSC. Die Messung wurde auf die Transkription des Housekeeping-Gens *GAPDH* normiert. Die Messwerte werden relativ zur USSC-Messung angegeben.

Zusätzlich zur Analyse der Transkription wurde die Expression von SOX2 auf Proteinebene durchgeführt. Es konnte keine spezifische Bande, weder in den SpheUSSC noch in den USSC, detektiert werden (Anhang).

3.7.4 *NANOG*-Expression

NANOG ist neben *SOX2* und *OCT4* ebenfalls ein zentraler Transkriptionsfaktor, der für die Pluripotenz und die Selbsterneuerung der embryonalen Stammzellen und der iPS-Zellen benötigt wird (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Es ist bekannt, dass *OCT4* und *NANOG* desgleichen wie *OCT4* und *SOX2* zusammenwirken können, um zahlreiche transkriptionelle Regulationswege in Stammzellen zu gewährleisten (Boyer et al., 2005). In mehreren Stammzellen, in denen die Pluripotenz und die Inhibierung der Differenzierung aufrechterhalten werden, sind meistens *OCT4* und *NANOG* gleichzeitig exprimiert (Nichols et al., 1998). Die epigenetische Behandlung der SpheUSSC induziert die Expression von *OCT4*. Daher wurde auch hier mittels der *real time* PCR die *NANOG*-Gentranskription aus derselben cDNA, die zuvor für die Messungen der Transkription der beiden anderen Pluripotenzfaktoren verwendet wurde, gemessen. Die Daten der *real time* PCR zeigten eine höhere *NANOG*-Transkription in den SpheUSSC im Vergleich zu den USSC-Zellen (Abb. 3.22).

In wiederholten Experimenten konnte festgestellt werden, dass die SpheUSSC das Vierfache an *NANOG*-Gentranskription aufweisen als die Ausgangszellen (USSC).

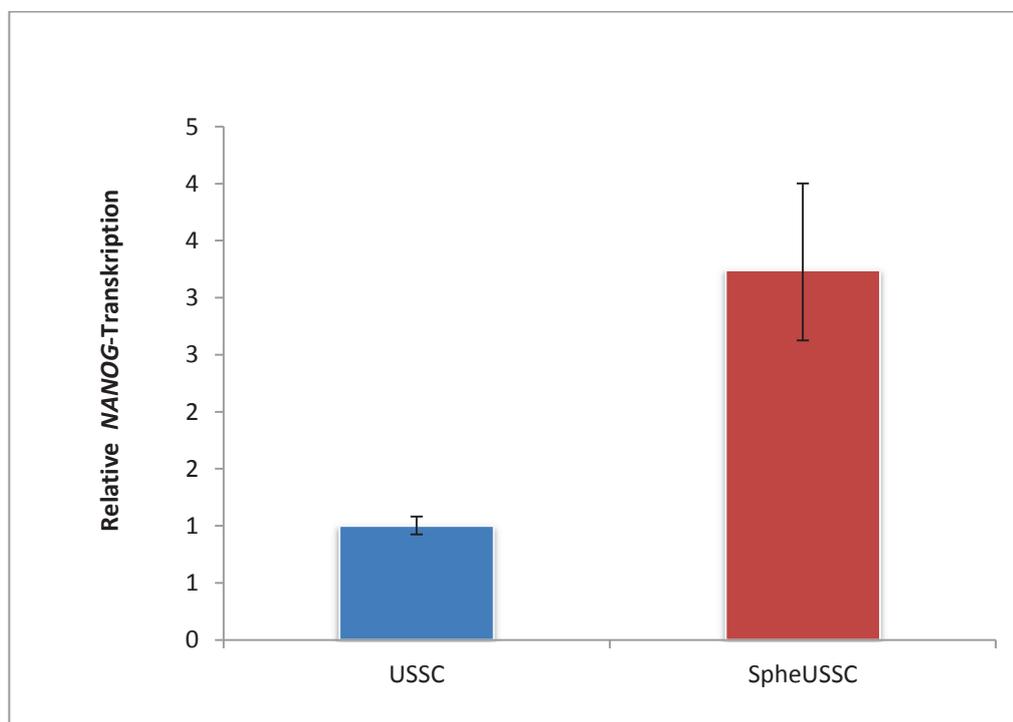


Abb. 3.22: Real-Time RT-PCR-Analyse der mRNA-Transkription von *NANOG* in den USSC S8/25 und den SpheUSSC. Die Transkription wurde normiert auf das House-keeping-Gen *GAPDH*. Die Transkription ist relativ zu der USSC-Transkription angegeben, die auf eins gesetzt wurde.

Die Expression von *NANOG* in den SpheUSSC auf Proteinebene ließ sich mittels Southerblot-Analysen nicht nachweisen. Somit ist keine Induktion des *NANOG*-Proteins nach der epigenetischen Behandlung festzustellen.

3.8 Evaluierung der Proliferationsfähigkeit der SpheUSSC

3.8.1 Proliferationsparameter

Die generierten SpheUSSC-Zellen lassen sich auffällig effizient proliferieren, sodass sie, aufgrund der schnell erreichten hohen Dichte, oft ausgesät werden müssen. Um diese Beobachtung genauer beurteilen zu können, war es nötig die Proliferationsrate und -fähigkeit der Zellen genauer zu untersuchen und zu bestimmen.

Zu diesem Zweck wurden die epigenetisch erzeugten SpheUSSC über mehr als ein Jahr ohne Unterbrechung und unter konstanten Bedingungen kultiviert. Studiert wurden die Proliferation und die morphologische Veränderung der Zellen. Um die Proliferationsrate zu bestimmen, wurden die Zellen über die Langzeitkultur regelmäßig lichtmikroskopisch

gezählt. Die kultivierten SpheUSSC wurden hierfür trypsiniert und dünn, 500×10^3 , ausgesät. Das Medium wurde an jedem dritten Tag zur Hälfte gewechselt. Die Zählung unter dem Mikroskop erfolgte ebenfalls bei jedem Mediumwechsel (Anhang). Während der Kultivierung konnten die SpheUSSC in Kultur über den gesamten Zeitraum von weit über einem Jahr eine hohe und beständige Proliferationsrate aufweisen. Um die Proliferationsrate der SpheUSSC zu bestimmen, wurde eine Wachstumskurve angefertigt (Abb. 3.23). Die Analyse des Zellwachstums ergibt, dass die SpheUSSC sich im Schnitt alle 48 bis 72 Stunden verdoppeln können. Die Kultivierung der SpheUSSC erfolgte ohne Unterbrechung über mehr als 18 Monate. Die Subkultivierung erfolgte im Schnitt einmal pro Woche. Dies ergibt ca. 75 Passagen und eindeutig deutlich mehr als 50 Teilungen und somit eindeutig höher als die Hayflick-Grenze (Hayflick, 1965). Die limitierte Teilung der diploiden Zellen *in-vitro* begründeten Hayflick sowie mehrere andere Arbeiten mit der induzierten Zellalterung und Seneszenz. Um dies im Fall der SpheUSSC-Zellen zu prüfen, war es nötig die Seneszenz sowohl in den Ausgangszellen als auch den daraus generierten SpheUSSC zu ermitteln.

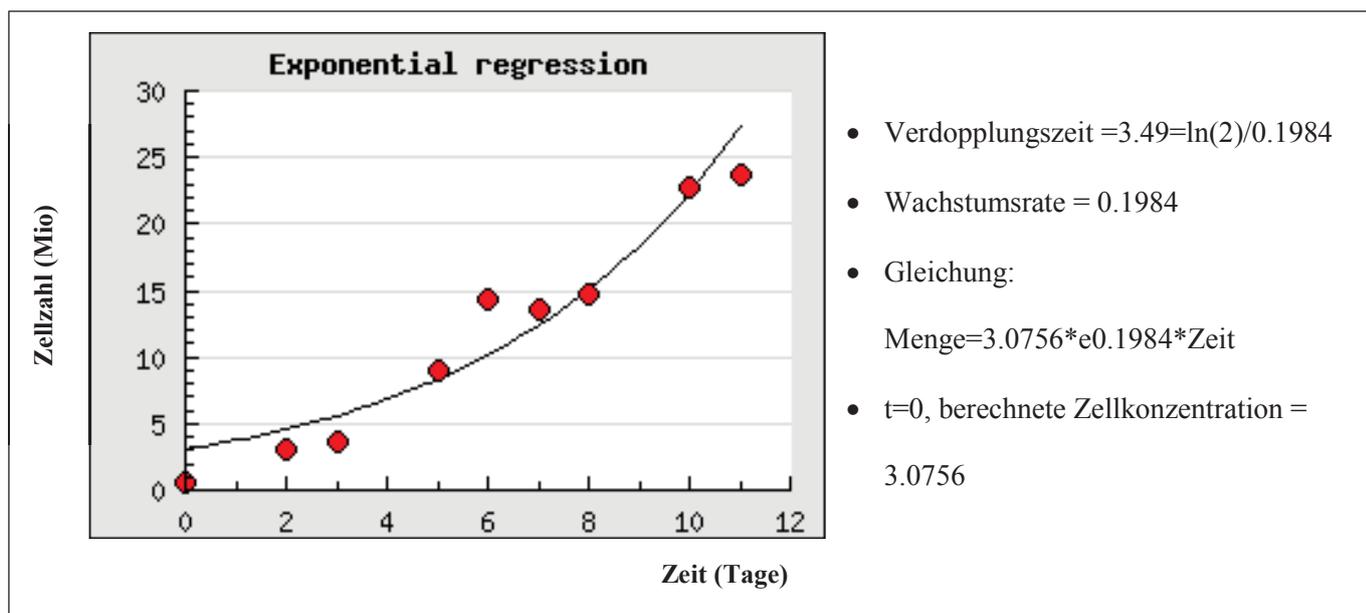


Abb. 3.23 Grafische Darstellung der Wachstumskurve der SpheUSSC-Zellen.

Zellen wurden ständig unter geringer Dichte kultiviert, um einer etwaigen Zellkontakthinhibition weitgehend entgegenzuwirken und die Zählung der Zellen erfolgte an jeden dritten Tag. (Berechnung erfolgt mittels des Online-Tools „doubling-time“, <http://www.doubling-time.com>).

3.8.2 Evaluierung der Seneszenz in den SpheUSSC

Die erhöhte Proliferationsfähigkeit der SpheUSSC sowie die stabile Morphologie der Zellen in der über 1,5 Jahre langen Zellkultivierung legitimierte die Fragestellung, ob die epigenetische Behandlung der USSC zu einem Effekt auf die Lebenszeit der Zellen geführt haben könnte. Die Arbeiten von Aktas et al. zeigen, dass die Seneszenz in den USSC-Zellen schon bei der ersten Passage detektiert wird (Aktas et al., 2008). Es ist bekannt, dass zelluläre Seneszenz mit funktionellen und morphologischen Änderungen korreliert ist (Hayflick und Moorhead, 1961). Die wichtigste Änderung, die mit der zellulären Seneszenz einhergeht, ist der Verlust der Befähigung zur Mitose und der Zellwachstumsstopp (Di Leonardo et al., 1994). Diese Erkenntnisse sowie die beobachtete bzw. die ermittelte andauernde hohe Proliferationsfähigkeit der SpheUSSC lässt vermuten, dass eventuell die zelluläre Seneszenz verloren gegangen ist. Ein gut etablierter Marker der Seneszenz ist die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (Dimri et al., 1995). Dieser Marker wird fast in allen seneszenten Zellen histochemisch nachweisbar. Daher wurde ein Test auf die Expression der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase durchgeführt, um damit zu prüfen, ob sich in der Tat das Seneszenzverhalten der Zellen geändert hat. Bei dem Experiment wurden SpheUSSC aus mehreren fortgeschrittenen Passagen getestet. Die verwendeten USSC-Zellen stammen aus der Passage 8. Es waren keine Färbungen in den SpheUSSC-Zellen zu beobachten. Die spezifische blaue Färbung, die charakteristisch für seneszente Zellen ist, war nur in den vereinzelt USSC-Zellen nachweisbar, jedoch auch nach wiederholter Anwendung nicht in den SpheUSSC zu beobachten (Abb. 3.24).

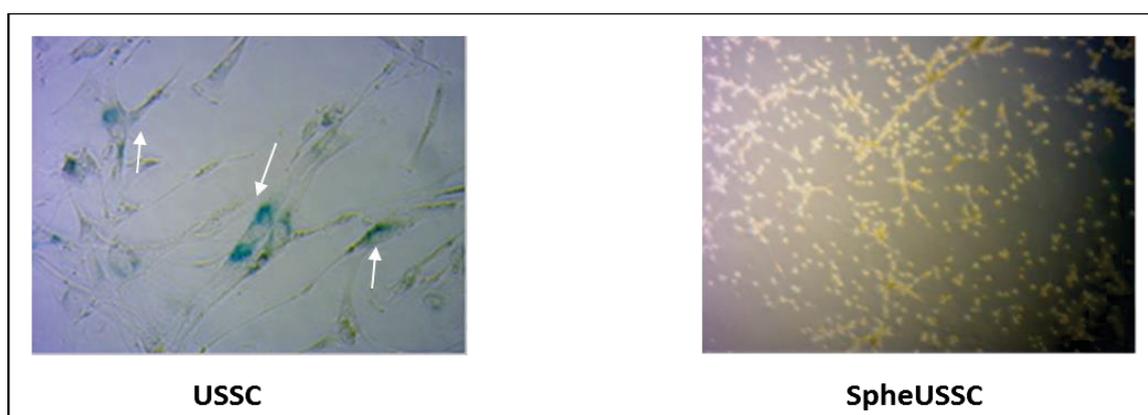


Abb. 3.24: Untersuchung der Seneszenz in USSC SA 8/25 und in SpheUSSC-Zellen mittels des Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Markers. Die USSC, im Gegensatz zu den SpheUSSC, exprimieren den Seneszenzmarker SA- β -Galaktosidase in einigen Zellen, dessen Anwesenheit durch seine enzymatische Aktivität bei der Umsetzung von X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (blau), nachgewiesen wird. Pfeile zeigen Stellen die blau erscheinen.

Zusätzliche Tests auf die Expression der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase von verschiedenen fortgeschrittenen Passagen der SpheUSSC zeigten ebenfalls eine sehr schwache bzw. vereinzelte spezifische Färbung. Die SpheUSSC scheinen somit während der Fortsetzung der Kultivierung nicht seneszent zu werden. Dieses Ergebnis korreliert mit der bereits beobachteten erhöhten und stabilen Proliferation.

3.9 Bestimmung der Länge der Telomere der SpheUSSC

3.9.1 Bestimmung der Länge der Telomere mittels *southern-Blot*-Analyse

Seneszente Zellen sind dadurch gezeichnet, dass sie sich nicht mehr teilen können, aber doch weiterhin noch lebensfähig sind (Campisi, 1997). Über dies exprimieren seneszente Zellen im sauren pH die β -Galaktosidase (Seneszenz-assoziierte SA- β -Gal-Aktivität), die in noch teilenden Zellen nicht detektiert wird (Dimri et. al., 1995). Es ist gut belegt, dass die Seneszenz mit verkürzten Telomeren korreliert (Herbert et al., 1999). Die erhöhte Befähigung zur Proliferation der SpheUSSC sowie deren nicht-seneszenter Phänotyp stellten die Frage, ob diese nachgewiesenen Veränderungen ggf. auf eine Verlängerung der Telomeren zurückzuführen ist. Hierfür war es nötig, die Länge der Telomeren der SpheUSSC zu bestimmen und diese mit der Telomerlänge in den Ausgangszellen zu vergleichen. Die Ermittlung der Telomerlängen erfolgte mittels der *Terminal Restriction Fragments (TRF)*-Methode anhand des Telo TAGGG Telomere Length Assay (Fa. Roche), kombiniert mit der Methode der Wahl, den *Southern Blot*. Für die Bestimmung der Länge der Telomeren wurde DNA aus den bereits charakterisierten nicht-senszenten SpheUSSC eingesetzt.

Die enzymatisch verdaute DNA der SpheUSSC weist im Vergleich zu den Ausgangszellen (USSC) wesentlich längere Telomeren auf. So ist die Länge der Telomeren der SpheUSSC mit der von embryonalen Stammzellen, ESC-H9, vergleichbar (Abb. 3.25). Darüber hinaus zeigt die Analyse, dass die Länge der Telomeren in SpheUSSC eher homogener als in den anderen analysierten Zellen auf. Dieser Versuch wurde unter denselben Bedingungen dreimal wiederholt. Auch in fortgeschrittenen Zellpassagen, z. B. Passage 35, nahm die Länge der Telomeren nicht ab. Weitere Versuche konnten diese ersten gewonnenen Ergebnisse bestätigen (siehe Anhang).

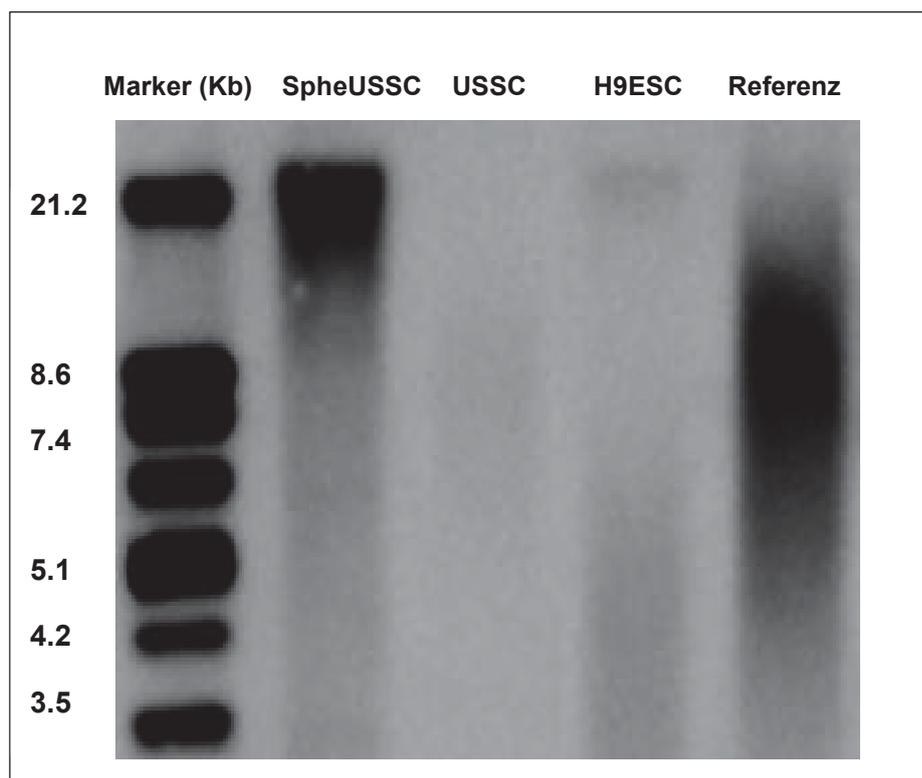


Abb. 3.25: Analyse der Telomerenlänge der SpheUSSC. Die Länge der Telomeren wurde mittels einer *Southern Blot*-Analyse bestimmt. Die DNA einer immortalisierten, embryonalen Karzinomzelllinie mit bekannten, verlängerten Telomeren wurden als Referenz gewählt. Jeweils 1 µg DNA einer Probe wurde für die Messung verwendet.

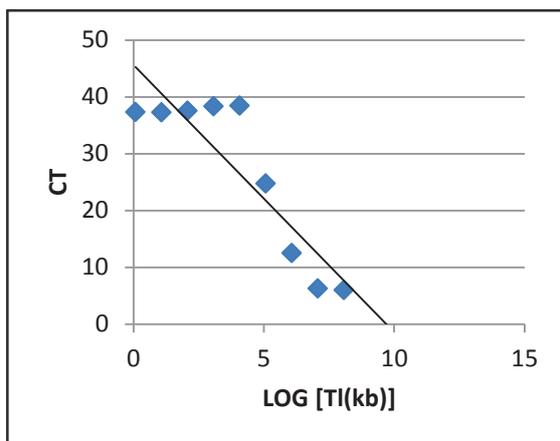
Die mittels *Terminal Restriction Fragments* (TRF)-Methode durchgeführte Telomerenanalyse zeigt, dass die SpheUSSC wesentlich längere Telomeren als die Ausgangszellen besitzen. Dieses Ergebnis geht einher mit der bereits festgestellten verminderten Seneszenz der Zellen und die beobachtete lange und gleichmäßige Kultivierung der SpheUSSC.

3.9.2 Bestimmung der Telomerlängen der SpheUSSC mittels einer *real time PCR*

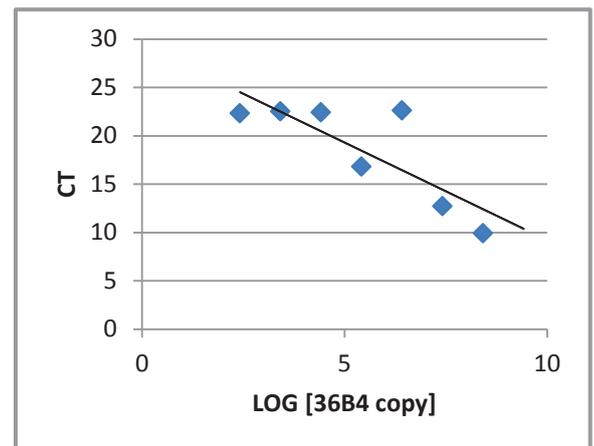
Immer mehr Studien bestätigen die Bedeutung der langen Telomeren in pluripotenten Stammzellen und deren Rolle für die Erhaltung der Zellproliferation (Stadtfeld et al., 2008; Huang et al., 2011). Im Hinblick auf die Bedeutung des Befundes, die ermittelte Verlängerung der Telomeren in den SpheUSSC-Zellen im Vergleich zu der Ausgangszellpopulation, war es notwendig, dass dieser Befund mit einer zweiten unabhängigen Methode verifiziert wird. Der auf einen enzymatischen Verdau basierte Nachweis zeigte deutlich eine unterschiedliche Länge der Telomeren zwischen den USSC

und den daraus epigenetisch generierten SpheUSSC. Allerdings spiegelt der mittels des Southern Blots ermittelte durchschnittliche TRF nicht nur die Länge der Telomeren wider, sondern beinhaltet eventuell auch die subtelomerischen *repeats*. Um eine genauere Einschätzung der Telomerenlänge zu erzielen und mögliche methodische Artefakte aufgrund einer ggf. unvollständigen enzymatischen Reaktion auszuschließen, wurde zusätzlich zur Restriktionsmethode eine neu publizierte PCR-Methode zur Telomerlängenbestimmung ausgearbeitet und eingesetzt. Die Methode ist in der Literatur gut etabliert und hat sich als gut reproduzierbar herausgestellt (O'Callaghan und Fenech, 2011). Mittels dieses quantitativen Verfahrens und unter Verwendung derselben DNA, die im Souther Blot-Versuch verwendet wurde, konnte die durchschnittliche Länge der Telomeren in Abhängigkeit von der Genom-Kopienanzahl ermittelt werden (Abb. 3.26; Abb. 3.27).

Die somit berechnete Länge der Telomeren bestätigt die mit der Restriktionsverdau-Methode generierten Ergebnisse. So weisen die SpheUSSC-Zellen die längsten Telomeren auf. Dieses Ergebnis korreliert deutlich mit denen aus der Southern Blot-Analyse gewonnenen Daten.



(A)



(B)

Abb. 3.26: Standardkurven wurden bestimmt um die Telomerenlänge pro Genom zu bestimmen. CT (cycle threshold) ist die Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, damit genügend SYBR *green*-Fluoreszenz detektiert werden kann (A) Die Grafik zeigt die Standardkurve für die Bestimmung der Länge der Telomeren pro Reaktion. Auf der X-Achse ist der logarithmische Wert der Länge der eingesetzten Telomeren pro Reaktion angegeben. Die Amplifikation ist abhängig von der Konzentration des Templates. Die Grafik stellt den linearen Bereich der Amplifikation dar (B). Die Grafik zeigt die Standardkurve für die Bestimmung der Anzahl der vorhandenen Genomkopien pro Reaktion. Das *Housekeeping*-Gen *36B4*, welches für das acidic ribosomal phosphoprotein kodiert, wurde verwendet.

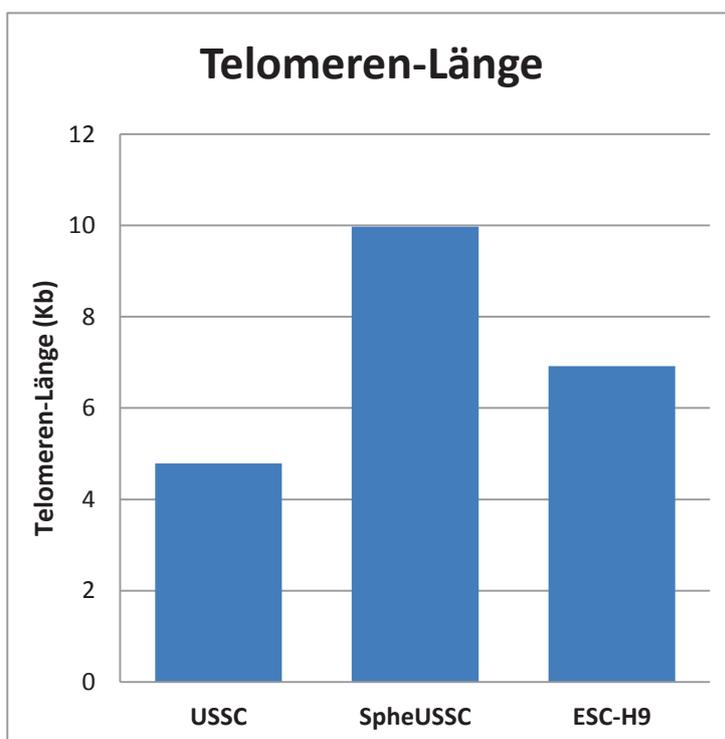


Abb. 3.27: Bestimmung der Länge der Telomeren mittels quantitativer PCR. Das gemessene Signal in der PCR ist mit der Länge der Telomeren korreliert. Die Zahl der Telomeren-Primer, die zur Telomeren-DNA am Anfang der PCR binden, ist direkt abhängig von der Anzahl der summierten Länge der Telomeren einer Zelle. Die Länge der Telomeren pro Reaktion ist durch die Anzahl der diploiden Kopienanzahl dividiert. Dies ergibt die eigentliche Länge der Telomeren pro Zelle bzw. pro Genome (Y-Achse). USSC 8/25 und H9 wurden als Kontrollen eingesetzt.

Sowohl mittels des Restriktionsverdauverfahrens als auch der semiquantitativen *real-time* PCR-Bestimmung konnte festgestellt werden, dass die Telomeren in den SpeUSSC wesentlich länger als in den Ausgangszellen sind. Es ist gut belegt, dass die Verlängerung der Telomeren überwiegend durch die Aktivität der Telomerase gewährleistet ist (Greider und Blackburn, 1985). So ist das Enzym, die Telomerase, in der Lage, während der Zellteilung verlorene telomerische repeats an den Enden der Chromosomen wieder zu synthetisieren (Blasco, 2005). In Keimbahnzellen sowie Krebszellen wurde ebenfalls gezeigt, dass die Telomerase dazu beiträgt, die Seneszenz zu inhibieren (Blasco, 2005). Diese Erkenntnisse legitimierten die Fragestellung, ob die Expression bzw. die Transkription der Telomerase in den SpeUSSC im Vergleich zu den USSC zugenommen hat. Hierzu wurde die Transkription der Telomerase auf der RNA-Ebene mittels einer PCR gemessen und anschließend die PCR-Produkte mittels der Gelelektrophorese geprüft (Abb. 3.28).



