

Aus dem Institut für Virologie und Zellbiologie der  
Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. N. Tautz

**Variabilität induziert pluripotenter  
Stammzellen im Hinblick auf  
Differenzierungspotential und  
epigenetische Modifikation**

Inauguraldissertation zur Erlangung der  
Doktorwürde der  
Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von  
Annalice Gode  
aus Crivitz in Mecklenburg

Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Rohwedel

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Katja Lohmann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2020

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 25.11.2020

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

In Memoriam K. F. K. Urbinger

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Stammzellen - Ihr Potential für die Medizin	5
1.2. Von der embryonalen Stammzelle zur induzierten Pluripotenz	6
1.3. iPS- Zellen vs. ES- Zellen: Gleichwertig oder Kompromiss?	9
1.4. Vergleich der iPS- und ES- Zellen auf genomischer Ebene	10
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>13</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1. Geräte	14
3.2. KITS	15
3.3. Materialien	16
3.4. Medien und Substanzen	17
3.5. Zellkultur	22
<i>Allgemeine Techniken der Zellkultivierung</i>	22
<i>Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) und Mitomycin C</i>	
<i>Behandlung zur MEF- Inaktivierung</i>	24
<i>Differenzierung der ES- Zellen</i>	25
<i>Besonderheiten bei der Kultivierung humaner Stammzellen aus Schweißdrüsen (hSGSCs)</i>	28
<i>Besonderheiten bei der Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs)</i>	28
<i>Besonderheiten bei der Kultivierung humaner Fibroblasten (hum. Fibros)</i>	28
3.6. Histochemische Färbungen und Molekulargenetische Methoden	29
<i>Alcianblau-Färbung und quantitative Messung</i>	29
<i>Immunfluoreszenzfärbung</i>	29
3.7. Molekulargenetische Methoden	30
<i>RNA- Isolation</i>	30
<i>Reverse Transkription und Polymerase- Ketten- Reaktion zum Nachweis der Kollagen- Expression</i>	30
<i>Plasmidklonierung</i>	31
3.8. Reprogrammierungsmethoden	34
<i>Transfektion</i>	34
<i>Elektroporation</i>	36
<i>Elektroporation mit NEPA21</i>	37
<i>Elektroporation und Kontrolle mittels FACS Analyse</i>	38
<i>Transfektion mit X-treme Gene</i>	38
<i>Transfektion unter Zugabe von mi- RNA</i>	39
<i>LDH-Test</i>	40

<i>Kombination Elektroporation, Transfektion und LDH- Test</i>	41
<i>Vergleich verschiedener Zelllinien</i>	42
<b>3.9. Bi-Sulfit-Konvertierung, Klonierung und Sequenzierung</b>	<b>43</b>
<i>Auswahl der Primer für die einzelnen zu untersuchenden Genabschnitte</i>	44
<i>Optimierung der Annealing Temperatur für die PCR</i>	48
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>54</b>
<b>4.1. Transfektionseffizienz</b>	<b>54</b>
<i>Transfektion von humanen Fibroblasten mittels STEMcircle™ durch Elektroporation, Xtreme Gene und mi- RNA Behandlung</i>	54
<i>Transfektion von murinen Fibroblasten mittels Elektroporation, X-treme Gene und mi- RNA Behandlung</i>	58
<i>Transfektion von humanen Fibroblasten mit Xtreme Gene und mi- RNA Behandlung ohne vorherige Elektroporation</i>	59
<i>Transfektion von humanen Fibroblasten und Messung der Zytotoxizität mittels LDH- Test</i>	60
<i>Elektroporation mit dem NAPA GEN 21 Elektroporator</i>	64
<i>Elektroporation humaner Fibroblasten im Vergleich zu humanen mesenchymalen Stammzellen</i>	65
<b>4.2. Differenzierung von embryonalen Stammzellen im Vergleich zu iPS- Zellen</b>	<b>66</b>
<i>Kardiogene Differenzierung von ES- und iPS- Zellen</i>	66
<i>Chondrogene Differenzierung von ES- und iPS- Zellen</i>	68
<b>4.3. Methylierungsanalyse von OCT-4 und Sox-2</b>	<b>72</b>
<i>Klonierung und Testrestriktion</i>	73
<i>Sequenzierung</i>	75
<b>5. Diskussion</b>	<b>78</b>
<b>5.1. Reprogrammierungsmöglichkeiten</b>	<b>78</b>
<b>5.2. Unterschiede in der myogenen und chondrogenen Entwicklung</b>	<b>81</b>
<b>5.3. Aussagen des Methylierungsgrades in Bezug auf DNA- Stabilität: Stammzellen versus iPS- Zellen</b>	<b>84</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>92</b>
<b>8.1. Tabellen zur Gesichtsfeldauszählung</b>	<b>92</b>
<b>8.2. Genabschnitte mit Primern nach Bisulfitkonversion</b>	<b>100</b>
<b>8.3. Sequenzierungsergebnis Oct-4, Nanog und Sox-2 forward und reverse</b>	<b>112</b>

8.4.	Sequenzierungsergebnis Zusammenfassung	114
9.	<b>Danksagungen</b>	<b>116</b>
10.	<b>Lebenslauf</b>	<b>117</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Stammzellen - Ihr Potential für die Medizin

Stammzellen haben die besondere Eigenschaft sich einerseits selbst zu erneuern und andererseits in eine funktionelle Zelle zu differenzieren. Die bei der Zellteilung entstehenden Tochterzellen können entweder weiterhin als Stammzelle verbleiben oder sich ausdifferenzieren. Auf diese Weise kann ein Gewebe oder Organ sich ständig selbst erneuern und reparieren. Viele Organe besitzen einen eigenen Stammzellentyp. So wird mit Hilfe der Stammzellen zum Beispiel Darmepithel und Hautepithel ständig erneuert. Jedoch nicht alle Gewebetypen des menschlichen Organismus besitzen Stammzellen, beispielsweise das Epithel der Netzhaut, was zur Folge hat, dass die Photorezeptoren der Netzhaut unersetzbar sind (Roberts and Vetter, 2018).

In der klinischen Medizin können häufig mesenchymale Stammzellen (MSC's) als Ersatz verwendet werden, welche z. B. aus Fettgewebe bei Liposuctionen oder aus dem Knochenmark durch Beckenkammpunktion gewonnen werden können (Rea and Livingstone, 2018)(Kosinski et al., 2020). Es existieren aber auch europaweite Kryobanken mit Stammzellen, so z.B. auch im Rahmen der deutsch-dänischen Kooperation BONEBANK ("BONEBANK," n.d.). Ziel der Sammlung und Forschung an Stammzellen ist es, sie beispielsweise in der regenerativen Behandlung von Arthrose, Schlaganfällen, Myokardinfarkten und Rückenmarksverletzungen einzusetzen.

Stammzellen können im jeweiligen Gewebe aufgrund ihrer Differenzierungseigenschaften dysfunktionale Zellen durch eigene Differenzierung in diese ersetzen. Damit besitzt das Gewebe einen multifunktionalen Schutzmechanismus. Für Gewebetypen ohne eigene Stammzellen hat der menschliche Organismus eine andere Art der Reparatur zum Schutz als Notreaktion entwickelt: Die fibrotische Zelltransformation. Am Beispiel des Bindegewebes lässt sich dies folgend darstellen. Die Fibroblasten, Knorpel- und Knochenzellen bilden eine Stützstruktur. Diesen Zelltypen ist gemein, dass sie die Extrazellulärmatrix bilden, welche hauptsächlich aus Kollagen Typ I und III besteht. Wird dieser Zell-/ Extrazellularverbund gestört, zum Beispiel durch chemische oder mechanische Verletzung, bilden die Fibrozyten Kollagen um den

Defekt zu reparieren und zu isolieren. Dabei können sie sich in andere Zelltypen differenzieren (Alberts, 2017).

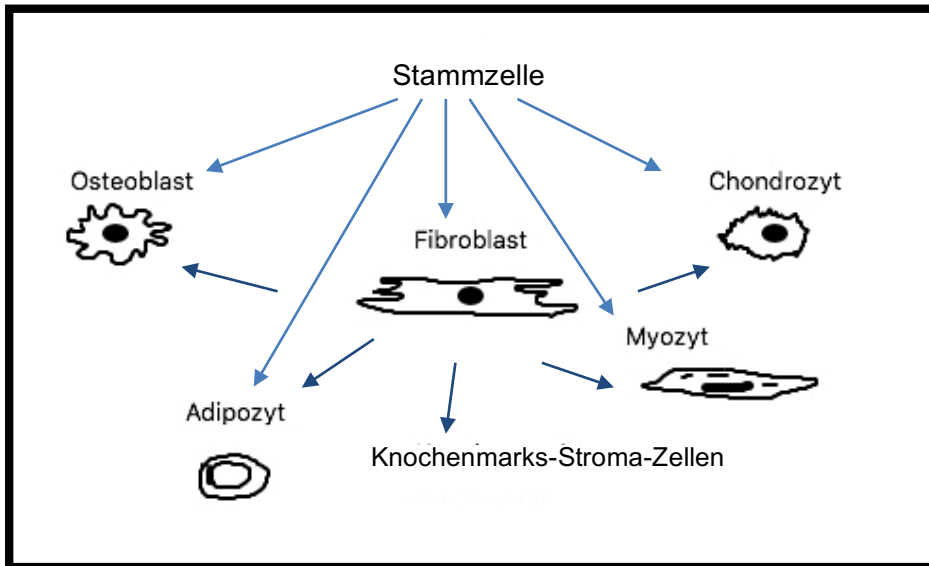


Abb. 1: Differenzierungsmöglichkeiten der Stammzelle und Transformationsmöglichkeiten des Fibroblasten in vivo

## 1.2. Von der embryonalen Stammzelle zur induzierten Pluripotenz

Einige Stammzellen können eine Vielzahl differenzierter Zelltypen bilden. Dabei ist eine totipotente Stammzelle eine Zelle, die sich in jede Art von Gewebe differenzieren kann und einen vollständigen und eigenständigen Organismus bilden kann.

Eine Zelle, die sich in alle Zelltypen des adulten Organismus, abgesehen vom extraembryonalen Gewebe (dem Trophoblasten und die aus ihm entstehende Plazenta), differenzieren kann, ist pluripotent. Pluripotente Zellen sind zum Beispiel die Zellen der inneren Zellmasse einer Blastozyste und die daraus isolierten embryonalen Stammzellen (Alberts, 2017).

Die ersten Untersuchungen mit Beschreibung der embryonalen Stammzellen wurden an Mäuseembryonen vorgenommen, wobei die embryonalen Stammzellen (ES- Zellen) aus der inneren Zellmasse der Blastozyste der Maus gewonnen wurden und gezeigt werden konnte, dass sie sich in alle Zellen der drei Keimblätter und in Keimzellen differenzieren können (Evans and Kaufman, 1981).



Zur Erhaltung der Pluripotenz konnte gezeigt werden, dass entweder die murinen ES-Zellen in Kokultur mit embryonalen Fibroblasten gebracht werden müssen oder der LIF- Faktor („leukemia inhibitory factor“) zum Kultivierungsmedium hinzugegeben werden muss, um eine Zellvermehrung im undifferenzierten Zustand zu ermöglichen (Smith et al., 1988) (Pease et al., 1990).

Bei der Untersuchung der Differenzierung der murinen ES- Zellen konnte nachgewiesen werden, dass diese im Verlauf der Kultivierung dreidimensionale Zellaggregate, sogenannte embryoid bodies (EB's) bilden (Doetschman et al., 1985). Zur Kultivierung dieser eignet sich die Methode der sogenannten „hängenden Tropfen“ (Behringer et al., 2016)(Kibschull, 2017), wie im Material/Methoden-Teil dieser Arbeit beschrieben, hier modifiziert entsprechend einem Protokoll von Wobus et al. aus dem Jahr 1991 (Wobus et al., 1991).

Dieses Zelldifferenzierungssystem kann, nachdem humane embryonale Stammzellen erstmals 1998 etabliert wurden (Thomson et al., 1998), auch im humanen Bereich Verwendung finden. Im weiteren konnte auch gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den murinen ES- Zellen eine Kokultur mit Fibroblasten und/ oder LIF keinen gewünschten Effekt auf die Erhaltung der Pluripotenz hat (Dahéron et al., 2004) (Nakamura et al., 1998).

Die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen unterliegt einer ständigen ethischen Debatte (Lensink et al., 2020), da zu ihrer Gewinnung Embryonen getötet werden müssen. Um diesen Diskurs zu vermeiden, haben in den 2000er Jahren Forscher versucht diesen Weg zu umgehen. Eine besondere Eigenschaft der ES- Zellen ist es, dass sie unbegrenzt proliferieren können, da sie den Verkürzungsprozess der Telomere bei der Teilung durch Expression von Telomerase rückgängig machen können (Cricqui et al., 2020). Auf genetischer Ebene konnte zudem nachgewiesen werden, dass es sogenannte „ES- kritische Gene“ gibt (Qi and Pei, 2007) (Pera, 2008) (Duinsbergen et al., 2008), die für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands essentiell sind. Ein Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor Oct-4. Fehlt er führt dies zum Abbruch der Weiterentwicklung eines Organismus und damit zum Verlust der Stammzellfunktion.

Es wurde die Hypothese aufgestellt und verifiziert, dass der Transfer des Gens Oct-4 in eine differenzierte Zelle und seine Expression zur Reprogrammierung der Zelle in eine Stammzelle führen könnte. „ES- kritische Gene“ wie Oct-4 wurden mittels retroviraler Vektoren in somatische Zellen überführt und induzierten dort die Reprogrammierung. Es gibt eine Reihe weiterer Faktoren, die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Bedeutung sind und deren Expression durch die Reprogrammierungsfaktoren aktiviert wird, wie z.B. das Gen Nanog, dessen Expression laut der Gruppe um Mitsui und Yamanaka unabdingbar für die Pluripotenz in ES- Zellen ist (Mitsui et al., 2003).

Der Forschungsgruppe um Takahashi und Yamanaka gelang es 2006 nach Untersuchung von insgesamt 24 solcher Gene Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS- Zellen) zu reprogrammieren (Takahashi and Yamanaka, 2006). Die Gruppen um Takahashi, Yamanaka, Okita und Wernig et al. konnten außerdem zeigen, dass die Kombination der Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox-2, Klf-4 und c-Myc, die sogenannten OSKM Faktoren, dafür ausreicht (Welstead et al., 2008) (Wernig et al., 2007) (Okita et al., 2007). Im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Pluripotenz einer Zelle gelten diese Gene als Transkriptions- Master- Regulatoren, da Ihre Expression reicht, um die Änderung der Zellidentität auszulösen. Dabei kontrollieren sie ihre eigene Expression durch Bindung an eine Kontrollregion. Yamanaka erhielt für diese Entdeckung 2012 den Nobelpreis für Medizin.

Die erfolgreiche Reprogrammierung von somatischen Zellen eröffnet die Möglichkeit neuer Ansätze zur Gewinnung differenzierter Zellen in der regenerativen Medizin mittels pluripotenter, patienten-spezifischer Zellen, die einen autologen Therapieansatz ermöglichen könnten (Li et al., 2016) (Mungenast et al., 2016) (Sproul, 2015) (Miller et al., 2020). Außerdem wird die ethisch problematische Gewinnung embryonaler Stammzellen umgangen. Ein wichtiger Aspekt bei der Reprogrammierung ist, diese „Entwicklung rückwärts“ in ihrer Methodik zu vereinfachen und die Effizienz zu steigern. Diesem Thema widmet sich der erste Abschnitt dieser Dissertation.

Bisher genutzte Methoden zur Reprogrammierung beinhalten verschiedene Transfektionsverfahren. Transfektion bedeutet dabei das Einbringen von Fremd-DNA, wie z.B. Plasmiden in die Zelle. Die von Yamanaka publizierte Methode der Reprogrammierung mittels retroviraler Vektoren ist vergleichsweise effizient, führt aber in der Regel zur Integration des Transgens in das Ziel- Genom (Stadtfeld and Hochedlinger, 2010). Diesen Nachteil vermeidet die Methode der Reprogrammierung mittels Plasmid- DNA, die aber recht ineffizient ist. Verschiedene Methoden, wie Lipofektion oder Elektroporation (Sharifi Tabar et al., 2015) werden dabei für die Transfektion der Zellen angewandt. Zur Optimierung dieser Methode wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Methoden der Transfektion somatischer Zellen mit Plasmid- DNA untersucht. Zum Vergleich mit einer Standardmethode wurde dabei als Kontrolle die Reprogrammierungsmethode mittels retroviraler Vektoren verwendet. (Capetian et al., 2016). In diesem Protokoll wird auch die zusätzliche Verwendung von mi- RNA zur Steigerung der Induktion der Pluripotenz beschrieben (Judson et al., 2009). Um die Toxizität der einzelnen Versuchsschritte des Protokolls quantitativ abbilden zu können, wurde in dieser Arbeit der LDH- Test zur Abbildung des Zellsterbens (Kaja et al., 2017) verwendet.

Die Optimierung der Reprogrammierungseffizienz ist ein wichtiger technischer Aspekt. Darüber hinaus stellt sich die Frage „Sind die iPS- Zellen den embryonalen Stammzellen ebenbürtig?!“

### **1.3. iPS- Zellen vs. ES- Zellen: Gleichwertig oder Kompromiss?**

Ein wichtiges Indiz für das pluripotente Zellstadium ist das Differenzierungsvermögen der Zelle. Die in vitro Differenzierung von ES- Zellen, zum Beispiel in Muskelzellen, Herzzellen oder Knorpelzellen ist gut untersucht (Guan et al., 1999). Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden daher das Ausmaß der Differenzierung der ES- Zellen in Muskel-, Herz- und Knorpelzellen mit dem der iPS- Zellen vergleichend untersucht.

Ein Beispiel ist die Chondrogenese, also die Differenzierung von Knorpelzellen. Die Arbeitsgruppe um Kramer et al konnte zeigen, dass „während dieser Chondrogenese die in der frühen Phase von der prächondrogenen Zelle umgebenden Faktoren und die Zellaggregation eine entscheidende Rolle spielt“

(Kramer et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich sogenannte „Nodules“ bilden, also zufällig im EB verteilte mesenchymale Kondensationen, welche bestimmte Marker- Gene, wie z.B. Proteoglykane und vor allem Kollagen Typ II exprimieren (Kramer et al., 2005). Kollagen Typ II kann unter anderem mittels histologischer Färbung oder Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden.

Die kardiogene Differenzierung zeigt sich anhand verdichteter schlagender Areale und der Expression von Marker- Genen, wie herzzell- spezifische Isoformen von Actin und Myosin durch die Zellen bei der Differenzierung (Di Pasquale et al., 2013). Schlagende Areale wurden daher in dieser Arbeit innerhalb der EBs mikroskopisch ausgewertet.

Sowohl die chondrogene als auch die kardiogene Differenzierung von iPS- Zellen wurde im Vergleich mit den ES- Zellen untersucht.

#### **1.4. Vergleich der iPS- und ES- Zellen auf genomischer Ebene**

Differenzierte Zellen behalten in der Regel Ihre Identität bei. Einige dieser Zellen wie zum Beispiel Nervenzellen teilen sich nicht mehr. Andere differenzierte Zellen wie Leberzellen können sich teilen und neue funktionelle Zellen hervorbringen. Charakteristisch für einen bestimmten Zelltyp und damit der Identität einer Zelle ist ihr Genexpressionsmuster (Buganim et al., 2013). Dieses muss „erinnert“ und an die Tochterzelle weitergeben werden. Mechanismen, die dieses Weitergeben unterstützen und regulieren sind unter anderem positive wie negative Rückkopplungsschleifen basierend auf Transkriptionsregulatoren, sowie cis-Regulationssequenzen und Transkriptionsschaltkreise (Buganim et al., 2013). Es gibt also ein Zellgedächtnis, die Zellidentität, welches den Weg der Zelle im Lauf der Entwicklung bestimmt und molekulare Mechanismen, welche das Zellgedächtnis bilden. Das DNA- Methylierungsmuster, in Form des methylierten Cytosins, spielt hierbei ebenfalls eine wichtige Rolle und wird z.B. an die Tochterzellen vererbt (Bird, 2011).

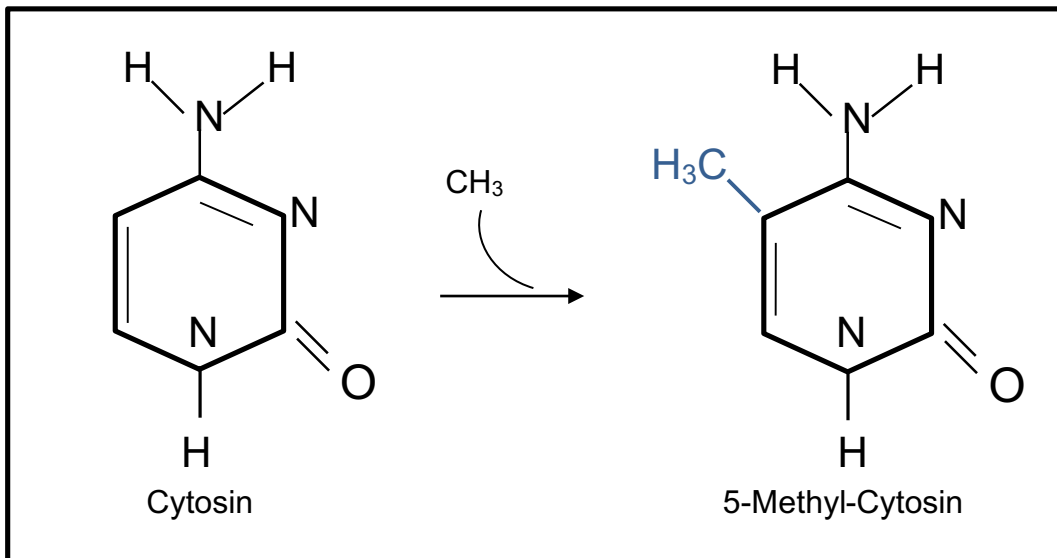


Abb. 2: Methylierung von Cytosin zu methyliertem Cytosin (5-Methylcytosin) durch die Methyltransferase

Bei Wirbeltieren tritt die Methylierung von Cytosin nur bei ausgewählten C-Nukleotiden innerhalb einer CG- Sequenz auf. Die Erhaltungs- Methyltransferase methyliert bei der DNA- Replikation ausschließlich an solchen CG- Sequenzen, welche bereits mit methylierten CG- Sequenzen basengepaart sind, und erhält so das Muster aufrecht (Bird, 2011).

Es konnte ein Zusammenhang zwischen „inkorrektem“ DNA- Methylierungsmuster und der Entartung von Zellen bei der Carcinomentstehung nachgewiesen werden (M and M, 2010). Zudem verändern sich die Methylierungsmuster im Verlauf der Säugerentwicklung. Schon kurz nach der Befruchtung der Eizelle wird das gesamte Genom demethyliert und ein neues Muster gebildet (Li and Zhang, 2014).

DNA Reparaturenzyme können den Anteil methylierter C's verringern. Durch zufällige Desaminierung eines nicht methylierten C entsteht Uracil. Da Uracil aber nur in der RNA, nicht in der DNA, vorkommt wird es durch die Uracil- DNA- Glykosylase erkannt, ausgeschnitten und durch ein unmethyliertes C ersetzt. Die Desaminierung eines 5- Methyl- C führt hingegen zu einem Thymin. Somit kann die Uracil- DNA- Glykosylase nicht agieren, folglich wird kein neues C gebildet, es verbleibt das „mutierte“ Thymin und es kommt zur Transition. Als Konsequenz dieses Mechanismus gingen im Lauf der Evolution mehr als drei von vier CG-

Sequenzen verloren (Li and Zhang, 2014). Die verbliebenen CG- Sequenzen sind ungleich verteilt, wobei es im Vergleich zum restlichen Genom Areale mit einer zehnfach höheren CG- Dichte gibt, sogenannte CG- Inseln mit ca. 1000 Nukleotiden- Länge. Diese Inseln liegen häufig in Promotoren von Genen, die für die Lebensfähigkeit der Zelle unverzichtbar sind. Diese CG- Inseln blieben also offensichtlich von der Desaminierung verschont und verblieben unmethyliert in der Keimbahn. Erkannt werden diese CG- Inseln in ihrer methylierten Form durch DNA- Bindeproteine, deren cis- Regulationssequenzen auf Genebene oft selbst CG enthalten. Die cis- Regulationssequenzen der Proteine binden an den CG- DNA- Abschnitt und schützen damit vor Ort vor oben benannter Methyltransferase (Alberts, 2017).

Ein weiterer Mechanismus zum Erhalt der Zellidentität ist das genomische 'Imprinting', bei der ebenfalls die Methylierung der DNA eine Rolle spielt. Genomisches 'Imprinting' bedeutet, dass bei einem diploiden Chromosomensatz entweder die paternale oder maternale Genkopie aktiviert wird, sodass nur von einer Kopie die Geninformation in ein Protein umgewandelt wird. Beim Menschen betrifft dies etwa 300 Gene (Lawson et al., 2013).

Es konnte gezeigt werden, dass beim menschlichen frühen Embryo die Gene, die dem genomischen 'Imprinting' unterliegen durch Methylierung markiert werden, und somit entweder die paternale oder maternale Genkopie methyliert wird. Dies führt zu einer veränderten Genexpression der jeweiligen methylierten Genkopie (Lee and Bartolomei, 2013).

Pluripotente Zellen besitzen ebenfalls charakteristische CG- Methylierungsmuster. In Bezug auf die Unterschiede zwischen iPS- und ES- Zellen wurde daher die Methylierung von CG- Sequenzen in den Pluripotenz- Genen Oct-4, Sox-2 und Nanog in dieser Dissertation untersucht. Als Grundgedanke steht hier die Vergleichbarkeit der Zellen in Bezug auf die CG- Sequenzen im Mittelpunkt.

## 2. Zielsetzung

*Hypothese: iPS- Zellen und ES- Zellen weisen auf klonaler Ebene Unterschiede im Hinblick auf epigenetische Modifikationen und ihr Differenzierungspotential auf. Die Korrelationen können erfasst und dargestellt werden.*

*Ziele:*

- 1) Etablierung von Zelllinien aus Klonen von iPS- Zellen und ES- Zellen*
- 2) Analyse des in vitro Differenzierungspotentials der etablierten Klone in die myogene und chondrogene Richtung*
- 3) Analyse epigenetischer Modifikationen der etablierten Klone und mögliche Korrelation mit der myogenen und chondrogenen Differenzierungsfähigkeit*

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Geräte

Autoklav 2540 EL (Systec, Wetzlar, Deutschland)

Autoklav Varioklav H+P (Oberschleißheim, Deutschland)

Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Eismaschine Scotsman AF-20 (Herborn, Deutschland)

Elektrophorese Gelkammer Consort EV 243 (Biorad, München, Deutschland)

Elektronische Pipettierhilfe (accu-jet Brand, Wertheim, Deutschland)

Feinwaage 0,5g-1500g (Kern, Balingen, Deutschland)

Fluolink-UV-Kabine Biobloc 254 nm (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Fluoreszenzmikroskop Zeiss AxioStar plus (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

FOculus Digitalkamera EEE1394 (NET GmbH, Finning, Deutschland)

Gelkammer (Peqlab, Erlangen, Deutschland)

Inkubator, Zellkultur, Nuaire IR CO2 Water Jacketed (Nuaire, Plymouth, USA)

Inkubator, Zellkultur, Hera Cell Heraeus (Nunc, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

Inkubator, Zellkultur, Hera Cell 240 i (Nunc, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

Magnetthermorührer MR2002 (Heidolph, Nürnberg, Deutschland)

Mikroskop CK2 (Olympus, Hamburg, Deutschland)

Mikrowelle ER7700 (Toshiba, Tokyo, Japan)

Nanodrop 2000 c Spektrophotometer (Thermo Scientific Schwerte, Deutschland)

NEPA 21 Elektroporator (Nepa Gene, Ichikawa, Japan)

Pipettierhilfe 10 µl, 100 µl und 1000 µl (Eppendorf, Köln, Deutschland)

pH-Meter 766 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte, Berlin, Deutschland)

Photometer, Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

Real Time Thermocycler (Applied Biosystems, FC, CA, USA)

Rotator (Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland)

Schüttler Vortex Genie 2 (Scientific, Bohemia, USA)

Software Axio Vision 3.0.6 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Software Corel DRAW X5 Graphic Suite (Corel Corporation, Ontario, Canada)



Software Firewire CameracontrolCenter (Flir, InfrarotTec Systems, Ranstadt, Deutschland)

Software Nanodrop Thermo Scientific 2000c Spektrophotometer (Schwerte, Deutschland)

Software Sigma Plot 2000 5.0 (Systal, Erkrath, Deutschland)

Stickstofftank Arpege 110 (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Thermocycler Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Thermocycler MWG (Biotech, Ebersberg, Deutschland)

Thermocycler PTC-200 (Biorad, München, Deutschland)

THOMA-Zählkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

UV-Transilluminator Bioblock (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) mit Videokamera (Olympus, Hamburg, Deutschland)

Vortexer (Bachofer, Reutlingen, Deutschland)

Wasserbad Typ 3044 (Köttermann, Hänigsen, Deutschland)

Werkbank Nuair Class II (Zapf Instruments, Sarstedt, Deutschland)

Zentrifuge 5804 Zellkultur (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Zentrifuge 5415 R Zellkultur (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Zentrifuge Labor Mikrozentrifuge (Eppendorf, Köln, Deutschland)

Zentrifuge Biofuge fresco, Rotor 3765 (Heraeus, Osterode, Deutschland)

Zentrifuge MiniSpin Plus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Zentrifuge Multifuge 3 S-R (Heraeus, Osterode, Deutschland)

Zentrifuge Sorvall (DuPont Bad Homburg, Deutschland)

### **3.2. KITS**

Nucleospin Plasmid DNA, RNA und Protein Purification KIT (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland)

Nucleospin RNA KIT (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland)

EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Irvine, CA USA)

Quick-gDNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA USA)

Nulceo Spin Extract II (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland)

Plasmid DNA Purification (Mini, Midi, Maxi, Mega, Giga) (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland)

CytoToxONE (LDHCytotoxicity Test, Promega GmbH, Walldorf, Deutschland)

### 3.3. Materialien

Culture Slides BD Falcon (BioCoat, BD Bio Science, Bedford, USA)  
Chamber Slides Objektträger mit 2 Kammern (Nunc, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)  
Einfrierröhrchen 1,5 ml (TPP, Trasadingen, Schweiz)  
Einwegspritze 10 ml, 20 ml (Braun, Melsungen, Deutschland)  
Glaspipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20ml (Eppendorf, Köln, Deutschland)  
Gene Pulser Cuvette 0,4 cm (Biorad, München, Deutschland)  
Gewebekulturschalen 6 cm, 10 cm Durchmesser (TPP, Trasadingen, Schweiz)  
Gewebekulturflaschen 25-150 cm (TPP, Trasadingen, Schweiz)  
Halbmikroküvetten UVette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)  
Kyroröhrchen 2.0 ml (Nunc, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)  
Pasteurpipetten (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
Parafilm M (American National Can., St. Louis, USA)  
Petrischalen, 10 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)  
Pipettenspitzen, steril mit Filter, 10 µl, 100 µl und 1000 µl (Nunc, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)  
Sterilfilter 0,22 µl Millipore (Merck KGA, Darmstadt, Deutschland)  
Sterilfilter 0,22 µm (TPP, Trasadingen, Schweiz)  
Sterilfilter Millipore (Merck KGA, Darmstadt, Deutschland)  
Stericup und Steritop Millipore (Merck KGA, Darmstadt, Deutschland)  
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml (Nunc, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)  
Zellkulturplatten, 6-Well, 24-Well, 96-Well (Nunc, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

### 3.4. Medien und Substanzen

Agarose (Applichem, Darmstadt, Deutschland)  
Amphotericin B (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)  
Anti-RNase (Ambion Inc. Austin TX, USA)  
BSA (Rinderserumalbumin, BioMol, Hamburg, Deutschland)  
Dexamethason (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure, Titriplex II, Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
DMEM (Dulbeccos Eagle Modified Medium, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)  
dNTPs (Fermentas GmbH, St Leon-Rot, Schweiz)  
Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
Ethidiumbromid (Roche, Mannheim, Deutschland)  
Fetales Kälberserum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
Formalin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
GeneRuler 1 kb Ladder (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)  
Isopropanol (100 %, Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
Oligo dT Primer zur c-DNA Synthese (Roche, Mannheim, Deutschland)  
Penicillin/Streptomycin (Bio Whittaker, Belgien)  
2-Propanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
RT-PCR Grade Water (Ambion Inc. Austin TX, USA)  
sekundärer Antikörper anti-Ig-Mouse/anti-Ig-Rabbit (Chemilumineszenz-Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)  
sekundärer Antikörper Goat anti Rabbit (Dako, Glostrup, Dänemark)  
sekundärer Antikörper Rabbit anti Goat (Dako, Glostrup, Dänemark)  
SuperScriptII RNase H (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)  
Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland)  
Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

**Fetales Kälberserum (FKS), inaktiviert:**

Fetales Kälberserum wurde bei Raumtemperatur auftgetaut und anschließend 30 Minuten im Wasserbad bei 54 °C erwärmt, umgefüllt und bei -20 °C gelagert.

**Gelatine-Lösung:**

1 g Gelatine von Sigma Aldrich (München, Deutschland) wurde in 100 ml PBS gelöst und autoklaviert. Im Anschluss wurde diese Lösung mit PBS zu einer Endkonzentration von 0,1 % verdünnt.

Die Zellkulturschalen wurden vor Beimpfung mit Gelatine bodendeckend befüllt und mindestens drei Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, dann die Gelatine abpipettiert und die Kultivierungsschalen mit dem Kultivierungsmedium befüllt.

**Kultivierungsmedium für Embryonale Stammzellen (ESC):**

Inaktiviertes FKS (fetales Kälberserum), 75 ml, DMEM Medium 409 ml, L- Glutamin 5 ml, Beta- Mercaptoethanol Lösung 1 ml, Nicht- essentielle Aminosäuren (MEM) 5 ml, Penicillin/ Streptomycin 5 ml.

Zusammengeführt und mit DMEM aufgefüllt und mittels Steristrip-Filter in eine 500 ml Flasche steril filtriert.

**Differenzierungsmedium für Embryonale Stammzellen (ECS):**

Inaktiviertes FKS (Endkonzentration 20 %) 100 ml, DMEM 384 ml, L- Glutamin 5 ml, Beta-Mercaptoethanol Lösung 1 ml, Nicht- essentielle Aminosäuren (MEM) 5 ml, Penicillin/Streptomycin 5 ml.

Inaktiviertes FKS (Endkonzentration 0,2 %) 1 ml, DMEM 483 ml, L- Glutamin 5 ml, Beta-Mercaptoethanol Lösung 1 ml, Nicht- essentielle Aminosäuren (MEM) 5 ml, Penicillin/Streptomycin 5 ml.

**Kultivierungsmedium für murine Stammzellen (MSC):**

Nicht inaktiviertes FKS (Endkonzentration 10 %) 50 ml, DMEM 430 ml, L- Glutamin 5 ml, Natrium- Pyruvat 5 ml, Nicht- essentielle Aminosäuren (MEM) 5 ml, Penicillin/ Streptomycin 5 ml, 30 mg Vitamin C.

**Kultivierungsmedium humane Fibroblasten:**

Inaktiviertes FKS (Endkonzentration 10 %) 50 ml, DMEM 430 ml, L-Glutamin 5 ml, Natrium-Pyruvat 5 ml, Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM) 5 ml, Penicillin/Streptomycin 5 ml, 30 mg Vitamin C.

**TBE-Puffer:**

pH 8,3, 108 g TrisBase, 55 g Borsäure, 7,45 g EDTAxNa<sub>2</sub>, mit aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, mit HCL auf pH-Wert einstellen.

**Phosphate Buffered Saline (PBS):**

Es wurden für die 10x Stocklösung nachfolgende Substanzen in 1000 ml destilliertem, deionisiertem Wasser gelöst und auf einen pH von 7,2 titriert:

26,9 mM KCL (Merck, Darmstadt, Germany)

1,37 M NaCl (Merck, Darmstadt, Germany)

17,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Germany)

0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich, München, Germany)

Anschließend wurde von der Stocklösung 1:10 verdünnt und autoklaviert.

**PBS (10x)**

NaCl 100 g

KCL 2,5 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2H<sub>2</sub>O 14,4 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 g

Ad 1000 ml aqua dest

pH: 7,2

**Trypsin/ Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA) – Lösung:**

Die sterile Trypsin/ EDTA - Lösung wurde mit PBS 1:50 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### **FCS (inaktivieren)**

Wasserbad auf 54 °C vorheizen, FCS auf Raumtemperatur bringen, FCS 30 min bei 54 °C erwärmen

10 Röhrchen zu je 50 ml aliquotieren und bei -20 °C lagern

### **LIF-Medium (100 mg/ml)**

25 µl LIF-Lösung in 50 ml Kultivierungsmedium geben (Endkonzentration 5 ng/µl)

### **Mitomycin C Lösung (200 µg/ml)**

2 mg Mitomycin C (Serva, Heidelberg, Deutschland) in 10 ml PBS lösen, steril in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführen und bei -20 °C lagern

### **Mitomycin C Medium**

Mitomycin C Lösung 300 µl und 6 ml Kultivierungsmedium

### **Einfriermedium**

Kultivierungsmedium mit 8 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde sterilfiltriert.

### **mTeSR 1 Kultivierungsmedium**

für Stammzellen (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada)

### **Verwendete Antikörper**

Primärantikörper

II-II6B3 mouse-anti-mouse Collagen Type II (DSHB, Iowa, USA)

X-AC 9 mouse-anti-mouse Collagen Type X (DSHB, Iowa, USA)

Sekundärantikörper

Rabbit-anti-mouse-FITC (DSHB, Iowa, USA)

## Primer

Für die Sequenzierungsanalyse erfolgte die Synthese der Primer durch die Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland), mit einer Menge von 100 µM (100 pmol/µl) in einem Volumen von 50 µl:

Tabelle 1: Auflistung der Primer zu den jeweiligen Genabschnitten

Gen	Primername	Primer
Oct4-1	Externer Primer, reverse	5' – CTCCCCTAAAAACAACCTTCCTACTC
Oct4-1	Externer Primer, forward	5' – ggTTTTTTgAggTTgTgTgATTTAT
Oct4-1	Interner Primer, reverse	5' – CTCCTCAAAAACAAAACCTCAAATA
Oct4-1	Interner Primer, forward	5' – gggATTTTTAgATTgggTTTAgAAAA
Oct4-2	Externer Primer, reverse	5' – CAACCAAATCCCTTCACTTACCT
Oct4-2	Externer Primer, forward	5' – ggTTTTTAggTgggTTTggAATT
Oct4-2	Interner Primer, reverse	5' – AAAATTAATTCCACCTTCTCCAACCT
Oct4-2	Interner Primer, forward	5' – AgAggTATTggggATTTTTTTATgT
Nanog	Externer Primer, reverse	5' – CACCAACCAAATCAACCTATCT
Nanog	Externer Primer, forward	5' – TTAaggTTTggAggTgTAGTTg
Nanog	Interner Primer, reverse	5' – AACCAAATCAACCTATCTAAAAACCAA
Nanog	Interner Primer, forward	5' – ATgAATAAAgTgAAATgAggTAAAg
Sox2	Externer Primer, reverse	5' – CACTCTCTTCTCTACCTTAACAA
Sox2	Externer Primer, forward	5' – ATgggTTTTgTTTTATTTTggTTTTAg
Sox2	Interner Primer, reverse	5' – TAAACAAATTAATAAACAACCATC
Sox2	Interner Primer, forward	5' – gTATTTAAgAgAggTTAATATT

### 3.5. Zellkultur

#### Allgemeine Techniken der Zellkultivierung

Die Arbeit mit den Säugerzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank. Dabei wurden die Medien/ Lösungen stets vor Gebrauch sterilfiltriert oder autoklaviert und auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37° C kultiviert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit folgenden eukaryotischen Zellen gearbeitet:

Es wurden murine ES- Zellen (BLC6 und D3) und murine embryonale Fibroblasten (MEF) und eine Zelllinie aus einer durch Überexpression von Oct-3/4 und Klf-4 reprogrammierten neuralen Stammzelle (2FiPS) untersucht, wobei die MEFs zur Ko-Kultivierung mit den ES- Zellen verwendet wurden. Bei den Reprogrammierungsversuchen wurden zusätzlich zu den humanen Fibroblasten (hum Fibros) auch humane Stammzellen aus Schweißdrüsenzellen (hSGSC) und humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) verwendet.

Für die Zellkultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten wurde Kultivierungsmedium und für die ES- und iPS Zellen zudem LIF- Medium mit einer Konzentration von 5 ng/µl LIF verwendet um die Pluripotenz bei der Zellteilung und -vermehrung zu erhalten. Im Folgenden wird zunächst auf die allgemeinen und anschließend speziellen Techniken der Zellkultivierung eingegangen.

#### **Gelatinebeschichtung**

Zur Optimierung der Zelladhäsion wurden die Zellplatten vor der Mediumbeschickung mit 0,1 % Gelatine für ca. 15 Minuten beschichtet, diese anschließend verworfen und das jeweilige Zellkulturmedium auf die Platten gegeben.

#### **Ablösen der Zellen zum Passagieren und Einfrieren, sowie Kryokonservierung**

Zunächst wurde das Zellkultivierungsmedium abgesaugt, anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült. Nun wurde je nach Platten/- Schalengröße EDTA/Trypsin Lösung auf die Zellen gegeben. Nach ca. 5 min Einwirkzeit, wurde



das Ablösen unter dem Mikroskop kontrolliert. Wenn die Zellen sich abgelöst haben, wurde die Zell- EDTA/ Trypsin Suspension mit derselben Menge Kultivierungsmedium aufgefüllt und somit die Proteasereaktion gestoppt. Anschließend konnte die Lösung in einem 15 ml- Falcon-Röhrchen aufgenommen mit Kultivierungsmedium auf 10 ml aufgefüllt und das Röhrchen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet entweder in Einfriermedium resuspendiert und anschließend kryokonserviert oder in Kultivierungsmedium resuspendiert und auf Zellkulturschalen verteilt.

Die Kryokonservierung erfolgte durch Verpackung des Kryogefäßes mit dem in Einfriermedium resuspendiertem Zellpellet in einem Styroporkarton, der bei bei -80 °C gelagert wurde und so innerhalb von 24 h herunterkühlte. Anschließend wurden die Röhrchen zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gegeben.

### **Auftauen der Zellen**

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch ca. 5 min Inkubation der Einfriergefäße im 37 °C Wasserbad. Anschließend wurde die Zellsuspension in Kultivierungsmedium aufgenommen und die Zellen bei 1000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und die Menge auf die Zellkulturschalen aufgeteilt.

### **Ermittlung der Zellzahl**

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde nach Zentrifugation der Zellen und Resuspension von 1 µl der Zellsuspension, diese mittels Pasteurpipette in eine THOMA Zählkammer gegeben. Die Zellen wurden pro Gesichtsfeld ausgezählt und die Zellzahl wird wie folgt ermittelt:

Gezählte Zellen/64 x 10<sup>6</sup> entspricht der Zellzahl pro Milliliter Medium.

## **Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) und Mitomycin C Behandlung zur MEF- Inaktivierung**

- 1) Feeder Layer auftauen: vier 10 cm- Schalen wurden mit je 9 ml Kultivierungsmedium beschickt und in ein 15 ml- Röhrchen 6 ml Kultivierungsmedium vorgelegt. MEF-Zellen wurden schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, mit einer 2 ml- Pipette resuspendiert und in das vorgelegte Medium gegeben, anschließend bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 4 ml Kultivierungsmedium gut resuspendiert und auf die vier Schalen zu gleichen Teilen verteilt.
- 2) Feeder Layer mit Mitomycin C behandeln (Inaktivierung): 6ml Mitomycin C Medium wurden auf die MEF-Zellen gegeben, dabei mit Sterilfilter und Spritze direkt auf die Schale filtriert und bei 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden 20 6 cm- Schalen mit 0,1 % Gelatine beschichtet. 6 ml Kultivierungsmedium wurden in ein 15 ml- Röhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden 3x mit je 5 ml PBS gewaschen, dann 2 ml Trypsin/EDTA Lösung darauf gegeben und 3-5 min. inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Zellen wurden mit 2 ml- Pipette vereinzelt und in das vorgelegte Medium gegeben, dann 5min bei 1000 rpm zentrifugiert. 20 6 cm- Schalen wurden mit je 4 ml Kultivierungsmedium beschickt, der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 20ml Medium aufgenommen, gut resuspendiert und gleichmäßig auf die 20 Schalen verteilt.
- 3) Feeder Layer passagieren: vier 10 cm- Schalen wurden mit je 9 ml Kultivierungsmedium beschickt. In ein 15 ml- Röhrchen wurden 6 ml Kultivierungsmedium vorgelegt. In eine 10 cm- Schale wurden die Zellen 2x mit je 10 ml PBS gewaschen und dann 2 ml Trypsin/EDTA draufgegeben. Das Ablösen wurde mikroskopisch kontrolliert und die Zellen mit 2 ml- Pipette gut vereinzelt und in das vorgelegte Medium gegeben. Anschließend wurde 5 min. bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden mit 4 ml Kultivierungsmedium aufgenommen, gut resuspendiert und gleichmäßig auf die vier neuen Schalen verteilt.

- 4) Embryonale Stammzellen (ES- Zellen, ESC) auftauen: Zwei 6 cm- Schalen Feeder Layer MMC wurden mit je 4 ml LIF- Medium beschickt und in ein 15 ml- Röhrchen 6ml Kultivierungsmedium vorgelegt. Die ES- Zellen wurden schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit einer 2 ml Pipette gut resuspendiert und in das vorgelegte Medium gegeben. Anschließend wurde 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und ein Pellet in 1,5 ml LIF- Medium resuspendiert und auf die Schale gegeben. (Einige ESC werden ohne Feeder Layer kultiviert, dann muss LIF- Medium mit der doppelten LIF- Konzentration (10 ng/ml) verwendet werden und mit 0,1 % Gelatine vorbeschichtet werden).
- 5) ES- Zellen passagieren: zwei 6 cm- Schalen Feeder Layer MMC mit je 4 ml LIF- Medium beschicken. In ein 15 ml- Röhrchen 6ml Kultivierungsmedium vorlegen. Zellen einer Schale 2 x mit je 5 ml PBS waschen und dann 2 ml Trypsin/ EDTA draufgeben. Ablösen mikroskopisch kontrollieren. Zellen mit 2 ml- Pipette vereinzeln und in das vorgelegte Medium geben. 5 min. bei 1000 rpm zentrifugieren. Überstand absaugen, Zellen in 4ml Kultivierungsmedium aufnehmen, resuspendieren und gleichmäßig auf die zwei neuen Schalen verteilen.
- 6) ES- Zellen einfrieren: Einfriermedium wurde angesetzt: Kultivierungsmedium 9,2 ml und 800 µl DMSO wurden steril filtriert. ES- Zellen wurden abgelöst und nach Zentrifugation bei 1000 rpm das Zellpellet in 1,8 ml Einfriermedium aufgeommen und in ein Kryotube gegeben. Das Tube wurde in ein im Kühlschrank vorgekühltes Einfriergefäß gegeben und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Das Tube wurde am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **Differenzierung der ES- Zellen**

Es wurde die Differenzierung der murinen pluripotenten Zelllinien BLC6, D3 (ES- Zelllinien) und 2FiPS untersucht. Dafür wurden EBs durch Kultivierung der Zellen in hängenden Tropfen (siehe unten) hergestellt, über 6 Wochen kultiviert und einmal wöchentlich je eine Probe zur RNA- Isolation für die Untersuchung auf genetischer Ebene und zur histochemischen Färbung mittels Alcianblaufärbung und Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis der Proteinexpression entnommen.

Die Probenentnahmen erfolgten an den Tagen 5+7 d, 5+14 d, 5+21 d, 5+28 d, 5+35 d, 5+42 d („+“ bedeutet hierbei, die seit dem Plattieren der EBs vergangenen Tage).

### **Zeitlicher Versuchsablauf des Differenzierungsversuches**

Tag 0: hängende Tropfen

Tag 1: RNA- Isolierung

Tag 2: Suspension und RNA- Isolierung

Tag 3: RNA- Isolierung

Tag 4: RNA- Isolierung

Tag 5: Ausplattieren und RNA- Isolierung

Tag 6 bis Ende: Mediumwechsel alle 2 Tage

Tag 5 plus 2 bis Ende: Verwendung von Medium mit 0,2 % FKS

Tag 5 plus 7: RNA- Isolierung

Tag 5 plus 14, 21,28,35,42,49: RNA- Isolierung und Alcianblaufärbung

### **Hängende Tropfen zur Herstellung der EBs**

- 1) Bakteriologische Petri-Schalen vorbereiten:
  - a. Die Deckel einer 6cm- Zellkultur Schale wurden in den Deckel der bakteriologischen Schale gestellt.
  - b. 4 ml steriles PBS in den Deckel der 6 cm- Schale gefüllt.
- 2) In ein 15 ml- Röhrchen wurden 6ml Kulti-Medium vorgelegt.
- 3) Zellen wurden 2 x mit je 5 ml PBS gewaschen und dann 2 ml Trypsin/EDTA draufgegeben.
- 4) Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert.
- 5) Zellen wurden mit 2 ml- Pipette vereinzelt und in das vorgelegte Medium gegeben.
- 6) 5min bei 1000 rpm zentrifugiert.
- 7) Überstand abgesaugt, Zellen mit 2 ml 20 % Diff-Medium aufgenommen, resuspendiert und in der Thoma Kammer gezählt und die Zellzahl berechnet.

$[(x/64) * 1\ 000\ 000] / 40\ 000$  bzw  $30\ 000 =$  Verdünnungsfaktor für 1 ml Zell-Suspension

Verdünnungsfaktor \* 2<sup>-2</sup> = Für die gesamte Suspension benötigtes Medium

(die generelle Formel zur Berechnung der Zellzahl in der Thoma-Kammer lautet (Gezählte Zellen / 64) \* 1 000 000 = Zellen/ml)

- 8) Zellen wurden auf eine Konzentration von 40 000 Zellen/ml (800 Zellen / EB) oder 30 000 Zellen/ml (600 Zellen / EB) verdünnt. Dafür wurde 20 % Differenzierungsmedium verwendet.
- 9) Der Boden einer bakteriologischen Petri-Schale wurde mit je 50 – 60 Tropfen Zellsuspension mittels 20 µl- Pipette beschickt.

### **Suspensionskultur der EBs**

- 1) PBS Deckel wurden aus den bakteriologischen Schalen entfernt.
- 2) 8 ml 20 % Differenzierungsmedium wurden auf die hängenden Tropfen gegeben.
- 3) Schale schwenken, damit sich die EB's nicht festsetzen
- 4) Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, das die EB's möglichst rund sind
- 5) 2 Tage Inkubation bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C.

### **Plattieren der EBs**

- 1) Zellkulturschalen wurden mit Gelatine-Gebrauchslösung beschichtet.
- 2) 20 % Differenzierungsmedium vorgelegt.
- 3) Die Pipette wurde auf 100 µl eingestellt und EB's aus den bakteriologischen Petri-Schalen auf die Zellkulturschalen gegeben.
- 4) EB's wurden durch schwenken verteilt und nach 24h mikroskopisch kontrolliert.

24 Well- Platte	1 EB pro Well	→ Alcianblaufärbung
6 cm- Schale	10 EB	→ RNA Isolation
Chamber Slide (2-Well)	5 EB pro well	→ Immunfluoreszenz
24 Well- Platte	1 EB pro well	

- 5) Nach 2 Tagen (also an Tag 5+2 d) erfolgte der erste Mediumwechsel, ab dann wurde 0,2 % Differenzierungsmedium verwendet.

### **Besonderheiten bei der Kultivierung humaner Stammzellen aus Schweißdrüsen (hSGSCs)**

Im konfluenten Stadium werden die hSGSCs kleiner und durchlaufen einen Proliferationsschub, sodass sie erst 3-4 Tage nach diesem Stadium passagiert werden sollten. Dies entspricht auch der Verdopplungszeit. Sobald die Zellen groß und flächig sind, sind sie ausdifferenziert. Die optimale Zeitspanne für Versuche ist erfahrungsgemäß Passage 11 bis 18. Das Passagieren sollte immer im Verhältnis 1:3 erfolgen, sodass eine Aussaatdichte von 2000-5000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  entsteht.

Kultivierungsmedium: 10 % DMEM (445 ml DMEM, Zugabe von 5 ml Penicillin /Streptomycin(PAA) und 50 ml FKS

Einfriermedium: 10 % DMSO (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 90 % FKS

Zellablösung: Trypsin- EDTA Solution, PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Die Zellen wurden nach dem Auftauen in Kultivierungsmedium in einer 25  $\text{cm}^2$ -Kulturflasche inkubiert.

Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage, frisch aufgetaute Zellen wurden direkt am Folgetag gewechselt, Passagieren und Einfrieren erfolgte wie oben beschrieben.

### **Besonderheiten bei der Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs)**

Kultivierung in MSC Medium: DMEM, nicht inaktiviertes FKS 50 ml, Pen/Strep 5 ml, L-Gluthion 5 ml, Natrium-Pyruvat 5 ml, MEM 5 ml, Vit. C 30 mg.

Auftauen erfolgte wie beschrieben, Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Passagieren und Einfrieren erfolgte wie oben beschrieben.

### **Besonderheiten bei der Kultivierung humaner Fibroblasten (hum. Fibros)**

Kultivierungsmedium: DMEM, 50 ml inaktiviertes FKS, Pen Strepp 5 ml, L-Glutathion 5 ml, MEM 5 ml, Natrium- Pyruvat 5 ml, 30 mg Vit. C  
Auftauen erfolgte wie beschrieben, der Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage.  
Passagieren und Einfrieren erfolgte wie oben beschrieben.

### **3.6. Histochemische Färbungen und Molekulargenetische Methoden**

#### **Alcianblau-Färbung und quantitative Messung**

Dieser Phthalocyaninfarbstoff kann zur selektiven Färbung von unter anderem knorpelspezifischen Glucosaminoglykanen eingesetzt werden und führt bei einem sauren pH- Wert zu einer blauen Färbung. Erstmals wurde dieser Farbstoff um 1950 durch Harold F. Steedman in der Histologie als „Schleimfarbstoff“ eingeführt (Scott, 1996).

Versuchsablauf:

- 1) Zellen mit PBS 2x waschen
- 2) 30 min mit 3,7 % Formaldehyd fixieren
- 3) Zellen 3x mit PBS waschen
- 4) Über Nacht bei Raumtemperatur mit Alcianblau-Färbelösung inkubieren
- 5) Zellen 3x mit PBS waschen und bis zur mikroskopischen Auswertung mit PBS überschichtet bei 4 °C lagern

#### **Immunfluoreszenzfärbung**

- 1) Medium vom „Chamber Slide“ absaugen und 2x mit PBS waschen
- 2) Präparat 5 min in 500 µl eines Gemisches von Methanol und Aceton im Verhältnis 7:10, gekühlt bei -20°C für 20 min. inkubieren
- 3) Präparat 3 x mit PBS waschen
- 4) Präparat mit 500 µl 7,5 % BSA in PBS 30 min bei Raumtemperatur blocken
- 5) Präparat mit 300 µl primärem Antikörper (Lösung in PBS) 1 h bei 37 °C inkubieren
- 6) Präparat 4 x mit PBS waschen

- 7) Präparat mit 300 µl sekundärer Antikörperlösung (in PBS gelöst) 1 h bei 37 °C inkubieren. Die sekundäre Antikörperlösung wird zusätzlich mit 1 µg/ml DAPI (1:1000) versetzt (DAPI färbt Kerne blau, interkaliert mit DNA)  
sekundärer AK: FITC Antikörper, 1:200 verdünnt, rabbit Anti Mouse, markiert mit FITC
- 8) Präparat 4 x mit PBS waschen, anschließend 1 x mit aqua dest. waschen
- 9) Chamber und Silikon mit Spezialwerkzeug entfernen
- 10) Präparat mit Vectashield (Rotimount, Karlsruhe Deutschland), eindecken und das Deckglas mit Nagellack fixieren

### 3.7. Molekulargenetische Methoden

#### RNA- Isolation

Die RNA- Isolation erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin<sup>®</sup> RNAII*-Kits. Nach der RNA-Isolation und -Aufreinigung mittels des o.g. Kits erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA in 1 µl Probevolumen durch eine photometrische Messung der Extinktion bei 260/ 280 nm im Nanodrop-Spektrophotometer.

#### Reverse Transkription und Polymerase- Ketten- Reaktion zum Nachweis der Kollagen- Expression

Die Reverse Transkription erfolgte mit dem *Revert Aid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis* Kit.

Zuerst wurden 500 ng RNA mit Wasser auf 11 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl Oligo dT folgte eine fünfminütige Inkubation bei 65 °C (Anlagerung der Primer an den Poly(A)-Schwanz der mRNA). Anschließend wurden 1/10 Volumen Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 42 °C, dann für fünf Minuten bei 70 °C. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.



## PCR Reaktion

Material: Puffer 10x, dNTP (10 mM), Primer (10  $\mu$ M), Taq-Polymerase (NatuTec)

Durchführung: es wurde immer auf Eis gearbeitet,

Mastermix (18  $\mu$ l PCR-H<sub>2</sub>O, 2,5  $\mu$ l Puffer, 1  $\mu$ l DNTP von Fermentas (1 mM),

Primer (10  $\mu$ M) je 1,25  $\mu$ l, Taq Polymerase von Segenetics 0,25  $\mu$ l)

- a) 24,25  $\mu$ l Mastermix in je 0,5 ml Tube geben
- b) je 0,75  $\mu$ l c-DNA zugeben
- c) Proben mischen, kurz zentrifugieren und in den Thermocycler geben (2 min 95 °C, Zyklen a 40 sec 95 °C, 40 sec 60 °C (jeweilige Annealing Temperatur) 40 sec 72 °C, dann 8 min 72 °C, 10 min 4 °C.
- d) Proben bei -20 °C lagern

## Plasmidklonierung

Zur Plasmidklonierung in E. coli wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 1) Transfektion von E. coli mit Plasmid-DNA mittels „TOPO Cloning“-Reaktion Kit
- 2) Plasmid-Isolierung mittels Kit Macherey & Nagel (Düren, Deutschland)
- 3) Testrestriktion der Plasmid-DNA
- 4) Agarose-Gelelektrophorese zur Längenbestimmung der DNA-Fragmente nach Restriktion

### “TOPO Cloning” Reaktion:

Tag 1: “One Shot Chemical Transformation”: 100ng Plasmid-DNA zu chemokompetenten E. coli- Zellen hinzugeben, dann 5 bis 30 min auf Eis inkubieren, Hitzeschock bei 42 °C für 30 s ohne schütteln. Auf Eis inkubieren, dann 250  $\mu$ l SOC-Medium hinzugeben. Dann bei 200 rpm und 37 °C für 1 h schütteln. 10-50  $\mu$ l dieser Transformationslösung auf eine vorgewärmte Agar-Platte (mit entsprechender Antibiotikaresistenz: PYFP: Kanamycin, sonst Ampicillin) geben. E. coli- Kolonien nach 1 Tag Inkubation bei 37 °C isolieren.

Tag 2: Kolonien mit 100 µl Pipette isolieren und in 15 ml- Röhrcchen mit LB-Medium, versetzt mit dem jeweiligen Antibiotikum, überführen und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultivieren.

Tag 3: Plasmid- DNA- Aufreinigung mit einem Kit von M&N (Plasmid DNA Purification): Nach Kultivierung der Zellen werden diese von der Oberfläche abgelöst und lysiert, das Lysat aufgereinigt, anschließend die DNA an einer Membran gebunden und erneut aufgereinigt und letztlich aus der Membran gelöst, sodass ein Eluat entsteht. Die DNA- Konzentration des Eluats wird bestimmt und 500- 1000 ng pro Probe mit Restriktionsenzym verdaut. Es wurde PST1 als Restriktionsenzym verwendet.

Tag 4: Agarose- Gelelektrophorese zur Darstellung des Restriktionsverdaus:

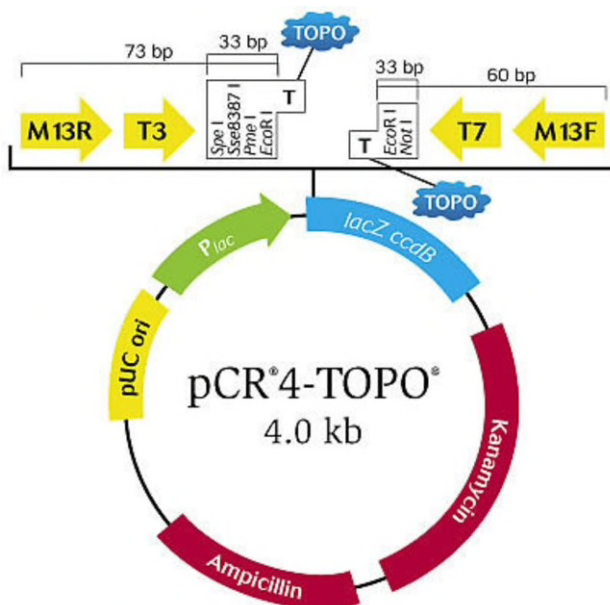


Abb. 3: TOPO Vektor von Invitrogen ("Topo™ TA Cloning™ Kit für die Sequenzierung, mit pCR4-TOPO Vektor, One Shot™ TOP10 chemisch kompetente E. coli und PureLink Quick Plasmid MiniPrep-Kit," n.d.)