Abb. 3.28: Elektrophoretische Analyse der Telomerase-Transkription in SpeUSSC. Die *hTERT*-cDNA-Amplifikation wurde in den SpeUSSC-, den USSC- und den ESC-H9-Zellen angesetzt. Nach 35 Zyklen war nur in der Positivkontrolle, den ESC-H9-Zellen eine spezifische Bande auf dem Gel zu sehen. Weder in den USSC noch in den SpeUSSC-Zellen konnten *hTERT*-Transkripte nachgewiesen werden.

Die Transkription von *hTERT* konnte nur in der embryonalen Stammzelllinie ESC-H9 in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Weder in den USSC noch in den SpeUSSC war Transkription detektierbar. Wiederholte Messungen der *hTERT* aus mehreren SpeUSSC-Kulturen lieferten stets die gleichen Ergebnisse. Diese Ergebnisse liefern Evidenz dafür, dass die festgestellte Verlängerung der Telomeren in den SpeUSSC nicht auf die Aktivität der Telomerase zurückzuführen ist. Immer mehr Studien belegen, dass die Verlängerung der Telomeren auch durch Telomerase-unabhängige Mechanismen erfolgen kann (Bryan et al., 1995)

3.10 Evaluierung des Differenzierungspotentials der SpheUSSC-Zellen

Die morphologische sowie molekularbiologische Evaluierung wies nach, dass die SpheUSSC Zellen wesentliche Veränderungen im Vergleich zu den Ausgangszellen erworben haben. So weisen die SpheUSSC eine OCT4-Expression, sowie eine transkriptionelle Aktivität der beiden anderen Pluripotenzfaktoren SOX2 und NANOG auf. Darüber hinaus sind die Telomeren der SpheUSSC wesentlich länger geworden. Dies geht einher mit einem nachgewiesenen Zuwachs der Proliferationsfähigkeit von >100 Zellteilungen und der Abwesenheit von Seneszenz in der Zellkultur. Es ist bekannt, dass die Expression von Pluripotenzfaktoren wie z. B. OCT4, SOX2 und NANOG und die Telomerlänge (Armstrong et al., 2005) Parameter darstellen, die einen Einfluss auf das zelluläre Differenzierungspotential haben. So besitzen Stammzellen, in denen diese Faktoren co-exprimiert werden und die lange Telomeren aufweisen, ein breites Differenzierungspotential (Huang et. al., 2011). Daher warfen die oben beschriebenen Ergebnisse die grundlegende Frage auf, ob auch die SpheUSSC eine Veränderung in ihrer Differenzierungsfähigkeit erfahren haben.

Es ist bereits beschrieben, dass sich in den USSC-Zelllinien Zellen, jedoch mit variierender Effizienz, zur verschiedenen Zelltypen differenzieren lassen (Kögler et al., 2004; Gretschat et al., 2008). Die bisher untersuchten USSC-Zelllinien können sich allerdings nicht zu Adipozyten differenzieren (Kluth et al., 2010). So ist die in dieser Arbeit benutzte USSC 8/25 nachgewiesenerweise nicht zu Adipozyten differenzierbar (Kluth et al., 2010).

Um zu prüfen, ob die Differenzierungseigenschaften der SpheUSSC im Vergleich zu den 8/25 USSC-Zellen unverändert geblieben sind, reduziert oder erweitert worden sind, wurden verschiedene Differenzierungswege durchgeführt (Abb. 3.29). Im Einzelnen wurde versucht aus den SpheUSSC-Zellen Adipozyten, Osteoblasten, Chondrozyten, Nervenzellen und Cardiomyzten zu differenzieren.

Hierfür wurden sowohl in der Literatur beschriebene, gut etablierte Differenzierungsprotokolle angewandt als auch im Markt erhältliche, für die Differenzierung erprobte und optimierte Medien eingesetzt.

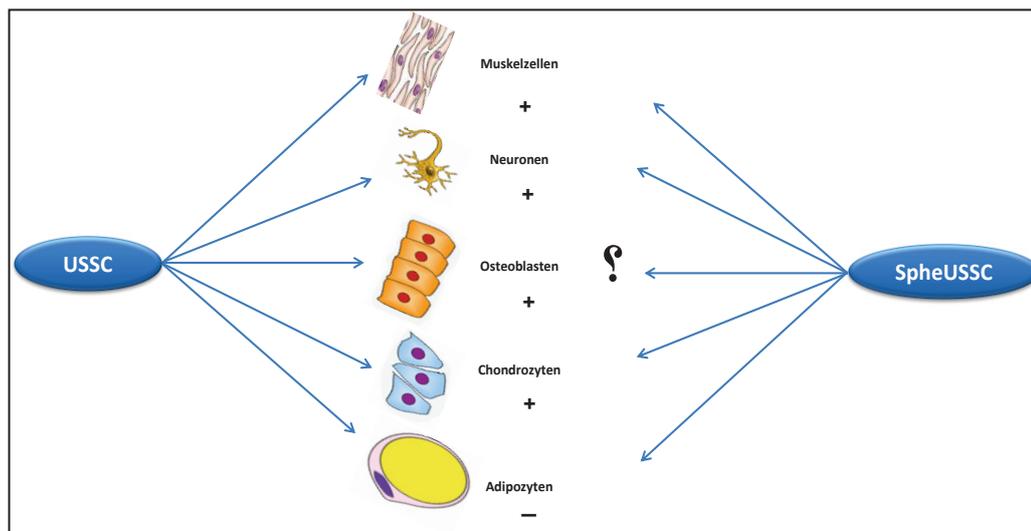


Abb. 3.29: Differenzierungspotential der USSC. Die USSC sind in der Lage sich mit unterschiedlicher Effizienz in verschiedenen Zelltypen zu differenzieren (Muskelzellen, Neuronen, Osteoblasten, Chondrozyten,) (Kögler et al., 2004). Eine Differenzierung zur Adipozyten ist den nativen USSC nicht möglich (Kluth et al., 2010).

3.10.1 Adipozytendifferenzierung

Die USSC 8/25, die in dieser Arbeit epigenetisch zu den SpheUSSC modifiziert wurde, zeigt keine Adipozytendifferenzierung. Dies wurde mehrfach von der Arbeitsgruppe von Prof. Kogler bestätigt. Nach ihrer Bildung wachsen die SpheUSSC in Suspension als Agglomerate. Im Expansionsmedium lassen sich die SpheUSSC-Zellen mittels eines Mediumwechsels alle drei Tage, ohne Passagieren, rasch anziehen. Unterlässt man die Subkultivierung der SpheUSSC über zwei Wochen, werden sie zum größten Teil adhären. Die Abbildung stellt die Entwicklung der SpheUSSC im Verlauf der Differenzierung dar. Undifferenzierte, in Suspension wachsende SpheUSSC ohne Subkultivierung adhären allmählich auf die Oberfläche der Kulturschale. Eine Woche nach der Adhäsion sind auf ihrer Oberfläche sowie am Rand der adhären Sphären erste kleine Lipidtröpfchen zu erkennen. Bis zum Tag 14 dieser spontan einsetzenden Differenzierung verdichten sich die gebildeten Vakuolen immer stärker. Auffällig dabei ist, dass die zuvor in Sphären gewachsenen SpheUSSC ihr dreidimensionales Wachstum einbüßen und stattdessen nunmehr flach und eindimensional wachsen und Vakuolen entstehen, die morphologisch Lipidvakuolen ähneln. Vereinzelt kommen auch besonders große Vakuolen vor.

Die kleineren Vakuolen sind eher dicht aneinander entstehend und befinden sich nahe dem Zentrum der ursprünglichen Sphäre (Abb. 3.30). Der Zeitpunkt, in dem sich fast alle Sphären in eine Fläche abgesetzt haben und fast alle Zellen mit Lipidtröpfchen versehen sind, stellt die Phase der Ausdifferenzierung der Zellen dar.

Um zu testen, ob tatsächlich diese Zellen enddifferenziert sind, wurden die gebildeten Adipozyten ausgesät und weiterkultiviert. Die ausgesäten Zellen konnten nicht adhären werden und starben nach wenigen Tagen. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die generierten Zellen ausdifferenziert waren und das Potential eingebüßt haben sich weiter zu teilen.

Um nachzuweisen, ob es sich bei der effizienten und homogenen Bildung der runden Vesikel in der Tat um Fett handelt, wurde eine Fettrotfärbung mittels *RED-Oil-O*-Färbung der differenzierten Zellen durchgeführt (Abb. 3.30). Die Fett-Rotfärbung ermöglicht die optische Detektion von Neutralfett, Triglyzeriden und Cholesterolestern im Zytoplasma von differenzierten Adipozyten (Proescher et al., 1946; Ramirez-Zacarias et al., 1992). Die rotgefärbte Fläche weist auf eine Speicherung von Neutrallipiden in den Zellen hin. Grobe Sphären scheinen stärker gefärbt, was auf eine dichtere Bildung von Adipozyten hindeutet. Darüber hinaus bestätigt die *RED-Oil-O*-Färbung, dass die einzelnen Vakuolen größer als die zusammenhängenden sind.

Der Versuch wurde in größeren Kulturflaschen (T75) reproduziert. Hierfür wurden frisch gebildete SpheUSSC in ca. 30 ml SpheUSSC Medium subkultiviert. Es erfolgte kein Passagieren der Zellen für ca. zwei Wochen. Das Medium wurde zur Hälfte wöchentlich gewechselt. Es wurde beobachtet, dass sich die Differenzierung in diesem größeren Maßstab genauso verhielt wie zuvor in den kleineren Zellkulturflaschen (Abb. 3.30). So waren die SpheUSSC wieder nach ca. drei Wochen zu reifen Adipozyten ausdifferenziert. Aus den mehrfach wiederholten Experimenten der spontanen Adipozyten-Differenzierung der SpheUSSC ließ sich makroskopisch, mikroskopisch und mittels der Rot-Färbung feststellen, dass die Differenzierung ca. 90% der Zellen betraf.

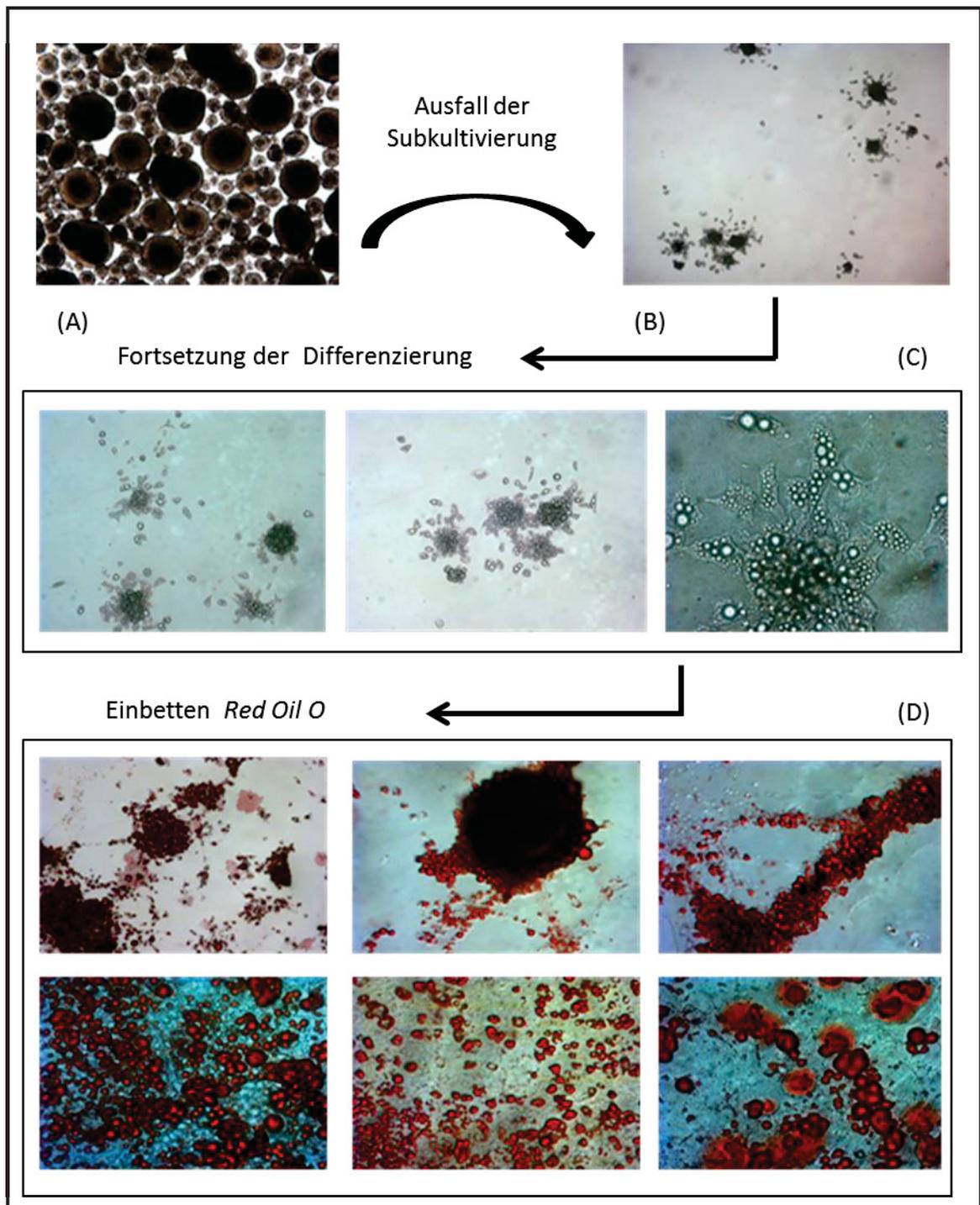


Abb. 3.30: Spontane Differenzierung der SpheUSSC (A) zu Adipozyten (B). Eine Unterbrechung der Subkultivierung der SpheUSSC für ca. zehn Tage führt zu einer spontanen und uniformen Ausbildung von Adipozyten (B, C). Erste glänzende Lipidvakuolen sind ca. zehn Tage nach Absetzen der Subkultur sichtbar (C). Die maximale Akkumulation von Vakuolen in den Zellen ist nach zwei Wochen erreicht. Die intrazellulären Neutralfette sind mit *RED-Oil-O*-Färbung nachgewiesen (D).

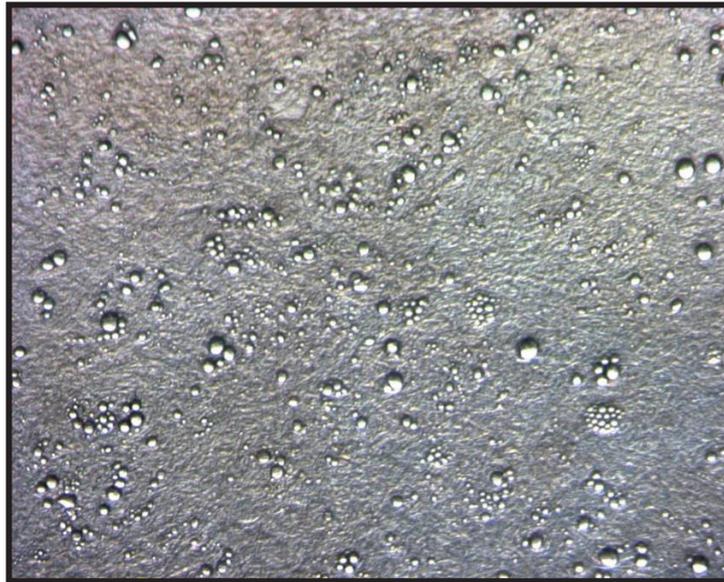


Abb. 3.31: Homogene Adipozytendifferenzierung. Die SpheUSSC sind zur spontanen und effizienten Differenzierung zu Adipozyten befähigt. Nach ca. drei Wochen entwickelt die Mehrheit der Zellen kleine Lipidtröpfchen. Zahlreiche runde, glänzende Strukturen sind makroskopisch und mikroskopisch zu erkennen. Die Anzahl und die Größe dieser homogenen Strukturen steigen im Verlauf der Differenzierung an.

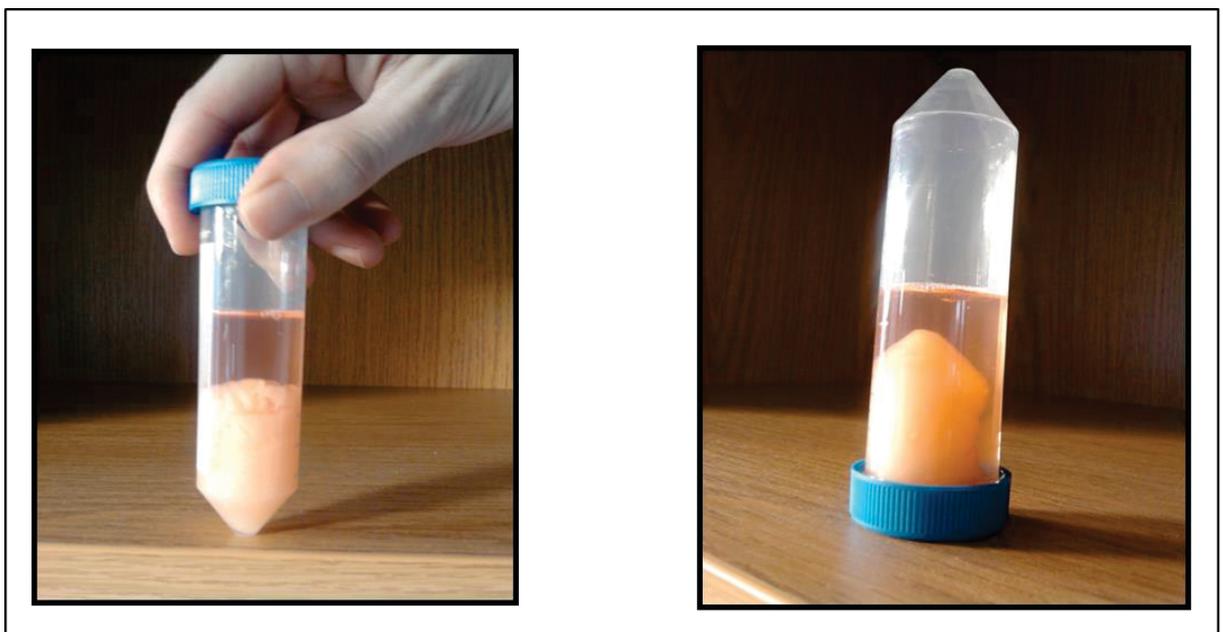


Abb. 3.32: Fettgenerierung aus den SpheUSSC-Zellen. Die SpheUSSC lassen sich auch im großen Maßstab effizient zu Adipozyten differenzieren. Nach ca. zwei bis drei Wochen kann aus einer großen Kulturflasche (T75), nach der Zellyse die dargestellte Menge an Fett gewonnen werden.

Neben der beschriebenen morphologischen Charakterisierung der generierten Adipozyten wurde ihre Erzeugung auch molekularbiologisch untersucht.

Zuerst wurde die Expression des klassischen, frühen, adipozytären Markers Leptin (Zhang et al., 1994) getestet. Leptin wird von Adipozyten exprimiert oder auch in der Plazenta (Kline et al., 1997; Gong et al., 1996). Die Untersuchungen zur Expression erfolgten mittels der relativen Quantifizierung der Leptin-Transkription über die RT-PCR. Dabei wurde die Transkription in den Ausgangszellen USSC 8/25, den undifferenzierten SpheUSSC-Zellen und den ausdifferenzierten Adipozyten gemessen. Nur bei den ausdifferenzierten Adipozyten aus den SpheUSSC konnte die Transkription von Leptin nachgewiesen werden. Der gleichzeitige Nachweis der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-(GAPDH-)Transkription wurde zur Normalisierung der Messung verwendet (Abb. 3.33).

Einer der wichtigsten und etablierten Marker für die Präadipozyten ist DLK1. Die Expression von DLK-1 ist stark in den Präadipozyten, lässt nach während der Differenzierung und ist in den reifen Adipozyten völlig abwesend (Smas et al., 1996; Wang et al., 2006). In der Arbeit von Kluth et. al. 2010 wurde für eine Reihe von Nabelschnurblut-Zelllinien eine negative Korrelation zwischen der Expression des Adipogenese-Inhibitors DLK1 und der Befähigung zur Adipozyten-Differenzierung nachgewiesen. So wurde die Hypothese erhoben, dass die DLK-Expression in den epigenetisch erzeugten SpheUSSC- und den 8/25 USSC-Zellen, die keine Adipozytendifferenzierung aufweisen, ggf. unterschiedlich sein könnte. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die DLK1-Transkription in denselben Zellen, die zuvor für Leptin getestet worden sind, durchgeführt. Weder bei den SpheUSSC noch bei den Adipozyten war die Transkription von DLK1 nachweisbar. DLK1-Transkription konnte nur bei den USSC 8/25 nachgewiesen werden. Diese Versuche wurden mehrfach durchgeführt und hatten stets dasselbe Ergebnis. So ist die Expression des Adipogeneseinhibitors DLK1, in den zur uniformen Adipogenese befähigten und epigenetisch erzeugten SpheUSSC im Gegensatz zu der 8/25 USSC-Ausgangspopulation, abwesend.

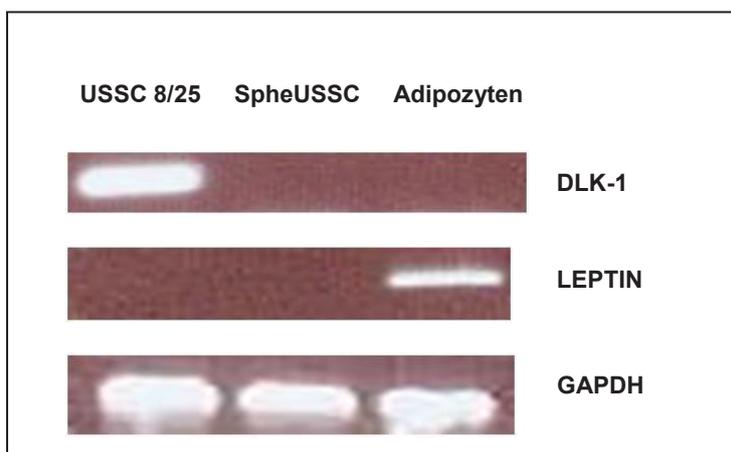


Abb. 3.33: Analyse der DLK-1-Transkription. Vergleichende Analyse der Transkription des adipozytären Markers *LEPTIN* und des Adipogeneseinhibitors *DLK1* in den 8/25 USSC, den SpheUSSC und den daraus differenzierten Adipozyten. *GAPDH* diente als Normalisator.

3.10.2 Osteodifferenzierung

Bestimmte USSC-Zelllinien sind in der Lage, sich unter entsprechenden Kulturivierungsbedingungen zu Osteoblasten zu differenzieren (Kögler et al., 2004). Da nachgewiesen werden konnte, dass sich die Differenzierungsfähigkeit der SpheUSSC hinsichtlich der Adipozyten-Differenzierung im Vergleich zu der USSC 8/25-Zelllinie geändert hatte, stellte sich die Frage, inwiefern sich die anderen Differenzierungsoptionen aufgrund der epigenetischen Behandlung geändert hatten. Daher wurde mehrfach der Versuch unternommen, die SpheUSSC in dafür optimierten Kulturbedingungen zu Osteoblasten zu differenzieren.

SpheUSSC-Sphären werden in einem spezifisch für die Osteodifferenzierung optimierten Induktionsmedium sieben Tage lang kultiviert. Unter diesen Bedingungen sind die SpheUSSC bereits nach einem Tag adhären und verlieren allmählich das kolonieartige Wachstum. Nach ca. drei Tagen haben sich langgestreckte Zellen am Rande der Sphärenkolonien gebildet. Im Lauf der weiteren Differenzierung verlieren immer mehr Zellen die sphäroide Form und wachsen mehrheitlich als langgestreckten Zellen. Nach ca. einer Woche sind schon makroskopisch dünne, weiße, extrazelluläre Ablagerungen zu erkennen (Abb. 3.34B). Diese bestehen aus kleinen Granulaten, die sich mit der Fortsetzung der Differenzierung weiter verdichten. Ein geringer Teil der differenzierten Zellen verliert jedoch leicht die Adhärenz während des Mediumwechsels. Die Mehrheit der Zellen bleibt jedoch bis zur Beendigung der Kultur adhären und die Konfluenz der

Zellkultur nimmt zu. Eine Subkultivierung der entstandenen Osteoblasten blieb erfolglos. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen bereits nach einer Woche der Differenzierung die Fähigkeit verloren haben, sich weiter zu teilen und somit enddifferenziert waren.

Einer der Hauptmerkmale der Osteodifferenzierung ist die Bildung von Kalzium (Hoemann et al., 2009; Huang et al., 2007). Die Färbung der Zellen mittels Alizarin-Rot stellt die einfachste und effizienteste Methode dar, um Kalziumanlagerungen nachzuweisen (Hoyte et al., 1960). Nach der Färbung sah die Mehrheit der Zellen in der Petrischale sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch rot aus (Abb. 3.34C). Eine stärkere Färbung ist eher an den noch im Zentrum der Sphärenkolonie wachsenden Zellen und den kreisförmigen Granulaten zu sehen. Die langgestreckten Zellen am Rand sind hingegen schwach gefärbt.

Um diese erste Evidenz auf das Vorliegen kalziumhaltiger Osteoblasten zu untermauern, wurde zusätzlich die folgende molekulare Untersuchung vorgenommen. Zu den am besten etablierten Marker für die Osteodifferenzierung gilt die alkalische Phosphatase (AP), (Golub et al., 2007). Hierfür wurde RNA aus den differenzierten Zellen isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Der Nachweis der Transkription erfolgte mittels der RT-PCR.

Dabei wurde die Transkription der AP in den Ausgangszellen, USSC 8/25, den SpheUSSC und den für die Alizarin-Rot-Färbung positiven, differenzierten Zellen gemessen. Nur bei den differenzierten Zellen konnte die alkalische Phosphatase nachgewiesen werden. Bei den Ausgangszellen USSC 8/25 sowie die SpheUSSC Zellen konnte die AP nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.34D).

Somit liefern diese Ergebnisse Evidenz dafür, dass hier eine Osteoblastendifferenzierung vorliegt. Die USSC 8/25 zeigen eine vergleichbare Befähigung, wie dies von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kogler bereits nachgewiesen wurde.