## Agarose-Gelelektrophorese

Verwendete Materialien:

Gelkammer, Agarose von Roth (Karlsruhe, Deutschland), 1x TBE Puffer, Midori Green (3  $\mu\text{l}$ /100 ml Gel) von Nippon Genetic Europe, Blue Juice Puffer, 1 kb Leiter (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) von Gene Ruler Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific

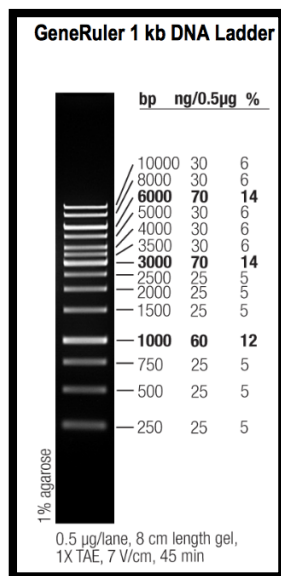


Abb. 4: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fa. Thermo Scientific) (“GeneRuler™ 1 kb DNA-Leiter,” n.d.)

Durchführung:

- 1) 1% Agarose in 1x TBE abwägen und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung erhitzen
- 2) Gel auf ca. 70 °C abkühlen lassen, Midori-Green Lösung in 1  $\mu\text{l}$  auf 100 ml Gel zufügen und leicht umschwenken und in den Gelgießstand geben (Gelkammer und Kämme werden nach Größe der aufzutrennenden Produkte ausgewählt)
- 3) Gel vollständig aushärten lassen (ca. 30 min.), dann in die Pufferkammer geben und mit 1x TBE Puffer bedecken
- 4) Vorsichtig den Kamm ziehen und die Taschen mit Puffer spülen
- 5) Das zu trennende Produkt (z.B.: DNA- Produkt aus PCR) mit Blue Juice (1:6) versetzen, vortexen und die Probe in die Kammer geben
- 6) 1 kb Leiter 1:10 mit Blue Juice verdünnen und von dieser Stammlösung 18  $\mu\text{l}$  einsetzen

- 7) Gel vorsichtig mit Proben und Leiter beladen und bei 125 mA und konstanter Voltzahl laufen lassen
- 8) Nach 30- 60 min. Gel unter UV-Licht auswerten.

### 3.8. Reprogrammierungsmethoden

#### Transfektion

Es wurden verschiedene Methoden zur Optimierung der Transfektion durchgeführt.

Der STEM- Circles- Vektor enthält die Gene Lin28, GFP, Nanog, Sox-2 und Oct-4 unter der Kontrolle einer CMV- Promotorregion (Abb. 5a). Im Rahmen der Arbeit sind sämtliche Transfektionsversuche mittels STEM-Circles erfolgt.

Zusätzlich wurde ein Reportergen- Konstrukt mit einem ubiquitär exprimierten EGFP- Gen als Kontrolle für die Transfektion verwendet. Dieses Kontrollplasmid ist pEYFP-N1 (Addgene, Teddington UK, Abb. 5b). Anschließend wurde das Plasmid mittels E. coli kloniert, isoliert und mittels Testrestriktion und anschließender Gelelektrophorese überprüft. Die Testrestriktion erfolgte mit dem Enzym PstI. Dabei sind zwei Fragmente von 550 bp und 4200 bp Länge zu erwarten.

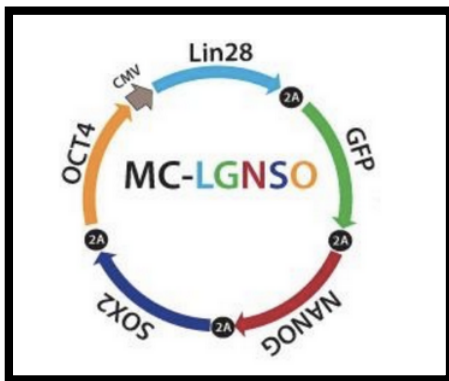


Abb. 5a: Schematische Darstellung des STEM-Circles™ Vektor vom Hersteller STEMCELL Technologies Inc. (Canada) ("STEMCELL Technologies is Proud to Announce STEMcircles™, a Virus-Free Technology for Reprogramming Cells," n.d.)

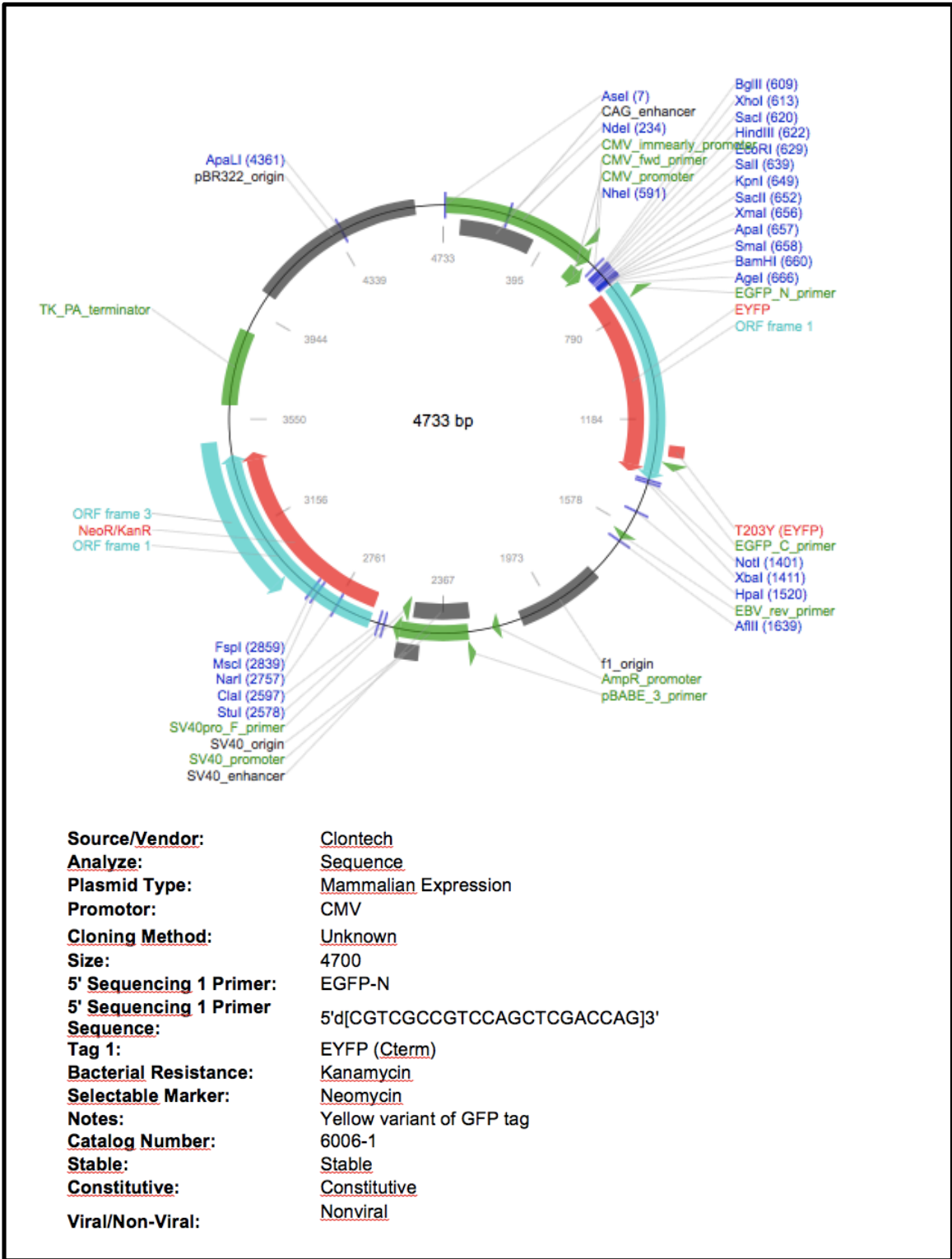


Abb. 5b: Genkarte vom Plasmid PYFP (Fa. Addgene) (Sarrion-Perdigones et al., 2013)

## Elektroporation

Vorbereitung: Trypsin/ EDTA Lösung, PBS, 15 ml- Röhren mit 6 ml Kultivierungsmedium, Cytomix (5 ml Cytomixbasis und 100 µl Glutathion (250 mM) und 100 µl ATP (250 mM), 6-Well Platte, vorbeschickt mit 0,1% Gelatine mit Kultivierungsmedium befüllt, Zählkammer, Mikroskop mit Videokamera

Zuvor waren in der AG Rohwedel bereits die besten Bedingungen der Elektroporation ermittelt worden. Dabei wurden als beste Bedingungen 320 V und 500 µF in einer 0,4 cm Küvette ermittelt. Diese Bedingungen werden ebenso von der Firma BIO-RAD für den Gene Pulser vorgeschlagen, um eine Effizienz von 60 % zu erhalten. Ebenso wurden im Rahmen der Bachelorarbeit „Induzierte pluripotente Stammzellen: Chondrogenes Differenzierungspotential und Vektorsysteme zur Reprogrammierung“ am Institut für Virologie und Zellbiologie der Universität zu Lübeck bereits verschiedene Transfektionsreagenzien getestet, und zwar im Einzelnen Lipofectamin, X-TremeGENE HP, DreamFECT und DreamFECT Gold. Dabei ergaben sich deutliche Vorteile bei der Verwendung von X-tremeGENE HP.

Cytomix:

120 mM KCL, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.6), 25 mM HEPES (1 M Stocklösung), 2 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, eingestellt mittels KOH auf pH 7,6, sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert

Arbeitsschritte:

- 1.) 1x T150 Flasche mit zu 80 % konfluenten humanen Fibroblasten 2 x mit 20 ml PBS waschen
- 2.) 4 ml Trypsin/EDTA hinzugeben, 2- 5 min inkubieren
- 3.) Zellsuspension in 15 ml- Falcon-Röhren mit 6ml Kultivierungsmedium überführen
- 4.) Zellen in Zählkammer zählen (9 µl Suspension)
- 5.) Ca. 2 Mio Zellen bei 1100 rpm 5 min zentrifugieren
- 6.) Überstand absaugen und 800 µl Cytomix resuspendieren
- 7.) Je 5 µl DNA in eine 0,4 cm- Küvette geben (2 Proben mit STEMcircles™ Probe und GFP Kontrollkonstrukt Plasmid)

- 5 µg minicircle DNA bei einer Konzentration von 0,3 µg/µl (STEMcircles™)
  - 5 µg GFP-Kontrollkonstrukt Plasmid bei einer Konzentration von 0,3 µg/µl (Das Kontrollplasmid PYFP wurde mir von der AG N. Tautz Universität zu Lübeck, Institut für Virologie und Zellbiologie von Dr. Isken zur Verfügung gestellt)
- 8.) Elektroporation bei 320 V und 500 µF
  - 9.) 200 µl Kultivierungsmedium hinzugeben
  - 10.) Gesamtmenge auf 4 Wells zu je 250 µl verteilen und bei 37 °C inkubieren
  - 11.) Kontrolle und Zellzahlermittlung durch Auszählung unter einem Fluoreszenzmikroskop, Tabelle mit Ergebnissen

Zellzahlberechnung mittels Neubauer-Zählkammer:

Gezählte Zellen/64 x 1 Mio/ml x ml Volumen, im 10 ml- Rörchen entspricht dies der Gesamtzellzahl

### **Elektroporation mit NEPA21**

Versuch mit hSGSC Zellen:

Elektroporation mit Unterstützung vom Fraunhofer Institut und deren NEPA 21

Auf 24 Well Platte  $5 \times 10^4$  Zellen pro 500 µl pro Well (entspricht 80 % Konfluenz)

Vor Elektroporation mit Optimem-Medium beschicken, 30 min. nach Elektroporation wieder 10 % DMEM dazugeben

Elektroporation mit NEPA 21 (Fraunhofer EBM)

## Elektroporation und Kontrolle mittels FACS Analyse

Elektroporation nach Verfahren der AG Rohwedel wie oben beschrieben mit folgenden Änderungen:

- statt humaner Fibroblasten wird mit hMSC Zellen gearbeitet, diese benötigen ein spezielles Kultivierungsmedium (s.o.)
- bei Schritt 6 wird ein Tube entfernt und für den Cellsorter (FACS) bereitgestellt auf Eis als Negativkontrolle
- bei Schritt 11 wird 1x 250 µl in ein Eppendorfgefäß überführt bei 1100 rpm 2-3 min. anzentrifugiert, das Pellet in 500 µl PBS mit 1 % FKS aufgenommen und für den Cellsorter (FACS) als Positivkontrolle auf Eis gestellt.

## Transfektion mit X-treme Gene

Vorbereitungen:

Opti-MEM I, Plasmid-DNA (Kontroll-Plasmid), Eppendorfgefäß

Arbeitsschritte pro 6 Well Platte:

1. X-treme Gene HP DNA- Transfektionsreagenz auf Raumtemperatur erwärmen, vorsichtig vortexen
2. 200 µl Opti-MEM I serumreduziertes Medium oder serumfreies Medium in ein steriles Röhrchen vorlegen
3. 2,0 µg (entspricht vom Kontrollplasmid 6,66 µl) (Plasmid- DNA dazugeben, vorsichtig pipettieren, komplett vermischen)
4. 8µl (entspricht 26,6 µl für Kontrollplasmid) und X-treme Gene HP DNA Transfektionsreagenz vorsichtig dazu pipettieren und komplett vermischen (im Verhältnis 4:1 Reagenz zu DNA)
5. bei Raumtemperatur 15-30 min inkubieren
6. X-treme Gene HP Reagenz: DNA-Komplexe in verschiedene Bereiche der Wells hinzu pipettieren (pro 6 Well Plate)
7. Wellplatte vorsichtig zum vermischen
8. für 24-48 h bei 37 °C inkubieren



## Transfektion unter Zugabe von mi- RNA

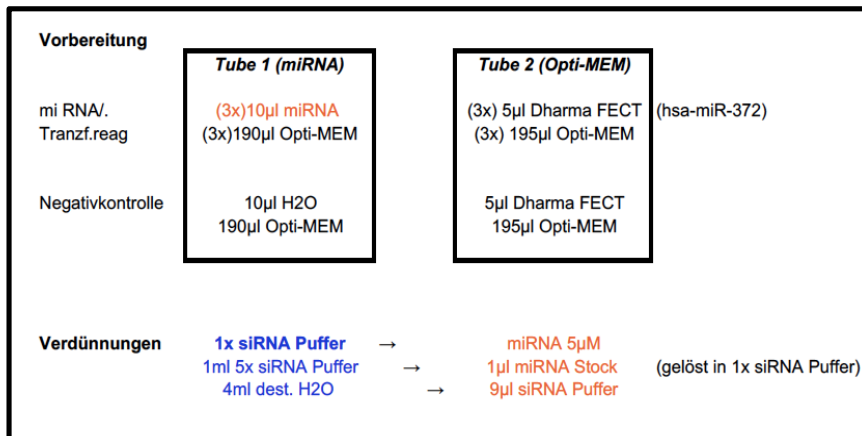


Abb. 6: mi- RNA Ansatz

### Arbeitsschritte:

1. Verdünnung ansetzen (siehe Abb. 6)
2. Tube 1 und 2 ansetzen, mixen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
3. Tube 1 zu Tube 2 hinzugeben mittels vorsichtigem Resuspendieren und 20 min. bei Raumtemperatur inkubieren
4. Je 1600 µl Opti- MEM hinzugeben
5. „altes“ Kultivierungsmedium von den 4 Wells absaugen
6. 2 ml Transfektionsmedium pro Well pipettieren
7. 24- 48 h Inkubieren bei 37 °C

## LDH-Test

### Versuchsaufbau

t0 (vor Behandlung) day 1	K	K1	K2	K3
	S	S1	S2	S3
t1 (nach Elektroporation) day 2	K	K1	K2	K3
	S	S1	S2	S3
t2 (nach miRNA I) day 4	K	K1	K2	K3
	S	S1	S2	S3
t3 (nach X-treme Gene) day 6	K	K1	K2	K3
	S	S1	S2	S3
t4 (nach X-treme Gene) day 8	K	K1	K2	K3
	S	S1	S2	S3
t5 (nach miRNA II) day 11	K	K1	K2	K3
	S	S1	S2	S3

### pro Zeitpunkt (t)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1	K2	K3	A1	A1	A1	A2	A2	A2	A3	A3	A3
B	S1	S2	S3	S1	S1	S1	S2	S2	S2	S3	S3	S3
C				1	1	1	2	2	2	3	3	3
d				std1	std1	std1	std2	std2	std2			
E				blank	blank	blank						

Abb. 7: LDH- Test Versuchsaufbau: Behandlungszeitpunkte mit LDH- Test (t0, t1, t2, t3, t4 und t5), je Kontroll- Kultur (K) und STEM- Circle Kultur (S) mit den Referenzwerten vom LDH mit 100% (std1), mit 50% (std1/2) und als Negativkontrolle (blank). Jede Kontrollkultur- Probe (K1, K2, K3) und STEM- Circle- Probe (S1, S2, S3) entsprechen dabei je einem Well einer 6- Well Platte. Zudem erfolgte eine Dreifachkontrolle pro Zeitpunkt (t) für K1 mit A1, für K2 mit A2, für K3 mit A3 und für S1 mit S1, für S2 mit S2 und für S3 mit S3.

Nutzung des LDH- Test Kits zur Messung der Zytotoxizität: CytoToxONE (LDH Cytotoxicity Test, Promega GmbH, Walldorf Deutschland)

Durchführung des LDH-Tests während des Elektroporationsversuches nach den einzelnen Behandlungsschritten (t(x) pro Well/Eppendorfgefäße):

1. Zellen 1x mit PBS waschen (6 Wells und 3 Eppendorfgefäße entspricht 9 Proben, die 3 Eppendorfgefäße entsprechen dabei der Ausgangsprobe und legen somit den Ausgangswert zum späteren Abgleich fest)
2. Mastermix ansetzen; pro Probe: 180 µl PBS + 20 µl Triton 10 % (= 1800 µl PBS + 200 µl Triton 10 %)
3. pro Probe 200 µl Mastermix pipettieren
4. 45 min bei 37 °C inkubieren

5. pro Probe erfolgen drei Messungen, d.h. es werden jeweils 3x 50 µl von jedem Ansatz abgenommen (K1: A4, A5, A6 K2: A7, A8, A9 / Nullwert-Eppi 1: C4, C5, C6 Nullwert Eppi 2: C7, C8, C9 usw.)
6. die restlichen ca. 50 µl von K1, K2, K3 und S1, S2, S3 in jeweils ein Well einer 96 Wellplatte überführen und bei -20 °C wegfrieren (zur DNA - Isolation)
7. Standard (std): LDH-positiv Kontrolle separat (1:5000 G181A), ebenfalls 3x 50µl pipettieren (D4-D6) (entspricht 100% LDH)
8. Standard ½ (std ½): LDH-positiv Kontrolle separat, 1:2 (in PBS) verdünnt, ebenfalls 3x 50 µl pipettieren (D7-D9) (entspricht 50% LDH)
9. blank: PBS 3x 50 µl (E4-E6) (entspricht 0% LDH)
10. je Well (36x) 50 µl LDH-Substratlösung (G179A, G180A)
11. 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
12. je Well (36x) 50 µl Stop-Solution (G183A AcOH) hinzufügen
13. Lysat bei 490/ 492 nm messen

### **Kombination Elektroporation, Transfektion und LDH- Test**

- 1) Versuchsaufbau Elektroporation mit STEMcircles™, Behandlung mit mi-RNA und Transfektion mit X-Treme Gene
  - Tag 1: Elektroporation
  - Tag 2: Mediumwechsel mit hF-Medium 20 %
  - Tag 3: mi- RNA- Behandlung
  - Tag 5: Transfektion I
  - Tag 6: Mediumwechsel
  - Tag 7: Transfektion II
  - Tag 8: Mediumwechsel hiPSC Medium 0,2 %
  - Tag 9: Mediumwechsel
  - Tag 10: Mediumwechsel, mi- RNA- Behandlung
  - Tag 11: Mediumwechsel
  
- 2) Versuchsaufbau nur Transfektion und mi-RNA
  - Tag 1: Transfektion I
  - Tag 2: Mediumwechsel auf hF Medium 20 %

Tag 3: mi- RNA- Behandlung  
Tag 4: Fotos  
Tag 5: Transfektion II  
Tag 6: Mediumwechsel  
Tag 7: Transfektion III  
Tag 8: Mediumwechsel hiPSC Medium 0,2%  
Tag 9: Mediumwechsel  
Tag 10: mi- RNA- Behandlung  
Tag 11: Mediumwechsel

3) Versuchsaufbau Elektroporation, Transfektion, mi- RNA und LDH- Test

Tag 1: Elektroporation, dann LDH- Test  
Tag 2: Mediumwechsel auf hF-Medium 20 %, dann LDH- Test  
Tag 3: mi- RNA- Behandlung  
Tag 4: LDH-Test  
Tag 5: Transfektion I  
Tag 6: Mediumwechsel, LDH-Test  
Tag 7: Transdektion II  
Tag 8: Mediumwechsel hiPSC Medium 0,2 %, LDH-Test  
Tag 9: Mediumwechsel  
Tag 10: Mediumwechsel, mi- RNA- Behandlung  
Tag 11: Mediumwechsel, LDH-Test

### **Vergleich verschiedener Zelllinien**

- 1) Versuchsaufbau wie Versuch 1 bis Tag 2, dann Wechsel auf 0,2 % Medium
- 2) Reprogrammierung mittels Elektroporation von STEM-CIRCLES humaner vs. muriner Fibroblasten
- 3) Reprogrammierung mittels Elektroporation humaner Fibroblasten vs. hSGSC Zellen mithilfe des NAPA GEN Elektroporators (in Kooperation mit dem Fraunhofer Institut Lübeck)
- 4) Reprogrammierung humaner Fibroblasten vs. humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) und Zellsortierung FACS (Durchflusszytometrie)

Durch die Markierung der erfolgreich reprogrammierten Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper (GFP) können diese im Zellsorter mittels Laser angeregt werden und emittieren ein Lichtsignal spezifischer Wellenlänge. Detektoren registrieren dieses Signal auf und verarbeiten es. Somit ist es möglich die Anzahl der Zellen durch Messung der Emission in einem Cellsorter (FACS) exakt zu bestimmen.

### 3.9. Bi-Sulfit-Konvertierung, Klonierung und Sequenzierung

#### Versuchsablauf

- 1.) D3, BLC6, 2FiPS anzüchten ohne Feeder Layer, dafür mit 50 µl LIF in Kultivierungsmedium (doppelt LIF)
- 2.) 2x 4 cm- Schalen *Quick gDNA<sup>TM</sup> MiniPrep* von Zymo Research (Irvine, CA USA) → 2x Eluat 50 µl
- 3.) *EZ DNA Methylation Gold Kit<sup>TM</sup>* Protokoll von Zymo Research (Irvine, CA USA) → 2x Eluat 10 µl
- 4.) Gradienten-PCR der externen Primer um die richtigen Annealing Temperatur zu finden
- 5.) Agarose Gel Elektrophorese mit den Produkten mittels externer Primer
- 6.) Wiederholung der PCR mit der ermittelten Annealing Temperatur für alle Proben (Oct4-1 ext: 57 °C 423 bp, Nanog ext: 64 °C 348 bp, Sox-2 ext: 57 °C 452 bp, Oct4-2 ext: 64 °C 299 bp)
- 7.) PCR-Produkte aufreinigen mit PCR Clean-up von *Nucleo Spin Extract II* von Macherey&Nagel (Düren, Deutschland)
- 8.) Gradienten-PCR der internen Primer mit dem PCR-Produkt der externen Primer um die beste Annealing-Temperatur der internen Primern zu ermitteln
- 9.) Agarose-Gelelektrophorese mit den Produkten der internen Primern
- 10.) Wiederholung der PCR mit der ermittelten Annealing Temperatur für alle Proben (Oct4-1 int: 61 °C 200 bp, Nanog int: 55,5 °C 312 bp, Sox-2 int: 55,5 °C 362 bp, Oct4-2 int: 64 °C 228 bp)
- 11.) PCR der Proben mit der besten ermittelten Temperatur: 3x Probe für die externen Primer, davon 2x Probe für die internen Primer: PCR clean up und 1x Gelelektrophorese, Rest -20 °C einfrieren
- 12.) 1x interne Probe auf Eis, 1x Gelelektrophorese der Endprodukte

- 13.) Gelextraktion: ausschneiden der Banden und aufreinigen der Gelbanden/Produkte (PCR clean up) mit Nulceo Spin Extract II
- 14.) TOPO→ Cloning von Thermofisher, mit Ampicillin Platten und Ampicillin 100 µl auf 100 ml LB-Medium (1:1000)
- 15.) Minipräp/ Plasmidpräparation mit *Plasmid DNA Purification Nucleo Spin Mini* von Macherey&Nagel (Düren, Germany) --> Eluat 50 µl
- 16.) Nano Drop Analyse der DNA-Menge
- 17.) Testrestriktion mit ECO-RI (GAATTC):  
500 ng DNA+ 1 µl ECO-RI + 5 µl Puffer Cut Smart, auffüllen auf 50 µl mit sterilem H<sub>2</sub>O
- 18.) Gelelektrophorese mit 2 % Agarose-Gel (150 ml TEA-Puffer+ 4,5 µl Midori Green bei 300 mA, 100 V, 50 W für 30-45 min
- 19.) für Analyse werden 1000 ng/10µl gebraucht→ nicht ausreichende Mengen:  
*Plasmid DNA Purification Midi von Macherey&Nagel (Düren, Germany) --> 100 µl Eluate*
- 20.) 1000 ng/10 µl DNA + 4 µl Primer M13 Invitrogen 10 µM x2 (forward und reverse) zu LGC-Genomics (Berlin, Germany) zur Analyse des Anteils der methylierten DNA- Abschnitte
- Restliche DNA der Klone mit Glycerin Stock einfrieren.  
Anlegen Glycerin Stock: 40 % Glycerin in LB- Medium.

### Auswahl der Primer für die einzelnen zu untersuchenden Genabschnitte

#### Oct-4, human, genomic DNA

- Genabschnitt 35500000 bp bis 35511776 bp  
(siehe Anlage Oct-4 Genabschnitt)
- Genabschnitt nach Bi- Sulfit- Konversion (siehe Anlage)
- Genabschnitt nach Bi- Sulfit- Konversion mit Primern (siehe Anlage)
- Externer Primer Oct-4-1:  
Forward: **GGTTTTTGAGGTTGTGTGATTTAT**  
Reverse: **GAGTAGGAAGTTGTTTTAGGGGAG**  
Genprodukt: 423 bp
- Interne Primer Oct-4-1:

Forward: GGGATTTTTAGATTGGGTTTAGAAAA

Reverse: TATTTGAGGTTTTGTTTTGAGGAG

Genprodukt: 200 bp

### Originalgenabschnitt Oct-4 Abschnitt 1

Vor Bi- Sulfit- Konversion:

GGGATCCTCAGACTGGGCCAGAAAA

CCACTCTAGGGAAGTTCAGGGTAGGCTCTCTGCACCCCCTCCTCCTAATCC

GTCTCCTTAGTGTCTTTCGCCAGCACAGGAATGGGGGAGGGGTGGGTGAC

GAGGATGAACACCGGAGTCCCTGGAGGAAGGGAAGCAGGGTATCTC

CATCTGAGGCTCTGTCTTTGAGGAG

Nach Bi- Sulfit- Konversion, nicht methyliert:

GGGATTTTTAGATTGGGTTTAGAAAA

TTATTTTAGGGAAGTTTAGGGTAGGTTTTTTGTATTTTTTTTTTTAATTTTGT

TTTTAGTGTTTTTTTTGTTAGTATAGGAATGGGGGAGGGGTGGGTGATGAGGA

TGAATATGTGAGTTTTTTGGAGGAAGGGAAGTAGGGTATTTT

TATTTGAGGTTTTGTTTTGAGGAG

- Externe Primer Oct-4-2:

Forward: GGTTTTAGGTGGGTTTGAATT

Reverse: AGGTAAGTGAAGGATTGTTG

Genprodukt: 290 bp

- Interne Primer Oct-4-2:

Forward: AGAGGTATTGGGGATTTTTTTATGT

Reverse: AGTTGGAGAAGGTGGAATTAATTTT

Genprodukt: 228 bp

## Originalgenabschnitt Oct-4 Abschnitt 2

Vor Bi- Sulfit- Konversion:

AGAGGTATTGGGGATCTCCCCATGT  
CCGCCCGCATA**CG**AGTTCTG**CG**GAGGGATGGCATACTGTGGACCTCAGGTT  
GGACTGGGCCTAGTCCCCCAAGTTGG**CG**TGGAGACTTTGCAGCCTGAGGGC  
CAGGCAGGAGC**CG**AGTGGAAAGCAACTCAGAGGGAACCTCCTCTGAGCCC  
TGTGCC**CG**AC**CG**CCCCAATGCC**CG**TGA  
AGTTGGAGAAGGTGGAACCAACTCC

Nach Bi- Sulfit- Konversion:

AGAGGTATTGGGGATTTTTTTATGT  
TTGTTTGTATATGAGTTTTGTGGAGGGATGGTATATTGTGGATTTTAGGTTGG  
ATTGGGTTTAGTTTTTTAAGTTGGTGTGGAGATTTTGTAGTTTGAGGGTTAGG  
TAGGAGTATGAGTGGAAAGTAATTTAGAGGGAATTTTTTTTGAGTTTTGTGTT  
GATTGTTTTAATGTTGTGA  
AGTTGGAGAAGGTGGAATTAATTTT

## Nanog, human, genomic DNA

- Genabschnitt 122700000 bp bis 122715000 bp  
(siehe Anhang *Nanog, human genomic DNA*)
- Genabschnitt nach Bi- Sulfit- Konversion (siehe Anlage)
- Genabschnitt nach Bi- Sulfit- Konversion mit Primern (siehe Anlage)
- Externer Primer

Forward: **TTAGGGTTTGGAGGTGTAGTTG**

Reverse: **AGATAGGTTGATTTGGTTGGTG**

Genprodukt: 348 bp

- Interner Primer:

Forward: **ATGAATAAAGTGAAATGAGGTAAAG**

Reverse: **TTGGTTTTTAGATAGGTTGATTTGGTT**

Genprodukt: 312 bp



## Originalgenabschnitt Nanog

Vor Bi- Sulfit- Konversion:

```
ATGAATAAAGTGAAATGAGGTAAAG
CCTCTTTTTGGGGGGGGGGGATGTCTTTAGATCAGAGGATGCCCCCTAAGCT
TTCCCTCCCTCCCAGTCTGGGTCACCTTACAGCTTCTTTTGCATTACAATGTC
CATGGTGGACCCTGCAGGTGGGATTAAGTGAATTCACAGGGCTGGTGGG
GCGTGGGTGCCTGGGTGCCTGGGAGAATAGGGGGTGGGTAGGGTAGG
AGGCTTGAGGGGGGAGGAGCAGGACCTACCCTTTAAATCTATCGCCTTGAG
CCG
TTGGCCTTCAGATAGGCTGATTTGGTT
```

Nach Bi- Sulfit- Konversion:

```
ATGAATAAAGTGAAATGAGGTAAAG
TTTTTTTTTGGGGGGGGGGGATGTTTTTAGATTAGAGGATGTTTTTAAGTTTT
TTTTTTTTTTAGTTTGGGTTATTTTATAGTTTTTTTTGTATTATAATGTTTATGG
TGGATTTTGTAGGTGGGATTAATTGTGAATTTATAGGGTTGGTGGGGTGTGG
GTGTTGTTTGGGTGTTTGGGAGAATAGGGGGTGGGTAGGGTAGGAGGTTTG
AGGGGGGAGGAGTAGGATTTATTTTTAAATTTATTGTTTTGAGTTG
TTGGTTTTTAGATAGGTTGATTTGGTT
```

## Sox-2, human, genomic DNA

- Genabschnitt 34649000 bp bis 34653000 bp  
(siehe Anlage Sox-2 Genabschnitt)
- Genabschnitt nach Bi- Sulfit- Konversion (siehe Anlage)
- Genabschnitt nach Bi- Sulfit- Konversion mit Primern (siehe Anlage)
- Externe Primer:  
Forward: **ATGGGTTTTGTTTTATTTGGTTTTAG**  
Reverse: **TTGTTAAGGTAGAGAAGAGAGTG**  
Genprodukt: 452 bp
- Interne Primer:  
Forward: **GATTTAAGAGAGAGTTAATATT**  
Reverse: **GATGGTTGTTTATTAATTTGTTTA**  
Genprodukt: 362 bp

## Originalgenabschnitt Sox-2

Vor Bi- Sulfit- Konversion:

GTATCCAAGAGAGAGCCAATATT

C**CG**TAGCATGGGGGAAAGGAGCTGT**CG**TCTTGGTGCTGTTTACCCACTTCCT  
T**CG**AACAGG**CG**T**CG****CG**TGACCTGTTGCTGAAAAC**CG**GGGGG**CG**GGGGGG  
GGGGATACAAAGGTTCCCCAG**CG**GC**CG**GCTG**CG**GGCC**CG**CCTCCCC**CG**CG  
**CG**GTT**CG**GGGCACAG**CG**CTCTGCTGGGCT**CG**GCT**CG**GC**CG**GC**CG**GCAGGC  
CC**CG**CCCCCTTTCATGCAAACCCTCTGG**CG**AGGCTGGGCT**CG**GG**CG**CAGG  
AGC**CG**GC**CG**CT**CG**CTGATTGGCC**CG**CGGAAACCCATTTATTCCCTGACAGCC  
CCCATCACATG

GATGGTTGTCTATTA ACTTGTTC A

Nach Bi- Sulfit- Konversion:

GTATTTAAGAGAGAGTTAATATT

T**TG**TAGTATGGGGGAAAGGAGTTGTTGTTTTGGTGTGTTTATTTATTTTTTTT  
GAATAGGTGTGTGTTGTGATTTGTTGTTGAAAATGGGGGGTGGGGGGGGGG  
GATATAAAGGTTTTTTAGTGGT**TG**GTTGTGGGTTTGTTTTTTTTGTGTGGTTTG  
GGGTATAGTGTTTTTGTTGGGTTTGGTTTGGTGGTGTGGTAGGTTTTGTTTTTT  
TTTATGTAATAATTTTTTGGTGAGGTTGGGTTTGGGTGTAGGAGTTGGTGTTTG  
TTGATTGGTTGTTGGAAATTTATTTATTTTTTGATAGTTTTTATTATATG  
GATGGTTGTTTATTAATTTGTTTA

## Optimierung der Annealing Temperatur für die PCR

Es erfolgte eine Gradienten- PCR zur Auswahl der besten Annealing Temperatur im Bereich von 55,5 °C bis 65 °C. Zunächst wurde diese für die externen ausgewählten Primer, anschließend für die internen Primer bestimmt.