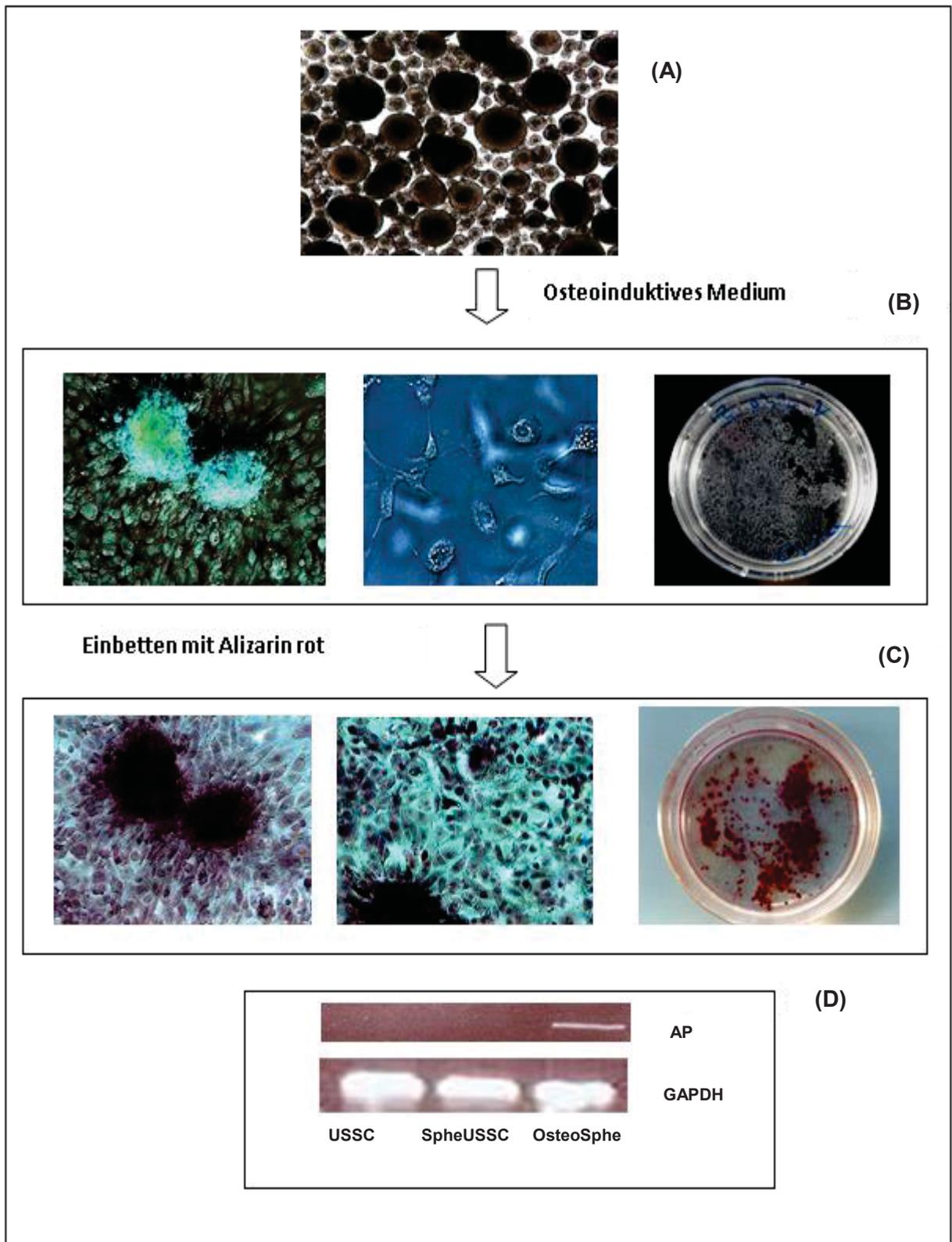


Abb. 3.34: Osteodifferenzierung der SpheUSSC. SpheUSSC (A) wurden in Osteodifferenzierungsmedium kultiviert. Nach einer Woche konnten mineralisierte Strukturen mikroskopisch und makroskopisch beobachtet werden (B). Dies wurde mittels der Alizarin-Rot-Färbung bestätigt (C). Nur in den differenzierten Zellen konnte die alkalische Phosphatase (AP) nachgewiesen werden. In den Ausgangszellen USSC 8/25 sowie den SpheUSSC war die AP nicht zu detektieren (D).

3.10.3 Chondrodifferenzierung

Die meisten Stammzellen, die sich zu Osteoblasten differenzieren lassen, sind auch in der Lage sich zu Chondrozyten zu differenzieren (Kögler et al., 2004; Kluth et al., 2010). Es ist bereits beschrieben, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut sowie die USSC in der Lage sind Chondrozyten zu bilden (Kögler et al., 2004). Aufgrund dieser Kenntnisse und der Tatsache, dass die SpheUSSC effizient zu Osteoblasten differenzieren, erschien es sinnvoll die Befähigung der SpheUSSC zur Chondrodifferenzierung zu untersuchen. Für die chondrogene Differenzierung wurden SpheUSSC-Sphären in TGF- β -haltigem, chondrogenen Induktionsmedium kultiviert. Die SpheUSSC werden nach zwei Tage adhären und wiesen morphologische Veränderungen auf. Ähnlich wie bei der Osteodifferenzierung verlieren die Sphären relativ schnell das kolonieartige Wachstum. Schon nach ca. drei Tagen migrieren die meisten Zellen aus dem Zellagglomerat und bilden eine langgestreckte Struktur. Mit Fortsetzung der Kultivierung sind runde bis ovale Zellen immer häufiger zu sehen. Diese Strukturen erinnern stark an die Chondrozyten-spezifische Glykosaminglykane (GAG)-Bildung (Abb. 3.35). Um die Synthese der GAG zu prüfen, wurden die Zellen mit Alcianblau gefärbt (Bjornsson et al., 1993). Die im Laufe der Differenzierung immer stärker werdende, positive histochemische Färbung bestätigte die Bildung einer für Chondrozyten typischen sauren sulfatreichen Proteoglycan-Matrix (Abb. 3.35). In mehreren Experimenten konnte wiederholt nachgewiesen werden, dass die Differenzierung der SpheUSSC zu Chondrozyten reproduzierbar und effizient ist. Es ließ sich feststellen, dass ca. 80 % der SpheUSSC-Zellen nach der Differenzierung positiv für die *AlcianBlue*-Färbung ist. Die aus den Chondrozyten subkultivierten Zellen lassen sich bereits nach sieben Tagen nicht mehr vermehren. Dies bedeutet, dass die Zellen bereits nach ca. einer Woche enddifferenziert sind.

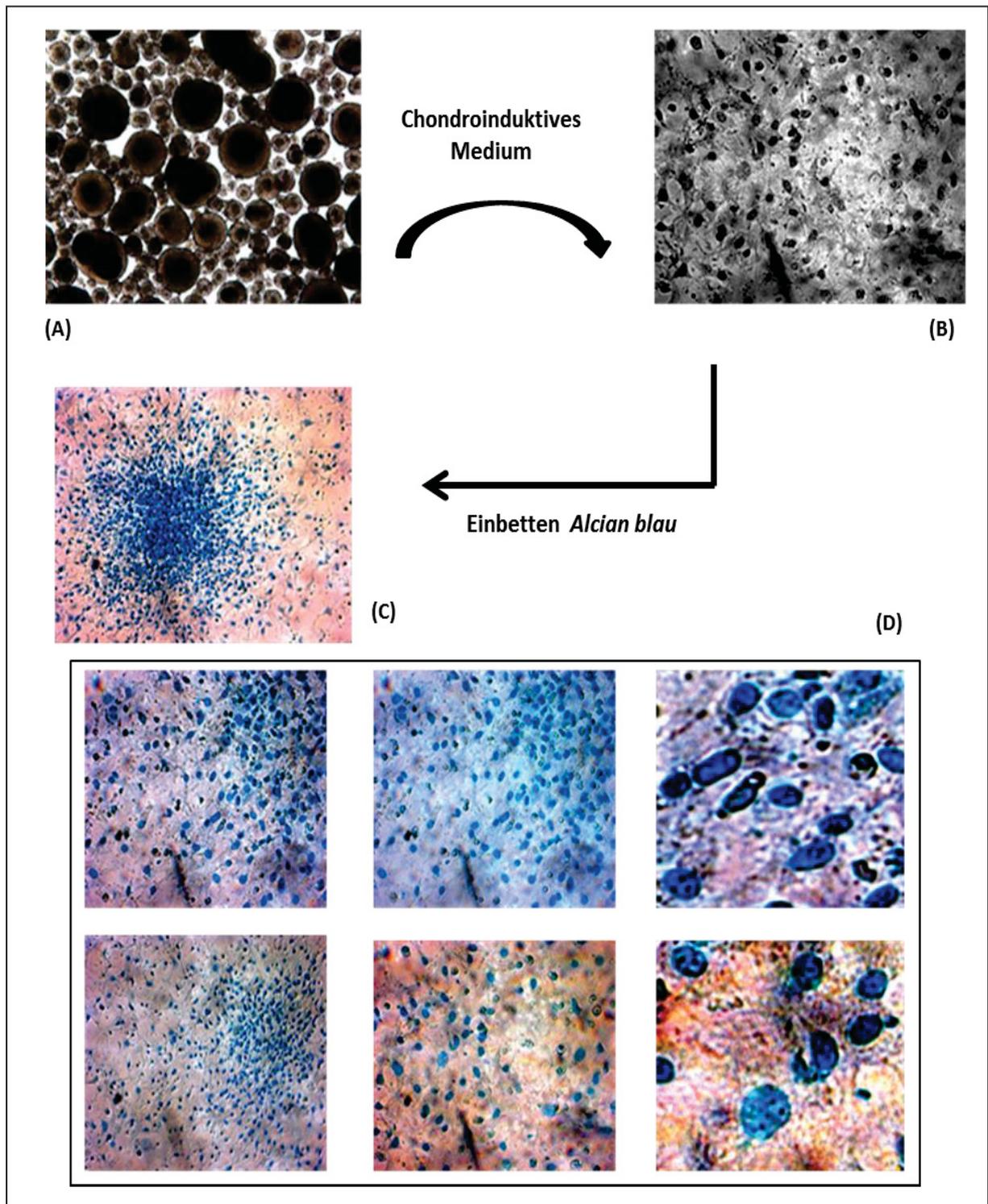


Abb. 3.35: Differenzierung der SpheUSSC-Zellen (A) zu Chondrozyten. SpheUSSC wurden in Chondrocyten-induzierendes Medium kultiviert. Nach ca. einer Woche waren morphologische Veränderungen der Zellen zu sehen (B). Mithilfe einer Alcian-Blau-Färbung konnten zahlreiche GAG-Bildungslozi nachgewiesen werden. Sowohl in den Kolonien (C) als auch in den vereinzelt Zellen (D) konnte die GAG-Synthese detektiert werden.

3.10.4 Neurodifferenzierung

Die USSC lassen sich in einem speziellen Retinsäure-haltigen Differenzierungsmedium (XXL-Medium) zu Neuronen differenzieren (Greschat et al., 2008). In diesen Experimenten waren neuronal spezifische, morphologische Modifikationen innerhalb der ersten Woche der Differenzierung zu sehen. So wiesen die differenzierten USSC eine ähnliche Morphologie wie Neuronen auf. Darüber hinaus konnten neuronale Marker nachgewiesen werden.

Um das Potential der Neurodifferenzierung der SpheUSSC zu evaluieren, wurden sie in einem spezifischen Medium, welches neuronale Stimulatoren enthält, kultiviert (Abb. 3.36). Hierfür wurden sowohl SpheUSSC Zellen (Abb. 3.36I) als auch vereinzelt SpheUSSC (Abb. 3.36II) Zellen eingesetzt. Durch Inkubation der SpheUSSC mit neuronalem Medium konnte bereits nach dem ersten Tag eine drastische morphologische Veränderung beobachtet werden. Die SpheUSSC verlassen schon nach ca. vier Stunden ihre klassische Morphologie und bilden am Rand spindelförmige Strukturen, welche innerhalb der folgenden Tage weiter wachsen. Im Laufe der Kultivierung wachsen die SpheUSSC bidimensional und bilden am Rande deutliche, oft langgestreckte Ausläufer. Die vereinzelt Zellen können schneller lange Ausläufer bilden und weisen deutlich eine Morphologie auf, die an Neuronen erinnert (Abb. 3.36).

Nach ca. einer Woche ändern die differenzierten Zellen ihre Morphologie nicht mehr. Ab der zweiten Woche stirbt ein kleiner Teil der Zellen und löst sich vom Boden ab. Wichtig zu beobachten ist, dass sich die Zellen im Differenzierungsmedium nicht mehr teilen. Die Expansion ist somit gestoppt. Um die Effizienz der neuronalen Differenzierung näher zu untersuchen, wurden die differenzierten Zellen anhand spezifischer Marker für eine neuronale Differenzierung angefärbt.

Zu den bekannten Markern, welche in Zellen des Nervensystems exprimiert werden, gelten die S-100 Proteine. S-100 Proteine sind reichlich in Gliazellen (Song und Zimmer, 1995) sowie in Neuronen gefunden worden (Yamashita et al. 1999). Die histochemische Färbung zeigte, dass ein großer Anteil, etwa 70 Prozent der differenzierten Zellen, die auch die neuronale Morphologie aufwiesen, für das S-100-Protein positiv waren (Abb. 3.36).

Die Morphologie eines wesentlichen Anteils der differenzierten Zellen erinnerte an die Struktur von Astrozyten. GFAP, gliales, saures, fibrilläres Protein, ist die überwiegende Komponente der Astrozyten und wird häufig als Marker für die Astrozyten verwendet

(Landry et al., 1990). Die Histochemie zeigte, dass ein geringer Teil, ca. 25% der differenzierten Zellen, positiv für GFAP waren.

Bei wiederholten Differenzierungen von groben und vereinzelt Sphären konnten die schon dargestellten Differenzierungsmerkmale wieder beobachtet werden. Eine Fortsetzung der Kultivierung von den differenzierten Zellen war nicht möglich. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen rasch unter den Differenzierungsbedingungen die Teilungsfähigkeit verlieren und somit ein Enddifferenzierungsstadium erreicht haben.

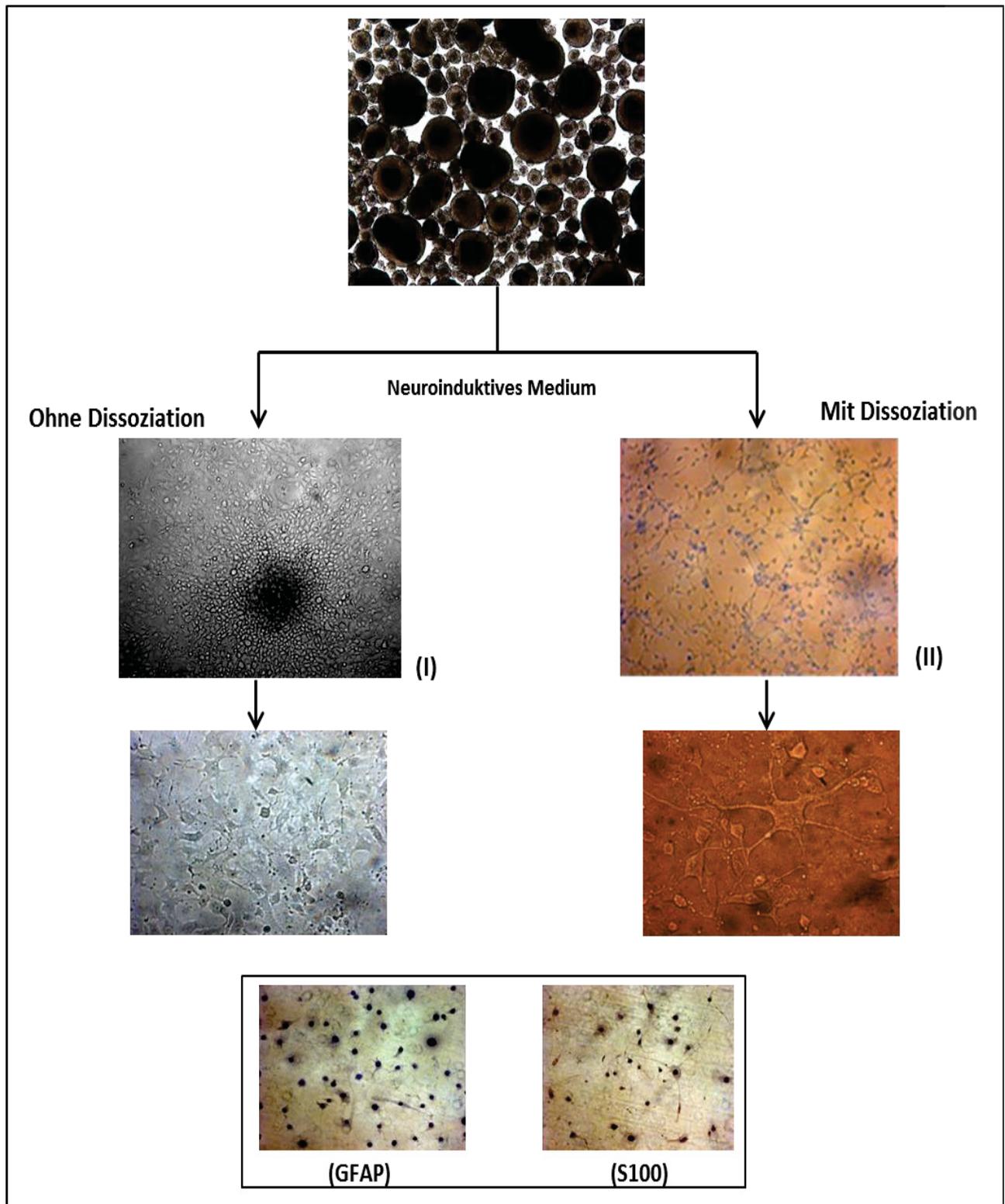


Abb. 3.36: Neuronale Differenzierung der SpheUSSC. Die Sphären können in dem für eine neuronale Differenzierung spezifischen Medium, welches die Wachstumsfaktoren „epidermal growth factor“ und „fibroblast growth factor-2“ enthält, zur Differenzierung kommen. Sowohl in der Sphären-Form (I) oder vereinzelt (II) übernehmen die SpheUSSC sehr rasch, nach ca. einem Tag, eine Morphologie, die an Zellen des Nervensystems erinnert. Bei den differenzierten Zellen konnte GFAP und S-100-Protein detektiert werden.

3.10.5 Kardiomyozyten-Differenzierung

Es wurde bereits gezeigt, dass bestimmte Zelllinien von USSC die Fähigkeit besitzen, sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren (Kögler et al., 2004). In einer jüngsten Arbeit von Ding und Kollegen wurde ebenfalls gezeigt, dass die USSC unter spezifischen Differenzierungsbedingungen sich *in vitro* innerhalb von einer Woche zu Kardiomyozyten differenzieren können (Ding et al., 2013). Allerdings liegen keine Arbeiten über die Funktion dieser differenzierten Kardiomyozyten vor. Auf der anderen Seite existieren Studien, die belegen, dass eine Behandlung von mesenchymalen Stammzellen mit der epigenetisch wirkenden Substanz 5-Azacytidine zu einer effizienten Differenzierung von Kardiomyozyten führt (Makino et al., 1999; Wakitani et al., 1995). Vor dem Hintergrund dieser Arbeiten und der epigenetischen Behandlung der USSC ließ sich die Frage stellen, ob das Kardiomyozyten -Differenzierungspotential der SpheUSSC sich durch die epigenetische Behandlung geändert bzw. erweitert hat.

Um das Potential der SpheUSSC zur Kardiomyozyten-Differenzierung zu evaluieren, wurde das Co-Kultur-System mit *neonatalen rat Cardiomyocyten* angesetzt. Die *neonatalen rat Cardiomyocyten* wurden isoliert aus dem neugeborenen Wistar rats (Passage 0-Passage 3). Diese Zellen wurden vorher kultiviert, bis dass sie adhärent geworden sind. Um die SpheUSSC bzw. die daraus resultierende differenzierte Zellen identifizieren zu können, wurden sie vorher stabil mit EGFP lentiviral transduziert. Hierfür wurde das Plasmid CL2.THPC, das das Reportergen EGFP enthält, verwendet. Dieses Plasmid enthält ein „*nuclearlocalization*“-Signal vor dem Reportergen. Nach der Transfektion erhält man somit Zellen mit vorwiegend grün leuchtenden Kernen (Abb. 3.37). SpheUSSC wurden gewaschen in Kulturmedium aufgenommen und auf die bereits adhärent wachsenden neotalen Cardiomyocyten in einem Verhältnis 1:1 kultiviert. Die SpheUSSC waren bereits nach einem Tag der Co-Kultur adhärent. Spindelförmige Strukturen am Rande der SpheUSSC waren an dem zweiten Tag zu beobachten. Die Migration setzte sich fort bis zum siebten Tag. Nach einer Woche war keine Migration zu beobachten. Wichtig zu beobachten war, dass die SpheUSSC schon am zweiten Tag in Co-Kultur spontane Kontraktionsbewegungen aufwiesen. In der Kultur-Petrischale waren unter dem mikroskopischen Monitoring ca. 10% der Kolonien in der Lage sich zu kontrahieren (Video.1). Während der ersten Woche der Co-Kultur waren nur vereinzelte gestreckte Zellen in der Lage sich zu kontrahieren. Nach einer Woche konnte unter dem

mikroskopischen Monitoring die synchrone Kontraktion der gesamten Zellpopulationen beobachtet werden (Video.2).

Um die Spezifität der morphologischen sowie mechanischen Veränderungen zu prüfen, wurden die differenzierten Zellen zusätzlich auf bekannte, spezifische Marker für die Kardiomyozyten getestet. Nach drei Tagen der Co-Kultur wurde eine signifikante Anzahl an eGFP-positiven, differenzierten Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen den Cardio-Marker, *cardiac troponin T* (cTnT), inkubiert (Farah et al., 1995). Bei ca. 30% der Zellen konnte eine spezifische Färbung detektiert werden, die in den EGFP-positiven, differenzierten SpheUSSC lokalisiert war. Diese Ergebnisse zeigen, dass die SpheUSSC sich effizient und rasch in dem Co-Kultur-System zu Kardiomyozyten differenzieren lassen.

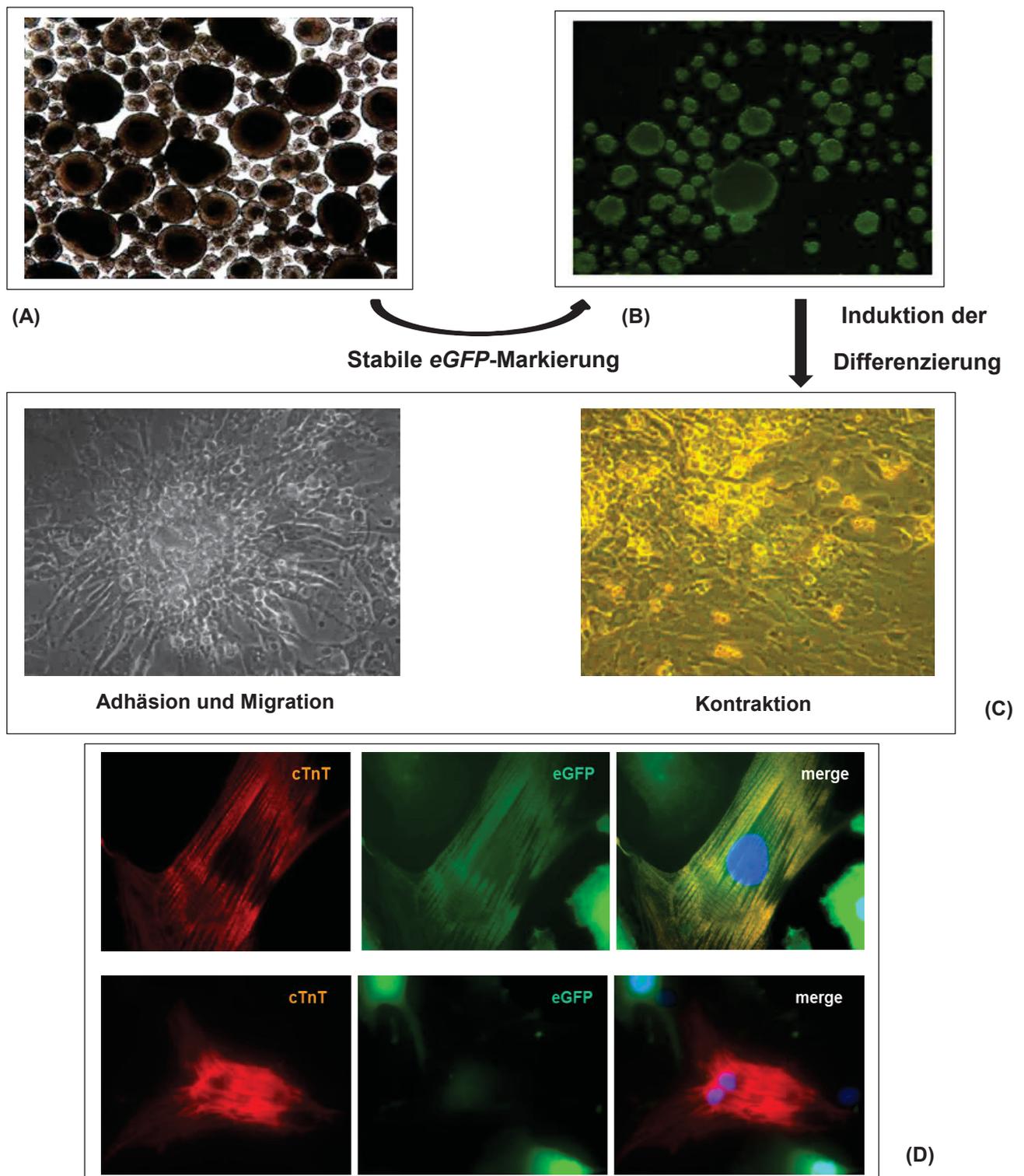


Abb. 3.37: Kardiomyozyten-Differenzierung der SpheUSSC. SpheUSSC (A) wurden stabil mit EGFP lentiviral transduziert (B). Nach zwei Tagen der Co-Kultur mit rat neonatal cardiomyocytes wurden eGFP-positive SpheUSSC adhären und konnten einzeln kontrahieren (C). Nach sieben Tagen der Fortsetzung der Differenzierung waren die SpheUSSC vollständig adhären und bildeten Agglomerate von Zellen, die synchron kontrahieren. Nach sieben Tagen der Fortsetzung der Differenzierung wurden eGFP-positiven SpheUSSC mit einem spezifischen Antikörper gegen cTnT inkubiert. CTNT konnte bei differenzierten SpheUSSC detektiert werden (D).

Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurden die durchgeführten Versuche zur Evaluierung des Differenzierungspotentials der SpheUSSC dargestellt. Die Experimente konnten zeigen, dass die SpheUSSC im Vergleich zur der Ausgangspopulation nicht nur ihr Differenzierungspotential erhalten haben, sondern es auch nachweislich erweitert haben. Im Fall der Differenzierung der SpheUSSC zu den Adipozyten war dies deutlich. Fast alle SpheUSSC ließen sich spontan innerhalb von maximal zwei Wochen homogen zu Adipozyten differenzieren.

Die Chondro- und Osteodifferenzierung der SpheUSSC war ebenfalls reproduzierbar und effizient. Eine Mineralisierung der Zellen war im Fall der Osteodifferenzierung bereits nach ca. einer Woche makroskopisch zu sehen.

Bei der neuronalen Differenzierung zeigten die SpheUSSC eine auffällige rasche neuronalartige Veränderung während des ersten Tags der Differenzierung. Diese neuronalartige Veränderung konnte histochemisch mittels der beiden Marker S100 und GFAP bestätigt werden.

Die SpheUSSC ließen sich ebenfalls mittels der Co-Kultur mit den *rat neonatalen Cardiomyocyten* rasch zu kontrahierenden Cardiomyocyten differenzieren. Eine immunhistochemische Evaluierung mittels cTNT bestätigte die Kardiomyozyten-Natur der differenzierten Zellen.

Bei allen Differenzierungen wurden die Versuche mehrmals wiederholt. Dies erfolgte mit Zellen aus verschiedenen Passagen und ebenfalls aus kryo-gefrorenen Zellen. Grobe und vereinzelte Sphären wurden in jedem Fall parallel differenziert. Bei allen diesen Experimenten konnten die in diesem Abschnitt „Evaluierung des Differenzierungspotentials der SpheUSSC-Zellen“ dargelegten Differenzierungsmerkmale wieder reproduziert werden. Eine Subkultivierung von den differenzierten Zellen war bei allen Differenzierungen, so den Adipozyten, Osteoblasten, Chondrozyten, Nervenzellen und Cardiomyzten nicht möglich. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen rasch unter Differenzierungsbedingungen die Teilungsfähigkeit verlieren und somit ein Enddifferenzierungsstadium erreichen.

- *Diskussion*

4. Diskussion

4.1 Vorversuche zur Behandlung der USSC-Zellen mit den epigenetischen Substanzen 5-Aza-dC und TSA

Immer mehr Studien unterstreichen, dass die Differenzierungspotenz von Stammzellen einer epigenetischen Regulation unterliegt (Watanabe et al., 2013; Meissner et al., 2010). So erfolgt beispielsweise während der Reprogrammierung eine Demethylierung der 5'-regulatorischen Region des *OCT4*-Gens, was mit seiner Aktivierung korreliert (Yamanaka et al., 2007). Diese Kenntnisse führten zu der Hypothese, dass eventuell eine Aufhebung der Methylierung begleitend von einer Histon-Acetylierung zu einer Erweiterung des Differenzierungspotentials der USSC beitragen könnte. Da eine lokale Demethylierung einer DNA-Region technisch noch nicht möglich ist, stellte die genomweite Demethylierung mittels 5-Aza-dC die Methode der Wahl dar. Zusätzlich kann eine genomweite Acetylierung der Histone durch TSA erzielt werden. Dieses Antibiotikum hemmt Histondeacetylasen und führt zu einer Aktivierung des Chromatins (Yoshida et al., 1990). Die Behandlung der USSC Zellen mit 5-Aza-dC oder TSA führte zur keiner messbaren Beeinflussung der Transkription der DNMT1. Die Behandlung mit den beiden Agenzien simultan, führte hingegen zur einer messbaren Inhibition der DNMT1-Transkription. Es ist bekannt, dass das humane DNMT1-Gen selbst einer epigenetischen Regulation unterliegt (Bigey et al., 2000). Andere Studien belegen, dass 5-Aza-dC auch in der Lage ist indirekt zur einer Degradation der DNMT1 zu führen (Ghoshal et al., 2005). Die Degradation erfolgt allerdings posttranslational, sodass es keinen Effekt auf die Transkription gibt. Darüber hinaus ist es bekannt, dass 5-Aza-dC und TSA, synergistisch, eher eine aktivierende Funktion auf Genpromotoren haben (Ghoshal et al., 2002). Es ist möglich, dass im Fall der behandelten USSC die epigenetischen Agenzien eine indirekte, reprimierende Wirkung auf die Transkription des *DNMT1*-Gens induziert haben. So kann an dieser Stelle spekuliert werden, dass die epigenetische Behandlung zur Aktivierung eines DNMT1-Suppressorfaktors geführt haben könnte oder dass die lokal wirkende DNA-Demethylierung und Histonacetylierung an dem DNMT1-Genlocus für die Inhibition der Transkription dieses Gens verantwortlich sein könnte.

Darüber hinaus ist es bekannt dass in pluripotenten embryonalen Stammzellen DNMT1 und andere DNMTs nicht erforderlich sind um die Differenzierung zu unterdrücken und die Pluripotenz aufrechtzuhalten (Fouse et al., 2008). Die Tatsache dass DNMT1 nach der epigenetischen Behandlung reduziert wird, stützt die Annahme, dass diese Behandlung zur

Dedifferenzierung der USSC Zellen geführt haben könnte. Diese Reduktion kann eine globale sowie fokale Hypomethylierung in den USSC Zellen zu Folge haben. Die Erweiterung des Differenzierungspotentials bzw. die Induktion des Masterregulators OCT4 nach fortgesetzter epigenetischer Behandlung geht mit dieser Annahme einher.

4.2 Die Behandlung der USSC mit 5-Aza-dC und TSA führt zu gravierenden morphologischen Veränderungen

Die Behandlung der USSC-Zellen mit 5-Aza-dC und TSA, bzw. die hierbei induzierte DNA-Demethylierung und Histon-Acetylierung, hat zu gravierenden Veränderungen des Phänotyps der USSC geführt. Bereits seit den 1970er-Jahren ist bekannt, dass eine Behandlung mit 5-Aza-dC eine Auswirkung auf den Phänotyp differenzierter Zellen haben kann (Taylor und Jones, 1979). So konnten aus Mauszellen 3T3 nach Behandlung mit 5-azacytidine oder 5-aza-2'-deoxycytidine neue Phänotypen entstehen: kontraktionsfähige Muskelzellen, Adipozyten und Chondrozyten.

Spätere Arbeiten haben des Weiteren gezeigt, dass 5-Aza-dC auch in humanen Zellen neue Phänotypen hervorbringen kann (Smith und McCulloch, 1984). Es ist ebenfalls bekannt, dass TSA in der Lage ist morphologische Veränderungen in behandelten Zellen zu verursachen. Dies ist beispielsweise bei den mit TSA behandelten NIH3T3 beobachtet worden (Sugita et al, 1992). Im Fall unseres adulten Stammzellmodells USSC, führte allerdings die Behandlung mit 5-Aza-dC oder mit TSA zur keiner Veränderung der Zellmorphologie. Nur die simultane Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA zusammen bewirkt eine Änderung des Phänotyps der Zellen. Die Entstehung von kolonieartigen Zellaggregationen ist hierbei ein Merkmal von eher undifferenzierten Zellen. Dies würde bedeuten, dass diese epigenetische Behandlung möglicherweise den Differenzierungsstatus verändert hat. Es ist bereits gezeigt, dass die beiden Agenzien zusammen verwendet, einen positiven Effekt auf die Reprogrammierung mehrere Zelltypen besitzen (Ding et al., 2008). So konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung von geklonten Rinderembryonen mittels 5-Aza-dC und TSA verbessert wird (Ding et al., 2008).

Der in dieser Arbeit beschriebene Effekt auf die zelluläre Morphologie durch die synergistische Wirkung beider Agenzien deutet darauf hin, dass hierzu sowohl eine genomische Demethylierung als auch eine genomweit wirkende Histon-Acetylierung erforderlich sind. Eine sich aufdrängende Frage war hierbei, ob nicht einzelne Pluripotenzgene hierbei eine zentrale Bedeutung haben.

Die Expression von Yamanakas Pluripotenzfaktoren in differenzierten Zellen beispielsweise führt zu einem zellulären Reprogrammierungsprozess mit einer grundlegenden epigenetischen Komponente (Koche et al., 2011). So ist eine frühe epigenetische Veränderung die in den Prä-IPS-Zellen nachweisbar ist, die Demethylierung der DNA in den Pluripotenzgenen (Mikkelsen et al., 2008). Hierbei ist eine weiterführende Frage, ob die DNA-Demethylierung vor einer Änderung der Histonmodifikationssignatur in den Pluripotenzgenen auftritt.

4.3 Molekularbiologische Charakterisierung der SpheUSSC

Die epigenetische Reprogrammierung von differenzierten Zellen ist vor allem mit einer DNA-Demethylierung der 5'-regulatorischen Bereiche von Pluripotenzgenen assoziiert (Koche et al., 2011). Hierbei ist ein demethylierter Promoter der Pluripotenzgene *OCT4* und *NANOG* mit ihrer Transkription einhergehend (Mali et al., 2010). In mehreren Arbeiten über die Reprogrammierung von differenzierten Zellen unter Verwendung verschiedener Transkriptionsfaktorkombinationen wurde nachgewiesen, dass eine Demethylierung und Aktivierung des endogenen *OCT4*-Genpromotors mit der ektopischen *OCT4*-Expression einhergeht (Yamanaka et al., 2008). In den nativen USSC konnte kein stammzellspezifisches *OCT4A* detektiert werden (Liedtke et al., 2007). In dieser Arbeit bewirkte jedoch die epigenetische Behandlung der USSC mit 5-Aza-dC und TSA eine Induktion der *OCT4*-Transkription. Es wurde bereits in einer vorausgegangenen Arbeit gezeigt, dass in diesen somatischen Stammzellen ein eigentümliches, bivalentes epigenetisches Muster vorliegt. So ist beispielsweise das Vorliegen einer partiellen Methylierung des *OCT4*-Genpromotors in den USSC nachgewiesen worden (Santourlidis et al., 2010). Die mittels 5-Aza-dC induzierte Demethylierung könnte somit ggf. die Transkription in diesen USSC-Zellen reaktivieren. Die Demethylierung und eine damit assoziierte Reaktivierung von epigenetisch stillgelegten Genen nach einer erfolgten Behandlung mit 5-Aza-dC konnte bisher in verschiedenen *in vitro* Zellmodellen nachgewiesen werden (Stresemann et al., 2006). Die Transkription von *OCT4* in den SpheUSSC Zellen ist zwar höher als in den Ausgangszellen, bleibt allerdings viel schwächer als in den mit den Yamanaka-Faktoren reprogrammierten iPS-USSC. Hingegen zeigt die Analyse der *OCT4*-Expression der SpheUSSC mittels des Western-Blots eine ähnliche Stärke wie die der iPS-USSC. Es ist nun bekannt, dass das humane *OCT4*-Gen drei Transkript-Isoformen (*OCT4A*, *OCT4B*, *OCT4B1*) aufweist, die durch alternatives Spleißen des Gens *OCT4* hervorgehen.

Die drei unterschiedlichen Isoformen des Transkripts kodieren für vier verschiedene Protein-Isoformen (OCT4A-360, OCT4B-265, OCT4B-190 und OCT4B-164). Alle OCT4-Isoformen enthalten denselben C-Terminus, unterscheiden sich allerdings durch die Länge des N-Terminus. Bei dem ersten eingesetzten Antikörper, ab 49091, handelt es sich um einen OCT4A N-Terminalen Antikörper (Abb. 4.1). Dieser Antikörper erkennt die Peptidregion, Aminosäure 114 bis 163, des N-Terminus. Diese Region erstreckt sich ebenfalls in die POU-Domäne. Daher können darin mindestens zwei verschiedene OCT4-Isoformen, eine 39- und eine 35 kDa-Isoform binden, die anhand ihrer unterschiedlichen Größen im Western-Blot unter Umständen nicht immer eindeutig zu unterscheiden sind (Abb. 4.1). Hingegen erkennt der zweite Antikörper sc5279 eine bindende OCT4-Peptidregion, AS 1-134, die ausschließlich im N-Terminus der OCT4A-Variante enthalten ist. Er hat also keine *Cross*-Reaktivität zu OCT4B. Dieser Antikörper generiert in der Western-Blot-Analyse der ESC-H9-Zellen eine deutliche Bande mit der erwarteten Größe für OCT4A von 45 kDa. Die Bande ist ebenfalls im Fall der SpheUSSC nachgewiesen. Auffällig bei dem Vergleich der beiden Ergebnisse unter Verwendung der beiden beschriebenen Antikörper ist die Stärke der Banden. So ist die für OCT4 detektierte Bande, mittels des Antikörpers ab 49091, in den SpheUSSC stärker als in den ESC-H9 Zellen. Mittels des zweiten Antikörpers, sc5279, ist die Bande in den ESC-H9 Zellen deutlich stärker als in den SpheUSSC. Die USSC liefern nahezu kein Signal. Dieser Unterschied kann dadurch erklärt werden, dass der erste Antikörper, der mindestens zwei Isoformen aufgrund seiner bindenden Region erkennen kann, im Fall der SpheUSSC nicht nur die Isoform A gebunden hat, sondern auch eine der kleineren Isoformen B. Das starke Signal kann auch dadurch erklärt werden, dass womöglich OCT4-Heterodimere im Western-blot gebunden haben. Diese Vermutung lässt sich dadurch untermauern, dass der Antikörper sc5279, mit Spezifität für OCT4A, in den SpheUSSC ein deutlich schwächeres Signal als in den ESC-H9 liefert. Diese Ergebnisse liefern Evidenz dafür, dass in den SpheUSSC möglicherweise zwei Isoformen induziert worden sind. Welche Isoform von OCT4 in den SpheUSSC allerdings überwiegt, lässt sich anhand der gewonnenen Ergebnisse nicht ableiten.

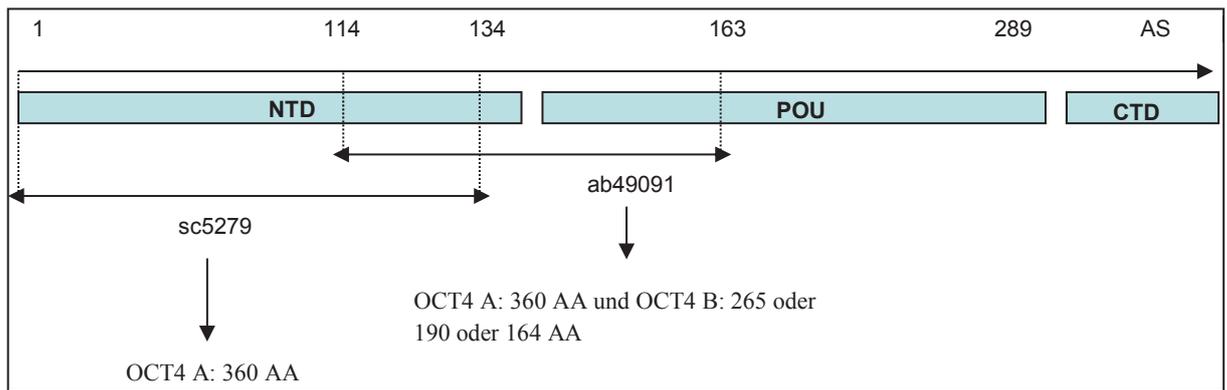


Abb. 4.1: Analyse der verwendeten OCT4-Antikörper und deren Epitope. Es wurden zwei verschiedene Antikörper für den Nachweis von OCT4 eingesetzt. Der erste verwendete Antikörper, ab 49091, erkennt die bindende Region 114 bis 163. Der zweite Antikörper sc5279 erkennt die Region 1 bis 134. Abhängig von dem Epitop können verschiedene Isoformen von OCT4 nachgewiesen werden. Während der sc5279 die große Isoform 360 AA bindet, kann der Antikörper ab 49091 verschiedene Formen binden.

Mehrere Arbeiten zeigen, dass ausschließlich die hochkonservierte Isoform A für die Aufrechterhaltung und Induktion der Pluripotenz notwendig ist (Shi et al., 2010). Wenig ist bekannt über die Funktion von OCT4B. Allerdings wird vermutet, dass die Expression von OCT4B mit Stress korreliert ist (Wang et al., 2009). Eine Rolle gegen Apoptosis wird ebenfalls der OCT4 B-Isoform zugesprochen (Wang et al., 2009). Aufgrund der epigenetischen Behandlung der USSC mit 5-Aza-dC und TSA und der damit einhergehenden Toxizität, könnte die Expression von OCT4B als Stress- bzw. Antiapoptose-Antwort in den SpheUSSC Zellen induziert worden sein.

Die Induktion von OCT4 in den SpheUSSC Zellen setzt voraus, dass die Methylierung des regulatorischen Bereiches aufgehoben wird, wenn eine Transkription von OCT4 mit einem unmethylierten Status seines Promotors korreliert ist (Kimura et al., 2004). Die Bisulfidsequenzierung des Promoters zeigt in den SpheUSSC ein einheitliches Methylierungsmuster in allen sequenzierten Klonen. Hingegen weisen die Ausgangszellen USSC 8/25 eine heterogene Methylierung auf, wie sie bereits beschrieben ist (Santourlidis et al., 2011). Der Methylierungsgrad der Ausgangszellen USSC und der SpheUSSC ist vergleichbar (43 % bzw. 52 %). Allerdings liegt der Hauptunterschied in der Verteilung der Methylierung. So sind alle sequenzierten Klone der SpheUSSC hinsichtlich des Methylierungsmusters sehr ähnlich, während sie sehr variabel in den USSC sind. Dies lässt vermuten, dass die analysierten SpheUSSC aus einer bestimmten Anzahl von behandelten USSC durch Selektion entstanden sind.

Darüber hinaus ist es bekannt, dass die DNA-Methylierung während der DNA-Replikation beibehalten werden kann (Bestor et al., 1988). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine Subpopulation von den behandelten USSC einen epigenetischen Status erreicht hat, der zu morphologischen Veränderungen geführt hat. Da die SpheUSSC aus den gepickten Kolonien entstanden und expandiert worden sind, ist dieses Ergebnis nachvollziehbar. Es ist hier anzunehmen, dass die epigenetische Behandlung der USSC zur einer Reprogrammierung des OCT4-Promoters geführt hat. Dieser Status blieb nachweislich im Lauf der Fortsetzung der Kultivierung der SpheUSSC stabil. Allerdings bleibt diese Demethylierung immer noch unvollständig. Diese partielle Reprogrammierung kann auch eine Erklärung für die gemessenen Unterschiede der Transkriptionsstärke zwischen den SpheUSSC und die komplett rerprogrammierten iPS-USSC sein. Hingegen weisen die proximalen und distalen Enhancer von OCT4 in den SpheUSSC Zellen ein heterogenes Methylierungsmuster auf. Darüber hinaus war eine Zunahme der Methylierung an den Enhancer in den SpheUSSC Zellen zu messen. Diese Zunahme der Methylierung deutet darauf hin, dass bestimmte Zellen während der Kultivierung der SpheUSSC einer *de novo*-Methylierung unterlagen. Es ist bekannt dass undifferenzierte embryonale Stammzellen eine erhöhte *de novo* DNA-Methylierung besitzen (Stewart et al., 1982; Lei et al., 1996). Im Hinblick auf die reduzierte Transkription des *DNMT1*-Gens in USSC Zellen nach der epigenetischen Behandlung, lässt sich vermuten dass die ermittelte, erworbene Methylierung auf die Aktivität der *de novo* Methyltransferasen zurückzuführen ist.

Diese Heterogenität der Methylierung an den Enhancer geht mit einer erworbenen Diversität des Phänotyps einher. Es ist bereits bekannt, dass proximale und distale Enhancer alternierend die zellspezifische Expression von OCT4 steuern (Yeom et al., 1996; Yoshimizu et al., 1999). Diese bivalente Konformation der Enhancer-Methylierung könnte somit dazu beitragen, dass die SpheUSSC unter definierten Bedingungen zu verschiedenen Zelltypen differenziert werden können.

4.4 Co-Expression der Pluripotenzfaktoren

Neben OCT4, dem Hauptpluripotenzfaktor, spielen SOX2 und NANOG eine zentrale Rolle in der Erhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen (Masui et al., 2007; Feng et al., 2008). Darüber hinaus zeigen Genomanalysen, dass diese Faktoren synergistisch an regulatorischen Bereichen von diversen Genen binden, die eine zentrale Rolle in der Pluripotenzerhaltung oder auch Differenzierung spielen (Boyer et al., 2005). Des Weiteren belegen mehrere Studien, dass

ein selbstregulierendes Netzwerk zwischen Oct4, Sox2 und Nanog in pluripotenten Stammzellen vorhanden ist (Okumura-Nakanishi et al., 2005; Masui et al., 2007). Im Einklang mit diesen Kenntnissen konnten wir in einer vorausgegangenen Arbeit zeigen, dass eine ektopische Expression von OCT4 in USSC zu einer Induktion der *SOX2*-Transkription führt (Santourlidis et al., 2010). Im Fall der epigenetisch generierten SpheUSSC konnte die Expression des OCT4-Proteins nachgewiesen werden.

SOX2- und *NANOG*-Transkripte konnten zwar gemessen werden, jedoch blieb der Nachweis ihrer Proteine aus. Dies bedeutet, dass in den generierten Sphären entweder überhaupt keine Translation der gemessenen Transkripte stattgefunden hat oder, dass die translatierte Menge der Proteine unter dem Detektionslevel der Methode bzw. des Western-Blots lag.

Die epigenetische Behandlung der USSC scheint somit die Aktivierung der beiden Pluripotenzfaktoren *SOX2* und *NANOG* auf der Ebene der Transkription bewirkt zu haben, was ggf. einen ersten Schritt in Richtung einer Erzeugung dieser Pluripotenz-Transkriptionsfaktoren bedeuten könnte. Es ist bekannt, dass die beiden Pluripotenzfaktoren, OCT4 und SOX2, in embryonalen Stammzellen koexprimiert sind (Liu et al., 2007). In anderen Zelltypen können sie jedoch auch einzeln exprimiert sein. So ist beispielsweise SOX2 in neuronalen Stammzellen (NSC) exprimiert, wobei OCT4 hier nicht detektierbar ist (Ellis et al., 2004). Auf der anderen Seite ist es bekannt, dass die SOX2- und OCT4-Faktoren miteinander wechselwirken und synergistisch in verschiedenen Transkriptionswegen wirken können (J. L. Chew et al.; Chew et al. 2005). SOX2 und OCT4 sind beispielsweise in der Lage als Heterodimer nicht nur andere Gene, sondern auch ihre eigene Expression zu regulieren (Tomioka et al., 2002). Der *Sox2-Enhancer* enthält eine *Oct4-Sox2*-Bindestelle, auf der Oct4-Sox2-Heterodimere binden können und somit die *Sox2*-Transkription aktivieren können (Chew et al., 2005). Zu dem Zeitpunkt der Messung der SOX2-Expression in SpheUSSC war die Transkription von OCT4 in den SpheUSSC zwar höher als in den USSC, aber immer noch viel schwächer als in ESC-H9. Darüber hinaus war die Stärke der Expression des Proteins von OCT4-A in SpheUSSC deutlich schwächer als in ESC-H9. Dies könnte bedeuten, dass die exprimierte Menge an OCT4 in den SpheUSSC keinen induktiven Einfluss auf die Expression von SOX2 hat. Dass eine erhöhte OCT4-Expression keinen Einfluss auf SOX2 hat, deutet daraufhin, dass entweder die exprimierte Menge an OCT4 in den SpheUSSC nicht ausreichend ist oder/und, dass andere erforderliche Faktoren für die SOX2-Translation fehlen. Einer oder mehrere dieser Faktoren des Pluripotenznetzwerks, die stark in den

embryonalen Stammzellen exprimiert werden, ist bzw. sind wahrscheinlich in den SpheUSSC Zellen abwesend.

Neben OCT4 und SOX2 gilt NANOG ebenfalls als wesentlicher Transkriptionsfaktor für die Erhaltung der Pluripotenz (Orkin et al., 2008; Pan et al., 2007). Mutagenese Experimente und *in vitro*-Bindungsassays deuten auf eine kooperative Interaktionen zwischen diesen Faktoren hin (Rodda et al., 2005). Durch Chromatin-Immunopräzipitationsassays konnte gezeigt werden, dass die beiden Faktoren OCT4 und SOX2 an den *NANOG*-Promoter binden können. So kann das OCT4/SOX2-Heterodimer die Effizienz der Transkription von *NANOG* verstärken (Rodda et al., 2005). Dass in den SpheUSSC eine Transkription des *NANOG*-Gens gemessen werden konnte, könnte entsprechend dieser Kenntnisse auf eine solche Synergie hinweisen und ebenso auf die Anwesenheit von SOX2-Protein unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Western Blots. Dies erklärt gleichzeitig, dass die Transkription von *NANOG* zwar induziert wurde, aber viel schwächer ist als in den embryonalen Stammzellen. Denn im Gegensatz zu SOX2, welches auch alleine in einer Zelle exprimiert werden kann, wie in neuronalen Stammzellen (Ellis et al., 2004.), ist die Expression von NANOG mit der Expression der beiden andern Pluripotenzfaktoren OCT4 und SOX2 verknüpft (Boyer et al., 2005.). Ein weiterer denkbarer Grund für das fehlende Protein kann ebenfalls auf die Stabilität der Proteine zurückgeführt werden. So sind beispielsweise für NANOG posttranslationale Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierung nötig, um die translatierte Proteine überhaupt stabil zu halten (Moretto-Zita et al., 2010).

Diese Erkenntnisse und die gewonnenen Daten lassen den Schluß zu, dass der induzierte Pluripotenzfaktor OCT4 in den SpheUSSC Zellen in Synergie mit einer noch geringen Menge an SOX2, die allerdings unter der Nachweisgrenze war, die Transkription des *NANOG* Gens in geringen Maßen aktiviert hat.

4.5 Evaluierung des Wachstums und der Proliferation der SpheUSSC

Die SpheUSSC weisen eine gute Kultivierbarkeit und ein robustes Wachstumsverhalten auf. So lassen sie sich stets problemlos passagieren und zeigen hierbei eine sehr geringe Zellsterblichkeit. Darüber hinaus können sie problemlos eingefroren und aufgetaut werden. Die Zellen konnten über mehr als eineinhalb Jahre ohne Unterbrechung kultiviert werden. Die Adipogenese und die Chondrogenese wurden ebenfalls mit SpheUSSC fortgeschrittener Passagen erfolgreich durchgeführt, was auf die Stabilität dieses Zelltyps hinweist. Somit haben die SpheUSSC nicht nur eine erweiterte Differenzierungsfähigkeit,

sondern auch eine erhöhte Teilungsfähigkeit erworben. Hayflick und Moorhead haben bereits 1961 gezeigt dass *in vitro* kultivierte Zellen bzw. Lungenfibroblasten nach ca. 50 „population doublings“ die Fähigkeit zur weiteren Teilung einbüßen (Hayflick and Moorhead, 1961). Hayflick führte dies auf einen Zellzyklusarrest zurück und bezeichnete dies als *replicative senescence* (Hayflick, 1965). Die SpheUSSC überschritten somit, mit >150 begleitete Zellteilungen deutlich diese Hayflick-Grenze. Mittels der Seneszenz-assoziierten-beta-Galaktosidase-Messung konnte dies weiter untermauert werden. Die Tatsache, dass die Sphären auch nach weit über 100 Zellteilungen keine bzw. sehr geringe beta-Galaktosidase-Aktivität aufweisen zeigt, dass sie zu diesem Zeitpunkt der Kultur weiterhin teilungsfähig sind. Entsprechend den Arbeiten von Olovnikov ist die unvollständige Replikation der Chromosomen und somit der Verlust telomerischer DNA dafür verantwortlich, dass die Zellteilung blockiert wird (Olovnikov, 1973). Dieses Erkenntnis wurde später bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass sich die Telomeren von *in vitro* kultivierten humanen Fibroblasten im Lauf der Kultur verkürzen (Harley et al. 1990). Entsprechend dieser Rolle kann die nachgewiesene Verlängerung der Telomeren in den Sphären für deren erhöhte Teilungsfähigkeit mit verantwortlich sein.

Erreichen die Telomeren nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen eine kritische Länge, erreicht ebenfalls die Zelle das *Hayflick limit* und tritt in einen stabilen Zellzyklusarrest bzw. in die „*replicative senescence*“ ein (Harley et al., 1990; Hastie et al., 1990; Lindsey et al., 1991). Eine der Konsequenzen der Seneszenz ist die Repression von Genen, welche die Proliferation der Zelle fördern und die Expression von antiproliferativ wirkenden Genen (Goldstein, 1990; Smith and Pereira-Smith, 1996). Die Regulation dieser Gene lässt sich in eine positive und eine negative Regulation unterteilen (Hipfner and M. Cohen, 2004). Die Methylierungsanalyse bekannter Proliferations-assoziiierter Gene zeigt eine differenzielle Methylierung zwischen USSC und SpheUSSC (Anhang, Fokale Methylierungsanalysen). Von den sechs untersuchten Faktoren, welche die Apoptose positiv regulieren, sind die regulatorischen Regionen von drei Genen (Bax, BCLAF1, CRADD) hypermethyliert in den SpheUSSC Zellen. Diese Zunahme der Methylierung kann womöglich eine Herunterregulation der entsprechenden Expression bewirken. Diese Beobachtungen bzw. eine mögliche Abnahme der Expression von Apoptose-Genen untermauern die bereits gemessene niedrige Seneszenz in den SpheUSSC. Da kurze Telomere, bzw. deren Verkürzungen, Apoptose in der betroffenen Zelle hervorrufen können (Engelhardt et al., 1998), ist diese Beobachtung auf die verlängerten Telomeren zurückzuführen.

Eine Verlängerung der Telomeren könnte durch die Aktivität der Telomerase erfolgt sein. Denn es ist gezeigt, dass die Telomerase in der Lage ist, die nach jeder Zellteilung erfolgte Verkürzung der Telomeren, durch *de novo*-Synthese der Telomerasequenzen an den Enden der Chromosomen zu kompensieren (Morin 1989). Über 80% aller Tumorzellarten und immortalisierte Modelzelllinien besitzen eine Telomeraseaktivität und verlängerte Telomere (Kim et al., 1994; Shay and Wright, 1996). Ebenfalls weisen Keimbahnzellen und embryonale Stammzellen eine Telomeraseaktivität auf. Diese Aktivität wird als eine Voraussetzung für die zelluläre Selbsterneuerung angesehen (Wright et al., 1996; Thomson et al., 1998).