## Gradienten- PCR externe Primer

Bestimmung der optimalen Annealing Temperatur mittels Gradienten- PCR für die externen Primer von Oct-4-1, Oct-4-2, Nanog und von Sox-2 (forward und reverse):

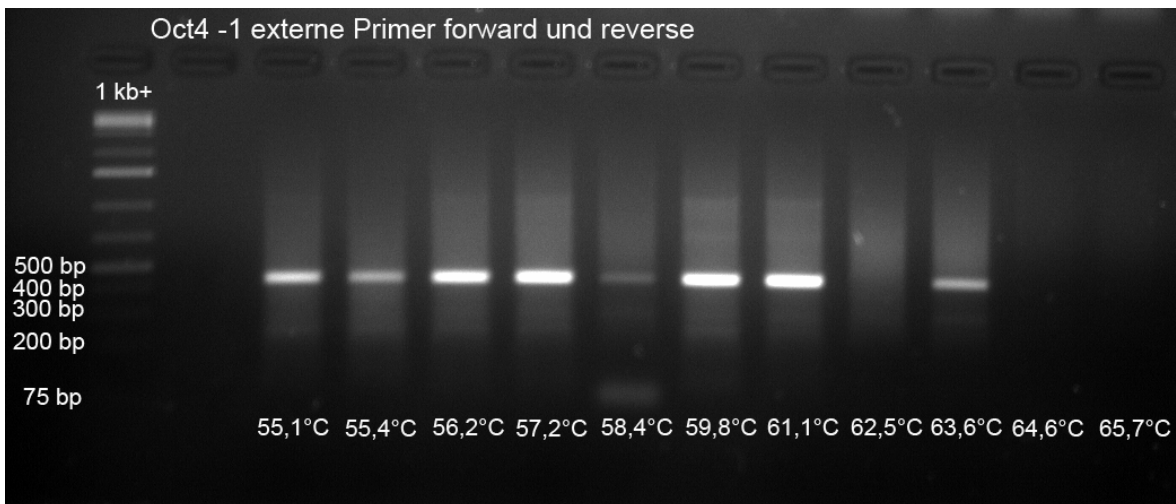


Abb. 8: Gradienten- PCR des Genabschnitts Oct-4-1 mit den externen Primern forward (**GGTTTTTGAGGTTGTGTGATTTAT**) und reverse (**GAGTAGGAAGTTGTTTTAGGGGAG**). Die Größe der DNA sollte bei diesem Genabschnitt bei ca. 423 bp liegen. Die kräftigste Bande liegt bei 56,2 und 57,2 °C, sodass hier 57 °C ausgewählt wurde.

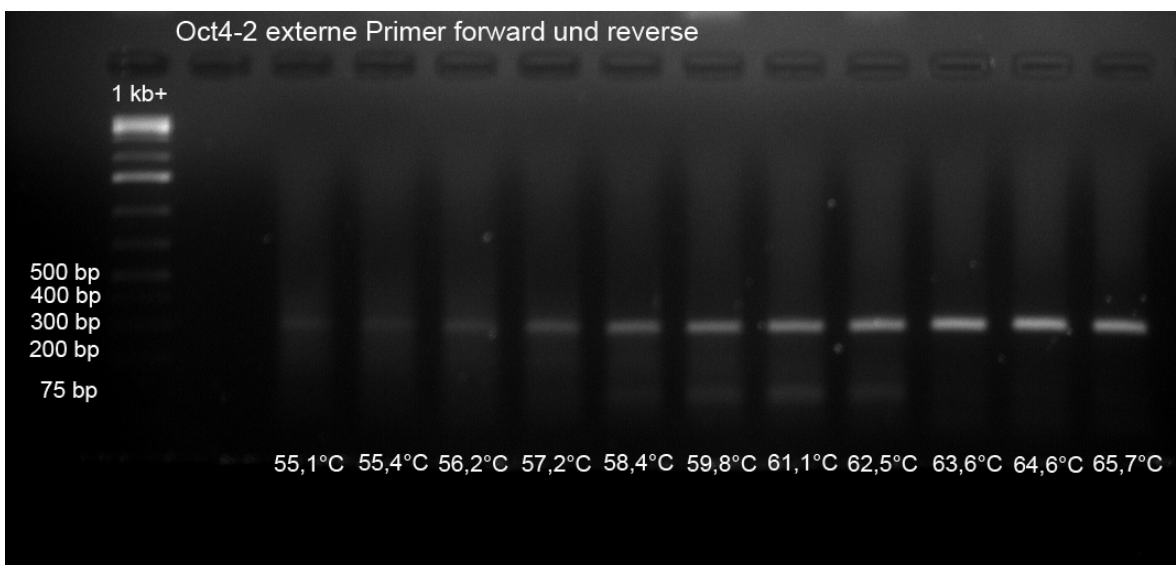


Abb. 9: Gradienten- PCR des Genabschnitts Oct-4-2 mit den externen Primern forward (**GGTTTTAGGTGGGTTTGGGAATT**) und reverse (**AGGTAAGTGAAGGGATTTGGTTG**).

Die Größe der DNA sollte bei diesem Genabschnitt bei ca. 288 bp liegen. Die kräftigste Bande liegt bei 63,6 °C und 64,6 °C, sodass hier 64 °C ausgewählt wurde.

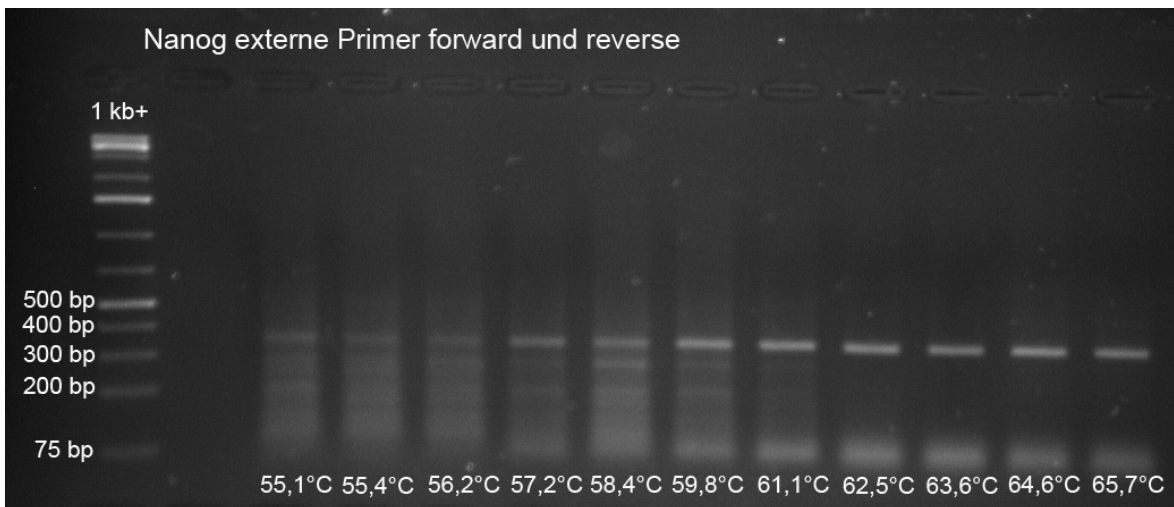


Abb. 10: Gradienten- PCR des Genabschnitts Nanog mit den externen Primern forward (**TTAGGGTTTGGAGGTGTAGTTG**) und reverse (**AGATAGGTTGATTGTTGGTG**). Die Größe der DNA sollte bei diesem Genabschnitt bei ca. 384 bp liegen. Die kräftigste Bande liegt bei 64,6 °C, sodass hier 64 °C ausgewählt wurde.

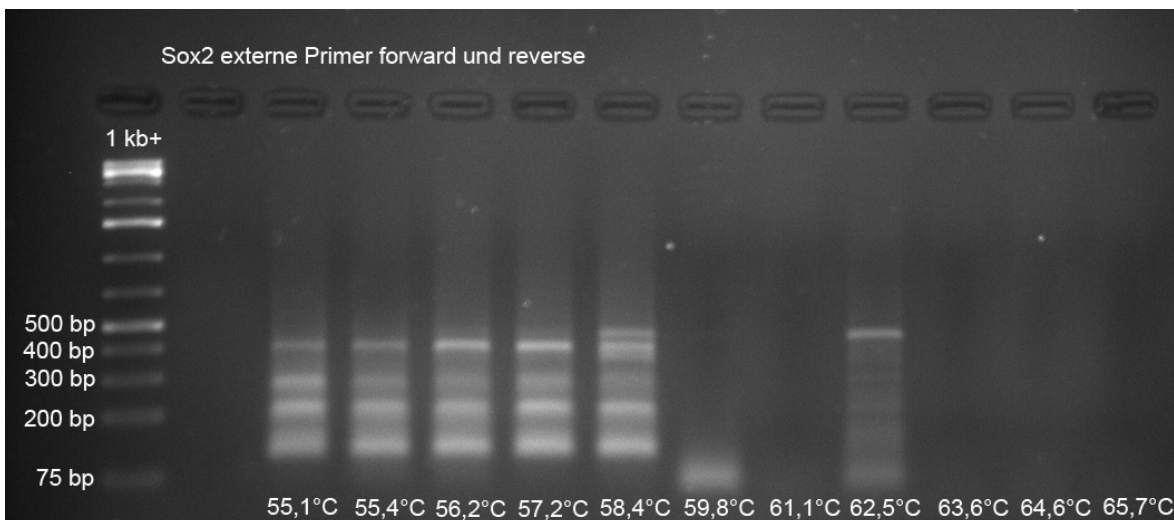


Abb. 11: Gradienten- PCR des Genabschnitts Sox-2 mit den externen Primern forward (**ATGGGTTTTGTTTTATTTGGTTTTAG**) und reverse (**TTGTTAAGGTAGAGAAGAGAGTG**). Die Größe der DNA sollte bei diesem Genabschnitt bei ca. 452 bp liegen. Die kräftigste Bande liegt bei 57,2 °C, sodass hier 57 °C ausgewählt wurde.

Anschließend wurde erneut eine Gradienten- PCR zur Bestimmung der optimalen 'Annealing'-Temperatur für die internen Primer durchgeführt. Die Länge der jeweiligen amplifizierten Fragmente sollten für Oct-4-1 bei 200 bp, für Oct-4-2 bei 228 bp, für Nanog bei 312 bp und für Sox-2 bei 362 bp Größe liegen.

### Gradienten- PCR Externe und Interne Primer

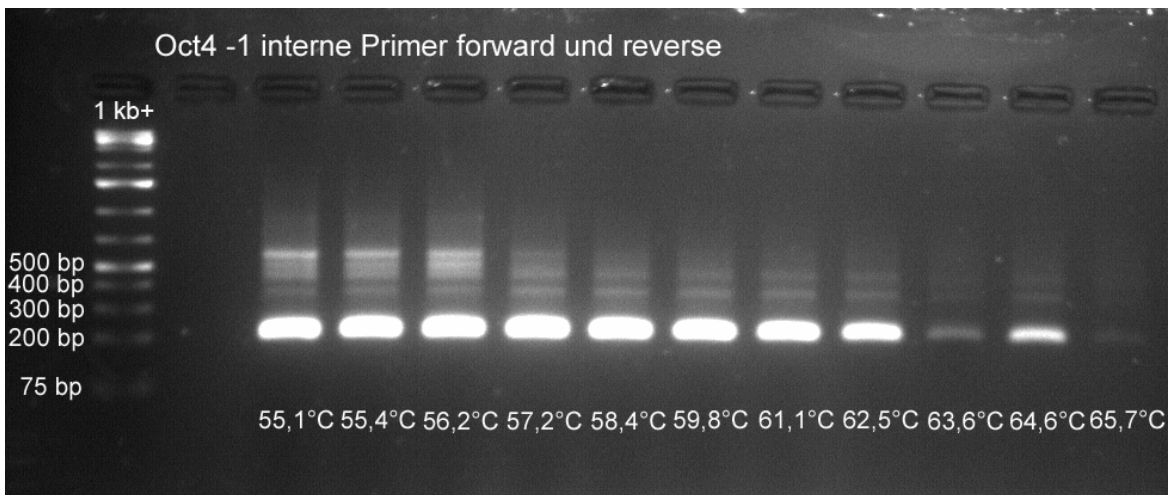


Abb. 12: Gradienten- PCR des Genabschnitts Sox-2 mit den internen Primern forward (**GGGATTTTTAGATTGGGTTTAGAAAA**) und reverse (**TATTTGAGGTTTTGTTTTGAGGAG**). Die Größe der DNA sollte bei diesem Genabschnitt bei ca. 200 bp liegen. Die kräftigste Bande liegt bei 59,8 °C und 61,1 °C, sodass hier 61 °C ausgewählt wurde.

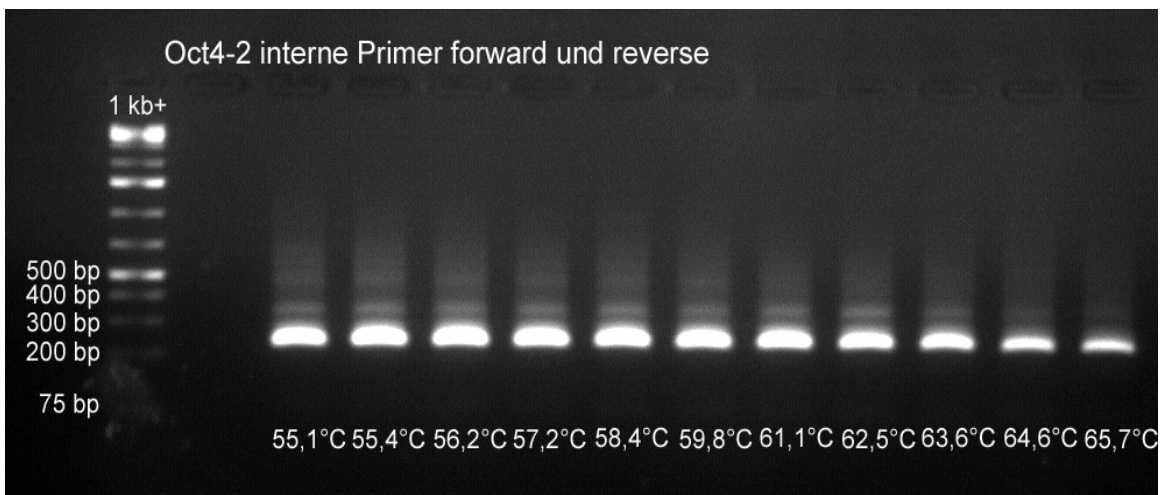


Abb. 13: Gradienten- PCR des Genabschnitts Oct-4-2 mit den internen Primern forward (**AGAGGTATTGGGGATTTTTTATGT**) und reverse (**AGTTGGAGAAGGTGGAATTAATTTT**). Die Größe der DNA sollte bei diesem

Genabschnitt bei ca. 228 bp liegen. Die kräftigste Bande liegt bei 64,6 °C, sodass hier 64 °C ausgewählt wurde.

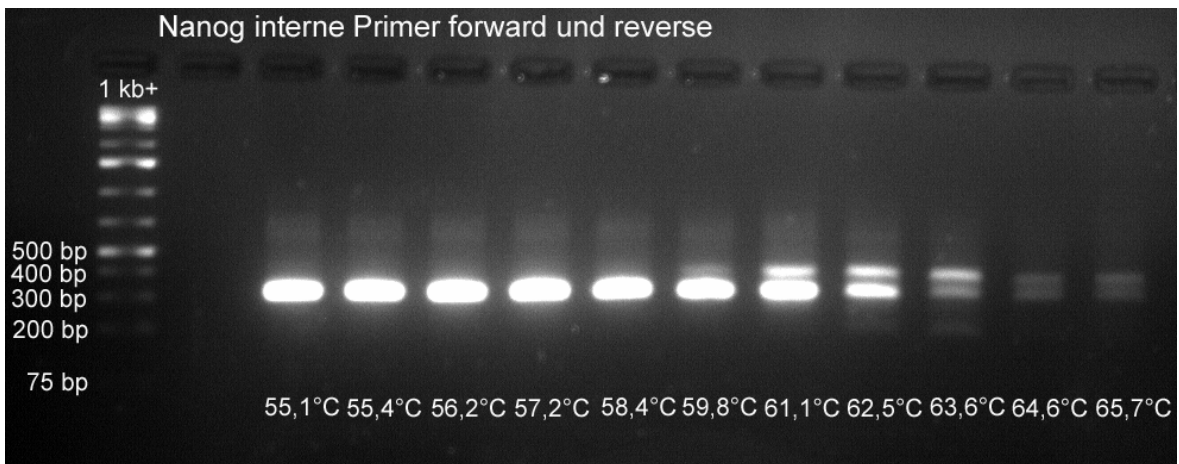


Abb. 14: Gradienten- PCR des Genabschnitts Nanog mit den internen Primern forward (**ATGAATAAAGTGAAATGAGGTAAAG**) und reverse (**TTGGTTTTTAGATAGGTTGATTTGGTT**). Die Größe der DNA sollte bei diesem Genabschnitt bei ca. 312 bp liegen. Die kräftigste Bande liegt bei 55,4 °C und 56,2 °C, sodass 55,5 °C ausgewählt wurde.

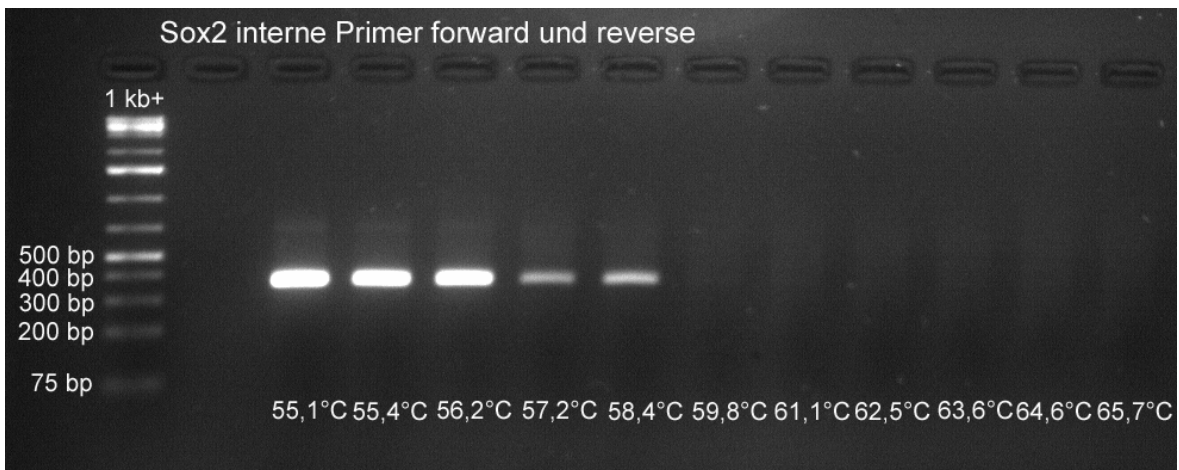


Abb. 15: Gradienten- PCR des Genabschnitts Sox-2 mit den internen Primern forward (**GTATTTAAGAGAGAGTTAATATT**) und reverse (**GATGGTTGTTTATTAATTTGTTTA**). Die Größe der DNA sollte bei diesem Genabschnitt bei ca. 362 bp liegen. Die kräftigste Bande liegt bei 55,4 °C, sodass hier 55,5 °C ausgewählt wurde.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Annealing-Temperaturen:

Tabelle 2: Annealing Temperaturen der Externen Primer

Gen	Gengröße 1 (bp)	Annealing Temperatur 1 (°C)	Gengröße 2 (bp)	Annealing Temperatur 2 (°C)
Oct-4-1	423	57	288	61
Oct-4-2	288	64	228	64
Nanog	348	64	312	55,5
Sox-2	452	57	362	55,5

Zusammenfassung der Annealing-Temperaturen anhand der Gradienten-PCR der Gene mit den externen Primer (Gengröße 1 und Annealing Temperatur 1) sowie der internen Primer (Gengröße 2 und Annealing Temperatur 2)

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Transfektionseffizienz

Die erfolgreiche Transfektion somatischer Zellen spielt für die Reprogrammierungseffizienz eine entscheidende Rolle. Daher wurden zunächst verschiedene Transfektionsmethoden verglichen.

#### **Transfektion von humanen Fibroblasten mittels STEMcircle™ durch Elektroporation, Xtreme Gene und mi- RNA Behandlung**

Humane Fibroblasten wurden kultiviert und mittels Elektroporation (Abb. 16) bzw. durch Zusatz von Xtreme Gene (Abb. 18) und durch Zusatz von Xtreme Gene und anschließende mi- RNA- Applikation (Abb. 17) mit dem STEMcircles™ - Plasmid transfiziert. Bei der Variante mit mi- RNA wurde als Negativkontrolle eine Transfektion ohne mi- RNA durchgeführt. Nach jedem Transfektionsschritt erfolgte eine Kontrolle auf erfolgreiche Transfektion durch Gesichtsfeldzählung der grün fluoreszierenden Zellen der mit STEMcircles™ transfizierten humanen Fibroblasten (HF) im Vergleich zu einer mit dem Reporter- Konstrukt GFP transfizierten Kontrollkultur (PYFP). Für die Gesichtsfeldzählung wurden 10 Areale betrachtet und die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen pro Areal erfasst. Die Zeitpunkte der Erfassung und die Auszählung der Zellen sind in Tabelle 3 im Anhang dargestellt.



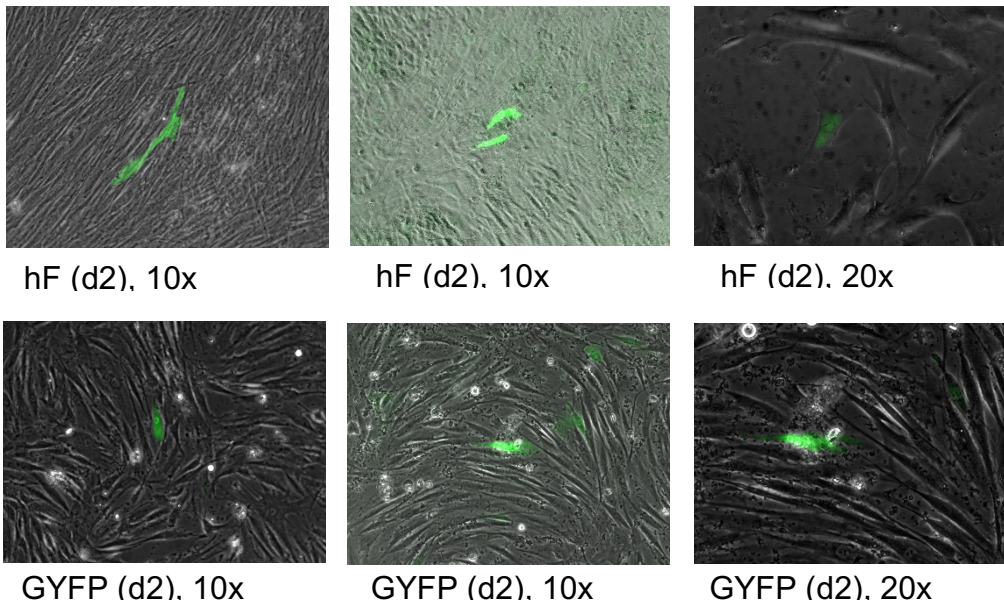


Abb. 16: Humane Fibroblasten mit STEMcircle™ Plasmid transfiziert (hF) vs. Kontrollkultur mit GYFP Vektor (GYFP) nach Elektroporation (d2), 10x und 20x vergrößert

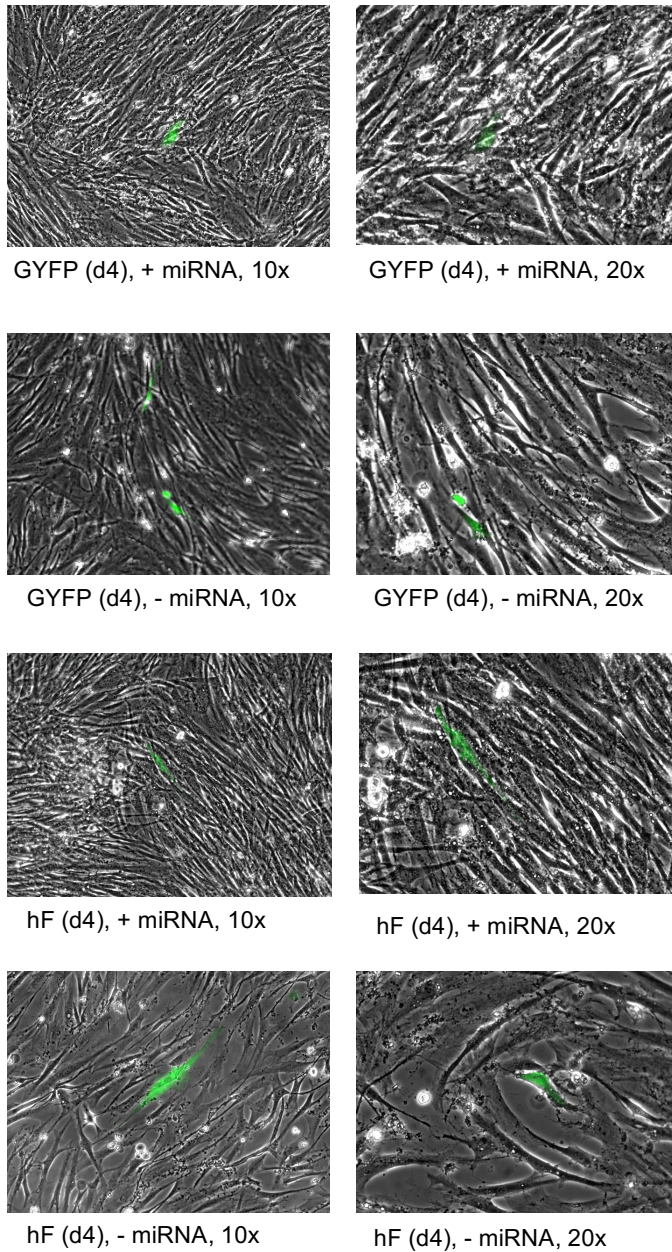


Abb. 17: Humane Fibroblasten mit STEMcircle™ Plasmid transfiziert (hF) vs. Kontrollkultur mit GYFP Vektor (GYFP) nach Behandlung mit miRNA (d4, + mi- RNA), und keine Behandlung mit mi- RNA (d4, - mi- RNA), 10x und 20x vergrößert

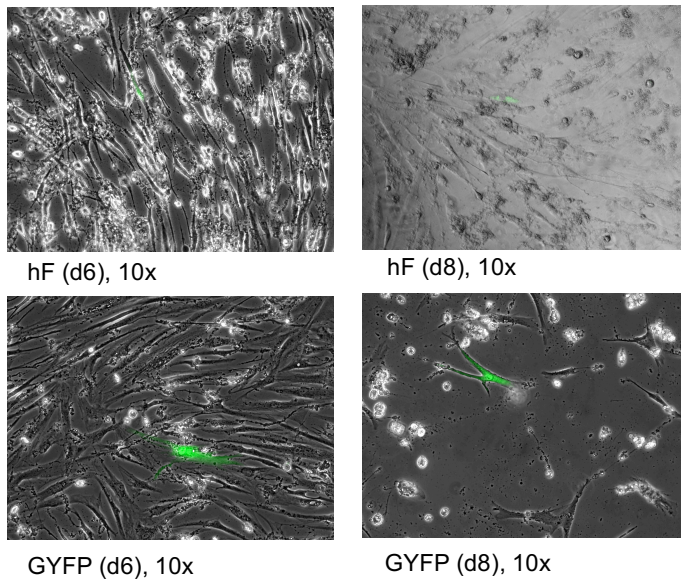


Abb. 18: Humane Fibroblasten mit STEMcircle™ Plasmid transfiziert (hF) vs. Kontrollkultur mit GYFP Vektor (GYFP), nach erster Transfektion mit X-treme Gene (d6) und zweiter Transfektion mit X-treme Gene (d8), 10x vergrößert

Bei diesem Versuch zeigt sich anhand der Auszählung der grün fluoreszierenden Zellen pro Gesichtsfeld ein Unterschied der STEMcircles™ behandelten humanen Fibroblasten im Vergleich zur Kontrollkultur, (Abb. 16). Im Mittel lag der Anteil der grün fluoreszierenden Zellen in der Kontrollkultur bei 1,4 Zellen je Gesichtsfeld (Z/G) im Vergleich zu 0,6 Z/G bei den STEMcircles™ behandelten humanen Fibroblasten.