In den SpheUSSC konnte allerdings keine Aktivität bzw. keine Transkription der Telomerase gemessen werden. Diese war zu verschiedenen Zeitpunkten, so frühen (P8) und späten Passagen (P60) stets abwesend. Die SpheUSSC stellen hier keine Ausnahme dar. So besitzt eine große Anzahl von *in vitro*-immortalisierten Zelllinien und auch manche Tumorzellen, so z. B. Nierentumoren lange Telomeren ohne nachweisbare Telomeraseaktivität. Colgin und Reddel begründeten dies damit, dass fast alle Zellen einen „telomere maintenance mechanism“ (TMM) besitzen, welcher entweder die Telomeraseaktivität beinhaltet oder aber einen alternativen Mechanismus darstellen könnte (Colgin und Reddel, 1999). Die Arbeiten von Reddel und seinen Kollegen 1995 wiesen den ALT- (Alternative Lengthening of Telomeres)-Mechanismus in humanen Fibroblasten nach (Bryan et al., 1995).

Da die Verlängerung der Telomeren nicht auf die Aktivität der Telomerase in den SpheUSSC zurückgeführt werden kann, scheint es möglich, dass die SpheUSSC ein Alt-Mechanismus entwickelt haben. Es ist gezeigt, dass ALT-Zellen besonders lange Telomere besitzen. Üblicherweise weisen Telomeren, welche durch ALT synthetisiert worden sind, in der elektrophoretischen Analyse eine Größe zwischen 2 Kb bis 50 Kb, mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 20 kb, auf (Bryan et al., 1995). Diese Größenordnung entspricht der detektierten Größe bei der SpheUSSC mittels der Southern-Blot-Analyse von ca. 20 Kb.

Diese Verlängerung kann wahrscheinlich eine Folge einer homologen Rekombination sein (Liu et al., 2007), die durch einen Verlust von CpG Methylierung in subtelomerischen Regionen erleichtert wird. Somit ist nicht ausgeschlossen dass die epigenetische Behandlung eine Telomeren-Rekombination induziert hat.

Das Vorhandensein einer großen CpG-Insel mit einem dichten CG-reichen Inhalt (Horikawa et al., 1999) legt nahe, dass die DNA-Methylierung eventuell eine Rolle bei der Regulierung der *hTERT*-Expression spielen kann.

Die Methylierungsanalyse der regulatorischen Region von *hTERT* in den SpheUSSC zeigt eine relativ erhöhte Methylierung im Promotorbereich im Vergleich zu der nativen USSC (Abb. 4.2). Eine Korrelation zwischen der Methylierung des Promotorbereiches von *hTERT* und der Telomerase-Expression wurde bereits in verschiedene Zelltypen gezeigt (Devereux et al., 1999). Es ist auch möglich, dass die Zellen bzw. die SpheUSSC mit der erhöhten Methylierung des Promotorbereiches von *hTERT* einen anderen Regulationsmechanismus der Telomeren-Verlängerung erworben haben, sodass eine Transkription bzw. Expression von *hTERT* nicht erforderlich wird.

In diesem Kontext lässt unsere Beobachtung den Schluss zu, dass die SpheUSSC einem ALT-Mechanismus unterliegen, der durch die Behandlung mit den epigenetischen Substanzen hervorgerufen worden ist und dazu führt, dass die Zellen lange Telomeren erwerben und immortal werden. Somit könnte die in dieser Arbeit vorgestellte SpheUSSC-Generierung ein neues Zellsystem zur Erforschung der epigenetischen Komponente des ALT-Mechanismus darstellen, der ansonsten experimentell unzugänglich ist, zumal er in dem frühen 2-4-Zellstadium stattfindet (Liu et al., 2007), für das keine Zellmodelle existieren.

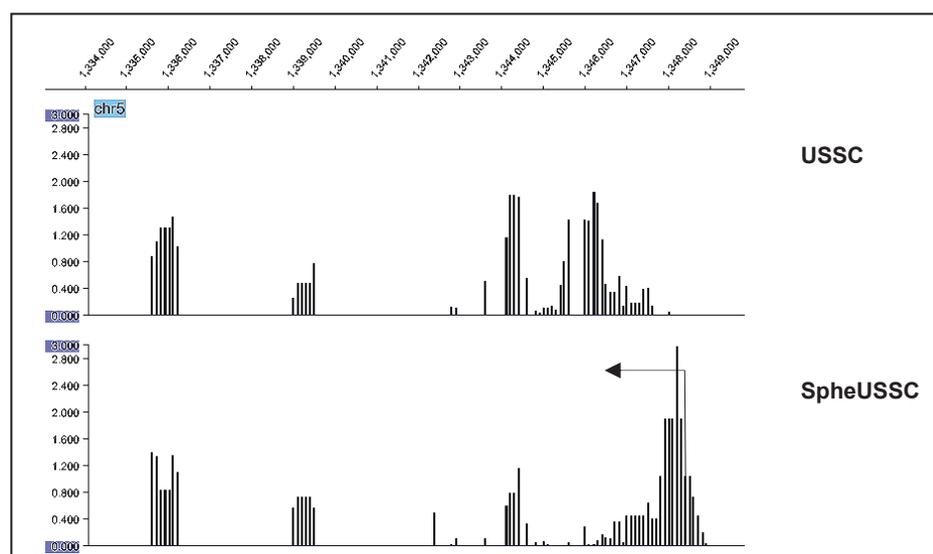


Abb. 4.2: Darstellung des Methylierungsstatus in 5'-Region von *hTERT*. Dargestellt ist der Methylierungsstatus in USSC vor der Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA und in generierten Sphären. Je höher die Balken sind, desto stärker ist die Methylierung. Der Pfeil zeigt den Transkriptionsstart an.

4.6 Evaluierung des Differenzierungspotentials der SpheUSSC

4.6.1 Adipozytendifferenzierung

In vivo entwickeln sich Adipozyten aus multipotenten Stammzellen, welche mesodermalen Ursprungs sind. Die Enddifferenzierung der Prä-Adipozyten zu Adipozyten wird von einer vermehrten Lipideinlagerung begleitet. Mehrere Arbeiten zeigen, dass verschiedene mesenchymalen Zellen sich unter spezifischen Bedingungen zu Adipozyten differenzieren lassen. Im Fall der USSC-Zellen ist es gezeigt, dass sie zu keiner Adipozytendifferenzierung befähigt sind (Kluth et al., 2010). Diese Heterogenität des Differenzierungspotentials ist unter anderem auf den wichtigen Adipozyten-Inhibitor DLK1 zurückzuführen (Smas et al., 1997). Die epigenetisch behandelten USSC SA8/25 sind positiv für DLK1 und besitzen kein adipogenes Differenzierungspotential.

Im Gegensatz dazu können sich die epigenetisch erzeugten SpheUSSC auch ohne Zugabe von spezifischen Stimulatoren der Adipogenese, so z. B. Insulin, spontan und effizient zu Adipozyten differenzieren. So konnten sich bei allen wiederholten Versuchen mindestens 95% der Zellen zu reifen Adipozyten differenzieren. Diese einheitliche Befähigung fast jeder SpheUSSC-Zelle unterstreicht ein homogenes Differenzierungspotential dieser Zellen (Abb. 4.3). Es konnte bei allen differenzierten Adipozyten die Expression von Leptin gemessen werden. Leptin wurde sowohl im weißen Fett (Zhang et al., 1994) als auch im braunen Fett detektiert (Buyse et al., 2001). Morphologisch unterscheiden sich weiße und braune Adipozyten durch die Anzahl der Vakuolen. Während die weißen Adipozyten nur eine großen einzelne Vakuole aufweisen, besitzen die braunen multiple Vakuolen (Saely et al., 2010).

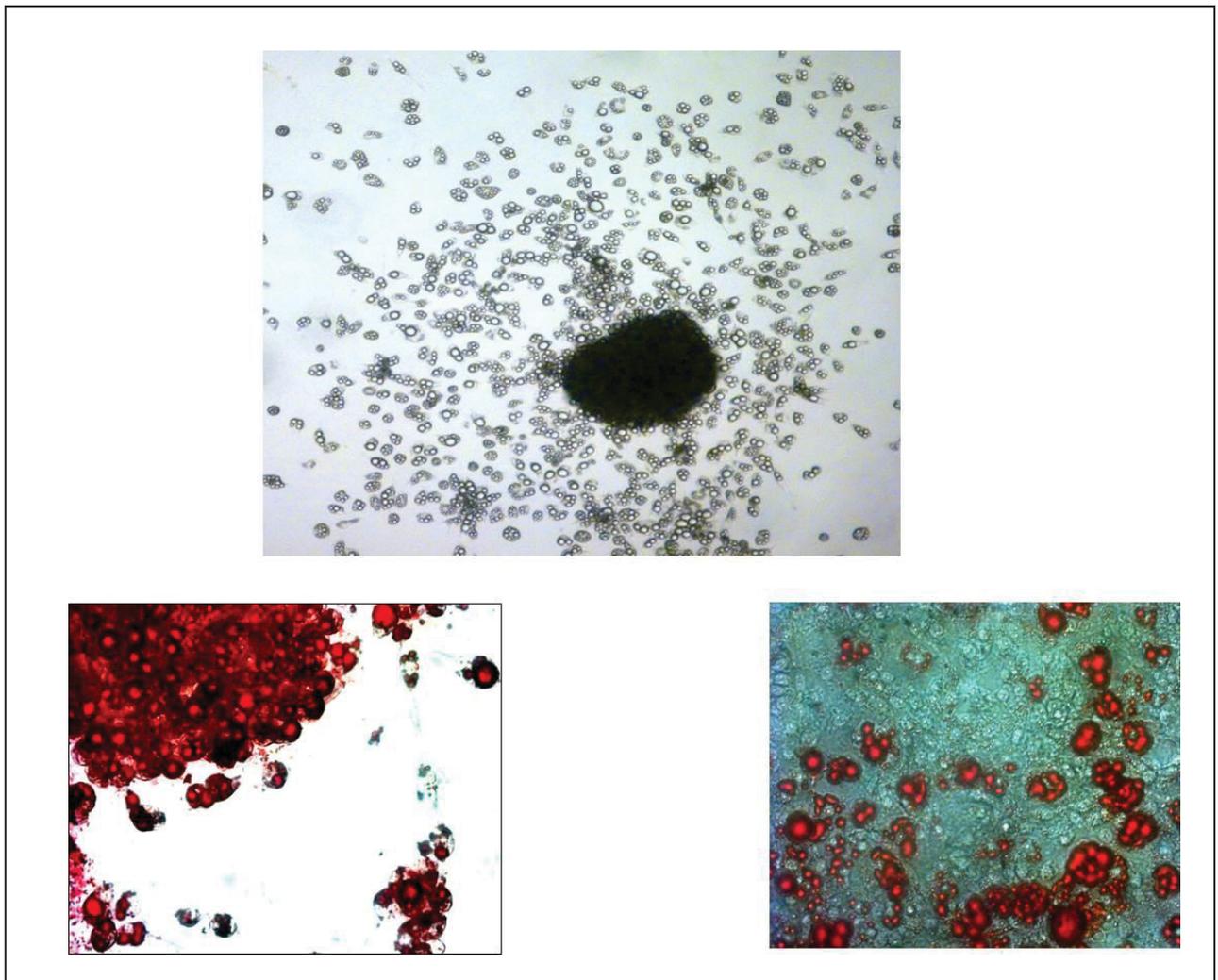


Abb. 4.3: Homogene Differenzierung der SpheUSSC zu Adipozyten. Viele differenzierte Zellen weisen multiple Vakuolen auf. Diese Vakuolen sind mittels der RED-*Oil-O*-Färbung deutlich zu sehen.

Aufgrund dieser morphologischen Vielfalt und der Expression von Leptin lässt sich nicht deduzieren, dass es sich bei den generierten Adipozyten um ausschließlich weißes oder braunes Fett handelt.

Im Gegensatz zu Leptin, das während der Adipogenese exprimiert wird, wird der Präadipozyten-Marker *DLK1* in den SpheUSSC nicht mehr exprimiert. Der Ausfall von *DLK1* in den SpheUSSC bedeutet, dass eine mögliche Blockade zur adipogenen Differenzierung aufgehoben wurde. Die Regulation der Expression von *DLK1* ist unter anderem epigenetisch reguliert. *DLK1* gilt als ein genomisch geprägtes Gen (Wylie et al., 2000). Bei der Maus wird dieses Gen von dem väterlichen Allel exprimiert. Er besitzt einen vollständig unmethylierten CpG-Insel-Promotor und einen im Exon differentiell methylierten Bereich (DMR), welcher auf dem mütterlichen Allel hypomethyliert wird und methyliert wird auf dem väterlichen Allel (Takada et al., 2000). Die epigenetische Analyse

bzw. die Methylierungsanalyse des *DLKI*-Promotors weist einen methylierten Status eher in den SpheUSSC Zellen, aber nicht in den USSC Zellen auf (Abb. 4.4). Diese differentielle Methylierung im Promotor von *DLKI* zwischen den SpheUSSC Zellen und der Ausgangszelle kann auf verschiedene Gründe zurückgeführt werden. Es ist bekannt, dass *DLKI* einer genetischen Prägung unterliegt. Dies bedeutet auf der einen Seite, dass der erwartete Methylierungsgrad in den analysierten Zellen gleich sein soll. Auf der anderen Seite ist es unbekannt, ob die Prägung von *DLKI* in den USSC bereits abgeschlossen ist oder nicht. Um dieses Ergebnis zu interpretieren, sind weitere Bisulfit-Sequenzierungen der USSC und der SpheUSSC nötig.

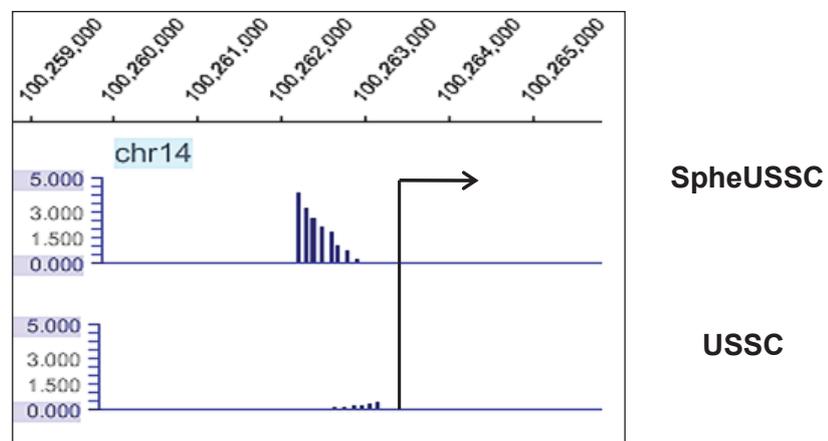


Abb. 4.4: Darstellung des Methylierungsstatus in der Promotorregion des *DLKI*-Gens in USSC und SpheUSSC. Je höher die Balken, desto stärker die Methylierung. Der Pfeil zeigt den Transkriptionsstart an.

4.6.2 Chondro- und Osteodifferenzierung der SpheUSSC

Chondrozyten und Osteoblasten stammen beide aus dem Keimblatt Mesoderm (Colnot et al., 2005). Es wird vermutet dass die beiden aus einem gemeinsamen embryonalen Vorläufer bzw. aus den mesodermalen-mesenchymalen Vorläuferzellen entstehen (Poliard et al., 1995; Colnot et al., 2005). Dies erklärt die Tatsache, dass die Stammzellen, welche sich zu Osteoblasten differenzieren, sich gleichzeitig zu Chondrozyten differenzieren und umgekehrt. Es ist bekannt, dass sich die USSC sowohl *in vitro* wie *in vivo* in Osteoblasten und Chondroblasten differenzieren lassen (Koegler et al., 2004).

Ebenfalls können viele MSC in Osteoblasten und Chondroblasten, aber auch in Adipozyten differenziert werden (Pittenger et al., 1999). Analog zu den mesenchymalen Stammzellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die SpheUSSC sich in den spezifischen Medien sehr effizient sowohl zu Adipozyten als auch Chondrozyten und Osteoblasten

differenzieren. Anders als bei MSC und USSC ist chronologisch und quantitativ die Effizienz der Differenzierung der SpheUSSC wesentlich stärker. So benötigen die MSC und die USSC unter optimalen Differenzierungsbedingungen ca. eine Woche bis zwei Wochen, bis sie sich zu Osteoblasten differenziert haben (Birmingham et al., 2012; Shafiee et al., 2011).

Die Homogenität der Differenzierung zeigte sich deutlich in den einheitliche Alizarin-Rot- und Alcian-Blau-Färbungen bei den Osteo- bzw. Chondrodifferenzierungen (Wardi et al., 1972).

Die Expression des wichtigen Osteomarkers, alkalische Phosphatase, nach einer Woche der Osteodifferenzierung belegt die Effizienz und die Spezifität der gebildeten mineralisierten Zellen. Die Alkalische Phosphatase (ALP) ist ein Phosphorsäureester hydrolysierendes Enzym und gilt als klassischer Marker für reife bzw. reifende Osteoblasten. Die Expression dieses Enzyms von den Osteoblasten markiert den Beginn der Mineralisation der Knochenmatrix (Zernik et al., 1990). Darüber hinaus war das Mineralisierungsstadium bei der Osteodifferenzierung schon nach einer Woche zu sehen, wobei mehrere Arbeiten zeigen, dass MSC hierfür zwei Wochen unter vergleichbaren Bedingungen benötigen.

Diese erworbene Fähigkeit zur raschen und homogenen Differenzierung im Vergleich zu der Ausgangszelle belegt, dass die SpheUSSC eine Erweiterung des Differenzierungspotentials erfahren haben.

4.6.3 Neuronale Differenzierung der SpheUSSC

Die Arbeiten von Greschat et al., 2008, belegten die neuronale Differenzierungsfähigkeit der USSC *in vitro*. *In vivo* konnte der Einsatz von USSC dazu beitragen, dass gelähmte Mäuse wieder die Fähigkeit erwarben sich zu bewegen (Schira et al., 2011). Im Unterschied zur neuronalen Differenzierung aus den ESC- oder IPs-Zellen ist die Differenzierung der USSC trotz der spezifischen morphologischen und molekularen Merkmale funktionell unvollständig. Im Gegensatz zu den adulten Stammzellen können menschliche embryonale Stammzellen (hESC) effizient in funktionelle Neuronen und Glia durch einen ähnlichen *in vivo*-Mechanismus differenzieren (Perrier et al., 2004; Hu et al., 2009). Sehr auffällig war, dass während der Inkubation der SpheUSSC mit dem spezifischen, neuronalen Medium sehr rasch, bereits am ersten Tag, eine deutliche morphologische Veränderung beobachtet werden konnte. Die meisten Zellen zeichneten sich durch ihren spindelförmigen, fibroblastenartigen Phänotyp aus. In den meisten

beschriebenen Differenzierungsprotokollen sind diese morphologischen Entwicklungen erst nach drei Tagen unter vergleichbaren Bedingungen zu sehen (Ferroni et al., 2013). Die mikroskopische Beobachtung der differenzierenden SpheUSSC zeigt jedoch keine einheitliche Morphologie (Abb. 4.5). So waren verschiedene Nervenzell-ähnliche Strukturen zu verschiedenen und auch parallelen Zeiten zu sehen.

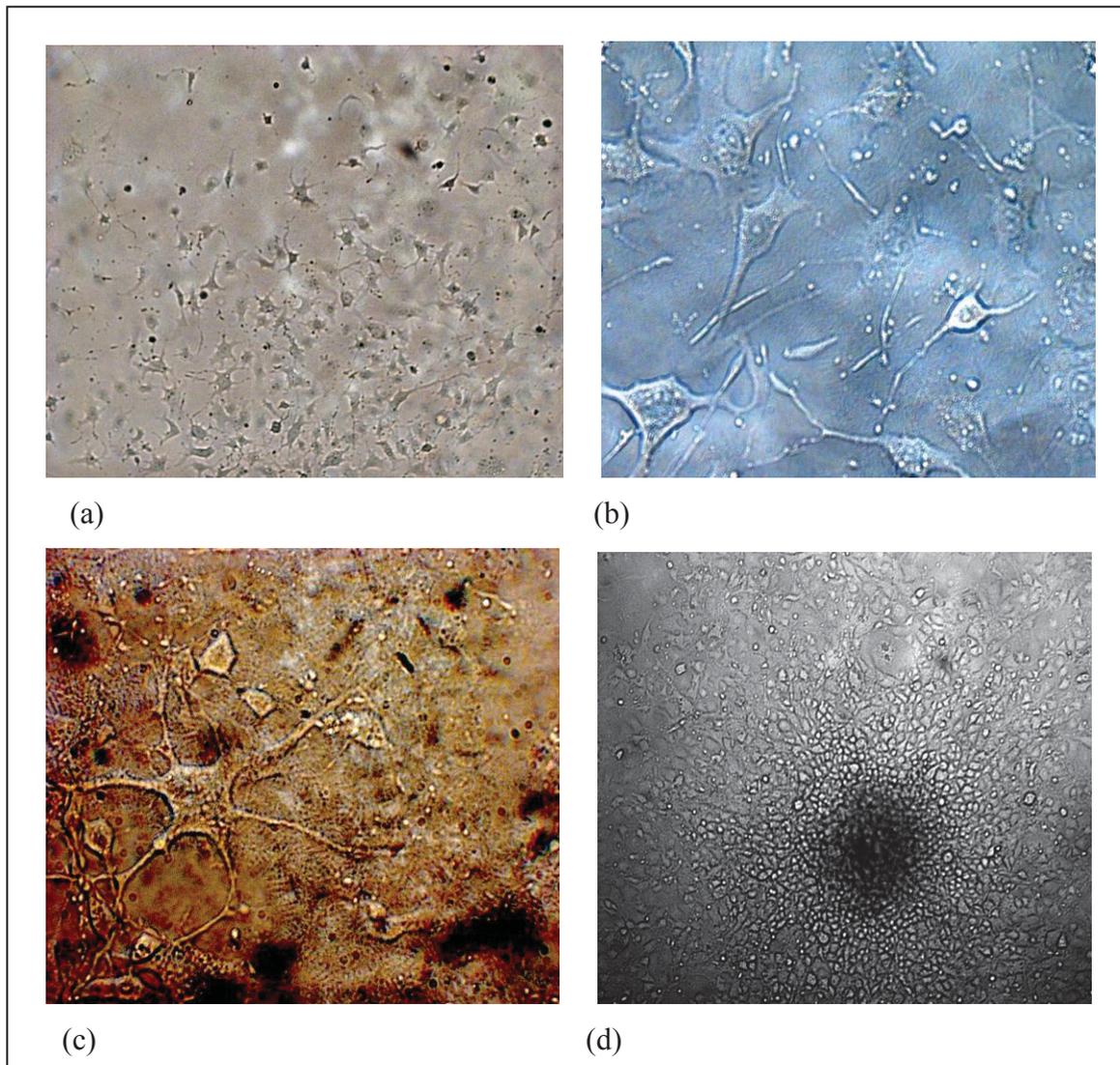


Abb. 4.5: Differenzierung der SpheUSSC zu unterschiedlichen Neuronen-ähnlichen Zellen. Die SpheUSSC lassen sich vereinzelt (a, b, c) oder auch grob (d) im neuronalen Induktionsmedium schnell differenzieren. Während der Kultivierung sind verschiedene Neuronen ähnliche Morphologien unter dem Mikroskop zu sehen.

Diese unterschiedliche Morphologie deutet auf eine potenzielle Kapazität der SpheUSSC zur breiten neuronalen Differenzierung hin. Um eine spezifischere Differenzierung zu erzielen, sind weitere Arbeiten bzw. Optimierungen der Kulturmedien und Differenzierungsbedingungen erforderlich.

4.6.4 Kardiomyozyten-Differenzierung der SpheUSSC

Es wurde gezeigt dass die USSC sich in der Co-Kultur mit neonatalen Kardiomyozyten zu Kardiomyozyten *in vitro* differenzieren lassen (Ding et al., 2013). Unter den gleichen Bedingungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die SpheUSSC sich ebenfalls zu Kardiomyozyten differenzieren lassen. Effizienter als im Fall der USSC konnten die SpheUSSC sehr rasch ihre Morphologie ändern und sich bereits nach nur zwei Tagen der Co-Kultur spontan kontrahieren. Mittels der markierten eGFP-SpheUSSC kann man schlussfolgern, dass die differenzierten Zellen tatsächlich aus den SpheUSSC stammen. Anhand dieser Markierung konnte man ausschließen, dass der detektierte spezifische humane Kardiomyozyten-Marker cTNT nicht auf neonatale Kardiomyozyten zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse belegen, dass die SpheUSSC die Kapazität besitzen, sich in Kardiomyozyten *in vitro* zu differenzieren. Andere Arbeiten belegen, dass Zellen aus dem Nabelschnurblut zur Differenzierung in Kardiomyozyten fähig sind (Nishiyama et al., 2007; Henning et al., 2010). Im Unterschied zu USSC und zu den anderen adulten Stammzellen aus dem Nabelschnurblut ist die chronologische Effizienz der SpheUSSC deutlich höher. IPS-Zellen konnten sich ebenfalls unter ähnlichen Bedingungen sehr rasch zu Kardiomyozyten *in vitro* differenzieren lassen (Zwi-Dantsis et al., 2012;).

Die Tatsache, dass eine große Zellpopulation (Video.2) differenzierter Zellen nach einer Woche spontan, synchron kontrahieren, deutet auf eine hohe Homogenität der differenzierten Kardiomyozyten hin. Dies bedeutet, dass die SpheUSSC im Vorfeld schon homogen waren, da eine Teilung während der Differenzierung stets beschränkt ist. Es wurde ebenfalls berichtet, dass die Behandlung von mesenchymalen Stammzellen mittels 5-Aza-dC eine Induktion der Kardiomyozyten-Differenzierung *in vitro* induziert (Xu et al., 2004; Qian et al., 2012). Obwohl die 5-Aza-dC -induzierte Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Kardiomyozyten eingehend untersucht wurde, sind detaillierte Kenntnisse über die involvierten Mechanismen nicht vorhanden. Eine Induktion durch eine Ko-Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA ist in der Literatur bisher nicht erforscht. Eine Differenzierung der SpheUSSC *in vivo* wurde in dieser Arbeit nicht unternommen. Die Ausgangszellen, USSC, konnten im Rattenmodell zu Kardiomyozyten differenziert werden (Ding et al., 2012). Da die SpheUSSC eine hohe Differenzierungseffizienz *in vitro* aufwies, ist es daher denkbar dass sie ebenfalls das Potential besitzen sich *in vivo* zu differenzieren.

4.7 Eine neue Hypothese zur Entstehung des neuen stabilen Phänotyps

- **Re-Kanalisierung**

Ein stark auffälliger Aspekt bei den SpheUSSC Zellen ist die Tatsache, dass sie über sehr lange Zeit einen stabilen Phänotyp aufweisen. Diese erworbene Eigenschaft spiegelt womöglich einen genetischen bzw. epigenetischen stabilen Status wider. Die kombinierte Behandlung der Zellen durch 5-Aza-dC und TSA bzw. die Aufhebung einer unbekanntem Anzahl an Methylgruppen und die Förderung der Acetylierung führten dazu, dass die Zellen einen neuen Phänotyp erworben haben, aber auch langfristig behalten können. Diese Entwicklung weist eine Parallele mit dem von Waddington entwickelten Modell (Abb. 4.6) auf. Es ist möglich, dass die behandelten Zellen eine bestimmte epigenetische „Konformation“ angenommen haben, die stabil ist. So konnten die Zellen mittels der epigenetischen Agenzien zu einer epigenetischen „Nische“ kanalisiert werden. Die epigenetische Behandlung scheint dafür verantwortlich zu sein, dass die USSC zur einen neuen Nische „rollen“ konnte.

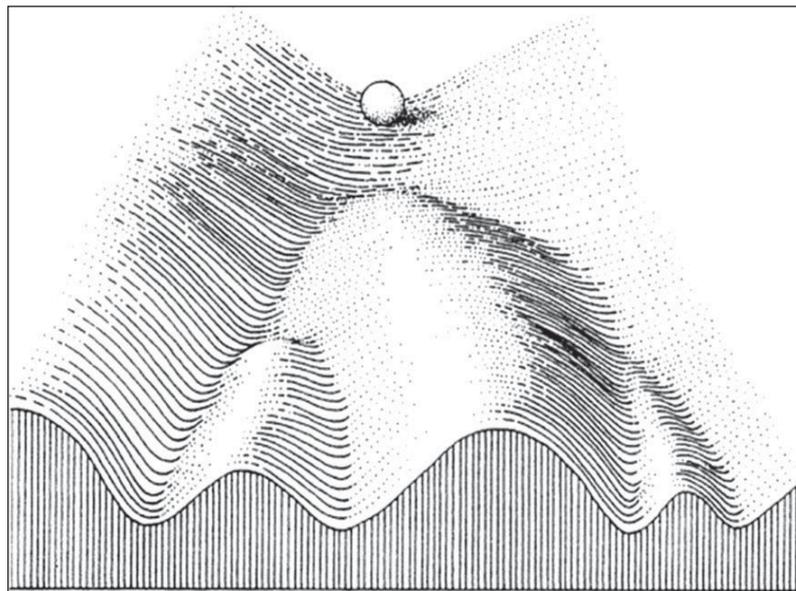


Abb. 4.6: Schematische Darstellung des epigenetischen Landschaftsmodells von Waddington. Während der normalen Entwicklung „rollt“ eine frühe pluripotente Zelle durch einen bestimmten und einzigen Weg der Landschaft. Je nachdem in welchen Weg sie rollt, entwickelt sich die Zelle endgültig zu einem bestimmten differenzierten Zelltyp (nach Waddington, 1957).

Die kanalisierte USSC „rollt“ nicht bis zum Endstadium der Differenzierung. Die SpheUSSC erreichen ein Stadium, bei dem sie sich unter bestimmten, definierten Bedingungen weiter differenzieren können, wie z. B. zu Adipozyten, Chondrozyten oder

auch Kardiomyozyten. So scheint es, dass es ein „physiologisches“ Stadium gibt, indem die Zelle noch nicht enddifferenziert, aber stabil bleibt.

Die epigenetische Behandlung kann somit dafür verantwortlich sein, dass die USSC „re-kanalisiert“ wird (Abb. 4.7). Die Re-Kanalisation der USSC geht somit von einem Stadium mit einem bestimmten Differenzierungspotential, welches nur beschränkt Adipogenese ermöglicht, zu einem Stadium mit einem breiteren Differenzierungspotential über, bei dem die Adipogenese effizient ist.

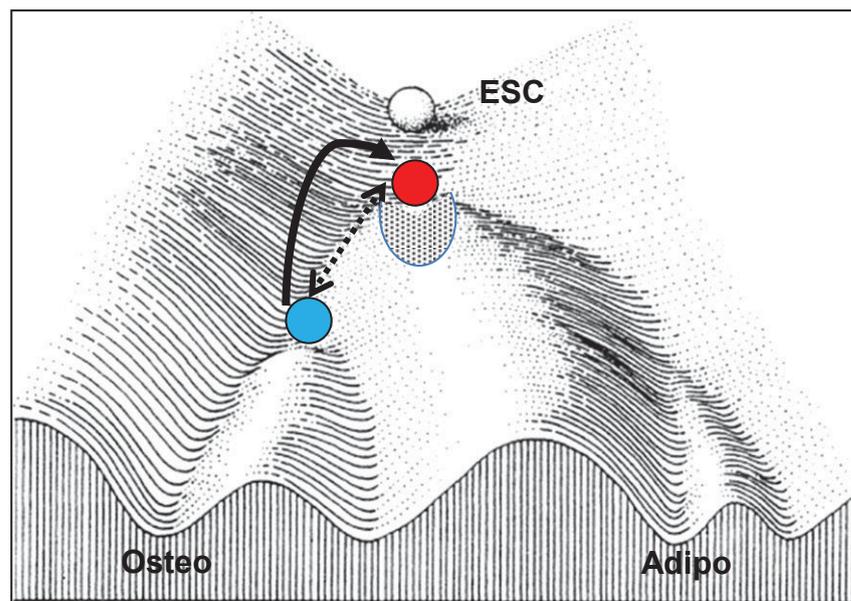


Abb. 4.7: Epigenetische Re-Kanalisation. Die epigenetische Behandlung der USSC (blau) kann die Zelle zu einem stabilen Phänotyp SpheUSSC (rot) re-kanalisieren. Hierfür muss die USSC eine „epigenetische Strecke“ zurücklaufen (durchgestrichene Pfeil). Die re-kanalisierte und phänotypisch stabile Zelle kann sich zu mehreren Zelltypen differenzieren. Die SpheUSSC scheint zu einer „Nische“ kanalisiert zu werden.

- **Epigenetische „Force“ und Zellschicksal**

Dass 5-Aza-dC oder TSA einzeln nicht in der Lage waren diese Kanalisierung zu bewirken, bedeutet, dass für die Kanalisierung sowohl Veränderungen der DNA-Methylierung als auch der Chromatin-Konformation notwendig sind. Die Behandlungskonzentrationen und Behandlungsdauer sind für die „richtige“ Kanalisierung entscheidend. So können sehr niedrige Konzentrationen von den Agenzien keinerlei Veränderung induzieren. Ebenfalls führen hohe Dosierungen zum Tod der Zellen. Eine „optimale“ Veränderung der Methylierung und der Chromatinkonformation ist notwendig um die Kanalisierung möglich zu machen. Da die epigenetische Konformation einer Zelle fast stets individuell ist, ist es dann notwendig für jeden Zelltyp die „optimale“

Veränderungen bzw. optimalen Behandlungsbedingungen zu screenen und zu identifizieren. Die Behandlung der Zellen mit den definierten Konzentrationen über einen bestimmten Zeitraum ergibt somit die optimale epigenetsche „Force“, die dafür nötig ist, die Zelle in eine stabile Nische dauerhaft zu bringen. Man kann aus diesen Beobachtungen und den gewonnenen Ergebnissen dieser Arbeit folgende Gleichung entwerfen:

$$\overrightarrow{\text{epiForce}} (C) = t (a / \text{Methylierung} + b \text{ Acetylierung})$$

a: Konzentration des Demethylierungsagens

b: Konzentration des Acetylierungsagens

t: Behandlungsdauer

Erreicht man für eine bestimmte Zelle die nötige epigenetische Force, so kann die Zelle in die mögliche Nische ankommen und von dort sich effizient zum neuen Schicksal losgehen (Abb. 4.8).

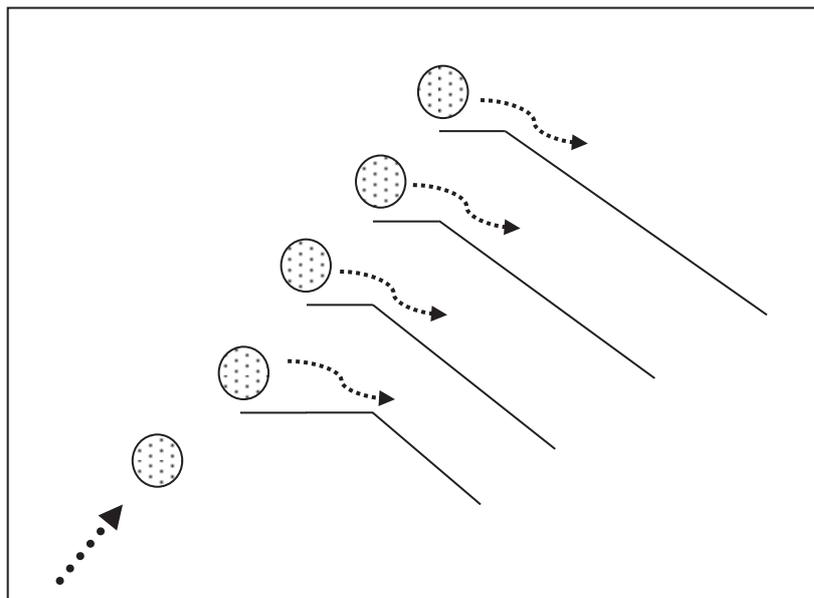


Abb. 4.8: Modell zur Re-Kanalisierung von Zellen. Je nach Ausmaß der Demethylierung und der Acetylierung können die behandelten Zellen ihre Epigenome so ändern, dass sie in eine stabile „Nische“ wandern. Die daraus resultierende epigenetische „Force“, abhängig vom dem Ausgangsepigenom, kann die Zellen so forcieren, dass sie aus der neu erworbenen Nische in anderen Differenzierungswege re-kanalisiert werden.

4.8 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die adulten Stammzellen, USSC, epigenetisch veränderbar sind. Die transiente Behandlung der Zellen mit 5-Aza-dC und TSA führte zu einem neuen stabilen Stammzellphänotyp mit neuen Eigenschaften. Entsprechend der gewonnenen Daten sind die neuen Charakteristika der SpheUSSC u.a. auf die genomweiten epigenetischen Veränderungen zurückzuführen. Ob die epigenetischen Agenzien 5-Aza-dC und TSA einen Selektionseffekt auf die behandelten Zellen herbeigeführt haben, lässt sich aus den generierten Ergebnissen weder ableiten noch ausschließen. Um dies näher zu untersuchen wäre es nötig die epigenetisch behandelten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Behandlung zu klonieren und diese Klone im Vergleich zu untersuchen. Die Stabilität der SpheUSSC deutet darauf hin, dass die USSC das Potential für eine epigenetische Re-Kanalisation besitzen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich um herauszufinden ob diese Re-Kanalisationfähigkeit spezifisch für die USSC ist oder aber bei anderen Zelltypen möglich wäre. Hierfür soll das entwickelte Behandlungsverfahren auf andere adulten Stammzellen oder auch differenzierte Zellen wie z. B. humane Fibroblasten angewandt werden. Da der Effekt der Kombination von nur zwei Agenzien auf die behandelten Zellen derartig deutlich gewesen ist, ist es legitim den Effekt von mehreren anderen Kombinationen auch zu untersuchen. Die Entwicklung neuer Verfahren mittels weitere epigenetischer Agenzien birgt ein Potential für die Steuerung der Differenzierung vieler Zelltypen. Analog zu der in dieser Arbeit entwickelten Methode soll die Kombination verschiedener Histondeacetylase-Inhibitoren, wie z. B. TSA, Valproinsäure (VPA) etc., mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren, wie z. B. 5-Aza-dC und mit dem Histon-Methyltransferase G9a-Inhibitor BIX-01294 auf verschiedenen Nabelschnurblut-Zellen, sowie andere differenzierten Zellen angewandt werden. Somit sollen diese nicht-transgenen Wege dahingehend geprüft werden, inwiefern sie sich dazu eignen das Differenzierungspotential weiterer Zellen epigenetisch zu modulieren. Die vorliegende Arbeit liefert Evidenz dafür, dass in den SpheUSSC epigenetisch der ALT-Mechanismus zur Telomerenverlängerung ausgelöst worden ist. Da dieser Mechanismus nur in den frühen 2-4-Zellstadien der Entwicklung zu finden ist, fehlen geeignete Modelle um ihn untersuchen zu können. Die in dieser Arbeit vorgestellte SpheUSSC stellen ggf. ein neues Zellmodell zur Erforschung des epigenetischen ALT-Mechanismus mit fundamentaler Bedeutung für die Ontogenese dar.

5. Anhang

5.1 Methylierungsanalysen

5.1.1 Globale Methylierungsanalysen

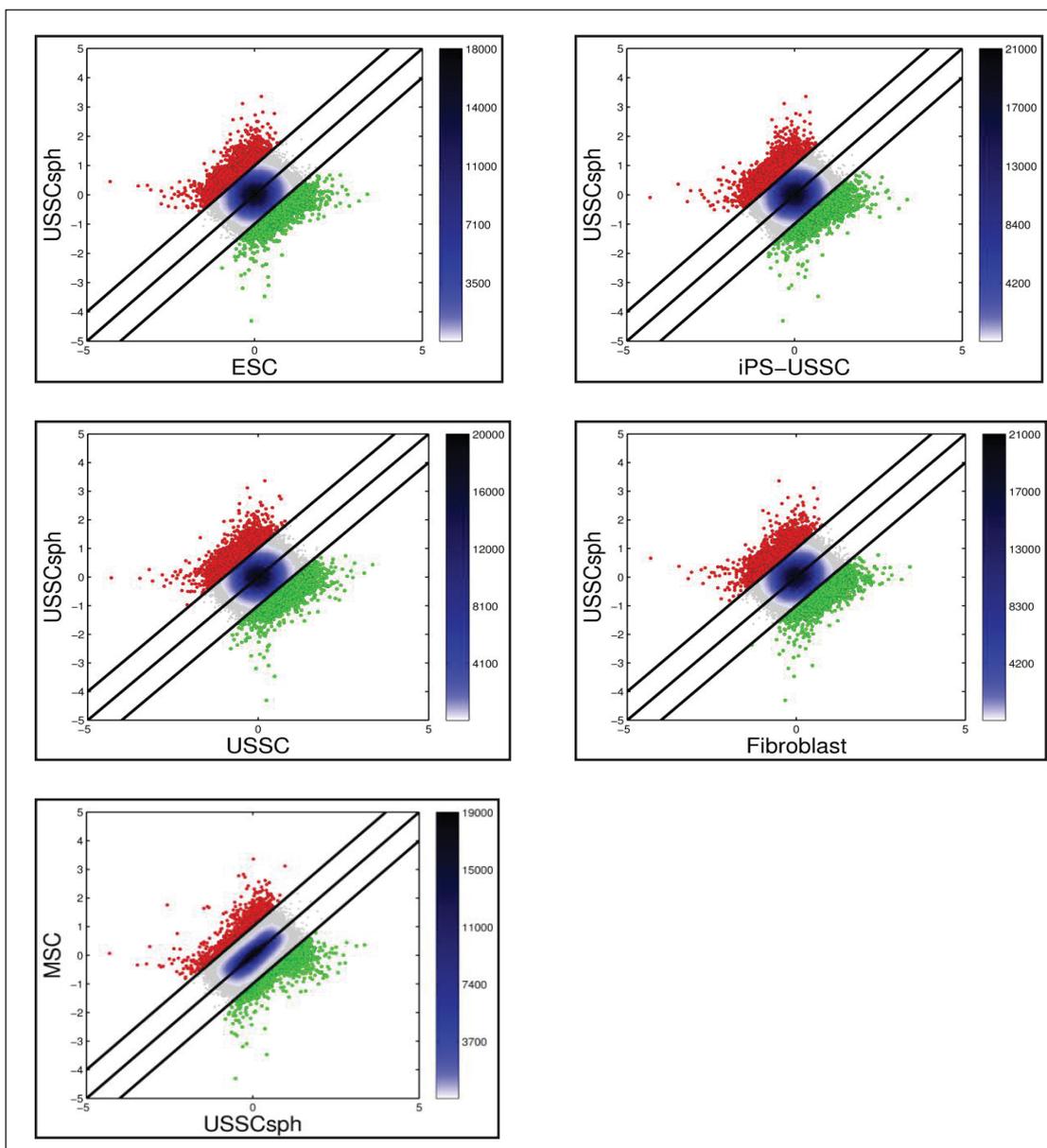


Abb. 5.1. Paarweise“ Streudiagramm von fünf verschiedenen Zelltypen. Auf der X-Achse ist der Methylierungsgrad einer Probe aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der Methylierungsgrad der zu vergleichenden Probe aufgetragen. Jeder Punkt im Diagramm stellt den Methylierungsgrad einer Region in zwei Proben dar. Je ähnlicher der Methylierungsgrad, desto näher sind die Punkte zur Diagonalen.

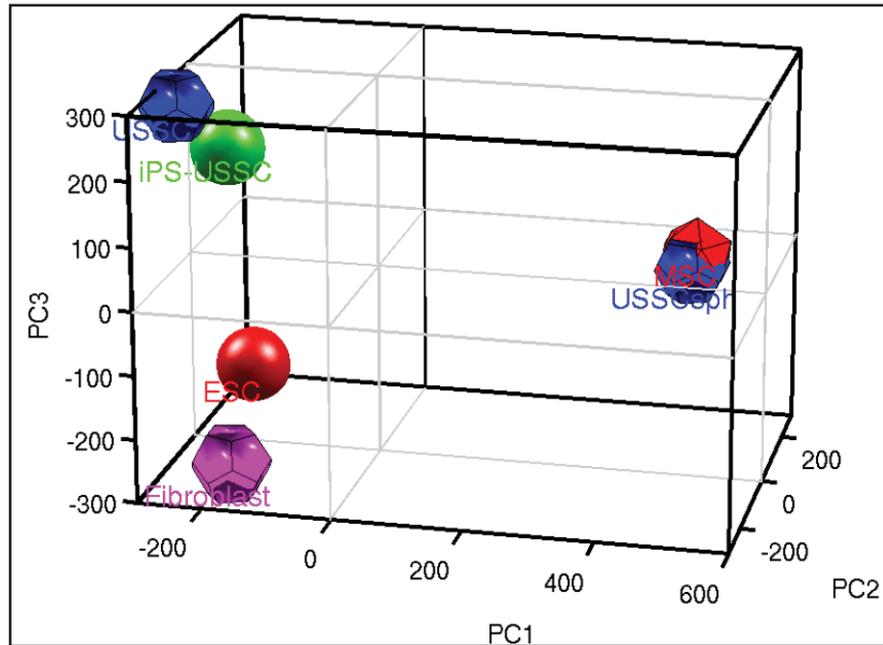


Abb. 5.2: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Microarray-Daten. 3-dimensionale Darstellung der Ähnlichkeit der analysierten Zellen im Bezug auf die globalen Methylierung. Die erste Hauptkomponente (PC1) umfasst 47% der Methylierungsvariabilität. Die zweite Hauptkomponente (PC2) umfasst 27% der Variabilität und die Dritte (PC3) umfasst 12%.

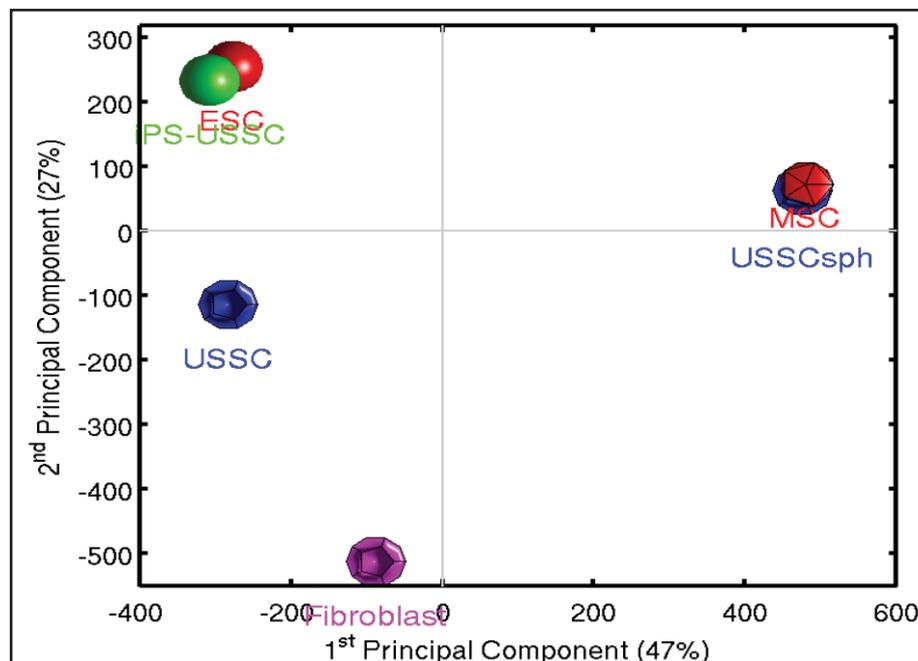


Abb. 5.3: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Microarray-Daten. 2-dimensionale Darstellung der Ähnlichkeit der analysierten Zellen in Bezug auf die globalen Methylierung. Der erste Hauptkomponent (PC1) umfasst 47% der Methylierungsvariabilität. Die zweite Hauptkomponente (PC2) umfasst 27% der Variabilität.

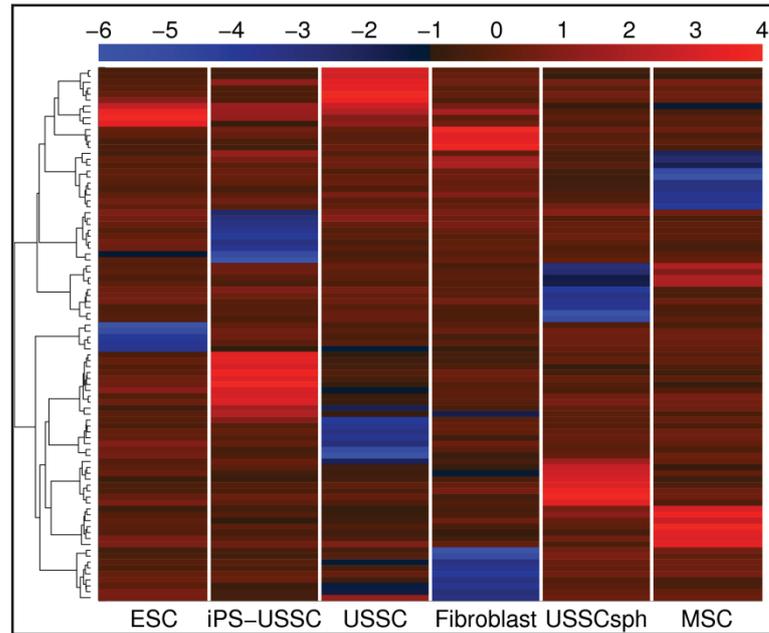


Abb. 5.4: Heat map. Der Farbcode repräsentiert die Methylierungsstärke in log₂-Skalierung. Je höher der Grad der Methylierung, desto heller ist die rote Farbe. Für die Analyse wurden die ersten 5.000 Positionen, die am stärksten differentiell methyliert sind, verwendet.

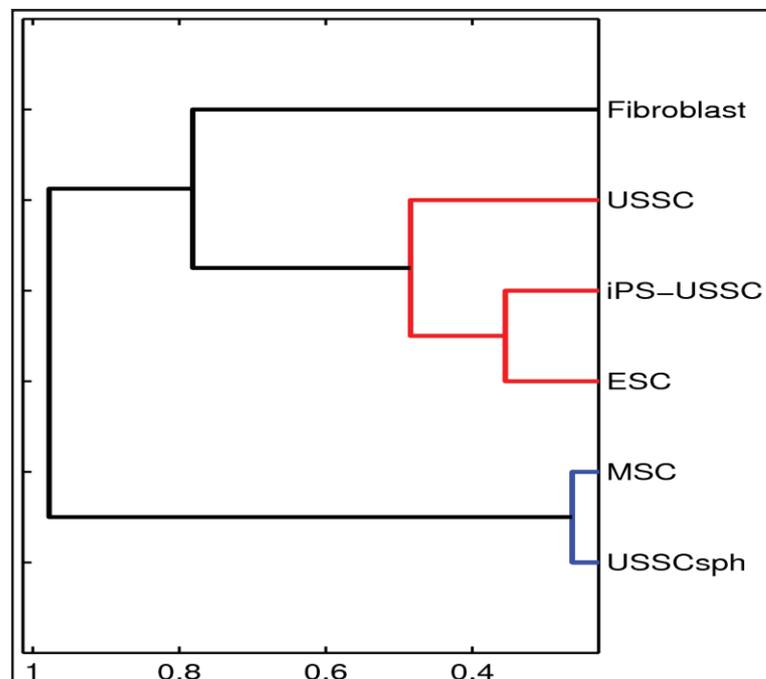


Abb. 5.5: Hierarchische Clusteranalyse. Die Zellen SpheUSSC und MSC sind nah mit einander und gleichzeitig viel weniger verwandt mit allen anderen Zelltypen.

5.1.2 Fokale Methylierungsanalysen

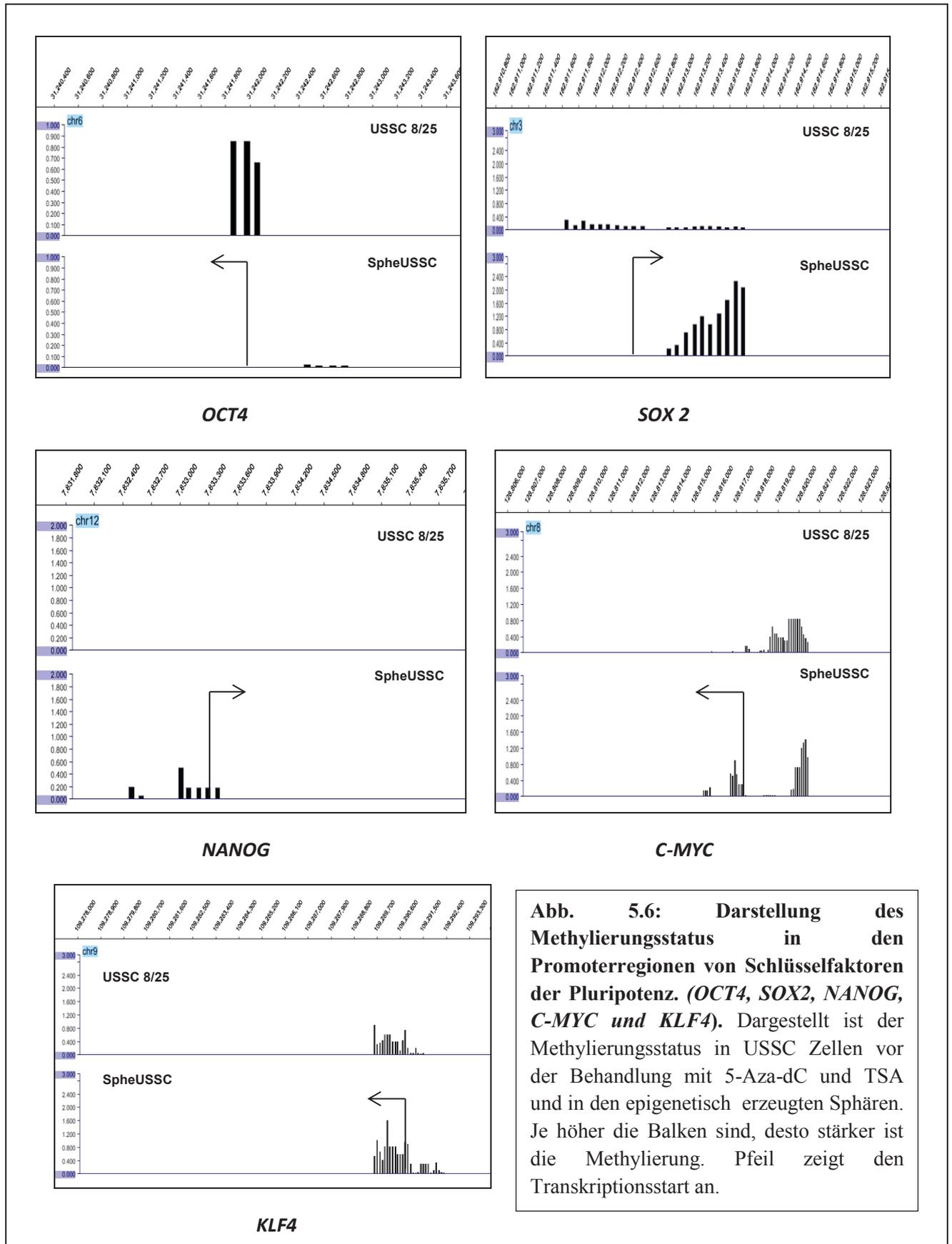


Abb. 5.6: Darstellung des Methylierungsstatus in den Promoterregionen von Schlüsselfaktoren der Pluripotenz. (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *C-MYC* und *KLF4*). Dargestellt ist der Methylierungsstatus in USSC Zellen vor der Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA und in den epigenetisch erzeugten Sphären. Je höher die Balken sind, desto stärker ist die Methylierung. Pfeil zeigt den Transkriptionsstart an.