Nach Verwendung von mi- RNA (Abb. 17) zeigte sich weiterhin eine erfolgreiche Transfektion mit einer Steigerung der Anzahl der Zellen der reprogrammierten humanen Fibroblasten auf 0,96 Z/G. Die Negativkontrolle ohne mi- RNA ergab 0,9 Z/G und die Kontrolle mit dem Genkonstrukt GFP ergab ebenfalls einen Anstieg auf 1,5 Z/G. Zudem zeigte sich in der Umgebung der Zellen eine Zunahme der absterbenden Zellen und eine Auflockerung des Zellverbundes unter dem Mikroskop.

Nach erfolgter erster Transfektion am fünften Versuchstag mittels X- treme Gene zeigte sich eine weitere Zunahme auf 1,0 Z/G versus der mi- RNA Negativkontrolle von 0,8 Z/G. In der Kontrolle zeigte sich bereits ein leichter Rückgang mit nicht mehr adhären Zellen von 0,37 Z/G.

Der Zellverbund lockerte sich zudem mit jedem weiteren Behandlungsschritt auf, sodass bereits am neunten Tag nach der zweiten Transfektion nur noch wenige adhärenente Zellen mit umgebenden Zelldebries vorhanden waren. Es konnte aber keine Ausbildung von Kolonien, also Klonen reprogrammierter Zellen beobachtet werden.

### **Transfektion von murinen Fibroblasten mittels Elektroporation, X-treme Gene und mi- RNA Behandlung**

Probatorisch wurde in diesem Versuch die Zelllinie der humanen Fibroblasten durch murine Fibroblasten ersetzt, da im vorherigen Versuch ein zunehmendes Absterben der Zellen mit weniger fluoreszierenden Zellen nach jeder weiteren Behandlung beobachtet worden war. Die zugrundeliegende Annahme ist, dass frühere Versuche der Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass murine Fibroblasten in der Kultivierung widerstandsfähiger sind. Es wurden daher murine Fibroblasten mit STEMcircles™ transfiziert. Nach der Transfektion an Tag 2 des Versuchsablaufs (Abb. 19) und nach erneuter Transfektion mit anschließender mi- RNA Behandlung an Tag 4 (Abb. 20) erfolgte eine Gesichtsfeldzählung der grün fluoreszierenden Zellen der murinen Fibroblasten (MF) im Vergleich zur Kontrollkultur (PYFP). Für die Gesichtsfeldzählung wurden 10 Areale betrachtet und die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen pro Areal erfasst. Die Zeitpunkte der Erfassung und die Auszählung der Zellen sind in der Tabelle 4 im Anhang dargestellt.

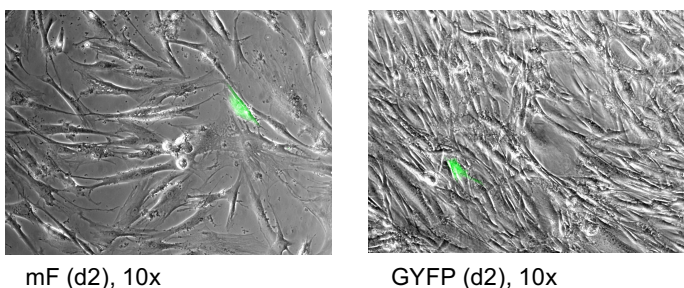


Abb. 19: Murine Fibroblasten mit STEMcircle™ Plasmid transfiziert (MF) vs. Kontrollkultur mit GYFP Vektor (GYFP), nach Elektroporation (d2), 10x vergrößert

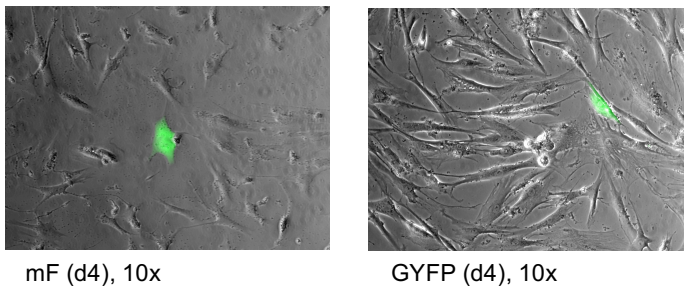


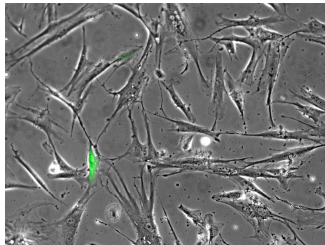
Abb. 20: Murine Fibroblasten mit STEMcircle™ Plasmid transfiziert (MF) vs. Kontrollkultur mit GYFP Vektor (GYFP), nach mi- RNA Behandlung (d4), 10x vergrößert

Nach der Elektroporation zeigten sich 0,33 Z/G bei den murinen Fibroblasten (MF) versus 0,625 Z/G bei der Kontrolle. Nach mi- RNA Behandlung stieg die Zahl der MF leicht auf 0,45 Z/G an, die Negativkontrolle und auch die PYFP Kontrolle ergaben 0,5 Z/G. Hier zeigte sich also kein deutlicher Effekt der mi- RNA Behandlung und zudem starben die Zellen bereits ab dem dritten Versuchstag, sodass die Transfektion zwar noch durchgeführt wurde, allerdings keine Zellen zur Auswertung mehr vorhanden waren.

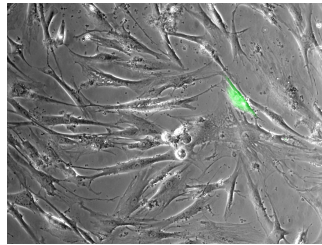
### **Transfektion von humanen Fibroblasten mit Xtreme Gene und mi- RNA Behandlung ohne vorherige Elektroporation**

Die Vorversuche haben gezeigt, dass es unabhängig von der Zelllinie bei der Elektroporation zu einem Absterben der Zellen im Versuchsverlauf kommt. Mit diesem Versuch wurde das Protokoll verändert und statt der Elektroporation nur Xtreme Gene als Transfektionsreagenz zur Transfektion der STEMcircles™ verwendet. Es wurden wiederum humane Fibroblasten verwendet und wie zuvor beschrieben behandelt. Nach der Transfektion erfolgte wiederum eine Gesichtsfeldzählung der grün fluoreszierenden Zellen der humanen Fibroblasten (HF) im Vergleich zur Kontrollkultur (PYFP). Zudem wurden mikroskopische Aufnahmen in 10 und 20- facher Vergrößerung dieser Zellen zum Zeitpunkt der Gesichtsfeldzählung gemacht (Abb. 21). Für die Gesichtsfeldzählung wurden 10 Areale betrachtet und die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen pro Areal

erfasst. Die Zeitpunkte der Erfassung und die Auszählung der Zellen werden in der Tabelle 5 im Anhang dargestellt.



hF (d2), 10x



GYFP (d2), 10x

Abb. 21: Humane Fibroblasten mit STEMcircle™ Plasmid transfiziert (hF) nach Transfektion mit X-treme Gene (d2) vs. Kontrollkultur mit GYFP Vektor (GYFP), 10x vergrößert

Die Gesichtsfeldauszählung nach Transfektion mittels X-treme Gene zeigte nach drei Tagen eine Quote von 0,4 Z/G bei den humanen Fibroblasten versus 0,25 Z/G in der Kontrolle. Nach der mi- RNA Behandlung zeigte sich das Zellsterben so ausgeprägt, dass eine Auswertung der Gesichtsfeldzählung nicht möglich war.

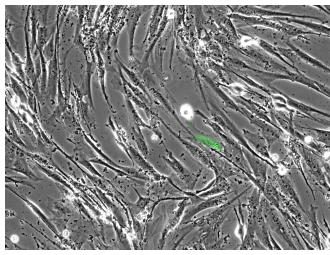
### **Transfektion von humanen Fibroblasten und Messung der Zytotoxizität mittels LDH- Test**

Da bei den vorherigen Versuchen sehr viele Zellen abstarben wurde ein LDH-Test durchgeführt, um zu prüfen, welcher Schritt des Protokolls den größten Anteil am Absterben der Zellen hat. Humane Fibroblasten wurden wie beschrieben transfiziert. Nach erfolgter Transfektion mit STEMcircles™ mittels Elektroporation und anschließender Behandlung mit mi- RNA (Tag 2 und Tag 4 des Versuchablaufs, Abb. 22), sowie X-treme Gene (Tag 6 des Versuchablaufs) und anschließender Behandlung mit mi- RNA (Tag 8 des Versuchablaufs, Abb. 23) erfolgte die Gesichtsfeldzählung der grün fluoreszierenden Zellen der humanen Fibroblasten (HF) im Vergleich zur Kontrollkultur (PYFP). Für die Gesichtsfeldzählung wurden 10 Areale betrachtet und die Anzahl der grün

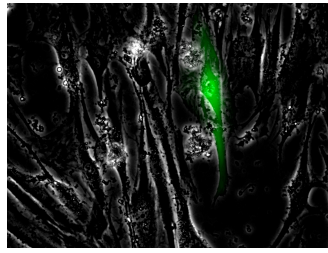
fluoreszierenden Zellen pro Areal erfasst. Die Zeitpunkte der Erfassung und die Auszählung der Zellen sind in der Tabelle 6 im Anhang dargestellt.

Für den LDH- Test wurde zusätzlich jeweils ein Well mit Zellen analysiert. Die Zellen dieses Wells wurden jeweils nach der Transfektion und nach der mi- RNA Behandlung abgelöst und das Substrat der LDH- Messung zugeführt.

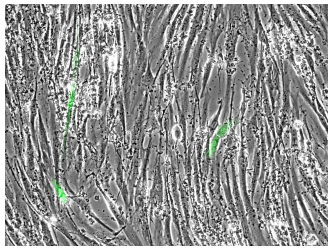
Es konnte dabei gezeigt werden, dass die umgebende LDH- Konzentration vier Tage nach der Elektroporation der mit STEMcircles™ behandelten humanen Fibroblasten mit einem erhöhten Anteil von 70,8 % LDH- Konzentration am größten war (Tabelle 7). Direkt einen Tag nach der Elektroporation lag der Wert bereits bei 64 % und fiel nach der ersten Transfektion am sechsten Tag wieder auf dieses Niveau zurück. Im weiteren Verlauf sank die Zellzahl unter Zunahme des Zelldebries. Ein ähnlicher Verlauf mit um 5 % weniger abweichenden Werten konnte auch bei der Kontrolle nachgewiesen werden.



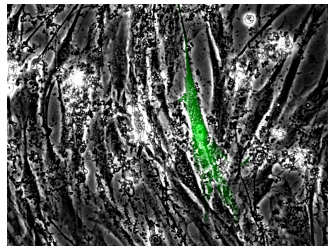
hF (d2), 10x



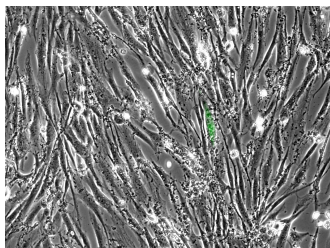
hF (d2), 20x



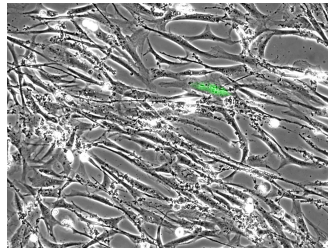
GYFP (d2), 10x



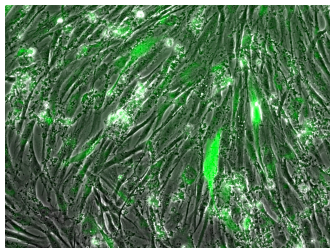
GYFP (d2), 20x



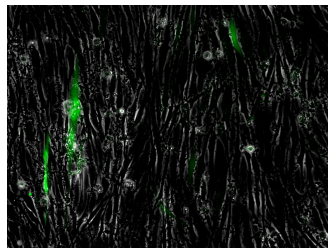
hF (d4), + miRNA, 10x



hF (d4), - miRNA, 10x



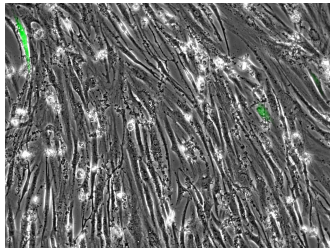
GYFP (d4), + miRNA, 10x



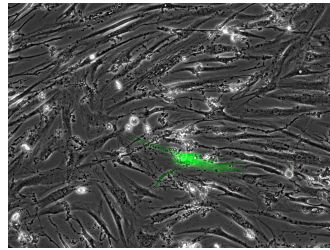
GYFP (d4), - miRNA, 10x

Abb. 22: Humane Fibroblasten mit STEMcircle™ Plasmid transfiziert (hF) nach Elektroporation (d2) und nach Behandlung mit mi- RNA (d4) vs. Kontrollkultur mit GYFP Vektor (GYFP), 10x und 20x vergrößert.

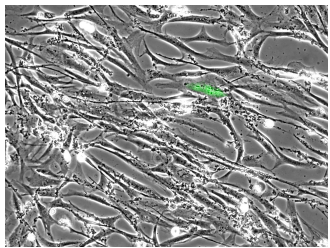




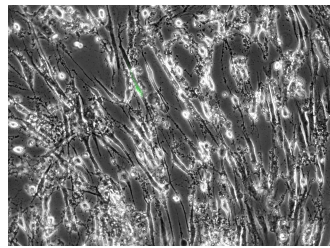
GYFP (d6), + miRNA, 10x



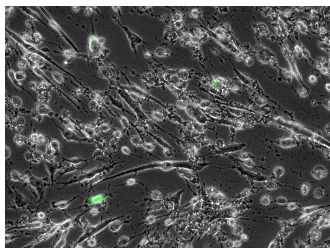
GYFP (d6), - miRNA, 10x



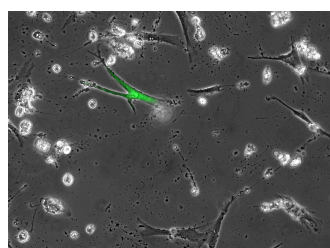
hF (d6), + miRNA, 10x



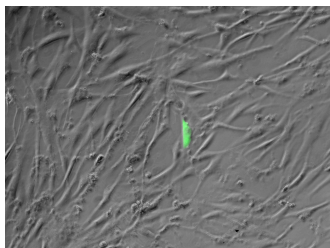
hF (d6), - miRNA, 10x



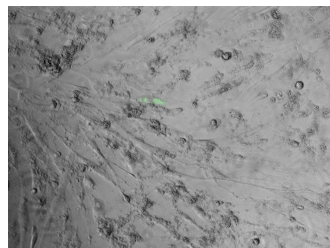
GYFP (d8), + miRNA, 10x



GYFP (d8), - miRNA, 10x



hF (d8), + miRNA, 10x



hF (d8), - miRNA, 10x

Abb. 23: Humane Fibroblasten mit STEMcircle™ Plasmid transfiziert (hF) nach 1. und 2. Behandlung mit X-treme Gene (d6 und d8) vs. Kontrollkultur mit GYFP Vektor (GYFP), 10x vergrößert

Tabelle 7: Toxizitätsmessung und Vitalitätsvergleich anhand des LDH-Tests

		Morphologie		Zelldichte		Zelldebries		LDH- Test (in %, von 100%)	
		K	S	K	S	K	S	K	S
d1	Elektroporation								
d2	Fotos+LDH- Test	++	++	+++	++	++	+	56,4	64,2
d3	mi- RNA								
d4	Fotos+LDH- Test	++	++	+++	++	++	++	66,5	70,8
d5	Transfektion I								
d6	Fotos+LDH- Test	+	+	++	+	+++	++	52	63,1
d7	Transfektion II								
d8	Fotos+LDH- Test	-	-	+	-	++++	+++	45,9	47,9
d10	mi-RNA								
d11	Fotos+LDH- Test	---	--	--	--	++	++	19,4	45,2

Vergleich der Vitalität mit Hilfe des LDH- Tests 24h nach Behandlung der Zellen nach dem vorherigen Protokoll: Die Zellen, humane Fibroblasten, welche mittels Stem-Circles behandelt wurden (S) und die Kontrollkultur (K), wurden anhand von Morphologie, Zelldichte, Zelldebries und LDH- Test verglichen. Der Versuchsablauf ist gleich zum Versuch unter 4.1.1., wobei d1, d2 etc. jeweils dem Tag der Behandlung entspricht, zusätzlich erfolgte nun 24h nach Behandlung ein LDH- Test. ‚+‘ entspricht bei der Morphologie dem Aussehen und der Gestalt der Zellen, ‚-‘ entspricht dem Verlust der Morphologie. Bei der Zelldichte entspricht ‚+‘ eine hohe Verdichtung/Konfluenz. ‚-‘ bedeutet zunehmende Lücken pro Gesichtsfeld. Ein ‚+‘ bei Zelldebries entspricht das Vorhandensein von einer großen Masse an extrazellulärem Material.

### Elektroporation mit dem NAPA GEN 21 Elektroporator

Es wurde, in Kooperation mit dem Fraunhofer EMB in Lübeck, eine alternative Elektroporationsmethode mit dem Gerät NAPA GEN 21 durchgeführt. Hierzu wurden humane Fibroblasten im Vergleich zu humanen Schweißdrüsenzellen als Kontrolle (siehe 3.5.5.) verwendet (Tabelle 8 im Anhang).

In der Gesichtsfeldauszählung zeigten sich bei beiden Zelllinien keine erfolgreich transfektierten, grünfluoreszierenden Zellen.

## **Elektroporation humaner Fibroblasten im Vergleich zu humanen mesenchymalen Stammzellen**

Als weitere möglich Zellquelle wurden schließlich humane mesenchymale Stammzellen im Vergleich zu den humanen Fibroblasten transfiziert (Tabelle 9 im Anhang).

Hier zeigte sich, dass die untersuchten humanen mesenchymalen Stammzellen nicht erfolgreich transfiziert werden konnten. Bei den humanen Fibroblasten als Kontrolle zeigten sich erneut 0,6 Z/G einen Tag nach der Elektroporation.

Trotz optimierter Bedingungen für die Transfektion der Zellen konnten keine reprogrammierten Zellen generiert werden. Die Methode der Reprogrammierung mittels eines Plasmid-Vektors ist bei Fibroblasten offenbar durch die eingeschränkte Transfektionseffizienz begrenzt.

## 4.2. Differenzierung von embryonalen Stammzellen im Vergleich zu iPS- Zellen

### Kardiogene Differenzierung von ES- und iPS- Zellen

Um zu prüfen, ob die Differenzierungsfähigkeit von reprogrammierten Zellen denen der ES- Zellen entspricht, wurde die etablierte iPS- Zelllinie 2FiPS verwendet und die kardiogene Differenzierung mit den ES- Zelllinien D3 und BLC6 verglichen.

Die kardiogene Differenzierung pluripotenter Zelllinien kann durch Differenzierung der Zellen als EBs und Auswertung der kontraktilen Areale pro EB quantifiziert werden (Abbildung 22). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 7 Wochen differenziert, wobei anfangs täglich, dann wöchentlich die kontraktilen Areale ausgezählt wurden. Die Negativkontrolle war mit der Zelllinie BLC6 eine Linie, welche keine kardiogene Differenzierung zeigt. Es zeigte sich in der gesamten Untersuchungszeit in mehreren Experimenten (n = 12), dass die iPS- Zellen der Linie 2FiPS zu einem geringeren Differenzierungsanteil in die kardiogene Richtung in der Lage waren (Abb. 24a und b).

60 % der EBs der Zelllinie D3 zeigten innerhalb der ersten fünf Tage pulsatile Areale. Dieses Niveau wurde bis zum 30. Tag beibehalten und fiel ab der fünften Woche auf 40 % und ab der sechsten Woche auf 20 % ab. Die Höchstwerte mit 80 % pulsatilen Arealen erreichte die Zelllinie kurz vor der zweiten Woche um den 11. /12. Tag und erneut ab dem 16. Tag in der zweiten Woche (Abb. 24a). Im Vergleich hierzu zeigten die EBs der Zelllinie 2FiPS gar keine oder sehr viel weniger pulsatile Areale (Abb. 24b). Bei der BLC6- Zelllinie waren wie zu erwarten keine kontraktilen Areale nachweisbar. Bei der Zelllinie 2FiPS zeigten sich ab dem 16. Tag wenige EBs mit pulsatilen Arealen (0,1 %). Dieser Anteil verdoppelt sich bis zum 21. Tag auf 0,2 % und bleibt bis zum 28. Tag auf diesem Niveau. Zum 30. Tag fiel der Anteil der schlagenden Zellen bereits wieder und ab dem 32. Tag wurden keine EBs mit pulsatilen Arealen mehr beobachtet.

Die Zelllinie 2FiPS hat somit ein Potential pulsatile Areale zu bilden, jedoch ist das Zeitfenster im Vergleich zur Zelllinie D3 deutlich kleiner (14 Tage bei 2FiPS vs. 44 Tage bei D3) und der prozentuale Anteil der Zellen der Zelllinie D3 deutlich größer. (D3 mit im Mittel 60 %, 2FiPS im Maximum 0,2 %).

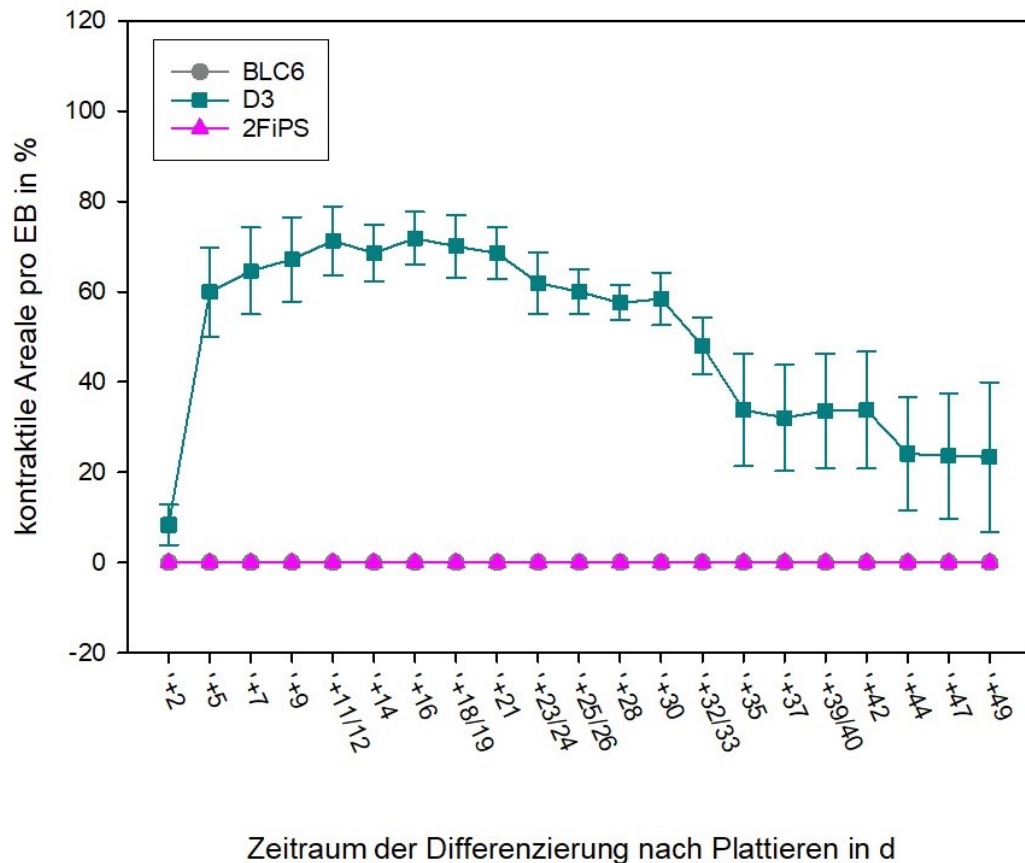


Abb. 24a: Während der in vitro-Differenzierung gebildeter Anteil an pulsatilem Areal pro embryoid body der Zelllinien BLC 6 (grau), D3 (blau) und 2FiPS (pink). Die pulsatilem Areal wurden mikroskopisch ausgezählt und tabellarisch erfasst. Die Zeitpunkte der Auszählung waren 5+2 d, 5+5 d, 5+7 d, 5+9 d, 5+11/12 d, 5+14 d, 5+16 d, 5+18/19 d, 5+21 d, 5+ 23/24 d, 5+ 25/26 d, 5+28 d, 5+ 30 d, 5+32/33 d, 5+35 d, 5+37 d, 5+39/40 d, 5+42 d, 5+44 d, 5+47 d und 5+49 d.

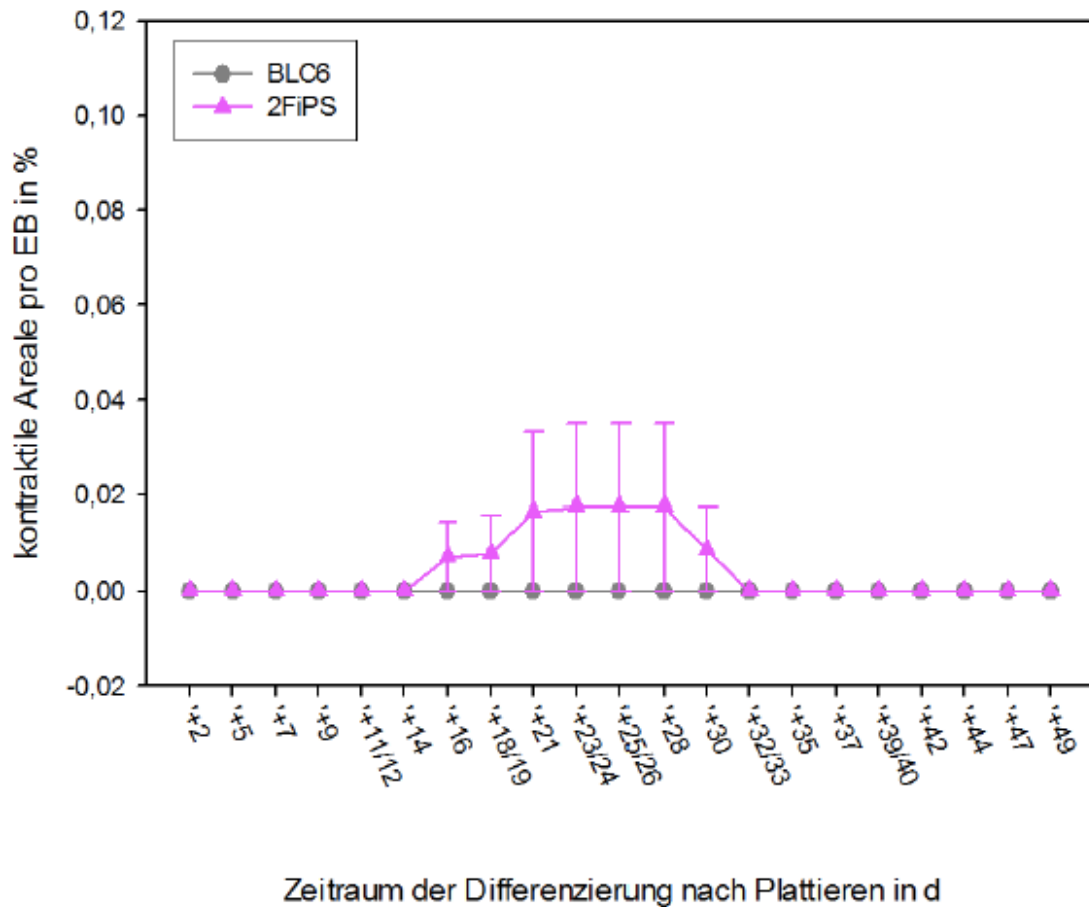


Abb. 24b: Ausschnitt aus Abbildung 24a ohne Mitbeurteilung der Zelllinie D3. Während der in vitro-Differenzierung gebildeter Anteil an pulsatilen Arealen pro embryoid body der Zelllinien BLC 6 (grau) und 2FiPS (pink). Die pulsatilen Areale wurden mikroskopisch ausgezählt und tabellarisch erfasst. Die Zeitpunkte der Auszählung waren 5+2 d, 5+5 d, 5+7 d, 5+9 d, 5+11/12 d, 5+14 d, 5+16 d, 5+18/19 d, 5+21 d, 5+ 23/24 d, 5+ 25/26 d, 5+28 d, 5+ 30 d, 5+32/33 d, 5+35 d, 5+37 d, 5+39/40 d, 5+42 d, 5+44 d, 5+47 d und 5+49 d.

### Chondrogene Differenzierung von ES- und iPS- Zellen

Die ES- Zelllinien D3 und BLC6 wurden mit der iPS- Zelllinie 2FiPS durch Differenzierung als EBs außerdem hinsichtlich Ihres chondrogenen Differenzierungspotentials verglichen. Als Marker für die chondrogene Differenzierung wurde das Vorhandensein von Kollagen Typ II in den Zellen untersucht. Kollagen Typ II ist ein extrazellulärer Hauptbestandteil der Zellmatrix

von Chondrozyten. Dessen Expression wurde im zeitlichen Fenster von 5+7 Tage bis 5+42 Tage nach EB Plattierung mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die chondrogene Differenzierung der Zelllinien D3, BLC6 und 2FiPS zeigt sich außerdem anhand blau gefärbter Knorpelareale (Nodules) nach histochemischer Alcianblaufärbung, welche Glucosaminoglykane wie z.B. Hyaluronsäure, welches von Knorpelzellen exprimiert wird, nachweist.