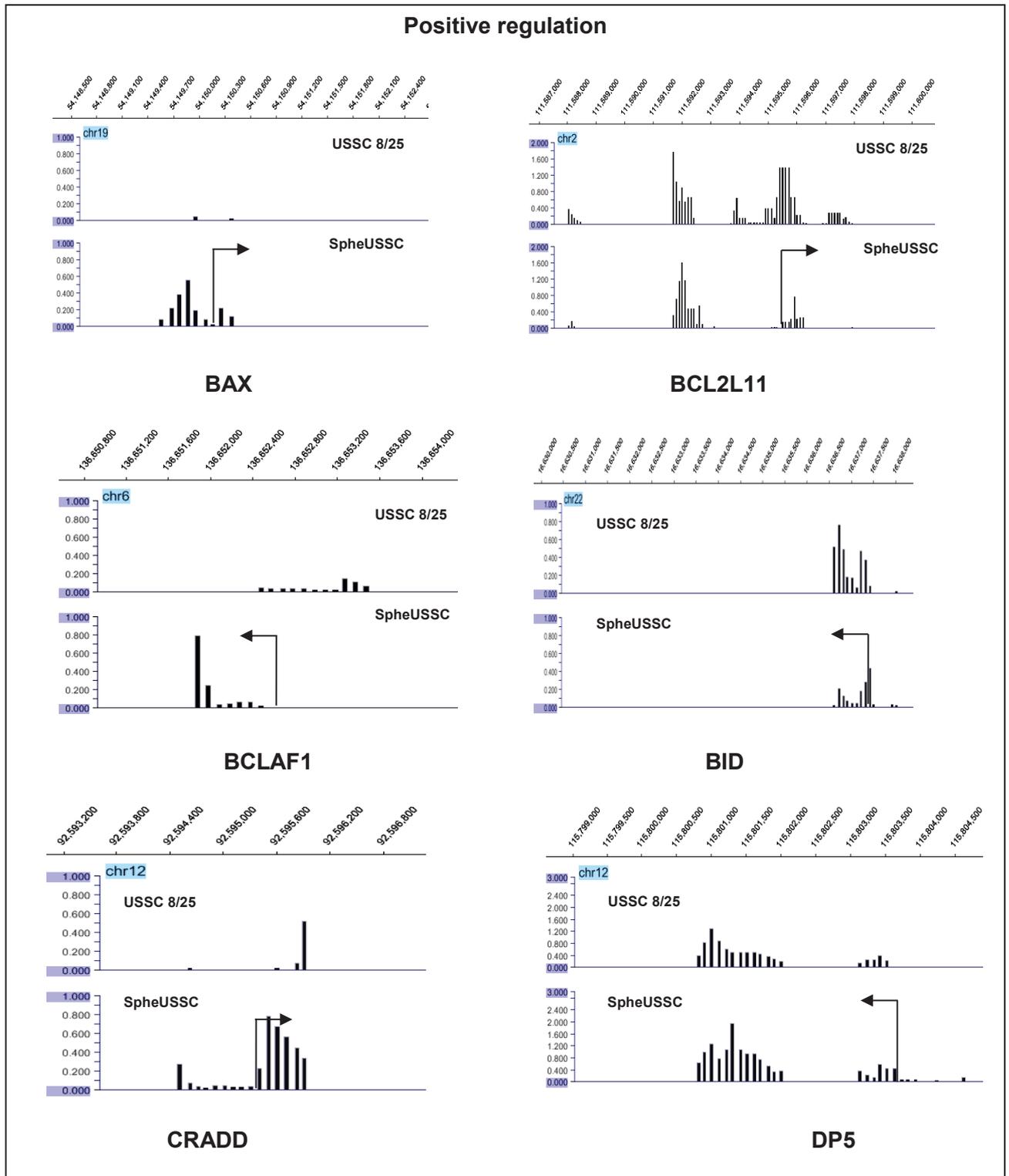


Abb. 5.7: Darstellung des Methylierungsstatus in den Promoterregionen von positiv-regulierenden Faktoren der Apoptose. Dargestellt ist der Methylierungsstatus in USSC vor der Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA und in generierten Sphären. Je höher die Balken sind, desto stärker ist die Methylierung. Pfeil zeigt den Transkriptionsstart an.

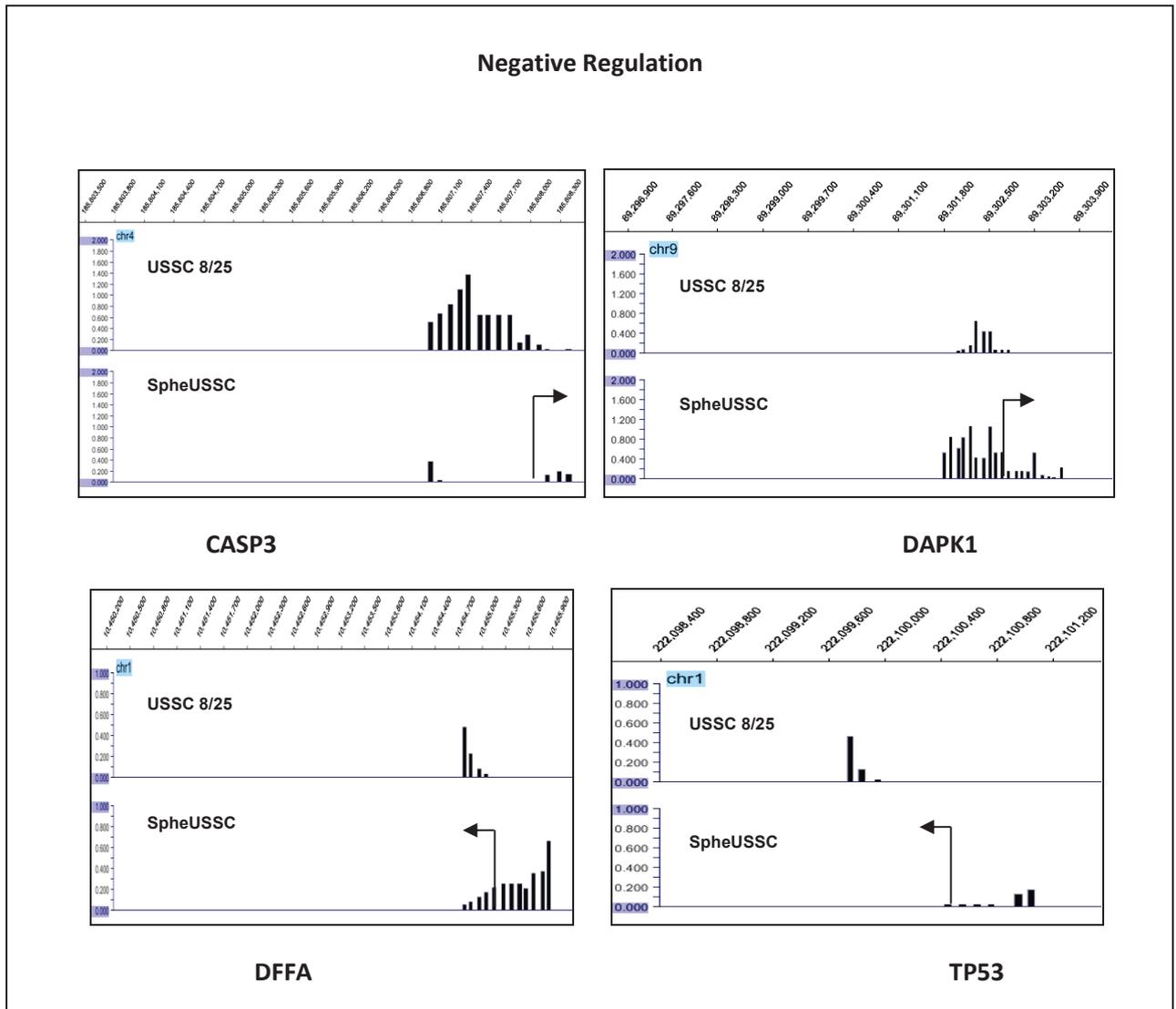


Abb. 5.8: Darstellung des Methylierungsstatus in Promoterregionen von negativ-regulierenden Faktoren des Apoptose. Dargestellt ist der Methylierungsstatus in USSC vor der Behandlung mit 5-Aza-dC und TSA und in generierten Sphären. Je höher die Balken sind, desto stärker ist die Methylierung. Pfeil zeigt den Transkriptionsstart an.

5.2 Westernblotanalysen

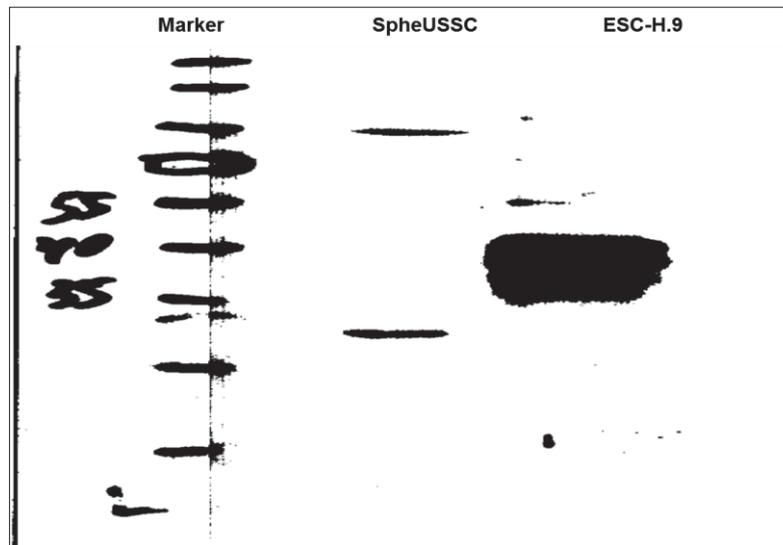


Abb. 5.2: Analyse der Expression von SOX2 in den SpheUSSC-Zellen mittels eines Western-Blots. Es wurden je 15 µg Proteinlysate aus den SpheUSSC-Zellen und den ESC-H9-Zellen aufgetragen. Die embryonale Stammzelle ESC-H9 diente als Positivreferenz. Eine Endkonzentration von 2 µg/ml wurde eingesetzt. Das erwartete SOX2-Signal liegt bei einer Größe von ca. 40 kDa. Die spezifische Bande war nur bei der ESC-H9 zu sehen.

5.3 Southern Blot-Analyse

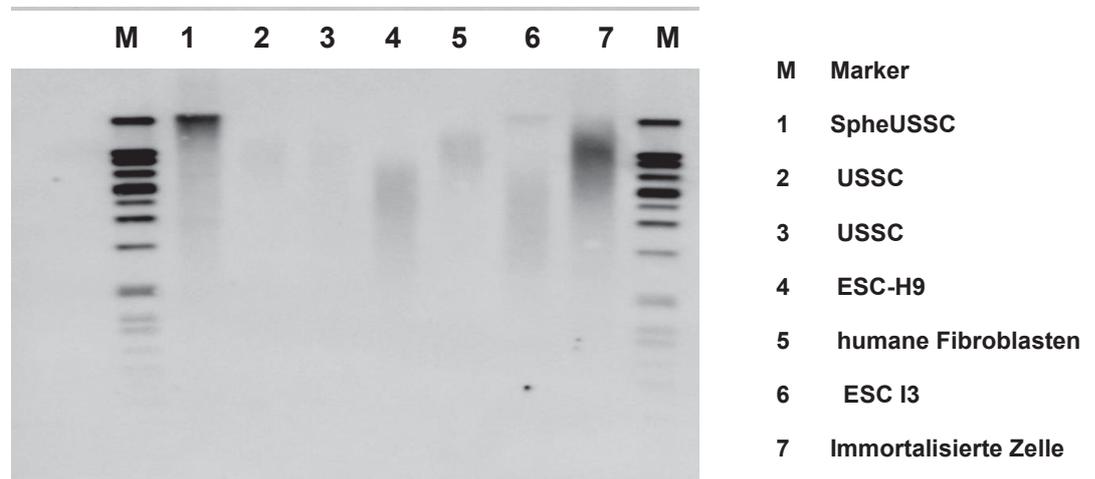


Abb. 5.3: Analyse der Telomerenlänge der SpheUSSC aus fortgeschrittener Passage (Passage 30). Die Länge der Telomeren wurde mittels einer *Southern Blot*-Analyse bestimmt. Die DNA einer immortalisierten, embryonalen Karzinomzelllinie mit bekannten, verlängerten Telomeren wurden als Referenz gewählt. Jeweils 1 µg DNA einer Probe wurde für die Messung verwendet.

5.4 Zellzählungen

Tabelle 9. Zellzählungen. Die kultivierten SpheUSSC wurden für die Zählung trypsiniert und dünn, 500×10^3 , ausgesät. Das Medium wurde an jedem dritten Tag zur Hälfte gewechselt. Die Zählung unter dem Mikroskop erfolgte ebenfalls bei jedem Mediumwechsel. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauerzählkammer. Hierfür wurden $20 \mu\text{l}$ Zellsuspension mit $20 \mu\text{l}$ Trypanblau vermischt und vier Großquadrate ausgezählt

Zellzahl $\times 10^6$	1.Zählung	2.Zählung	3.Zählung	4.Zählung	5.Zählung	6. Zählung	7.Zählung	8.Zählung	9.Zählung	10.Zählung	11. Zählung	12.Zählung	13.Zählung
Tag 0	0,5	0,45	0,47	0,4	0,58	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tag 1													
Tag 2			0,24			2,5		3,1					
Tag 3	1,3	0,82		0,57	3		3,4		3,6	3,9	1,7	2,6	2
Tag 4			0,51										
Tag 5					9			8,7	9	9,4			
Tag 6	3,85	4,75		5,65		13,7	14,3						3,2
Tag 7			7	6,65		14,5			12,7	14,4	16,8	19,8	
Tag 8	5,15	4,95		6,85	16,8	18,4	16,2	13,2					
Tag 9		5	7,8			23,2					18,2		22
Tag 10	7,15								22,6	22,9		27,6	
Tag 11							22,6	25,5		23,2			
Tag 12													
Tag 13													
Tag 15													

- *Literaturverzeichnis*

6. Literaturverzeichnis

- Aktas, M.*, A. Houben, R. Siaj, P. Wernet, G. Kögler (Dusseldorf, DE), Aging mechanisms in neonatal USSC and adult MSC, 34th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation 24th Meeting of the EBMT Nurses Group 7th Meeting of the EBMT Data Management Group 2nd Patient & Family Day Florence, Italy.

- Allfrey, V. G., R. Faulkner and A. E. Mirsky (1964). "acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of rna synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A 51: 786-794.

- Allis C. David, Thomas Jenuwein, Danny Reinberg, Marie-Laure Caparros (Editors). Epigenetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1 edition (October 31, 2006).

- Aloia, L., B. Di Stefano and L. Di Croce (2013). "Polycomb complexes in stem cells and embryonic development." Development 140(12): 2525-2534. loia, L., et al. (2013). "Polycomb complexes in stem cells and embryonic development." Development 140(12): 2525-2534.

- Armstrong, L., G. Saretzki, H. Peters, I. Wappler, J. Evans, N. Hole, T. von Zglinicki and M. Lako (2005). "Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage." Stem Cells 23(4): 516-529.

- Atlasi, Y., S. J. Mowla, S. A. Ziaee, P. J. Gokhale and P. W. Andrews (2008). "OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells." Stem Cells 26(12): 3068-3074.

- Bauer, Ludwig, and Dr. Otto Exne, the Chemistry of Hydroxamic Acids and *N*-Hydroxyimides, Angewandte Chemie International Edition in English Volume 13, Issue 6

- Bestor, T. H. (1988). "Cloning of a mammalian DNA methyltransferase." Gene 74(1): 9-12.

- Bestor, T. H. (2000). "The DNA methyltransferases of mammals." Hum Mol Genet 9(16): 2395-2402.

-
- Bestor, T. H. and V. M. Ingram (1983). "Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(18): 5559-5563.
 - Bestor, T. H., G. Gundersen, A. B. Kolsto and H. Prydz (1992). "CpG islands in mammalian gene promoters are inherently resistant to de novo methylation." *Genet Anal Tech Appl* 9(2): 48-53.
 - Bibikova, M., E. Chudin, B. Wu, L. Zhou, E. W. Garcia, Y. Liu, S. Shin, T. W. Plaia, J. M. Auerbach, D. E. Arking, R. Gonzalez, J. Crook, B. Davidson, T. C. Schulz, A. Robins, A. Khanna, P. Sartipy, J. Hyllner, P. Vanguri, S. Savant-Bhonsale, A. K. Smith, A. Chakravarti, A. Maitra, M. Rao, D. L. Barker, J. F. Loring and J. B. Fan (2006). "Human embryonic stem cells have a unique epigenetic signature." *Genome Res* 16(9): 1075-1083
 - Bigey, P., S. Ramchandani, J. Theberge, F. D. Araujo and M. Szyf (2000). "Transcriptional regulation of the human DNA Methyltransferase (dnmt1) gene." *Gene* 242(1-2): 407-418.
 - Birmingham, E., G. L. Niebur, P. E. McHugh, G. Shaw, F. P. Barry and L. M. McNamara (2012). "Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche." *Eur Cell Mater* 23: 13-27.
 - Bjornsson, S. (1993). "Simultaneous preparation and quantitation of proteoglycans by precipitation with alcian blue." *Anal Biochem* 210(2): 282-291.
 - Blasco, M. A. (2005). "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond." *Nat Rev Genet* 6(8): 611-622.
 - Blasco, M. A. (2005). "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond." *Nat Rev Genet* 6(8): 611-622.
 - Bohm, J., E. J. Schlaeger and R. Knippers (1980). "Acetylation of nucleosomal histones in vitro." *Eur J Biochem* 112(2): 353-362.
 - Bohm, L., F. A. Schneeweiss, R. N. Sharan and L. E. Feinendegen (1997). "Influence of histone acetylation on the modification of cytoplasmic and nuclear proteins by ADP-ribosylation in response to free radicals." *Biochim Biophys Acta* 1334(2-3): 149-154.
 - Boland, M. J., K. L. Nazor and J. F. Loring (2014). "Epigenetic Regulation of Pluripotency and Differentiation." *Circ Res* 115(2): 311-324.

- Boyer, L. A., T. I. Lee, M. F. Cole, S. E. Johnstone, S. S. Levine, J. P. Zucker, M. G. Guenther, R. M. Kumar, H. L. Murray, R. G. Jenner, D. K. Gifford, D. A. Melton, R. Jaenisch and R. A. Young (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." *Cell* 122(6): 947-956.

- Brem, G. and B. Kuhholzer (2002). "The recent history of somatic cloning in mammals." *Cloning Stem Cells* 4(1): 57-63.

- Brivanlou, A. H., F. H. Gage, R. Jaenisch, T. Jessell, D. Melton and J. Rossant (2003). "Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells." *Science* 300(5621): 913-916.

- Bryan, T. M., A. Englezou, J. Gupta, S. Bacchetti and R. R. Reddel (1995). "Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity." *EMBO J* 14(17): 4240-4248.

- Cameron, E. E., K. E. Bachman, S. Myohanen, J. G. Herman and S. B. Baylin (1999). "Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer." *Nat Genet* 21(1): 103-107.

- Campisi, J. (1997). "The biology of replicative senescence." *Eur J Cancer* 33(5): 703-709.

- Carpinelli, P., F. Granata, G. Augusti-Tocco, M. Rossi and S. Bartolucci (1993). "Antiproliferative effects and DNA hypomethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine in human neuroblastoma cell lines." *Anticancer Drugs* 4(6): 629-635.

- Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie and A. Smith (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." *Cell* 113(5): 643-655.

- Chew, J. L., Y. H. Loh, W. Zhang, X. Chen, W. L. Tam, L. S. Yeap, P. Li, Y. S. Ang, B. Lim, P. Robson and H. H. Ng (2005). "Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells." *Mol Cell Biol* 25(14): 6031-6046.

- Christman, J. K. (2002). "5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy." *Oncogene* 21(35): 5483-5495.

- Colgin, L. M. and R. R. Reddel (1999). "Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization." *Curr Opin Genet Dev* 9(1): 97-103.

-
- Colnot, C. (2005). "Cellular and molecular interactions regulating skeletogenesis." *J Cell Biochem* 95(4): 688-697.
 - Creusot, F., G. Acs and J. K. Christman (1982). "Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine." *J Biol Chem* 257(4): 2041-2048.
 - Davidson, S., P. Crowther, J. Radley and D. Woodcock (1992). "Cytotoxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine in a mammalian cell system." *Eur J Cancer* 28(2-3): 362-368.
 - Davidson, S., P. Crowther, J. Radley and D. Woodcock (1992). "Cytotoxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine in a mammalian cell system." *Eur J Cancer* 28(2-3): 362-368.
 - Devereux, T. R., I. Horikawa, C. H. Anna, L. A. Annab, C. A. Afshari and J. C. Barrett (1999). "DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene." *Cancer Res* 59(24): 6087-6090.
 - Di Leonardo, A., S. P. Linke, K. Clarkin and G. M. Wahl (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." *Genes Dev* 8(21): 2540-2551.
 - Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9363-9367.
 - Ding, X., Y. Wang, D. Zhang, Y. Wang, Z. Guo and Y. Zhang (2008). "Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A." *Theriogenology* 70(4): 622-630.
 - Ding, Z., S. Burghoff, A. Buchheiser, G. Kogler and J. Schrader (2013). "Survival, integration, and differentiation of unrestricted somatic stem cells in the heart." *Cell Transplant* 22(1): 15-27.
 - Dominguez, M. and F. Berger (2008). "Chromatin and the cell cycle meet in Madrid." *Development* 135(21): 3475-3480.
 - Drummond, D. C., C. O. Noble, D. B. Kirpotin, Z. Guo, G. K. Scott and C. C. Benz (2005). "Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 495-528.
 - Ehrlich, M. and R. Y. Wang (1981). "5-Methylcytosine in eukaryotic DNA." *Science* 212(4501): 1350-1357.

- Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, L. H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune and C. Gehrke (1982). "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells." *Nucleic Acids Res* 10(8): 2709-2721.

- Ellis, P., B. M. Fagan, S. T. Magness, S. Hutton, O. Taranova, S. Hayashi, A. McMahon, M. Rao and L. Pevny (2004). "SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult." *Dev Neurosci* 26(2-4): 148-165.

- El-Serafi, A. T., R. O. Oreffo and H. I. Roach (2011). "Epigenetic modifiers influence lineage commitment of human bone marrow stromal cells: Differential effects of 5-aza-deoxycytidine and trichostatin A." *Differentiation* 81(1): 35-41.

- Engelhardt, M. and U. M. Martens (1998). "The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality (Review)." *Oncol Rep* 5(5): 1043-1052.

- Esteller, M. (2006). "CpG island methylation and histone modifications: biology and clinical significance." *Ernst Schering Res Found Workshop*(57): 115-126.

- Farah, C. S. and F. C. Reinach (1995). "The troponin complex and regulation of muscle contraction." *FASEB J* 9(9): 755-767.

- Feldman, N., A. Gerson, J. Fang, E. Li, Y. Zhang, Y. Shinkai, H. Cedar and Y. Bergman (2006). "G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis." *Nat Cell Biol* 8(2): 188-194.

- Feng, B., J. Jiang, P. Kraus, J. H. Ng, J. C. Heng, Y. S. Chan, L. P. Yaw, W. Zhang, Y. H. Loh, J. Han, V. B. Vega, V. Cacheux-Rataboul, B. Lim, T. Lufkin and H. H. Ng (2009). "Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb." *Nat Cell Biol* 11(2): 197-203.

- Ferroni, L., C. Gardin, I. Tocco, R. Epis, A. Casadei, V. Vindigni, G. Mucci and B. Zavan (2013). "Potential for neural differentiation of mesenchymal stem cells." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 129: 89-115.

- Fouse, S. D., Y. Shen, M. Pellegrini, S. Cole, A. Meissner, L. Van Neste, R. Jaenisch and G. Fan (2008). "Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation." *Cell Stem Cell* 2(2): 160-169.

-
- Freberg, C. T., J. A. Dahl, S. Timoskainen and P. Collas (2007). "Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract." *Mol Biol Cell* 18(5): 1543-1553.

 - Frommer, M., L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy and C. L. Paul (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(5): 1827-1831.

 - Gao, Y., X. Wang, J. Han, Z. Xiao, B. Chen, G. Su and J. Dai (2010). "The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B." *J Genet Genomics* 37(7): 461-465.

 - Garcia-Manero, G. and J. P. Issa (2005). "Histone deacetylase inhibitors: a review of their clinical status as antineoplastic agents." *Cancer Invest* 23(7): 635-642.

 - Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz - ESchG), <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/eschg/gesamt.pdf>

 - Ghoshal, K., J. Datta, S. Majumder, S. Bai, H. Kutay, T. Motiwala and S. T. Jacob (2005). "5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal." *Mol Cell Biol* 25(11): 4727-4741.

 - Ghoshal, K., J. Datta, S. Majumder, S. Bai, X. Dong, M. Parthun and S. T. Jacob (2002). "Inhibitors of histone deacetylase and DNA methyltransferase synergistically activate the methylated metallothionein I promoter by activating the transcription factor MTF-1 and forming an open chromatin structure." *Mol Cell Biol* 22(23): 8302-8319.

 - Goldstein, S. (1990). "Replicative senescence: the human fibroblast comes of age." *Science* 249(4973): 1129-1133.

 - Goll, M. G., F. Kirpekar, K. A. Maggert, J. A. Yoder, C. L. Hsieh, X. Zhang, K. G. Golic, S. E. Jacobsen and T. H. Bestor (2006). "Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2." *Science* 311(5759): 395-398.

 - Gonzalo, S., I. Jaco, M. F. Fraga, T. Chen, E. Li, M. Esteller and M. A. Blasco (2006). "DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells." *Nat Cell Biol* 8(4): 416-424.

 - Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." *Cell* 43(2 Pt 1): 405-413.

-
- Greschat, S., J. Schira, P. Kury, C. Rosenbaum, M. A. de Souza Silva, G. Kogler, P. Wernet and H. W. Muller (2008). "Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype." *Stem Cells Dev* 17(2): 221-232.
 - Gurdon, J. B. (1964). "The transplantation of living cell nuclei." *Adv Morphog* 4: 1-43.
 - Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* 345(6274): 458-460.
 - Hastie, N. D., M. Dempster, M. G. Dunlop, A. M. Thompson, D. K. Green and R. C. Allshire (1990). "Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing." *Nature* 346(6287): 866-868.
 - Hayflick, L. (1965). "the limited in vitro lifetime of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* 37: 614-636.
 - Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* 25: 585-621.
 - Haynes, William M., ed. (2011). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (92nd ed.). CRC Press. pp. 5–94 to 5–98. ISBN 1439855110.
 - Heng, J. C., Y. L. Orlov and H. H. Ng (2010). "Transcription factors for the modulation of pluripotency and reprogramming." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75: 237-244.
 - Henning, R. J., J. Aufman, M. Shariff, D. Sawmiller, V. DeLostia, P. Sanberg and M. Morgan (2010). "Human umbilical cord blood mononuclear cells decrease fibrosis and increase cardiac function in cardiomyopathy." *Regen Med* 5(1): 45-54.
 - Herbert, B., A. E. Pitts, S. I. Baker, S. E. Hamilton, W. E. Wright, J. W. Shay and D. R. Corey (1999). "Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14276-14281.
 - Herman, J. G., J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin and S. B. Baylin (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9821-9826.
 - Hipfner, D. R. and S. M. Cohen (2004). "Connecting proliferation and apoptosis in development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10): 805-815.
 - Hochedlinger, K. and R. Jaenisch (2002). "Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice." *Curr Opin Cell Biol* 14(6): 741-748.