Zur Auswertung wurde zunächst die Anzahl der Alcianblau- positiven Nodules pro EB in Relation zum Zeitverlauf bei den o.g. Zelllinien untersucht. Hier zeigte sich eine deutlich höhere Anzahl an Differenzierung von Nodules bei den ES- Zelllinien von im Maximum vier Nodules pro EB versus knapp einem pro EB im Fall der iPS- Zellen. Zudem zeigte sich ein deutlich früheres Einsetzen der Differenzierung von Nodules bei den ES- Zellen im Mittel um den 21. Tag nach Plattierung der EBs, während die Differenzierung bei den iPS- Zellen deutlich verzögert war und im Mittel erst am 42. Tag nach Plattierung erfolgte (Abb. 25).

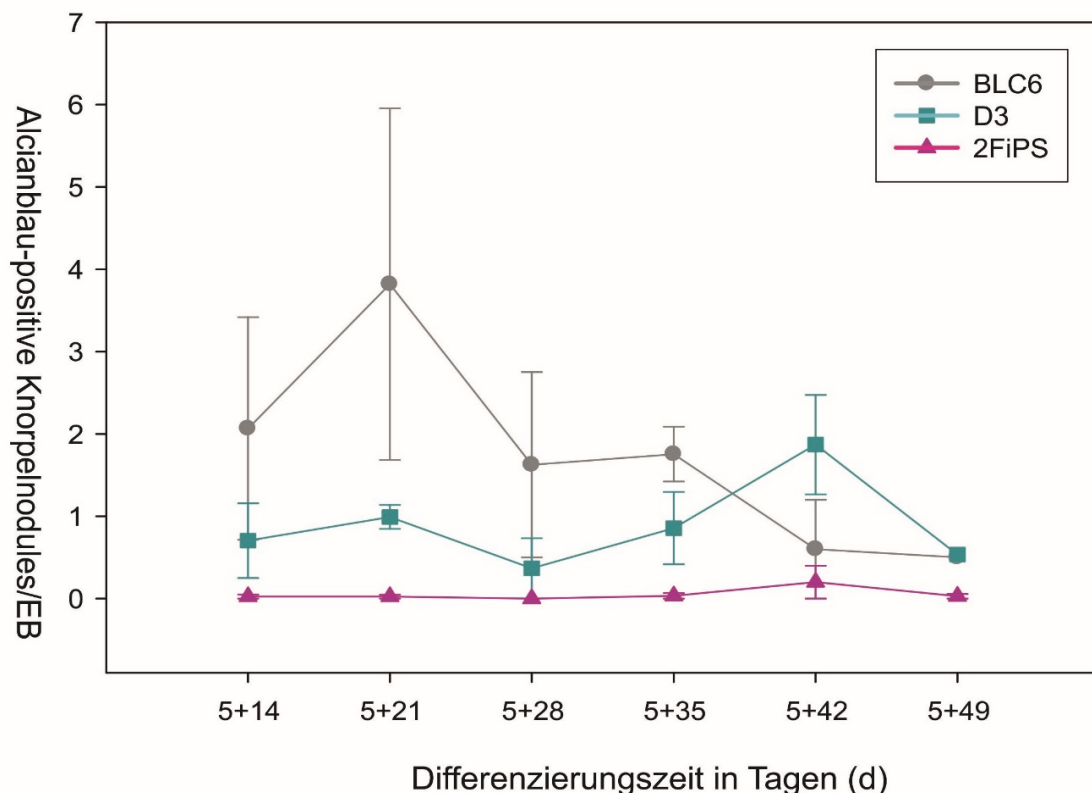


Abb. 25: Während der in vitro-Differenzierung gebildeter Anteil an Knorpelnodules pro embryoid body der Zelllinien BLC 6 (grau), D3 (blau) und 2FiPS (pink). Die Nodules (Areale mit hohem Knorpelzell- und damit Proteoglykananteil) wurden mit Hilfe der Alcianblaufärbung nachgewiesen und zu den Zeitpunkten 5+14 d, 5+21 d, 5+28 d, 5+35 d, 5+42 d, 5+49 d ausgezählt.

Des weiteren wurden mikroskopische Aufnahmen der Immunfärbungen und der Alcianblau-gefärbten Nodules angefertigt. Die Morphologie der Nodules unterschied sich bei den untersuchten ES- und der untersuchten iPS- Zelllinie nicht (Abb. 26).

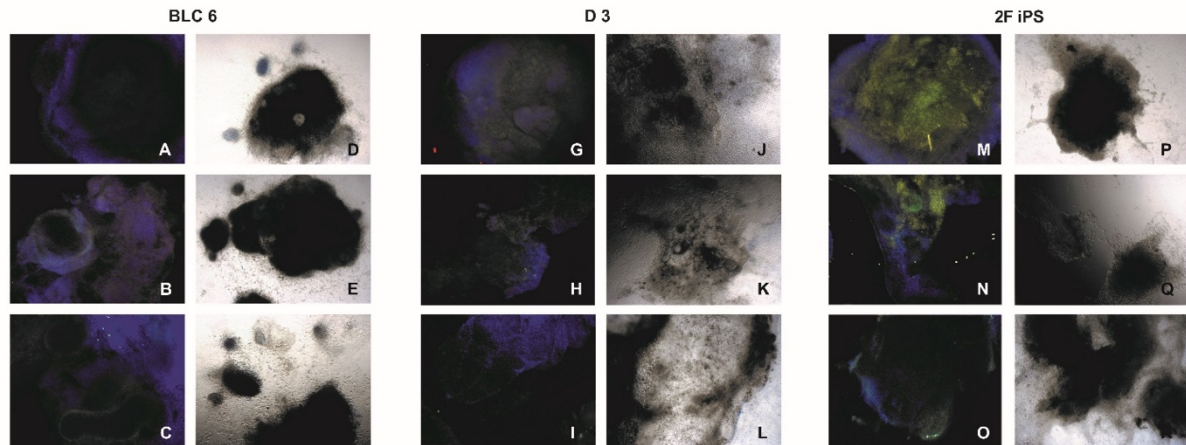


Abb. 26: Bildung von Knorpelzell-Nodules während der in vitro Differenzierung der ES-Zelllinien BLC6 (A-F) und D3 (G-L) sowie der iPS- Zelllinie 2FiPS (M-R) nachgewiesen mittels Alcianblau-Färbung (D-F, J-L, P-R) und Immunfärbung für Kollagen Typ II (A-C, G-I, M-O). Untersucht wurden verschiedene Zeitpunkte während der Differenzierung: 5+14 d (A, D, G, J, M, P); 5+28 d (B, E, H, K, N, Q) und 5+42 d (C, F, I, L, O, R).

Zum quantitativen Nachweis der Genexpression von Kollagen Typ II wurde RNA isoliert und mittels quantitativer RT-PCR analysiert (Abb. 27).

Die Ergebnisse bestätigten im Wesentlichen die Ergebnisse der Nodule-Auszählung. Es zeigte sich bei den ES- Zellen, dass mit der Zunahme der Genexpression des Kollagen Typ II bis zum 21. Tag nach Plattierung ebenfalls die Anzahl der Nodules zunahm, um nach dem 21. Tag wieder abzufallen. Bei den iPS- Zellen zeigte sich eine geringere Expression von Kollagen Typ II mit erst spätem Anstieg um den 42. bis 49. Tag nach Expression, welches mit der Anzahl der Nodules pro EB korreliert.



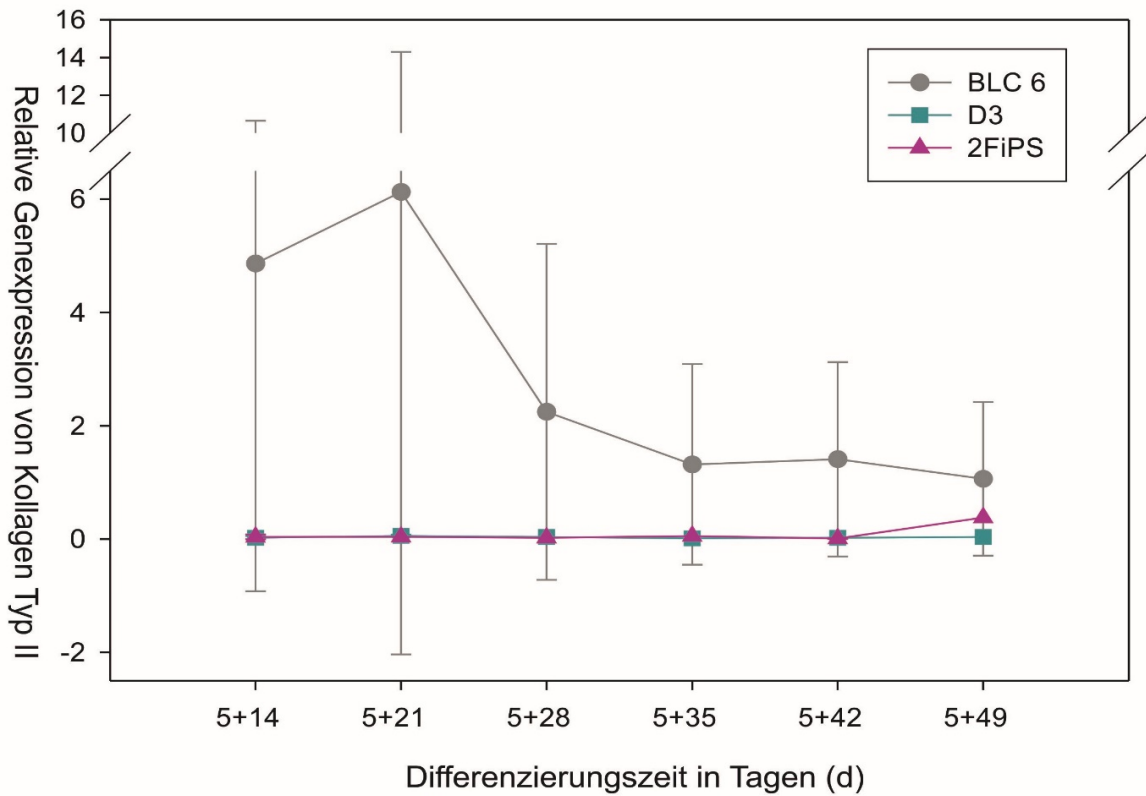


Abb. 27: Die Knorpel- Nodules exprimieren Kollagen Typ II wie mittels einer Realtime-PCR Analyse an den zuvor genannten Zeitpunkten gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend besteht eine Zunahme der Anzahl von Nodules und der Kollagen Typ II Expression im zeitlichen Verlauf des Versuches. Im Vergleich lag die Knorpeldifferenzierung und die Kollagen Typ II- Expression bei der BLC6-Zelllinie deutlich über der der D3- Zelllinie. Die Differenzierung war bei der untersuchten iPS- Zelllinie im Vergleich zu den ES- Zelllinien deutlich verzögert und reduziert.

### 4.3. Methylierungsanalyse von OCT-4 und Sox-2

Evident war in den durchgeführten Versuchen die geringere Differenzierungsfähigkeit der analysierten iPS- Zelllinie im Vergleich zu den ES- Zelllinien. Dies deutet darauf hin, dass die pluripotenten Eigenschaften dieser Zellen Unterschiede zeigen könnten. Solche Unterschiede könnten sich in der epigenetischen Modifikation der Zellen widerspiegeln. Um dies exemplarisch zu prüfen, wurde die Methylierung bestimmter Abschnitte der Gene Oct-4, Nanog und Sox-2 in den ES- Zelllinien mit denen der iPS- Zelllinie verglichen. Nach Isolierung genomischer DNA erfolgte eine Bi- Sulfit- Konvertierung der DNA zur Detektion methylierter Cytosine. Aus den Sequenzen der Gene Oct-4, Nanog und Sox-2 wurden charakteristische Abschnitte mit CG- Dinukleotiden ausgewählt und zur Erhöhung der Spezifität mit zwei Paaren von Primern für eine verschachtelte PCR ('nested primer') amplifiziert (Abb. 28 und 29). Nach Klonierung der Fragmente erfolgte die Sequenzierung.

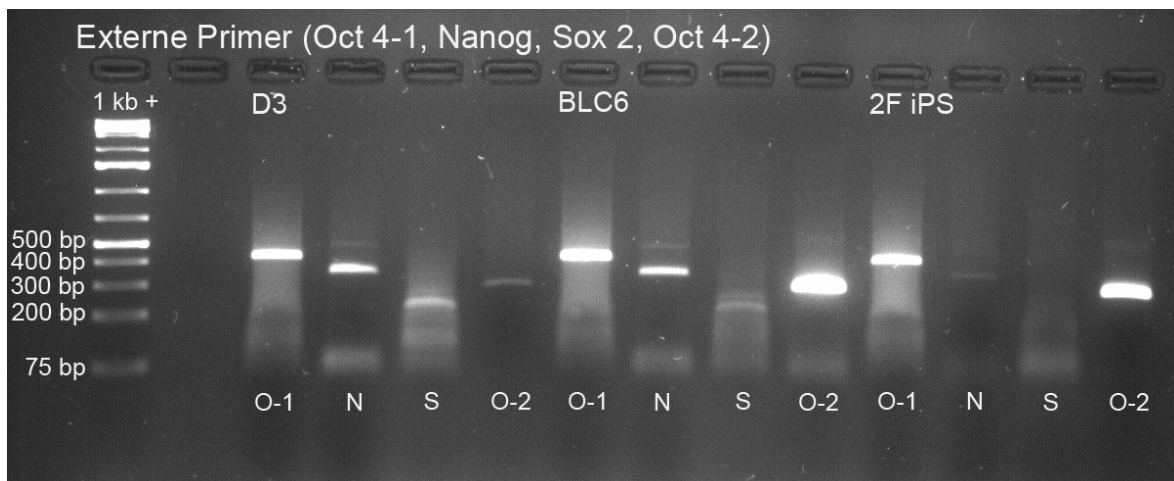


Abb. 28: Dargestellt ist eine Testrestriktion der Zelllinien D3, BLC6 und 2FiPS der jeweiligen Gene Oct-4-1 (O-1), Nanog (N), Sox-2 (S) und Oct-4-2 (O-2) nach Nutzung der externen Primer mit PCR.

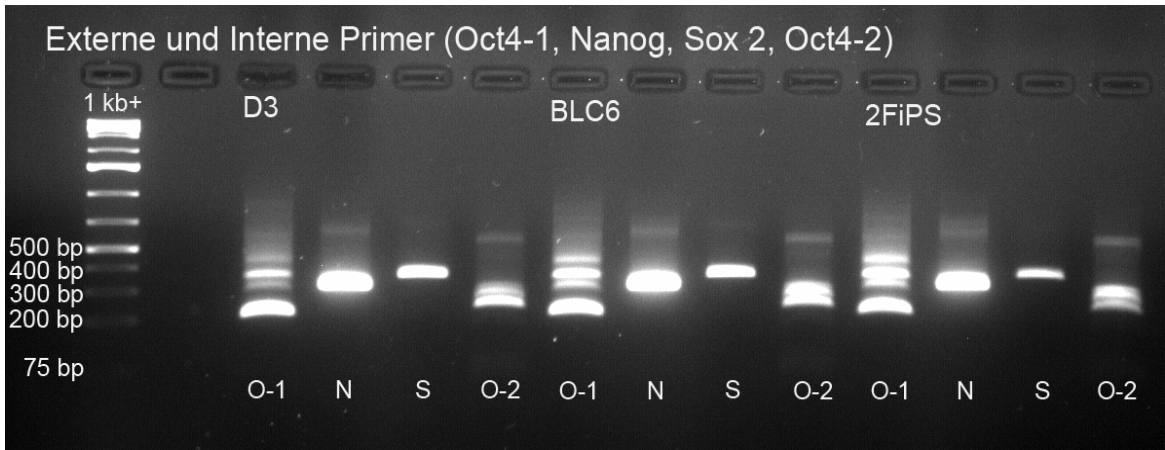


Abb. 29: Dargestellt ist eine Testrestriktion der Zelllinien D3, BLC6 und 2FiPS der jeweiligen Gene Oct-4-1 (O-1), Nanog (N), Sox-2 (S) und Oct-4-2 (O-2) nach Nutzung der externen und internen Primer mit PCR.

Die PCR mit den externen Primern ergab bei den Zelllinien D3, BLC6 und 2FiPS für Oct-4-1 ein Produkt mit einer Größe von über 400 bp, was dem erwarteten Produkt von 423 bp in etwa entspricht. Für Nanog ergab sich ein Produkt mit einer Länge von 348 bp, für Sox-2 mit einer Länge von 452 bp und für Oct-4-2 mit einer Länge von 299 bp.

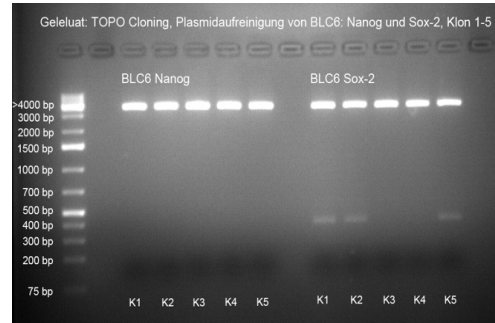
Nach Verwendung der externen und internen Primer zeigte sich für Oct-4-1 ein Fragment mit einer Länge von 200 bp, für Oct-4-2 eines mit einer Länge von 228 bp, für Nanog eines mit einer Länge von 312 bp und für Sox-2 eines mit einer Länge von 362 bp. Dies entspricht den erwarteten Fragmentlängen.

### Klonierung und Testrestriktion

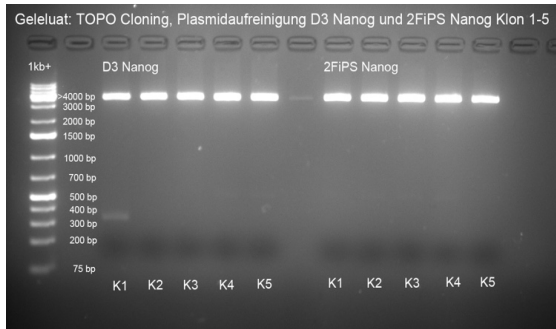
Die amplifizierten Genabschnitte wurden kloniert und die Klone mittels Restriktion überprüft (Abb. 30).



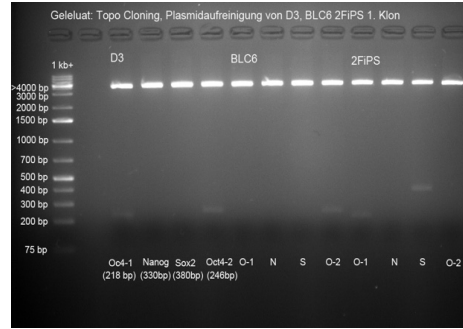
a



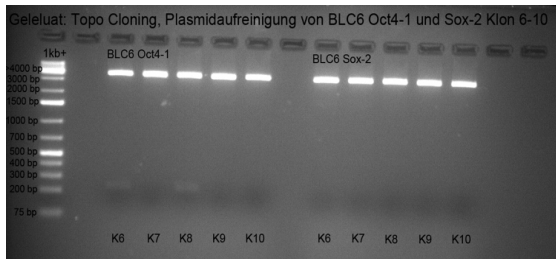
b



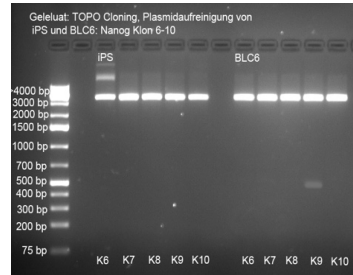
c



d



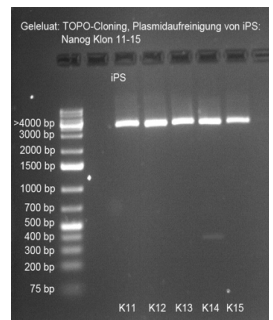
e



f



g



h

Abb. 30: Testrestriktionen (a-h) der Zelllinien D3, BLC6 und 2FiPS nach TOPO Kloning zum Nachweis der enthaltenen Genabschnitte. Für die Zelllinie D3 Sox-2 (a), Nanog (c) und Oct-4-1 und Oct-4-2 (d). Für die Zelllinie BLC6 Sox-2 (b), Oct-4-2 (d), Oct4-1 (e), Sox-2 (f). Für die Zelllinie 2FiPS Oct-4-1 und Sox2 (d), Oct-4-2 (g) und Nanog (h).

Es sind jeweils die Banden mit den zu erwarteten Basenpaargrößen der Genabschnitte zu erkennen.

## Sequenzierung

Die Sequenzen der amplifizierten und klonierten Fragmente der Gene Sox-2 und Oct-4 (Abb. 31 – 33) zeigen teilweise Unterschiede im Hinblick auf die Methylierung der CG- Dinukleotide zwischen den embryonalen Stammzellen (BLC6 und D3) und den iPS- Zellen (2FiPS). Die Abbildungen zeigen jeweils die Ergebnisse der Sequenz- Analysen unter Verwendung der „forward Primer“, die Daten zu den „reverse Primern“ konnten die Ergebnisse jeweils bestätigen und sind im Anhang hinterlegt. Abweichend davon sind in den Abbildungen 33b und 33c die Ergebnisse unter Verwendung der „reversen Primer“ dargestellt. So konnten die CG- Abschnitte im Gen Oct-4 und Sox-2 ermittelt werden.

Die Analyse des Fragments aus dem Gen Nanog ist nicht dargestellt, da das Ergebnis nicht eindeutig war.

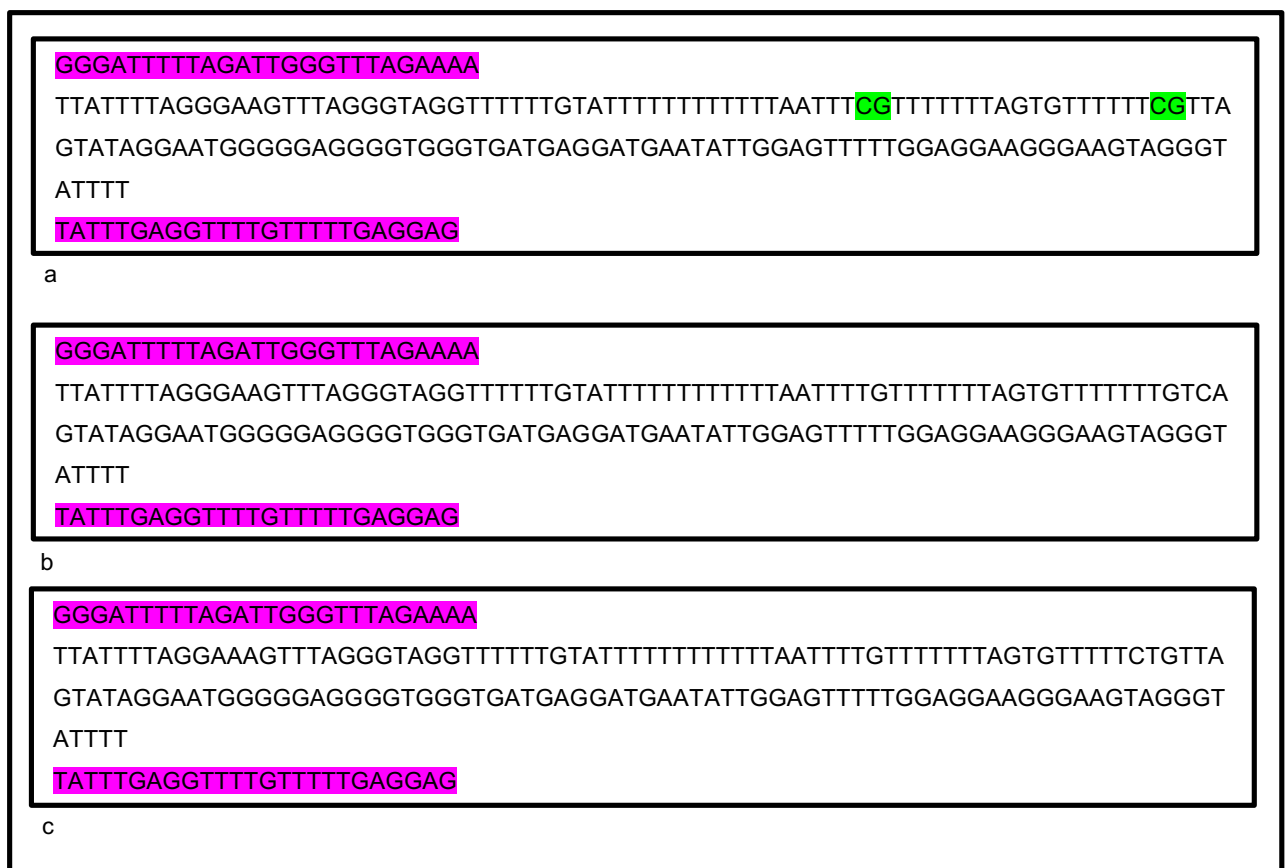


Abb. 31: Dargestellt ist das Sequenzierungsergebnis des Genabschnittes Oct-4-1 der Zelllinie D3 (a), BLC6 (b) und 2FiPS (c)

Abbildung 31 zeigt die ermittelten CG- Abschnitte von Oct-4-1 der Zelllinien D3, BLC6 und 2FiPS im Vergleich. Hier konnten nur bei D3 zwei Gen- Stellen (52 und 71) mit einer CG- Sequenz nach Bisulfitsequenzierung und Methylierung im Vergleich zum Original im Genabschnitt Oct-4-1 nachgewiesen werden (vergleichend hierzu Tabelle 10 im Anhang).

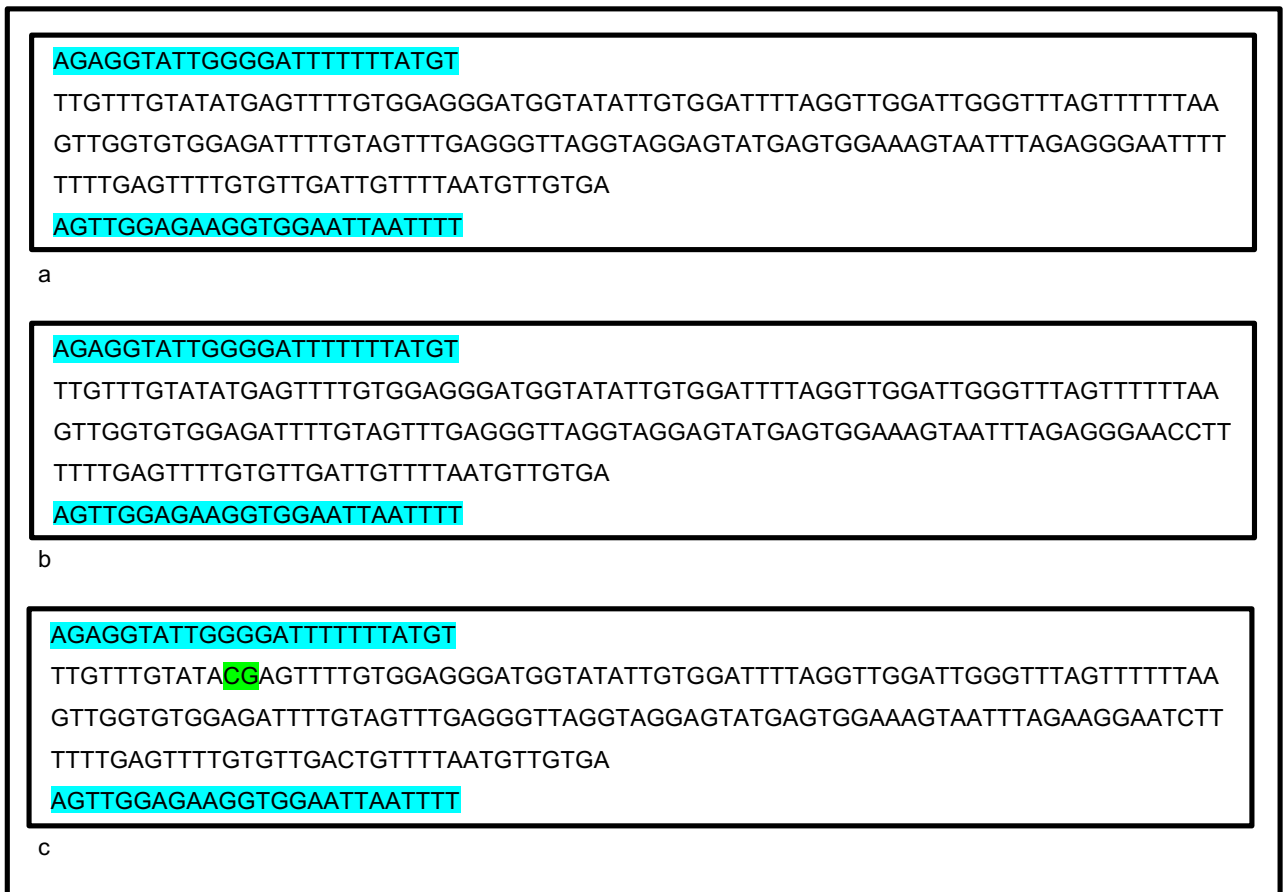


Abb. 32: Dargestellt ist das Sequenzierungsergebnis des Genabschnittes Oct-4-2 der Zelllinie D3 (a), BLC6 (b) und 2FiPS (c)

Abbildung 32 zeigt die ermittelten CG- Abschnitte des zweiten ausgewählten Abschnittes von Oct-4 (Oct-4-2). Hier konnte nur bei der Zelllinie 2FiPS eine CG- Sequenz an Stelle 12 im Vergleich zum Original nachgewiesen werden (vergleichend hierzu Tabelle 11 im Anhang).

TAAACAAATTAATAAACAACCATC

CATATAATAAAAACTATCAAAAAATAAATAAATTTCCAACAACCAATCAACAAACACCAACTCCTACACCCAA  
ACCCAACCTCACCAAAAAATTTACATAAAAAAACAAAACCTACCACACCACCAACCAAGCCCAACAAA  
ACACTATACCCCAAACCACACAAAAAAAACAAACCCACAACCAACCAACTAAAAAACCTTTATATCCCCCCC  
CCCACCCCCCATTTTCAACAACAAATCACAACACACACCTATTCAAAAAATAAATAAACAACACCAAAAC  
AACAACCTCTTTCCCCCATACTACAA

AATATTAACCTCTCTTAAATAC

a

GSTATTTAAGAGAGAGTTAATATT

TCG TAGTATGGGGGAAAGGAGTTGTTGTTTTGGTGTGTTTATTATTTTTTTGAACAGGTGTGTGTTGTG  
ATTTGTTGTTGAAAATGGGGGGTGGGGGGGGGATACAAAGGTTTTTTAGTGGT CG GTTGTGGGCTTGT  
TTTTTATGTGGTTTGGGTATAGTGTGTTTGTGGTTTGGTTTGGTGGTGTGGCAGTTTTTTTTTTTT  
ATGTAATTTTTTTGGTGAGGTTGGTTTTGGTGTAGGAGTTGGTGTGTTGATTGGTTGTTGAAATTTA  
TTTTTTTTTGATAGTTTTTATTATATG

GATGGTTGTTTATTAATTTGTTTA

b

TCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTT GSTATTTAAGAGAG  
AGTTAATATT TTGTAGTATGGGGGAAAGGAGTTGTTGTTTTGGTGTGTTTATTATTTTTTTGAATAGGTG  
TGTGTTGTGATTTGTTGTTGAAAATGGGGGGTGGGGGGGGGATATAAAGGTTTTTTAGNGGTTGGTTGTG  
GGTTTGTTTTTTT  
-STOPP-

c

Abb. 33: Dargestellt ist das Sequenzierungsergebnis des Genabschnittes Sox-2 der Zelllinie D3 (a), BLC6 (b) und 2FiPS (c). B und c zeigen dabei die Ergebnisse bei Nutzung des reverse Primers.