- Hollenbach, P. W., A. N. Nguyen, H. Brady, M. Williams, Y. Ning, N. Richard, L. Krushel, S. L. Aukerman, C. Heise and K. J. MacBeth (2010). "A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines." *PLoS One* 5(2): e9001.

- Horikawa, I., P. L. Cable, C. Afshari and J. C. Barrett (1999). "Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene." *Cancer Res* 59(4): 826-830.

- Hoyte, D. A. (1960). "Alizarin as an indicator of bone growth." *J Anat* 94: 432-442.

- Hsieh, C. L. (1999). "In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b." *Mol Cell Biol* 19(12): 8211-8218.

- Hu, B. Y., Z. W. Du and S. C. Zhang (2009). "Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells." *Nat Protoc* 4(11): 1614-1622.

- Huang, J., F. Wang, M. Okuka, N. Liu, G. Ji, X. Ye, B. Zuo, M. Li, P. Liang, W. W. Ge, J. C. Tsibris, D. L. Keefe and L. Liu (2011). "Association of telomere length with authentic pluripotency of ES/iPS cells." *Cell Res* 21(5): 779-792.

- Inoue, H. and S. Yamanaka (2011). "The use of induced pluripotent stem cells in drug development." *Clin Pharmacol Ther* 89(5): 655-661.

- Jaenisch, R., K. Hochedlinger, R. Blueloch, Y. Yamada, K. Baldwin and K. Eggan (2004). "Nuclear cloning, epigenetic reprogramming, and cellular differentiation." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69: 19-27.

- Jeltsch, A., W. Nellen and F. Lyko (2006). "Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases." *Trends Biochem Sci* 31(6): 306-308.

- Jones, A. and H. Wang (2010). "Polycomb repressive complex 2 in embryonic stem cells: an overview." *Protein Cell* 1(12): 1056-1062.

- Jones, P. A. and S. M. Taylor (1980). "Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation." *Cell* 20(1): 85-93.

- Juttermann, R., E. Li and R. Jaenisch (1994). "Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25): 11797-11801.

-
- Kass, S. U., N. Landsberger and A. P. Wolffe (1997). "DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation." *Curr Biol* 7(3): 157-165.
 - Kiefer, J. C. (2007). "Epigenetics in development." *Dev Dyn* 236(4): 1144-1156
 - Kim, J. B., B. Greber, M. J. Arauzo-Bravo, J. Meyer, K. I. Park, H. Zaehres and H. R. Scholer (2009). "Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4." *Nature* 461(7264): 649-643.
 - Kim, N. W., M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich and J. W. Shay (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." *Science* 266(5193): 2011-2015.
 - Kimura, H., M. Tada, N. Nakatsuji and T. Tada (2004). "Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells." *Mol Cell Biol* 24(13): 5710-5720.
 - Kluth, S. M., A. Buchheiser, A. P. Houben, S. Geyh, T. Krenz, T. F. Radke, C. Wiek, H. Hanenberg, P. Reinecke, P. Wernet and G. Kogler (2010). "DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood." *Stem Cells Dev* 19(10): 1471-1483.
 - Koche, R. P., Z. D. Smith, M. Adli, H. Gu, M. Ku, A. Gnirke, B. E. Bernstein and A. Meissner (2011). "Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling." *Cell Stem Cell* 8(1): 96-105.
 - Kogler, G., et al. (2004). "A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential." *J Exp Med* 200(2): 123-135.
 - Kogler, G., S. Sensken, J. A. Airey, T. Trapp, M. Muschen, N. Feldhahn, S. Liedtke, R. V. Sorg, J. Fischer, C. Rosenbaum, S. Greschat, A. Knipper, J. Bender, O. Degistirici, J. Gao, A. I. Caplan, E. J. Colletti, G. Almeida-Porada, H. W. Muller, E. Zanjani and P. Wernet (2004). "A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential." *J Exp Med* 200(2): 123-135.
 - Kouzarides, T. (2007). "SnapShot: Histone-modifying enzymes." *Cell* 131(4): 822.
 - Kucharski, R., J. Maleszka, S. Foret and R. Maleszka (2008). "Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation." *Science* 319(5871): 1827-1830.
 - Reik, W. (2007). "Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development." *Nature* 447(7143): 425-432.

-
- kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R. (2008): Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319: 1827–1830.
 - Kurz, D. J., S. Decary, Y. Hong and J. D. Erusalimsky (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." *J Cell Sci* **113** (Pt **20**): 3613-3622.
 - Kuzmichev, A., T. Jenuwein, P. Tempst and D. Reinberg (2004). "Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3." *Mol Cell* 14(2): 183-193.
 - Laird, P. W. and R. Jaenisch (1994). "DNA methylation and cancer." *Hum Mol Genet* 3 Spec No: 1487-1495.
 - Landry, C. F., G. O. Ivy and I. R. Brown (1990). "Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in the rat brain analyzed by in situ hybridization." *J Neurosci Res* **25**(2): 194-203.
 - Lee, J. H., S. R. Hart and D. G. Skalnik (2004). "Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation." *Genesis* 38(1): 32-38.
 - Lei, H., S. P. Oh, M. Okano, R. Juttermann, K. A. Goss, R. Jaenisch and E. Li (1996). "De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells." *Development* **122**(10): 3195-3205.
 - Li, E. (2002). "Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development." *Nat Rev Genet* 3(9): 662-673.
 - Li, E., T. H. Bestor and R. Jaenisch (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." *Cell* 69(6): 915-926.
 - Liedtke, S., J. Enczmann, S. Waclawczyk, P. Wernet and G. Kogler (2007). "Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research." *Cell Stem Cell* 1(4): 364-366.
 - Lindsey, J., N. I. McGill, L. A. Lindsey, D. K. Green and H. J. Cooke (1991). "In vivo loss of telomeric repeats with age in humans." *Mutat Res* 256(1): 45-48.
 - Liu, L., S. M. Bailey, M. Okuka, P. Munoz, C. Li, L. Zhou, C. Wu, E. Czerwiec, L. Sandler, A. Seyfang, M. A. Blasco and D. L. Keefe (2007). "Telomere lengthening early in development." *Nat Cell Biol* 9(12): 1436-1441.
 - Loh, K. M. and B. Lim (2011). "A precarious balance: pluripotency factors as lineage specifiers." *Cell Stem Cell* 8(4): 363-369.

- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Lund, A. H. and M. van Lohuizen (2004). "Polycomb complexes and silencing mechanisms." *Curr Opin Cell Biol* 16(3): 239-246.

- Lunyak, V. V. and M. G. Rosenfeld (2008). "Epigenetic regulation of stem cell fate." *Hum Mol Genet* 17(R1): R28-36.

- Lyssiotis, C. A., R. K. Foreman, J. Staerk, M. Garcia, D. Mathur, S. Markoulaki, J. Hanna, L. L. Lairson, B. D. Charette, L. C. Bouchez, M. Bollong, C. Kunick, A. Brinker, C. Y. Cho, P. G. Schultz and R. Jaenisch (2009). "Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(22): 8912-8917.

- Maherali, N., R. Sridharan, W. Xie, J. Utikal, S. Eminli, K. Arnold, M. Stadtfeld, R. Yachechko, J. Tchieu, R. Jaenisch, K. Plath and K. Hochedlinger (2007). "Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution." *Cell Stem Cell* 1(1): 55-70.

- Makino, S., K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi, H. Kodama, J. Pan, M. Sano, T. Takahashi, S. Hori, H. Abe, J. Hata, A. Umezawa and S. Ogawa (1999). "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro." *J Clin Invest* 103(5): 697-705.

- Mali, P., B. K. Chou, J. Yen, Z. Ye, J. Zou, S. Dowey, R. A. Brodsky, J. E. Ohm, W. Yu, S. B. Baylin, K. Yusa, A. Bradley, D. J. Meyers, C. Mukherjee, P. A. Cole and L. Cheng (2010). "Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes." *Stem Cells* 28(4): 713-720.

- Marks, P. A., V. M. Richon, T. Miller and W. K. Kelly (2004). "Histone deacetylase inhibitors." *Adv Cancer Res* 91: 137-168.

- Masui, S., Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A. A. Sharov, M. S. Ko and H. Niwa (2007). "Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells." *Nat Cell Biol* 9(6): 625-635.

- Mattout, A., A. Biran and E. Meshorer (2011). "Global epigenetic changes during somatic cell reprogramming to iPS cells." *J Mol Cell Biol* 3(6): 341-350.

- Meissner, A. (2010). "Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells." *Nat Biotechnol* 28(10): 1079-1088.

- Meng, F., G. Sun, M. Zhong, Y. Yu and M. A. Brewer (2013). "Inhibition of DNA methyltransferases, histone deacetylases and lysine-specific demethylase-1 suppresses the tumorigenicity of the ovarian cancer ascites cell line SKOV3." *Int J Oncol* 43(2): 495-502.
- Migliori, V., S. Phalke, M. Bezzi and E. Guccione (2010). "Arginine/lysine-methyl/methyl switches: biochemical role of histone arginine methylation in transcriptional regulation." *Epigenomics* 2(1): 119-13.
- Mikkelsen, T. S., J. Hanna, X. Zhang, M. Ku, M. Wernig, P. Schorderet, B. E. Bernstein, R. Jaenisch, E. S. Lander and A. Meissner (2008). "Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis." *Nature* 454(7200): 49-55.
- Miller, T. A., D. J. Witter and S. Belvedere (2003). "Histone deacetylase inhibitors." *J Med Chem* 46(24): 5097-5116.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda and S. Yamanaka (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." *Cell* 113(5): 631-642.
- Miyazaki, S., H. Yamamoto, N. Miyoshi, H. Takahashi, Y. Suzuki, N. Haraguchi, H. Ishii, Y. Doki and M. Mori (2012). "Emerging methods for preparing iPS cells." *Jpn J Clin Oncol* 42(9): 773-779.
- Momparler, R. L. and J. Goodman (1977). "In vitro cytotoxic and biochemical effects of 5-aza-2'-deoxycytidine." *Cancer Res* 37(6): 1636-1639.
- Moretto-Zita, M., H. Jin, Z. Shen, T. Zhao, S. P. Briggs and Y. Xu (2010). "Phosphorylation stabilizes Nanog by promoting its interaction with Pin1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(30): 13312-13317.
- Ng, H. H. and A. Bird (1999). "DNA methylation and chromatin modification." *Curr Opin Genet Dev* 9(2): 158-163.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer and A. Smith (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." *Cell* 95(3): 379-391.
- Nightingale, K. P., S. Gendreizig, D. A. White, C. Bradbury, F. Hollfelder and B. M. Turner (2007). "Cross-talk between histone modifications in response to histone deacetylase inhibitors: MLL4 links histone H3 acetylation and histone H3K4 methylation." *J Biol Chem* 282(7): 4408-4416.

- Nishiyama, N., S. Miyoshi, N. Hida, T. Uyama, K. Okamoto, Y. Ikegami, K. Miyado, K. Segawa, M. Terai, M. Sakamoto, S. Ogawa and A. Umezawa (2007). "The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro." *Stem Cells* 25(8): 2017-2024.

- Notari, R. E. and J. L. DeYoung (1975). "Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions." *J Pharm Sci* 64(7): 1148-1157.

- O'Callaghan, N. J. and M. Fenech (2011). "A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length." *Biol Proced Online* 13: 3.

- Oka, M., A. M. Meacham, T. Hamazaki, N. Rodic, L. J. Chang and N. Terada (2005). "De novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b primarily mediate the cytotoxic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine." *Oncogene* 24(19): 3091-3099.

- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber and E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* 99(3): 247-257.

- Okano, M., S. Xie and E. Li (1998). "Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells." *Nucleic Acids Res* 26(11): 2536-2540.

- Okita, K., T. Ichisaka and S. Yamanaka (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." *Nature* 448(7151): 313-317.

- Okumura-Nakanishi, S., M. Saito, H. Niwa and F. Ishikawa (2005). "Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells." *J Biol Chem* 280(7): 5307-5317.

- Olovnikov, A. M. (1973). "A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon." *J Theor Biol* 41(1): 181-190.

- Orkin, S. H., J. Wang, J. Kim, J. Chu, S. Rao, T. W. Theunissen, X. Shen and D. N. Levasseur (2008). "The transcriptional network controlling pluripotency in ES cells." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 195-202.

- Pan, G. J., Z. Y. Chang, H. R. Scholer and D. Pei (2002). "Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4." *Cell Res* 12(5-6): 321-329.

- Pan, G. and J. A. Thomson (2007). "Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency." *Cell Res* 17(1): 42-49.

-
- Patra, S. K. and S. Bettuzzi (2009). "Epigenetic DNA-(cytosine-5-carbon) modifications: 5-aza-2'-deoxycytidine and DNA-demethylation." *Biochemistry (Mosc)* 74(6): 613-619.
 - Payer, B. and J. T. Lee (2008). "X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance." *Annu Rev Genet* 42: 733-772.
 - Perrier, A. L., V. Tabar, T. Barberi, M. E. Rubio, J. Bruses, N. Topf, N. L. Harrison and L. Studer (2004). "Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34): 12543-12548.
 - Peterson, C. L. and J. Cote (2004). "Cellular machineries for chromosomal DNA repair." *Genes Dev* 18(6): 602-616.
 - Phinney, D. G. (2012). "Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy." *J Cell Biochem* 113(9): 2806-2812.
 - Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284(5411): 143-147.
 - Poliard, A., A. Nifuji, D. Lamblin, E. Plee, C. Forest and O. Kellermann (1995). "Controlled conversion of an immortalized mesodermal progenitor cell towards osteogenic, chondrogenic, or adipogenic pathways." *J Cell Biol* 130(6): 1461-1472.
 - Polo, J. M., E. Anderssen, R. M. Walsh, B. A. Schwarz, C. M. Nefzger, S. M. Lim, M. Borkent, E. Apostolou, S. Alaei, J. Cloutier, O. Bar-Nur, S. Cheloufi, M. Stadtfeld, M. E. Figueroa, D. Robinton, S. Natesan, A. Melnick, J. Zhu, S. Ramaswamy and K. Hochedlinger (2012). "A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells." *Cell* 151(7): 1617-1632.
 - Pradhan, S., A. Bacolla, R. D. Wells and R. J. Roberts (1999). "Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation." *J Biol Chem* 274(46): 33002-33010.
 - Proescher, F., E. M. Zapata and N. J. Mc (1946). "A rapid method of staining frozen sections of tissue for immediate diagnosis." *Am J Clin Pathol* 10: 50-52.
 - Qian, D. Z., M. Ren, Y. Wei, X. Wang, F. van de Geijn, C. Rasmussen, O. Nakanishi, N. Sacchi and R. Pili (2005). "In vivo imaging of retinoic acid receptor beta2 transcriptional activation by the histone deacetylase inhibitor MS-275 in retinoid-resistant prostate cancer cells." *Prostate* 64(1): 20-28.

- Ramirez-Zacarias, J. L., F. Castro-Munozledo and W. Kuri-Harcuch (1992). "Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O." *Histochemistry* 97(6): 493-497.
- Reik, W., W. Dean and J. Walter (2001). "Epigenetic reprogramming in mammalian development." *Science* 293(5532): 1089-1093.
- Robertson, K. D. and P. A. Jones (2000). "DNA methylation: past, present and future directions." *Carcinogenesis* 21(3): 461-467.
- Rodda, D. J., J. L. Chew, L. H. Lim, Y. H. Loh, B. Wang, H. H. Ng and P. Robson (2005). "Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2." *J Biol Chem* 280(26): 24731-24737.
- Rodenhiser, D. and M. Mann (2006). "Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications." *CMAJ* 174(3): 341-348.
- Rogstad, D. K., J. L. Herring, J. A. Theruvathu, A. Burdzy, C. C. Perry, J. W. Neidigh and L. C. Sowers (2009). "Chemical decomposition of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine): kinetic analyses and identification of products by NMR, HPLC, and mass spectrometry." *Chem Res Toxicol* 22(6): 1194-1204.
- Santi, D. V., A. Norment and C. E. Garrett (1984). "Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(22): 6993-6997.
- Santourlidis, S., P. Wernet, F. Ghanjati, N. Graffmann, J. Springer, C. Kriegs, X. Zhao, J. Brands, M. J. Arauzo-Bravo, R. Neves, G. Koegler and M. Uhrberg (2011). "Unrestricted somatic stem cells (USSC) from human umbilical cord blood display uncommitted epigenetic signatures of the major stem cell pluripotency genes." *Stem Cell Res* 6(1): 60-69.
- Schmittwolf, C., N. Kirchhof, A. Jauch, M. Durr, F. Harder, M. Zenke and A. M. Muller (2005). "In vivo haematopoietic activity is induced in neurosphere cells by chromatin-modifying agents." *EMBO J* 24(3): 554-566.
- Scholer, H. R. (2008). "Commentary: highlight on stem cell research." *Biol Chem* 389(7): 789.
- Scholer, H. R. (2008). "Commentary: highlight on stem cell research." *Biol Chem* 389(7): 789.

- Shafiee, A., E. Seyedjafari, M. Soleimani, N. Ahmadbeigi, P. Dinarvand and N. Ghaemi (2011). "A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue." *Biotechnol Lett* 33(6): 1257-1264.
- Shay, J. W. and W. E. Wright (1996). "Telomerase activity in human cancer." *Curr Opin Oncol* 8(1): 66-71.
- Shi, Y., C. Despons, J. T. Do, H. S. Hahm, H. R. Scholer and S. Ding (2008). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds." *Cell Stem Cell* 3(5): 568-574.
- Shiota, K., Y. Kogo, J. Ohgane, T. Imamura, A. Urano, K. Nishino, S. Tanaka and N. Hattori (2002). "Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice." *Genes Cells* 7(9): 961-969.
- Sikorska, M., J. K. Sandhu, P. Deb-Rinker, A. Jezierski, J. Leblanc, C. Charlebois, M. Ribocco-Lutkiewicz, M. Bani-Yaghoob and P. R. Walker (2008). "Epigenetic modifications of SOX2 enhancers, SRR1 and SRR2, correlate with in vitro neural differentiation." *J Neurosci Res* 86(8): 1680-1693.
- Smas, C. M. and H. S. Sul (1996). "Characterization of Pref-1 and its inhibitory role in adipocyte differentiation." *Int J Obes Relat Metab Disord* 20 Suppl 3: S65-72.
- Smith, J. R. and O. M. Pereira-Smith (1996). "Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression." *Science* 273(5271): 63-67.
- Smith, L. J. and E. A. McCulloch (1984). "Lineage infidelity following exposure of T lymphoblasts (MOLT-3 cells) to 5-azacytidine." *Blood* 63(6): 1324-1330.
- Song, W. and D. B. Zimmer (1996). "Expression of the rat S100A1 gene in neurons, glia, and skeletal muscle." *Brain Res* 721(1-2): 204-216.
- Sorm, F., A. Piskala, A. Cihak and J. Vesely (1964). "5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic." *Experientia* 20(4): 202-203.
- Sridharan, R., J. Tchieu, M. J. Mason, R. Yachechko, E. Kuoy, S. Horvath, Q. Zhou and K. Plath (2009). "Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency." *Cell* 136(2): 364-377.
- Stadtfeld, M., N. Maherali, D. T. Breault and K. Hochedlinger (2008). "Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse." *Cell Stem Cell* 2(3): 230-240.

- Stellungnahme der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Stammzellforschung in Deutschland Möglichkeiten und Perspektiven, Oktober 2006.
- Sternecker, J., S. Hoing and H. R. Scholer (2012). "Concise review: Oct4 and more: the reprogramming expressway." *Stem Cells* 30(1): 15-21.
- Stewart, C. L., H. Stuhlmann, D. Jahner and R. Jaenisch (1982). "De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(13): 4098-4102.
- Stresemann, C. and F. Lyko (2008). "Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine." *Int J Cancer* 123(1): 8-13.
- Stresemann, C., B. Brueckner, T. Musch, H. Stopper and F. Lyko (2006). "Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines." *Cancer Res* 66(5): 2794-2800.
- Sugita, K., K. Koizumi and H. Yoshida (1992). "Morphological reversion of sis-transformed NIH3T3 cells by trichostatin A." *Cancer Res* 52(1): 168-172.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* 126(4): 663-676.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* 131(5): 861-872.
- Teperek-Tkacz, M., V. Pasque, G. Gentsch and A. C. Ferguson-Smith (2011). "Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation?" *Reproduction* 142(5): 621-632.
- *The Strategy of the Genes*. by Allen and Unwin, 1957)
- Thomson, J. A. and J. S. Odorico (2000). "Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines." *Trends Biotechnol* 18(2): 53-57.
- Thomson, J. A. and J. S. Odorico (2000). "Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines." *Trends Biotechnol* 18(2): 53-57.
- Thomson, J. A., et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* 282(5391): 1145-1147.

- Vire, E., C. Brenner, R. Deplus, L. Blanchon, M. Fraga, C. Didelot, L. Morey, A. Van Eynde, D. Bernard, J. M. Vanderwinden, M. Bollen, M. Esteller, L. Di Croce, Y. de Launoit and F. Fuks (2006). "The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation." *Nature* 439(7078): 871-874.
- Wakitani, S., T. Saito and A. I. Caplan (1995). "Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine." *Muscle Nerve* 18(12): 1417-1426.
- Wang, J., S. Rao, J. Chu, X. Shen, D. N. Levasseur, T. W. Theunissen and S. H. Orkin (2006). "A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells." *Nature* 444(7117): 364-368.
- Wang, X. and J. Dai (2010). "Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology." *Stem Cells* 28(5): 885-893.
- Wang, X., Y. Zhao, Z. Xiao, B. Chen, Z. Wei, B. Wang, J. Zhang, J. Han, Y. Gao, L. Li, H. Zhao, W. Zhao, H. Lin and J. Dai (2009). "Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response." *Stem Cells* 27(6): 1265-1275.
- Wang, Y., K. A. Kim, J. H. Kim and H. S. Sul (2006). "Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis." *J Nutr* 136(12): 2953-2956.
- Wardi, A. H. and W. S. Allen (1972). "Alcian blue staining of glycoproteins." *Anal Biochem* 48(2): 621-623.
- Watanabe, A., Y. Yamada and S. Yamanaka (2013). "Epigenetic regulation in pluripotent stem cells: a key to breaking the epigenetic barrier." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1609): 20120292.
- Wegner, M. and C. C. Stolt (2005). "From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development." *Trends Neurosci* 28(11): 583-588.
- Wu, S. C. and Y. Zhang (2010). "Active DNA demethylation: many roads lead to Rome." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(9): 607-620.
- Xu, W., X. Zhang, H. Qian, W. Zhu, X. Sun, J. Hu, H. Zhou and Y. Chen (2004). "Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro." *Exp Biol Med* (Maywood) 229(7): 623-631.
- Yamanaka, S. (2008). "Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors." *Cell Prolif* 41 Suppl 1: 51-56.

- Yee, J. (2010) Turning Somatic Cells into Pluripotent Stem Cells. *Nature Education* 3(9):25

- Yamashita, N., E. C. Ilg, B. W. Schafer, C. W. Heizmann and T. Kosaka (1999). "Distribution of a specific calcium-binding protein of the S100 protein family, S100A6 (calcyclin), in subpopulations of neurons and glial cells of the adult rat nervous system." *J Comp Neurol* **404**(2): 235-257.

- Yeom, Y. I., G. Fuhrmann, C. E. Ovitt, A. Brehm, K. Ohbo, M. Gross, K. Hubner and H. R. Scholer (1996). "Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells." *Development* 122(3): 881-894.

- Yoder, J. A. and T. H. Bestor (1998). "A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast." *Hum Mol Genet* 7(2): 279-284.

- Yokochi, T. and K. D. Robertson (2002). "Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a." *J Biol Chem* 277(14): 11735-11745.

- Yoshida, M., M. Kijima, M. Akita and T. Beppu (1990). "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A." *J Biol Chem* 265(28): 17174-17179.

- Yoshimizu, T., N. Sugiyama, M. De Felice, Y. I. Yeom, K. Ohbo, K. Masuko, M. Obinata, K. Abe, H. R. Scholer and Y. Matsui (1999). "Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice." *Dev Growth Differ* 41(6): 675-684.

- Zernik, J., K. Twarog and W. B. Upholt (1990). "Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible." *Differentiation* 44(3): 207-215.

- Zhang, L. L. and J. X. Wu (2006). "[DNA methylation: an epigenetic mechanism for tumorigenesis]." *Yi Chuan* 28(7): 880-885.

- Zwi-Dantsis, L. and L. Gepstein (2012). "Induced pluripotent stem cells for cardiac repair." *Cell Mol Life Sci* 69(19): 3285-3299.

7. Abkürzungsverzeichnis

- °C Grad Celsius
- 5-Aza-dC Aza-2'-deoxycytidin
- Abb Abbildung
- amp Ampicillin
- AS Aminosäure
- BAH bromo-adjacent homology domain
- bp Basenpaar(e)
- bzw. beziehungsweise
- ca. Circa
- CD Cluster of Differentiation
- cDNA Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
- CXXC cystein-reich Domäne
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- DNMT DNA Methyltransferasen
- dNTP 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
- *E.coli* Escherichia coli
- EGFP Enhanced Green Fluorescent Protein
- EtBr Ethidium Bromid
- FACS fluorescence activated cell sorting
- FCS Fötale Kälber-Serum
- FITC Fluoreszeinisothiocyanat
- GFP Green Fluorescent Protein
- h Stunde
- HDAC Histon-Deacetylasen
- hESC humane embryonale Stammzellen
- hESC: humane embryonale Stammzellen
- HLA Human Leukocyte Antigen
- HMG High mobility group
- HOX homeobox domain
- ICM Innere Zellmasse

- IL Interleukin
- iPS induced pluripotent stem cells
- k Kontrolle
- kDa Kilodalton
- kb Kilobase(n)
- l Liter
- LB LB-Medium
- M Molar (Mol pro Liter)
- min Minute(n)
- MSC Mesenchymalen Stammzellen
- MSPCR Methylierungsspezifischen PCR
- NLS nuclear localisation signal
- PCNA Proliferating Cell Nuclear Antigen- Interacting Domains
- PCR polymerase chain reaction (= Polymerase-Kettenreaktion)
- RNA Ribonukleinsäure
- rpm rounds per minute (= Umdrehungen pro Minute)
- RT Raumtemperatur
- RT-PCR Reverse Transkriptions-PCR
- s Sekunde(n)
- SpheUSSC Sphäroiden-USSC
- T Temperatur
- Tab. Tabelle
- *tet-System* tetracyclin-System
- TFs Transkriptionsfaktoren
- TSA Trichostatin A
- USSC unrestricted somatic stem cells

8. Danksagung

Für meine Dissertationsarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank.

Besonders möchte ich mich bei PD Dr. Simeon Santourlidis bedanken, denn er brachte mir sehr viel Geduld entgegen und sorgte mit intensiver Betreuung sowie durch sein Fachwissen, seine konstruktive Kritik und seine vielen kreativen Ideen für das Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Frank Wunderlich danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Frau Silke Spudeit möchte ich danken für die tolle Unterstützung bei den Zellkulturarbeiten und den molekularbiologischen Arbeiten.

Dank an Prof. Dr. med. Wernet für die finanzielle Unterstützung der Arbeit, Prof. Dr. G. Kögler, für die Bereitstellung der USSC.

Dr. Holm Zähres danke ich für die Bereitstellung der hoch spezifischen Antikörper.

Dr. Zhaoping Ding möchte ich danken für seine Unterstützung bei der Kardiodifferenzierung der SpheUSSC.

Bei den allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Epigenetik Santourlidis möchte mich besonders bedanken.

Allen Kollegen und Mitarbeitern des ITZ möchte ich für ihre Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit danken.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, Rabiha und Mokhtar, und meiner Familie danken, die mir das Studium ermöglicht haben.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Düsseldorf, den