Abbildung 33 zeigt die ermittelten CG- Abschnitte von Sox-2 nach Bisulfitsequenzierung und Methylierung der Zelllinien D3, BLC6 und 2FiPS im Vergleich zum Original. Da die Analyse von Sox-2 bei 2FiPS misslungen ist, lässt sich nur über D3 und BLC6 eine Aussage treffen. Es konnten beide CG- Abschnitte aus dem Original an Stelle 2 und 128 auch bei BLC6 nachgewiesen werden. Bei D3 zeigte sich keine dieser CG- Sequenzen (vergleichend hierzu Tabelle 12 im Anhang).

## 5. Diskussion

### 5.1. Reprogrammierungsmöglichkeiten

Die Reprogrammierung mittels retroviraler Vektoren ist effizient, birgt aber den Nachteil der genomischen Integration der Pluripotenzfaktoren. Ein Ziel dieser Arbeit war, chemische und physikalische Methoden zur Reprogrammierung zu kombinieren, um damit ein zellschonendes, effizientes und genetisch sicheres Verfahren zu etablieren. Dazu wurden verschiedene Verfahren der Transfektion mit Plasmid- DNA- Konstrukten kombiniert. Es wurden außerdem verschiedene Zelltypen verwendet, u.a. humane Fibroblasten, aber auch humane Adipozyten und murine Fibroblasten. Zur Kontrolle der Transfektion wurde ein Reporter-Konstrukt mit dem Gen PYFP transfektiert.

Im ersten Versuch erfolgte eine Elektroporation und eine Transfektion mit dem Reagenz X-treme Gene. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, scheint die Verwendung von mi- RNA die Effektivität der Transfektion und die Überlebensfähigkeit der Zellen positiv zu beeinflussen (Ford and Cheng, 2008) (Shivdasani, 2006). Dies wurde daher ebenfalls untersucht.

Am zweiten Versuchstag nach der Elektroporation mittels STEMcircles<sup>TM</sup> zeigte sich in der mikroskopischen Gesichtsfeldauszählung eine deutlich höhere Anzahl von grün fluoreszierenden Zellen in der Kontrollgruppe, transfektiert mit PYFP, als bei den humanen Fibroblasten. Durch die Behandlung der Zellen mit mi- RNA am dritten Versuchstag konnte die Anzahl der Zellen der reprogrammierten humanen Fibroblasten gesteigert werden.

Nach erfolgter erster Transfektion am fünften Versuchstag mittels X-treme Gene zeigte sich eine weitere Zunahme der erfolgreich transfizierten humanen Fibroblasten. In der Kontrollkultur zeigte sich bereits ein Rückgang mit vielen nicht mehr adhärennten Zellen. Das Zellsterben setzte sich fort, sodass bereits am neunten Tag nach der zweiten Transfektion mit X-treme Gene nur noch wenige adhärennte Zellen, dafür viel umgebendes Zelldebries vorhanden war, welches in den Abbildungen 16, 17 und 18 zu sehen ist.

Zusammenfassend ergibt sich aus dem ersten Versuch, dass die Elektroporation einen erheblichen Zellschaden verursacht, welchem durch die mi- RNA-



Behandlung nicht ausreichend entgegengewirkt werden konnte. Es erschien also sinnvoll, in einer zweiten Versuchsreihe statt der humanen nun murine Fibroblasten zu verwenden, da sich murine Fibroblasten in der Nutzung und Behandlung häufig robuster als humane Fibroblasten erwiesen (Qiu et al., 2016).

Nach der Elektroporation zeigte sich zu Beginn eine geringere Rate an murinen transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Nach der mi- RNA Behandlung konnte die Anzahl dieser Zellen zwar leicht gesteigert werden, jedoch zeigte sich bereits ab dem dritten Versuchstag ein deutliches Zellsterben, sodass die Transfektion zwar noch durchgeführt wurde, allerdings in der Auswertung keine Zellen zur Nachuntersuchung mehr vorhanden waren.

Mit der nächsten Versuchsreihe wurde somit die Elektroporation gänzlich übersprungen, um den Verdacht des massiven Zellsterbens aufgrund der Elektroporation nach zu gehen. Es wurde nur mittels X-treme Gene transfiziert und im Anschluss eine Behandlung mit mi- RNA durchgeführt.

Der Wegfall der Elektroporation führte indes zu einem geringeren Erfolg der Transfektion der humanen Fibroblasten und der Kontrollkultur im Vergleich zu den Versuchen mit Elektroporation. Dieser Nachteil wurde leider nicht durch ein längeres Zellüberleben ausgeglichen: Für die mi- RNA Behandlung war ein Großteil der Zellen bereits abgestorben, sodass keine weitere Auswertung erfolgen konnte.

Alle bisherigen Versuche zeigten wie beschrieben ein enormes Absterben der Zellen mit Voranschreiten der Untersuchungstage. Um dies quantifizieren zu können, wurde der LDH- Test eingeführt. LDH ist ein Enzym, dass in einer intakten Zelle vorkommt und bei deren Membranzerstörung freigesetzt wird. Es ist daher ein gut abschätzbarer Wert für den Zelltod und seine Menge korreliert mit der Anzahl der abgestorbenen Zellmasse (G et al., 2011) (P et al., 2018). Im Versuch wurde täglich eine Probe entnommen. Dabei wurde der Prozentanteil der Menge an LDH der Zellumgebung der der Kontrollmenge von 100 % LDH entgegengesetzt (Tabelle 7). Hier konnte gezeigt werden, dass die umgebende LDH- Konzentration vier Tage nach der Elektroporation der mit STEMcircles™ behandelten humanen Fibroblasten am größten war (70,8 %) und im Anschluss auf 63 % zurückfiel. Im weiteren Verlauf zeigten sich die Zellen mikroskopisch von zunehmend geringerer Dichte unter starker Zunahme des Zelldebries. Ein

ähnlicher Verlauf wurde auch bei der Kontrolle beobachtet. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Elektroporation in Kombination mit der mi-RNA Behandlung effektiver als die reine chemische Transfektion ist, jedoch die Zellmembran durch den Eingriff so stark geschädigt wird, dass zunächst ein Großteil der Zellen sofort und der verbleibende Anteil der Zellen im Verlauf absterben.

In einem weiteren Versuch wurde mit einem anderem Elektroporator, in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut Lübeck, gearbeitet. Hier wurden humane Schweißdrüsenzellen statt humane Fibroblasten verwendet. Die Versuchsbedingungen wurden anhand der bereits vor Ort erfolgreich getesteten Methodik vorgenommen (Rackow and Lang, 2012). Es wurden die humanen Fibroblasten mit den humanen Schweißdrüsenzellen unter Nutzung der „Fraunhofer-Methodik“ verglichen. Leider konnten bei beiden Zelllinien keine erfolgreich transfektierten, grünfluoreszierenden Zellen generiert werden (Tabelle 8).

Ein weiterer Vergleich stellte die Erprobung des Verfahrens an den humanen Fibroblasten versus der humanen mesenchymalen Stammzellen dar. Zusätzlich wurde eine Messung der erfolgreich reprogrammierten Zellen durch Kopplung an einen Antikörper mit Nutzung des Cellsorters (FACS) durchgeführt. Hier zeigte sich, dass unter den humanen glutealen mesenchymalen Stammzellen die Transfektion nicht erfolgreich war.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die humanen Fibroblasten für die Untersuchung der Rückdifferenzierung besser geeignet sind als murine Fibroblasten oder andere humane mesenchymale Zellen. Im Versuchsprotokoll besteht weiterhin Optimierungsbedarf. Die Elektroporation selbst scheint effektiv, jedoch liegt sie in der Effizienz im Vergleich mit der retroviralen Vektortransfektion zurück. Hinzu kommt die deutliche Zellmembranverletzung, welche ebenfalls die Effektivität senkt. 2008 konnte eine Forschergruppe zudem zeigen, dass zusätzlich zu Oct-4, Nanog und Sox-2 auch die Expression von Lin28 und von zwei weiteren Faktoren, Klf-4 und c-MYC, die Effizienz deutlich steigerte (Liao et al., 2008).

Als Ausblick dieser und vieler anderer Arbeiten in diesem Forschungsgebiet bleiben unter anderem die Optimierungsfähigkeit der Effizienz der Reprogrammierung und der Nutzung von Transkriptionsfaktoren ohne genetische Modifikationen und weiterhin die Vermeidung der Nutzung retroviraler Vektoren. Ziel sollte es sein, eine genetisch sichere, effiziente und möglichst einfache Methode zu entwickeln.

## **5.2. Unterschiede in der myogenen und chondrogenen Entwicklung**

Bei den Säugetieren gibt es vier Zellarten welche über Aktin- und Myosinfilamente die Eigenschaft besitzen zu kontrahieren: Skelettmuskelzellen, Herzmuskelzellen, glatte Muskelzellen und Myoepithelzellen.

Nach der Bildung der drei Keimblätter im Zuge der Embryonalentwicklung, bestehend aus Mesoderm, Ektoderm und Entoderm, erfolgt während der weiteren Differenzierung des Mesoderms u.a. die Bildung des Myotoms, woraus zunächst Promyeloblasten und schließlich der Myoblast entsteht. Sobald mehrere Zellen zu einer Zelle mit vielen Zellkernen verschmelzen werden aus den Myoblasten Skelettmuskelfaserzellen. Diese teilen sich nicht mehr (Alberts, 2017). Zudem spalten sich kleine sogenannte Satellitenzellen ab, welche für die Regeneration und das Wachstum der Skelettmuskelzelle verantwortlich sind und vor Ort in der Basallamina der reifen Muskelzelle inaktiv verbleiben bis sie benötigt werden.

Die Herzmuskelzelle besitzt solche Stammzellen jedoch nicht. Stirbt die Zelle ab, kommt es nicht zur Regeneration. Der Herzmuskel kann als Versuch der Kompensation zur Leistungsoptimierung bzw. zum Leistungsausgleich hypertrophieren (Dickhuth et al., 2004).

Das Zusammenspiel der Filamente zu einer Gesamtkontraktion des Herzens ist präzise abgestimmt, sodass selbst geringe Veränderungen schon deutliche Folgen haben können. Für die Herzmuskelzellen existieren besondere Isoformen von Myosin und Aktin (Alberts, 2017). Ein Beispiel ist die hypertrophe Kardiomyopathie, welche genetisch vererbt und unter anderem durch eine von über vierzig verschiedenen Punktmutationen des Gens für die Kodierung des herzspezifischen Myosins hervorgerufen werden kann (Hayashi, 2020). Betrifft die

genetische Mutation das Aktinfilament kommt es hingegen zu dilatativen Kardiomyopathien (Vikstrom and Leinwand, 1996).

Die Gewinnung von differenzierten Herzmuskelzellen aus iPS-Zellen, welche zuvor aus dem eigenen Gewebe, beispielsweise Fibroblasten, gewonnen werden können stellen in diesem Zusammenhang im Hinblick auf eine denkbare Gewebeersatztherapie einen vielversprechenden Fortschritt dar.

Inwieweit die myogene Differenzierung der Stammzellen der myogenen Differenzierung der iPS- Zellen gleicht, ist Thema des zweiten Versuchsteils.

Es wurde die in vitro- Differenzierung beider Zellarten über 50 Tage mikroskopisch beobachtet und täglich die pulsatile Areal pro „embryoid body“ (EB) ausgezählt und miteinander verglichen. Die Negativkontrolle war mit der Zelllinie BLC6 eine Zellart, welche nur die chondrogene Differenzierung einschlagen kann. Es zeigte sich in der gesamten Untersuchungszeit über mehrere Experimente zwar der Nachweis von kontraktile Arealen der iPS- Zellen, jedoch war der Unterschied zu den embryonalen Stammzellen (ES- Zellen) groß.

Es scheint somit eine Differenzierung der iPS- Zellen in kontrahierende Herzmuskelzellen möglich. Als Ausblick sollte jedoch eine weitere Optimierung der Effektivität der Differenzierung untersucht werden. Zudem könnte als nächster Schritt die Ausdauer der Pulsation der Stammzellen mit denen der iPS- Zellen über einen Zeitraum verglichen werden. Offen bleibt auch die Anpassungsfähigkeit der Zellen nach Transplantation in einen Defekt an einem bestehenden pulsierenden Zellverbund.

Das Skelettsystem stammt wie die Skelettmuskelfaserzelle dem Mesoderm ab. Dabei exprimieren die Zellen des jeweiligen Bindegewebes ihre umgebende Matrix selbst. Beim kollagenen Bindegewebe besteht diese stark hydratisierte Matrix aus Proteoglykanen und vor allem Kollagen Typ II, welches von den Chondroblasten ausgeschieden wird (Alberts, 2017). Kollagen ist ein faserförmiges Protein, welches in mindestens vierzig verschiedenen Varianten im menschlichen Körper vorkommt. Kollagen Typ II findet man vor allem in der Bandscheibe, dem Glaskörper des Auges und im Knorpel.

Das Wachstum des Knorpels gelingt durch Ausdehnung der Matrix durch sich teilende Chondroblasten. Chondrozyten selbst sind, sobald sie differenziert und

das Gewebe ausgewachsen ist, nicht mehr teilungsfähig. Somit existiert auch im hyalinen Knorpel keine Stammzelle, um das Gewebe zu reparieren oder regenerieren.

Knorpelgewebe selbst besteht aus den Chondrozyten und ihrer Extrazellulärmatrix, welche vor allem aus Kollagen Typ II, XI und XI, hauptsächlich Wasser, Proteoglykane und vor allem Aggrecan und Hyaluronsäure besteht (Carballo et al., 2017).

Ist im Lauf des Menschenlebens dieser Knorpel in den Gelenken und in Form von Menisken, Disken, Bandscheiben etc. angegriffen, so bleibt häufig nur deren künstlicher Ersatz. Ein denkbarer Ansatz im Zusammenhang mit der Forschung an iPS- Zellen ist daher, diese Knorpeldefekte mittels aus Fibroblasten generierten iPS- Zellen nach chondrogener Differenzierung zu decken. Die Gemeinsamkeiten der chondrogenen Differenzierung von iPS- Zellen versus ES- Zellen wurde ebenfalls im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht und die etablierte iPS- Zelllinie (2FiPS) mit der ES- Zelllinie BLC6 und D3 als Negativkontrolle der myogenen Differenzierung über fünfzig Tage verglichen. Durch das histochemische Verfahren der Alcianblaufärbung mit Markierung der sogenannten Nodules pro EB konnte die chondrogene Differenzierung der Zelllinien dargestellt und verglichen werden. Hier zeigte sich eine deutlich höhere Expression von Nodules in der ES- Zelllinie von im Maximum vier Nodules pro EB versus knapp einem pro EB der iPS- Zellen. Zudem zeigte sich ein deutlich früheres Einsetzen der Expression der ES- Zellen im Mittel um den 21. Tag nach Plattierung, während der Anstieg der iPS- Zellen deutlich später im Mittel um den 42. Tag nach Plattierung erfolgte (Abb. 25).

Zudem erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung. In der mikroskopischen Auswertung konnten bei beiden Zelllinien zu jedem Zeitpunkt Nodules nachgewiesen werden (Abb. 26).

Letztlich erfolgte noch ein Vergleich auf DNA- Ebene: Zum quantitativen Nachweis der Genexpression von Kollagen Typ II erfolgte aus den Zellen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt der Auszählung ebenfalls eine RNA- Isolierung. Diese wurde mittels reverser Transkription in cDNA überführt, sodass nach Real- Time PCR eine zeitlich abgestimmte Analyse der Genexpression erfolgen konnte (Abb. 27). Hier zeigte sich bei den ES- Zellen, dass mit der Zunahme der Genexpression des Kollagen Typ II bis zum 21. Tag nach Plattierung ebenfalls die Anzahl der

Nodules zunahm, um nach dem 21. Tag wieder stark abzufallen. Bei den iPS-Zellen zeigte sich jedoch nur eine geringe Expression von Kollagen Typ II mit erst spätem Anstieg um den 42. bis 49. Tag nach Expression, welches mit der Anzahl der Nodules pro EB korreliert.

Zusammenfassend verdeutlicht der Versuch, dass iPS-Zellen fähig sind eine chondrogene Differenzierung durchzuführen und Kollagen Typ II zu bilden. In der histochemischen und Immunfluoreszenzfärbung lässt sich bei beiden Zelllinien die Differenzierung. Auffällig bleibt das deutlich spätere Ansteigen der Expression im zeitlichen Verlauf. Unklar bleibt, was der Auslöser dieses späten Peaks ist und ob die endgültigen Nodules in Ihrer Molekularstruktur denen der ES-Zellen ebenbürtig sind und inwieweit sie sich in ein Gefüge einbringen lassen würden um einen Defekt langanhaltend zu decken.

### **5.3. Aussagen des Methylierungsgrades in Bezug auf DNA-Stabilität: Stammzellen versus iPS-Zellen**

Im vorangegangenen Abschnitt wurde vor allem das Differenzierungspotential der ES-Zellen versus iPS-Zellen untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, diesen Vergleich auf die DNA-Ebene zu bringen und dabei im Besonderen die Genabschnitte von Oct-4, Nanog und Sox-2, welche unter anderem die Stammzelleigenschaft begründen zu betrachten.

Als Maß der DNA-Stabilität wurde der Grad der Methylierung als Faktor untersucht. Die DNA-Methylierung spielt, wie bereits in der Einleitung beschrieben eine entscheidende Rolle beim Erhalt der Zellidentität und der genomischen Prägung.

Anhand von Genkarten der jeweiligen Gene wurden die Genabschnitte herausgesucht, welche die meisten CG-Sequenzen enthielten. Wie bereits beschrieben deutet ein hohes Maß an CG-Sequenzen und ein damit entstehendes DNA-Methylierungsgerüst auf einen enorm wichtigen Genabschnitt hin, welcher über die Vererbung nicht verloren gehen darf. Diese Genabschnitte wurden herausgesucht und extern Primer zum kodieren und sequenzieren (Tabelle 1) hergestellt. An diesen Genabschnitten (siehe Anhang) wurden die Unterschiede in der Basenpaarabfolge verglichen, indem anhand der Häufigkeit der CG-Sequenzen Unterschiede oder Gemeinsamkeiten auf genomischer Ebene

im Hinblick auf die myogene und chondrogene Differenzierung herausgearbeitet wurden.

Als Zelllinien wurden erneut die ES- Zellen D3 (vorrangig myogene Differenzierung) und BLC6 (vorrangig chondrogene Differenzierung) der etablierten iPS- Zelllinie 2FiPS unserer Arbeitsgruppe entgegengesetzt. Für Oct4 wurden zwei geeignete Genabschnitte gewählt.

Um diesen Genabschnitt der Methylierungsreaktion zuzuführen, musste dieser zunächst aus dem großen Gen herausgeschnitten werden. Dies erfolgte zunächst durch Anwendung von externen (Abb. 28) und anschließend internen (Abb. 29) Primern, für welche zuvor durch eine jeweilige Gradienten- PCR die beste Annealing Temperatur ermittelt wurde. Es konnte somit für die externen Primer für Oct-4-1 und Sox-2 57 °C und für Oct-4-2 und Nanog 64 °C und für die internen Primer für Oct-4-1 61 °C, für Oct-4-2 64 °C und für Nanog und Sox-2 55,5 °C eruiert werden. Somit ergab sich nun eine neue Gengröße der zu untersuchenden Genabschnitte (siehe Tabelle 2). Vor der Sequenzierung dieser Genabschnitte nach der erfolgten Methylierungsreaktion erfolgte eine Testrestriktion der externen und internen Primer mit den jeweiligen Genabschnitten der Zelllinien. Hier konnten in der Gelelektrophorese sämtliche Gene mit den zuvor bestimmten Größen an Basenpaaren der Genabschnitte positiv abgebildet werden (Abb. 28 und 29). Nun konnte mit der Methylierungsreaktion begonnen werden. Im Anschluss wurde eine „TOPO cloning Reaktion“ durchgeführt, um nach erfolgter Prozedur die jeweiligen Genabschnitte weiterhin nachweisen zu können, bevor sie zur Sequenzierung freigegeben werden konnten. Mit der Durchführung von mehreren Versuchen konnten letztendlich sämtliche Genabschnitte nachgewiesen werden (Abb. 30 bis Abb. 37).

Nach erfolgter Sequenzierung konnten folgende Ergebnisse ausgewertet werden: Um das Methylierungsmuster zu vergleichen wurden die CG- Sequenzen in dem jeweiligen Genabschnitt (Abb. 31-34) betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass beim Genabschnitt Oct-4-1 an der Stelle 52 und 71 des Originalgenabschnitts diese CG- Sequenz bei der Zelllinie D3 erhalten blieb. Die Zelllinien BLC6 und vor allem die iPS- Zelllinie 2FiPS wiesen keinerlei erhaltene CG- Sequenzen nach Methylierung an diesen Stellen auf. Dies könnte zum einen dafürsprechen, dass mit diesem speziellen Methylierungsmuster der Zelllinie D3 im Gen Oct-4-1 ein wichtiger Code zur myogenen Differenzierung verschlüsselt ist, da diese

Abschnitte bei beiden anderen Zelllinien nicht mehr vorhanden sind und sie die myogene Differenzierung verloren haben (Tabelle 8).

Im zweiten Genabschnitt von Oct-4 (Oct-4-2) zeigten sich vor Bisulfitsequenzierung und Methylierung deutlich mehr CG- Sequenzen. Diese gingen vorrangig alle verloren, lediglich bei der iPS- Zelllinie konnte eine CG- Sequenz weiterhin an Stelle 12 nachgewiesen werden. Diese CG- Sequenz könnte für eine cis- Regulationssequenz stehen, welche zum Beispiel für die Anfälligkeit der Zelle oder die Ineffektivität in der Differenzierung als STOP Gen kodiert. Eine Vermutung könnte sein, dass ein Verlust dieser CG- Sequenz erforderlich wäre, um die Differenzierung losstoßen zu können, da das Fehlen der CG- Sequenzen bei den ES- Zelllinien nicht zur Fehlfunktion oder Fehldifferenzierung geführt hat (Tabelle 9).

Im Abschnitt von Nanog ist bei allen Zelllinien keine CG- Sequenz aus der ursprünglichen Gensequenz bestehen geblieben. Eine Vermutung für dieses Phänomen wäre, dass Nanog keinen direkten Einfluss auf die Qualität der myogenen oder chondrogenen Differenzierung hat (Tabelle 10).

Bei dem Genabschnitt von Sox-2 wiederum zeigten sich nur erhaltene CG- Sequenzen an den Stellen 2 und 128 bei der Zelllinie BLC6. Dies lässt vermuten, dass Sox-2 einen Einfluss bei der chondrogenen Differenzierung spielt.

Die Zelllinie D3 der ES- Zellen und die iPS- Zelllinie besitzen diese CG- Sequenzen nicht mehr, was darauf schließen lassen könnte, dass sie aufgrund dessen kein (D3) bis kaum Differenzierungspotential in die chondrogene Entwicklung gezeigt haben (Tabelle 11).



## 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es ein zellschonendes, effizientes und genetisch sicheres Verfahren zur Gewinnung von iPS- Zellen zu etablieren. Bei den Verfahren zur Transfektion der Zellen zeigte die Elektroporation in Kombination mit der Applikation von mi- RNA und anschließender Transfektion mit X-treme Gene die höchste Effizienz. Die Transfektion von humanen Fibroblasten war im Vergleich zu murinen Fibroblasten und humanen mesenchymalen Zellen erfolgreicher. Insgesamt war aber die Transfektion bei allen Versuchen mit einem stark ansteigenden Zellsterben verbunden, sodass letztlich auch keine iPS- Zell-Kolonien isoliert werden konnten. Dabei erwies sich insbesondere die Elektroporation als zwar effizienteste Methode, die aber zugleich auch das stärkste Zellsterben hervorrief.

Die methodisch einfache, effiziente und genetisch sichere Gewinnung von iPS- Zellen bleibt weiterhin ein Ziel vieler Forschungsgruppen. Es ergeben sich vielfältige Möglichkeiten in der Nutzung der iPS- Zellen, u.a. zur Defektbehebung am vom Körper nicht ersetzbarem Gewebe wie Knorpel oder Herzmuskel. Bei der Differenzierung der iPS- Zellen konnte die kardiogene Differenzierung mit Ausbildung von kontraktile Arealen nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich eine Differenzierung in die chondrogene Richtung unter Nachweis von Nodules, die Kollagen Typ II exprimierten. Beide Differenzierungswege der iPS- Zellen waren im Vergleich zu den ES- Zellen jedoch weniger effizient und im zeitlichen Verlauf langsamer.

Inwieweit sich die iPS- Zellen den ES- Zellen auch auf der epigenetischen Ebene gleichen, wurde anhand des Methylierungsgrades der DNA untersucht. Es wurden Genabschnitte gewählt, welche für die Eigenschaft der Stammzelle unabdingbar sind: Oct-4, Sox-2 und Nanog. Es konnte gezeigt werden, dass bei den iPS- Zellen deutlich weniger CG- Sequenzen und methylierte Abschnitte innerhalb dieser Genabschnitte vorhanden sind. Das starke Zellsterben der Fibroblasten nach Transfektion, insbesondere nach der Elektroporation, und die geringere Effizienz in der myogenen und chondrogenen Differenzierung könnten damit zusammenhängen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alberts, B. (Ed.), 2017. Molekularbiologie der Zelle, 6. Aufl. ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Behringer, R., Gertsenstein, M., Nagy, K.V., Nagy, A., 2016. Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies by Hanging-Drop Cultures. Cold Spring Harb. Protoc. 2016. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot092429>
- Bird, A., 2011. Putting the DNA back into DNA methylation. Nat. Genet. 43, 1050–1051. <https://doi.org/10.1038/ng.987>
- BONEBANK [WWW Document], n.d. . BONEBANK. URL <http://www.bonebank.eu/> (accessed 8.20.18).
- Buganim, Y., Faddah, D.A., Jaenisch, R., 2013. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. Nat. Rev. Genet. 14, 427–439. <https://doi.org/10.1038/nrg3473>
- Capetian, P., Azmitia, L., Pauly, M.G., Krajka, V., Stengel, F., Bernhardt, E.-M., Klett, M., Meier, B., Seibler, P., Stanslowsky, N., Moser, A., Knopp, A., Gillissen-Kaesbach, G., Nikkhah, G., Wegner, F., Döbrössy, M., Klein, C., 2016. Plasmid-Based Generation of Induced Neural Stem Cells from Adult Human Fibroblasts. Front. Cell. Neurosci. 10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00245>
- Carballo, C.B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., Rodeo, S.A., 2017. Basic Science of Articular Cartilage. Clin. Sports Med. 36, 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2017.02.001>
- Criqui, M., Qamra, A., Chu, T.W., Sharma, M., Tsao, J., Henry, D.A., Barsyte-Lovejoy, D., Arrowsmith, C.H., Winegarden, N., Lupien, M., Harrington, L., 2020. Telomere dysfunction cooperates with epigenetic alterations to impair murine embryonic stem cell fate commitment. eLife 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.47333>
- Dahéron, L., Opitz, S.L., Zaehres, H., Lensch, M.W., Lensch, W.M., Andrews, P.W., Itskovitz-Eldor, J., Daley, G.Q., 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. Stem Cells Dayt. Ohio 22, 770–778. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-770>
- Dickhuth, H.-H., Röcker, K., Mayer, F., König, D., Korsten-Reck, U., 2004. [Endurance training and cardiac adaptation (athlete's heart)]. Herz 29, 373–380. <https://doi.org/10.1007/s00059-004-2582-4>
- Di Pasquale, E., Song, B., Condorelli, G., 2013. Generation of human cardiomyocytes: a differentiation protocol from feeder-free human induced pluripotent stem cells. J. Vis. Exp. JoVE. <https://doi.org/10.3791/50429>
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R., 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27–45.
- Duinsbergen, D., Eriksson, M., 't Hoen, P.A.C., Frisén, J., Mikkers, H., 2008. Induced pluripotency with endogenous and inducible genes. Exp. Cell Res. 314, 3255–3263. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.06.024>
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Ford, L.P., Cheng, A., 2008. Using synthetic precursor and inhibitor miRNAs to understand miRNA function. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 419, 289–301.

- [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-033-1\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-033-1_20)  
GeneRuler™ 1 kb DNA-Leiter [WWW Document], n.d. URL <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0311> (accessed 5.4.20).
- G, G., S, H., Em, F., Lg, C., 2011. Measurements of Cell Death in Neuronal and Glial Cells [WWW Document]. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21815065/> (accessed 6.23.20).
- Guan, K., Rohwedel, J., Wobus, A.M., 1999. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology* 30, 211–226. <https://doi.org/10.1023/A:1008041420166>
- Hayashi, T., 2020. Hypertrophic Cardiomyopathy: Diverse Pathophysiology Revealed by Genetic Research, Toward Future Therapy. *Keio J. Med.* <https://doi.org/10.2302/kjm.2019-0012-OA>
- Judson, R.L., Babiarz, J.E., Venere, M., Blelloch, R., 2009. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat. Biotechnol.* 27, 459–461. <https://doi.org/10.1038/nbt.1535>
- Kaja, S., Payne, A.J., Naumchuk, Y., Koulen, P., 2017. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. *Curr. Protoc. Toxicol.* 72, 2.26.1–2.26.10. <https://doi.org/10.1002/cptx.21>
- Kibschull, M., 2017. Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies in AggreWell Plates. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2017, pdb.prot094169. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot094169>
- Kosinski, M., Figiel-Dabrowska, A., Lech, W., Wieprzowski, L., Strzalkowski, R., Strzemecki, D., Cheda, L., Lenart, J., Domanska-Janik, K., Sarnowska, A., 2020. Bone Defect Repair Using a Bone Substitute Supported by Mesenchymal Stem Cells Derived from the Umbilical Cord. *Stem Cells Int.* 2020, 1321283. <https://doi.org/10.1155/2020/1321283>
- Kramer, J., Hegert, C., Hargus, G., Rohwedel, J., 2005. Mouse ES cell lines show a variable degree of chondrogenic differentiation in vitro. *Cell Biol. Int.* 29, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.10.003>
- Lawson, H.A., Cheverud, J.M., Wolf, J.B., 2013. Genomic imprinting and parent-of-origin effects on complex traits. *Nat. Rev. Genet.* 14, 609–617. <https://doi.org/10.1038/nrg3543>
- Lee, J.T., Bartolomei, M.S., 2013. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell* 152, 1308–1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.016>
- Lensink, M.A., Jongsma, K.R., Boers, S.N., Noordhoek, J.J., Beekman, J.M., Bredenoord, A.L., 2020. Responsible use of organoids in precision medicine: the need for active participant involvement. *Dev. Camb. Engl.* 147. <https://doi.org/10.1242/dev.177972>
- Liao, J., Wu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Cui, C., Gao, Y., Chen, T., Rao, L., Chen, S., Jia, N., Dai, H., Xin, S., Kang, J., Pei, G., Xiao, L., 2008. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res.* 18, 600–603. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.51>
- Li, E., Zhang, Y., 2014. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a019133. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133>
- Li, K., Kong, Y., Zhang, M., Xie, F., Liu, P., Xu, S., 2016. Differentiation of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun. 471, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.182>
- Miller, J.M., Mardhekar, N.M., Pretorius, D., Krishnamurthy, P., Rajasekaran, N.S., Zhang, J., Kannappan, R., 2020. DNA damage-free iPS cells exhibit potential to yield competent cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 318, H801–H815. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00658.2019>
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S., 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631–642.
- M, K., M, E., 2010. DNA Methylation and Cancer [WWW Document]. *Adv. Genet.* URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20920744/> (accessed 6.23.20).
- Mungenast, A.E., Siegert, S., Tsai, L.-H., 2016. Modeling Alzheimer’s disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 73, 13–31. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.11.010>
- Nakamura, T., Arai, T., Takagi, M., Sawada, T., Matsuda, T., Yokota, T., Heike, T., 1998. A selective switch-on system for self-renewal of embryonic stem cells using chimeric cytokine receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 22–27. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8900>
- Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317. <https://doi.org/10.1038/nature05934>
- Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D., Williams, R.L., 1990. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev. Biol.* 141, 344–352.
- Pera, M.F., 2008. Stem cells. A new year and a new era. *Nature* 451, 135–136. <https://doi.org/10.1038/451135a>
- P, K., A, N., Pd, U., 2018. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay [WWW Document]. *Cold Spring Harb. Protoc.* URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29858337/> (accessed 6.23.20).
- Qi, H., Pei, D., 2007. The magic of four: induction of pluripotent stem cells from somatic cells by Oct4, Sox2, Myc and Klf4. *Cell Res.* 17, 578–580. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.59>
- Qiu, L.-Q., Lai, W.S., Stumpo, D.J., Blackshear, P.J., 2016. Mouse Embryonic Fibroblast Cell Culture and Stimulation. *Bio-Protoc.* 6. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1859>
- Rackow, A., Lang, P.D.S., 2012. Etablierung einer Transfektionsmethode für adhärenzte humane Stammzellen mittels Elektroporation.
- Rea, P., Livingstone, D., 2018. MSc medical visualisation and human anatomy. *J. Vis. Commun. Med.* 41, 177–183. <https://doi.org/10.1080/17453054.2018.1505426>
- Roberts, J.M., Vetter, M.L., 2018. From Retina to Stem Cell and Back Again: Memories of a Chromatin Journey. *Cell Rep.* 22, 2519–2520. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.078>
- Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palaci, J., Castelijns, B., Forment, J., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A., Orzaez, D., 2013. GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology. *PLANT Physiol.* 162, 1618–1631. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217661>
- Scott, J.E., 1996. Alcian blue. Now you see it, now you don’t. *Eur. J. Oral Sci.* 104, 2–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00038.x>
- Sharifi Tabar, M., Hesaraki, M., Esfandiari, F., Sahraneshin Samani, F., Vakilian, H., Baharvand, H., 2015. Evaluating Electroporation and Lipofectamine

- Approaches for Transient and Stable Transgene Expressions in Human Fibroblasts and Embryonic Stem Cells. *Cell J.* 17, 438–450. <https://doi.org/10.22074/cellj.2015.5>
- Shivdasani, R.A., 2006. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 108, 3646–3653. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-030015>
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D., 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688–690. <https://doi.org/10.1038/336688a0>
- Sproul, A.A., 2015. Being human: The role of pluripotent stem cells in regenerative medicine and humanizing Alzheimer’s disease models. *Mol. Aspects Med.* 43-44, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.06.007>
- Stadtfeld, M., Hochedlinger, K., 2010. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 24, 2239–2263. <https://doi.org/10.1101/gad.1963910>
- STEMCELL Technologies is Proud to Announce STEMcircles™, a Virus-Free Technology for Reprogramming Cells [WWW Document], n.d. URL <https://www.stemcell.com/stemcell-technologies-is-proud-to-announce-stemcircles-a-virus-free-technology-for-reprogramming-cells.html> (accessed 5.4.20).
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Topo™ TA Cloning™ Kit für die Sequenzierung, mit pCR4-TOPO Vektor, One Shot™ TOP10 chemisch kompetente E. coli und PureLink Quick Plasmid MiniPrep-Kit [WWW Document], n.d. URL <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K457502> (accessed 5.4.20).
- Vikstrom, K.L., Leinwand, L.A., 1996. Contractile protein mutations and heart disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 97–105.
- Welstead, G.G., Brambrink, T., Jaenisch, R., 2008. Generating iPS cells from MEFS through forced expression of Sox-2, Oct-4, c-Myc, and Klf4. *J. Vis. Exp. JoVE.* <https://doi.org/10.3791/734>
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318–324. <https://doi.org/10.1038/nature05944>
- Wobus, A.M., Wallukat, G., Hescheler, J., 1991. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differ. Res. Biol. Divers.* 48, 173–182.

## 8. Anhang

### 8.1. Tabellen zur Gesichtsfeldauszählung

Tabelle 3: Transfektion humaner Fibroblasten mittels Elektroporation, X-treme Gene und mi- RNA- Behandlung

Versuchsaufbau		Gesichtsfeldauszählung											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	
Elektroporation mittels STEMcircles (d2)	HF	Well 1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
		Well 2	0	0	1	0	2	0	1	0	1	0	5
		Well 3	1	5	0	3	0	1	0	1	2	0	13
		Well 4	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	4
	GYFP	Well 1	1	2	0	0	2	1	0	0	4	2	12
		Well 2	0	2	1	0	1	2	3	2	2	1	14
		Well 3	0	1	0	1	1	3	3	2	0	1	12
		Well 4	0	3	5	3	0	2	0	3	2	0	18
Behandlung mit mi- RNA (d4)	HF	Well 1	2	3	1	2	2	1	0	2	2	0	15
		Well 2	2	0	1	0	0	1	0	1	0	0	5
		Well 3	0	0	1	0	1	0	0	2	2	3	9
		Well 4*	2	0	0	1	2	0	2	0	1	1	9
	GYFP	Well 1	2	0	1	1	1	3	0	2	2	0	12
		Well 2	2	4	0	1	0	2	1	0	2	2	14
		Well 3	3	3	2	0	2	0	6	1	2	0	19
		Well 4*	3	2	0	2	1	3	2	3	1	2	19
Transfektion I mittels X-treme Gene (d6)	HF	Well 1	1	0	0	1	2	2	0	0	1	0	7
		Well 2	0	0	2	2	0	0	2	3	0	2	11
		Well 3	2	0	4	0	1	1	0	3	1	0	12
		Well 4*	0	0	1	2	2	0	0	1	0	2	8
	GYFP	Well 1	1	1	0	0	2	0	0	1	0	1	6
		Well 2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
		Well 3	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	3
		Well 4*	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	4

Transfektion II mittels X-treme Gene (d8)	HF	Well 1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
		Well 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 4*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GYFP	Well 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		Well 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 4*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dargestellt ist die Gesichtfeldauszählung der grün fluoreszierenden humanen Fibroblasten (HF) im Vergleich zur Kontrollkultur (GYFP). Die Zeitpunkte der Erfassung sind zunächst der zweite Tag nach der Elektroporation mit Stem-Circles (d2), der vierte Tag nach der Behandlung mit mi- RNA (d4), zusätzlich ab diesem Zeitpunkt eine Negativkontrolle ohne mi- RNA- Behandlung (\*) und am sechsten (d6) und achten Tag (d8) nach der Transfektion mittels X-treme Gene.

Tabelle 4: Transfektion muriner Fibroblasten mittels Elektroporation, X-treme Gene und mi- RNA Behandlung

Versuchsaufbau	Gesichtsfeldauszählung												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ		
Elektroporation mittels STEMcircles (d2)	MF	Well 1	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	4
		Well 2	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	3
		Well 3	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2
		Well 4	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	4
	GYFP	Well 1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
		Well 2	1	0	3	1	0	2	0	2	0	0	9
		Well 3	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	5
		Well 4	0	1	2	2	1	0	0	1	1	0	8
Behandlung mit mi- RNA (d4)	MF	Well 1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
		Well 2	1	1	0	0	1	2	0	0	2	0	7
		Well 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Well 4*	1	0	0	2	0	1	0	1	0	0	5
	GYFP	Well 1	0	1	0	1	1	0	1	2	0	0	6
		Well 2	0	0	1	0	2	0	0	0	1	1	5
		Well 3	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	4
		Well 4*	1	0	1	0	1	0	2	0	0	0	5
Transfektion I mittels X- treme Gene (d6)	MF	Well 1	-									-	
		Well 2	- Keine Zellen mehr vorhanden,									-	
		Well 3	- Zelldebries									-	
		Well 4*	-									-	
	GYFP	Well 1	-									-	
		Well 2	- Keine Zellen mehr vorhanden,									-	
		Well 3	- Zelldebries									-	
		Well 4*	-									-	

Dargestellt ist die Gesichtsfeldauszählung der grün fluoreszierenden murinen Fibroblasten (MF) im Vergleich zur Kontrollkultur (GYFP). Die Zeitpunkte der Erfassung sind zunächst der zweite Tag nach der Elektroporation mit Stem-Circles



(d2), der vierte Tag nach der Behandlung mit mi-RNA (d4), zusätzlich ab diesem Zeitpunkt eine Negativkontrolle ohne mi- RNA Behandlung (\*) und am sechsten (d6) nach der Transfektion mittels X-treme Gene. „-“ zeigt lockere Zellaggregate, welche wenige blass grüne Zellen überlagern, sodass eine Auswertung nicht möglich war. Eine weitere Transfektion war nach dem sechsten Tag bei sämtlichen abgestorbenen Zellen nicht mehr möglich.

Tabelle 5: Transfektion humaner Fibroblasten mittels X-treme Gene und mi- RNA Behandlung

Versuchsaufbau		Gesichtsfeldauszählung										Σ	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Transfektion mittels X-treme Gene (d2)	HF	Well 1	1	0	0	1	0	0	1	2	0	0	5
		Well 2	0	0	0	0	1	2	0	0	1	0	4
		Well 3	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	4
		Well 4	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3
	GYFP	Well 1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	4
		Well 2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
		Well 3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
		Well 4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
Behandlung mit mi- RNA (d4)	HF	Well 1	-										-
		Well 2	-	Keine Zellen mehr vorhanden,									-
		Well 3	-	Zelldebries									-
		Well 4*	-										-
	GYFP	Well 1	-										-
		Well 2	-	Keine Zellen mehr vorhanden,									-
		Well 3	-	Zelldebries									-
		Well 4*	-										-

Dargestellt ist die Gesichtsfeldauszählung der grün fluoreszierenden humanen Fibroblasten (HF) im Vergleich zur Kontrollkultur (GYFP). Die Zeitpunkte der Erfassung sind zunächst der zweite Tag nach Transfektion mittels X-treme Gene (d2), und der vierte Tag nach der Behandlung mit mi- RNA (d4), zusätzlich erfolgte

ab diesem Zeitpunkt eine Negativkontrolle ohne mi- RNA Behandlung (\*). „-“ zeigt lockere Zellaggregate, welche wenige blass grüne Zellen überlagern, sodass eine Auswertung nicht möglich war. Eine Fortführung des Protokolls war nach dem vierten Tag bei sämtlichen abgestorbenen Zellen nicht mehr möglich.

Tabelle 6: Transfektion humaner Fibroblasten mittels Elektroporation, X-treme Gene, mi- RNA Behandlung und LDH-Testung

Versuchsaufbau			Gesichtsfeldauszählung										Σ
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Elektroporation mittels STEMcircles (d2) + LDH- Test	HF	Well 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2
		Well 3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
		Well 4	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	3
	GYFP	Well 1	3	1	6	4	3	2	1	2	2	2	26
		Well 2	1	2	3	2	6	2	3	2	1	2	21
		Well 3	2	0	1	1	0	2	1	0	1	0	8
		Well 4	2	4	2	3	2	2	2	1	1	1	20
Behandlung mit mi- RNA (d4) + LDH- Test	HF	Well 1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
		Well 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 3	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
		Well 4*	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
	GYFP	Well 1	4	3	1	1	2	3	5	4	2	3	28
		Well 2	2	3	3	3	2	1	1	3	2	2	22
		Well 3	1	0	1	2	1	2	1	0	0	0	8
		Well 4*	6	2	0	3	2	2	1	0	0	2	18
Transfektion I mittels X-treme Gene (d6) + LDH- Test	HF	Well 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 4*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	GYFP	Well 1	2	2	0	3	0	0	0	0	1	0	8	
		Well 2	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	4	
		Well 3	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	
		Well 4*	2	5	2	1	2	2	2	3	2	1	22	
Transfektion II mittels X-treme Gene (d8) + LDH- Test	HF	Well 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Well 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Well 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Well 4*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	GYFP	Well 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 4*	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
Behandlung mit mi- RNA II (d11) + LDH- Test	HF	Well 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Well 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Well 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Well 4*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	GYFP	Well 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 4*	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2

Dargestellt ist die Gesichtfeldauszählung der grün fluoreszierenden humanen Fibroblasten (HF) im Vergleich zur Kontrollkultur (GYFP). Die Zeitpunkte der Erfassung sind zunächst der zweite Tag nach der Elektroporation mit Stem-Circles (d2), der vierte Tag nach der Behandlung mit mi-RNA (d4), zusätzlich ab diesem Zeitpunkt eine Negativkontrolle ohne mi-RNA Behandlung (\*) und am sechsten (d6) und achten Tag (d8) nach der Transfektion mittels X-treme Gene und eine weitere Behandlung mittels mi-RNA. 24h nach jeder Behandlung erfolgte der LDH-Test.

Tabelle 8: Transfektion humaner Fibroblasten vs. Schweißdrüsenzellen mittels Elektroporation durch NAPA GEN Elektroporator

Versuchsaufbau		Gesichtsfeldauszählung											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	
Elektroporation mittels STEMcircles (d2)	HF	Well 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	hSGSC s	Well 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dargestellt ist die Gesichtsfeldauszählung der grün fluoreszierenden humanen Fibroblasten (HF) im Vergleich zu den humanen Schweißdrüsenzellen (hSGSC) zwei Tage (d2) nach Elektroporation der Zellen mittels STEMcircles durch den NAPA GEN Elektroporator vom Fraunhofer Institut Lübeck.

Tabelle 9: Transfektion humaner Fibroblasten vs. humaner mesenchymaler Stammzellen mittels Elektroporation

Versuchsaufbau		Gesichtsfeldauszählung											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	
Elektroporation mittels STEMcircles (d2)	HF	Well 1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	3
		Well 2	0	0	1	0	2	0	1	0	1	0	5
		Well 3	1	5	0	3	0	1	0	2	2	0	14
		Well 4	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
	hSGSC s	Well 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Well 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Dargestellt ist die Gesichtsfeldauszählung der grün fluoreszierenden humanen Fibroblasten (HF) im Vergleich zu den humanen glutealen mesenchymalen Stammzellen (hSGSC) zwei Tage (d2) nach Elektroporation der Zellen mittels STEMcircles.

## 8.2. Genabschnitte mit Primern nach Bisulfitkonversion

### 8.2.1. Oct-4

TAGTATTAGAATTATTTAAATGGTTATTTGGTATTGGAGTTTTTTTTTTTTTTAATTTTTTTTTT  
ATTTGTTTATTTATTTATTTTATTTTATGTATGTAAGTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGT  
TTTTGAGATAGGGTTTTTTGTGTAGTTTTGGTTGTTTTGGAATTTATTTGTAGATTAGGTTAG  
TTTTGAATTTAGAAATTTGTTTGTGTTTTGTTTTTAAGTGTGGAATTAAGGTAAGGGTTATTAT  
ATTTGGTGTAAGTATTTTTTAAAGATGTATTTGTTTATATATGTGAGTATATTATTTTTTTTTTAG  
GTATATTAGGA  
GAGAGAATTAGATTTTTGTTATAGATGGTTGTGAGTTATTAAGTGGGAGTTGGGATTGAATTA  
GGATTTTTGGAAGAGTTGTTAGTGTATTTAATTTGTGAGTTATTTTTTAGTTTTTTTTTTTTGT  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGATATAGTTAATTATGTAGTTAGGTTAATTTTTAGTTTG  
TTGTGTTTTAGTTTTGAGTGTGTTTTGGGATTGTAGGAGTTTGTGTTTTGTTAGTTTATAGT  
TTGGGATGTTTTTTTTATAGATATTTATGTATTAGTATTGAAAGATAAAGATAAATATTGGTTTGT  
TTGTAAATTGTTAAGTTTTGTTAGTTTGATTAGGTTTGAGAGGAGATTTGTTAGTTTTTTAA  
GAAGATTGTGTGGAGGTTGGTGGTAGAAGGTGGGGTATAGAAGATTGTTTTATTTTATAAG  
GTGTTTTATTTATTTTTAATGTTAATTTTTTTTTATAGAGGTATAGGGATAATTTTTATTTTG  
ATTTATGTGGAGTGAGAAGGGTAGGAGGATGTATGGGAATAGGGTTGTAGTTTTTTTTTAAGT  
TGGAAGAAAATGGAGAGTTAGGTTAGGGAAGGTAGTGATTTTTTTGGGGTGTATATATATA  
TATATATATATATATATATATATATATATATATATATAGGGAATTTAGTATTGGTGGTGTGAG  
TAAGTAGGTAGTTATATGTAGTAATAATAAGATTTATTTTGTGAGAGTTATTATATAAGGTTT  
ATTTTTAAGTTAGTTAGGTGGTGGTGGTATATGTTTTAATTTTAGTATTTTGGAGATAGA  
GATAGGAGGATTTTTGAGTTTGAGGTTAGTTTGGTTATAAAGTGAGTTTTAGGATAGTTAGGG  
TTATATAGAGAAATTTGTTTTGAGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGTTTATATTTGTAAATTTTA  
ATTAATGTTTTATTTTTGTTTTTATAGTTGTTTATTTATGTGATATATTTAGTAGAAGGTTAGG  
TTTTTTTTTTAATTTTTAAGAGTGTGTTGTGATTTGAGGGATAGGATTTTAGTGGGGAGATTTT  
TTATTTATAAGGTAGATTAAGGTGGTTGGTTATTTTGAATGAGTGATGTTGTGGGGTTTTGGTT  
ATTAGGGTAGTTTTGGGTGTAGTGGTGAAGTTATTTTTGTAAGTTTAAAGGTATTTGGATAT  
TGTTTATTAGAATTGGGAAGGTAAGAGGATTAGAAGTTAAGGGTTTTTTGGTTATGTAGAGT  
TTAGGGGTAGTTTTGTTATATGTAAATTTGTTTTAGAAGAAAAAAGGAAATGGGTAGTAGTGG  
TGAATGTTTATAATTTTAGTATTTGGGAAGTAGAGGGTAGGTTGATTTTTGAGTTAAGGTTAGT  
TTGGTTTATAGAGTGAGTTTAGGATAGTTAGGGTTATATAGAGAAATTTGTTTTAGAAAGAAA  
AAAAAAAAAAGGGAGAAATAGAATTTATTTATTTTAAAGGGAGTAGGTATATTTTGAAGTTTTT  
TGTTTTGTTGGTGATTTATTTTTATTTTAGTTTTAGATTTTTGTTTTTTTTTTAATTTTTATTGT  
ATTGTGTGTGTGTGTATTTGAGTGTAAATTAATATTGAATTTTTGGAGATTAATGTTTTTTT  
GAAATGGATTTTAGGGATTAATTTATGGTTGTTAGGTTTAGTAAGTGTGGTTATTTGTTGAGTT  
GTTTTTAGGTTTTTTTAGGTTTTTTTTAAGTTTTTTTTTTAATTTTTTTTTTTTTGTTTTTGT  
AAGTTTTTTGATTAGGTAAGAAAATTAAGATAAGGAAAGGGAGATGTAGTTAGTTAAGGAATT  
TATGTTAGTTAGAGAAATTTTTTTTTTTTTTAGAATATTTGGATTTGGGAAGAGATGTTGTTG  
GTTTTAGGGTGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGGAGGGGGATGTTAATTAGTAAGGAAGTTGTT

TTTGGTTGGGGTAGGTTTGATTGAGTTTATGTTGTTGAAATTTTTATTTTTTTTATGGTTTTAT  
AGGGAGATTTAGTTTGGATGTTAATATGAGTGATTTTTTTGTTTTAGTTTAGTTTTTTGTGAG  
TTTATTTAATTGATTATTTAGTTTGTGAGGAGGTGTTGAAATTTATAGTAAGAAAGTTGTGGGG  
GTTAATGTTTATTGTTTGTGTTTTGTTTTAGATAAGGTTTTTTGTTGAGGTTGTTTAAAGTTGG  
TTTGGAGGATTTTTGTGTTTAAAGTTGGTTTTAAATTTTTTTTTAAAAGAAAATTATGTGTATATAT  
GTGTGTTTATGTAATTGTAGATGATTATAGTAGTTAAGAGATTTTTGTTTTTTTAGTTGTAAATTA  
TTAATATGGGTGTTAGGAATAGAATTTAAAAGGGTTTTTTGAAAGAGTAATGTATATTTAAAT  
GTTGAGTTTTTTTTAGTTTTTAGTTTTGGATTTTTGTTTTTATTATTTTAAATGTTTAAAGGGTAGG  
TATTATAGGTGTGGTATTTTGTATTTGGTTTTTTAGGATATTTTTTTATGTTGGTGGATTATTTTT  
GGTTGGGGATGTGTGGGTTTTTTTTGTTGTTTTTTGGTTTTTTAGATAGAATTTTGAGATAGATTTT  
GATTTGGTTTTAAATATAGGTGGTTTGTGGTAAGTTAATGAATTTTAGTTTAAATTTGGGGTAT  
TTAAGATATTATGGTGATTTTTTTTTGTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAGATTTA  
TTTATTATTGTATGTAAGTATTTTAGATATTAGAAGAGGGTGATAGATTTTTTTTTTTTTTTTGAGA  
TAGGATTTTTTTGTGAAGTTTTGGTTGTTTTGGAATTTATTTTGTAGATTAGGTTGGTTTGAAT  
TTAGAAATTTATTTGTTTTTTGTTTTTAAAGTGTGGGATTAAGTTATGAGTTGGGATTGTATTTG  
GTTTAAAGTGATTTTTTAAAGGGGGTAGAGTGGTATATATTTTTAATTTTAGTATTTAGGAAGTAA  
AGGTTGGTGGATTTTTGTGAGTTTAAAGTTAGTTTGGTTTATAGAGTGAGTTTAAAGTTATTTAA  
GGTTATGTAGGGAATTTTTGAATTAATTTAAAAGTTAGTTTGTGATTTTTTTAAGATTTAGGAG  
GTAAGAAATTGGATTAGATGAGTTAATAGGTTTGTGTTTTATTTTAGGGTTATTAGGTTTATA  
GTTTGGGATTAGGTTAGGGTATATTTGTTTTAAGTTAGTTTAAAGAAGATTTGGGATTTTAGATA  
AAGTTGTTGTTAAGGATTGTATTATATTTAGGTATGTTTAGGGTTAATTTGGTTGTAAAGTTAG  
TTATTAGGTAGTTAAAGGATTTAGAATATGTTTTTTGTTTTGGTTAGTGAGTTATTTAAAGAGAA  
ATTATAATTTATAAGATAAGGTTGGTATTGAATATAGATAGGATTGTTGGGTTGTAGGTATATTT  
GAATTGTGGTGGAGAGTGTTGTTTAGGTTTTAGAGGTTGGTTTTGGGAGGAATTGGGTGTGGG  
GAGGTTGTAGTTTGATTTTGTTTTTTTTTTTAGGGAGGTTGAGAGTTTTGGGTAGATGGTAGAT  
GTATAATAAAGGTGTATGATAGTTTTGTTTTGGGGGTAGAGAAGATGGTTGGGGAGGGGTTTT  
TTTTGTTTTAGTTTTTTTTTAAATTTGTTATTGAGGAAGTTTTGTGAATTTGGTGGTTTTTAAAGTTG  
TTGTTTTATTTAGGTTTTTTAATTAATTTATGGTATTGTTTTATAATGAATGTATAGAAATTGGG  
AGGTGAGTATGATAGAGTGGAGGAAATGGAAGATTTATGGAGAGGGTTAGAGAGATGGTTTTT  
TAGTTATTTTGGGGATGATTTGGATTTATGTGGTAGAAGGAGGGGATTTTTATATATGTGTTA  
TGTGTAGTTGTGTAGGTATATATATATTTTTTAAAATAAAATGTAATTTTTTTTTTAAAGTTTTA  
GGGTGAATTTGGTGAAGTTGATGAAGTTGAGGTAGGAGAATTATTAGGAGTTTAAAGGTAGTT  
TGTTTTATAGAGAAAGGTTTTATTTTTATTTGATGAAGATTATTATTAAGAGATATTTTTGTTTTT  
AGGGTATTTAGAGTTATTGATTTTAGTTAATAGTTTAGGTGGGTTGGGTTTAGGTTAGAATTTT  
GTTTTGGTTATGTATATTGTGGGGTGTTTTG**GGTTTTTTGAGGTTGTGTGATTAT**TTTTGGGGTT  
TTTTGTTTAGAGTATGGTGTAGGAGTAGATAGATAAATATTATTTTTTTGTAGATAGGTATTTTGAG  
GGTTATTTTTTTGTAAAGATAATTAAGTATTAGGTTAGTAAT**GGGATTTTTAGATTGGGTTTAGA**  
**AAA**TTATTTTAGGGAAGTTTAGGGTAGGTTTTTTGTATTTTTTTTTTTTTAATTTGTTTTTTTAGTG  
TTTTTTGTTAGTATAGGAATGGGGGAGGGGTGGGTGATGAGGATGAATATTGGAGTTTTTTGG  
AGGAAGGGAAGTAGGGTATTTT**TATTTGAGGTTTTGTTTTGAGGAG**AGGTTGGAGAGTTGGGG  
AAGTTTTGTGTGAGGGGATTGGGGTTTAGGAGGGGGTTGGG**GAGTAGGAAGTTGTTTTAGG**

GGAGTTATTTTGGTTTATTTAAGGGTTGAGTATTTGTTTAGGGTTAGAGTTGTTTTTTTTGGGGA  
TTAGGATTGTTTAGTTAAGGTTATTGTTTTGTTTTTTTTTTTTAGTTTTTTTTAGGTTTTTTGAAT  
TTGAAGTTAGATATTTTTTTTTTTTATTTATTTTTATTTGTTGGGTTTTTTTATTTAGGAATTAGG  
TTGGAAGTTTGGGATGAGGAGGTGGGGGGAGGGAGAATTGAGAATTTGAGGAAAGAGGTTT  
TGGTTTTAATTGTGAGGGGATGGAGTTTGGGTGTAGGTTTTATGGGGGTGGGGGGTGGTTA  
GTGTTTAATTTATTAATTTGGATAATATAAGATGGAATATTGTGTTTTGAAAATGTAGAGTTAGT  
ATTTTTTTGGGGTTTTTGGGGATATATTTGGTTGGGGTTTTGGGGTTTTATGGTGTAGAGTTTTT  
AAATTTTGGAGGATTGGAGGTGTAATGTTTGTGTTTTGTTTTGGTTTTGGATATGGGTTGAAATAT  
TGGGTTTATTTATATTTAGGATTTTAGATGGGTGGGTAAGTAAGAATTGAGGAGTGGTTTTAGA  
AATAATTGGTATATGAATATTTAATGGATGTTTTAGGTTTTTTAGAGGATGGTTGAGTGGGTTGT  
AAGGATAGGTTGAGAGGGTGTAGTGTTAATAGGTTTTGTGGTGTGATGGGGTATTTGAGTAAT  
TGGTTTGTGAGGTGTTTGGTGATTTAAGGTAGGGGTGAGAGGATTTTGAAGGTTGAAAATGAA  
GGTTTTTTGGGGTTTTGTTTTAAGGGTTGTTTTGTTTAGATGTTTTAATTTTTGTTTGAAGATA  
TAGGTAGATAGTGTGTTTTAGTTTTTTTTATTTTTATAGTTTTGTTTTTTATTTATTTAGGGGG  
TGGGGTTAGAGGTTAAGGTTAGAGGGTGGGATTGGGGAGGGAGAGGTGAAATTGTTTTTAGG  
TGAGTTGTTTTTTATTAGGTTTTTGGTTTGGGGTGTGTTTTTTTTTTATGGTTGGATATTTGTT  
TTAGATTTTGTGTTTTTTATTTTTATTAGGTGGGGGTGATGGGTTAGTAGGGTTGGAGTTGGGTT  
GGGTGGATTTTTGAATTTGGTTAAGTTTTAAGGGTTTTTAGGTTGGGTTTGAATTGGATTAGG  
TTTAGAGGTATTGGGGATTTTTTTATGTGTTTTGTATATGAGTTTTGTGGAGGGATGGTATATT  
GTGGATTTTAGGTTGGATTGGGTTTAGTTTTTAAAGTTGGTGTGGAGATTTTGTAGTTTGAGGG  
TTAGGTAGGAGTATGAGTGGAAAGTAATTTAGAGGGAATTTTTTTGAGTTTTGTGTTGATTGT  
TTTAATGTTGTGAAGTTGGAGAAGGTGGAATTAATTTTGTAGGAGGTAAGTGAAGGGATTGG  
TTGGTTGGTAGAGGTAGTAGTGAAGGGAATTGGAATATGTAGGGTAGTTATTTTTGTTTGT  
AAAGGTGGTGTGATTGTTTGGGTTTTTTGAGAAGTATGATGTAGTGTGGATTAGAATTTAGAAT  
TGTAAGAATTAGAAATTGGTTTGGATTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTATGTAGGTTATTTAGGTT  
TGGTTTGTGTTTTGATATTTGTTTTATGTTATTATTGTTTGTATATTAGTGTGTGAAAATTAG  
TTTTTTTTTAAAAAAAATATATTAGTTTTTTTGGGGATTTGGATTATAGTTGGATTTAGGAAT  
TTGGTTTTAAGGTTAGGTATGGTTGGGGGGGTAAAAATGGTGTGTTTTTTGGAGTTATTGTTA  
TTGAAGAGGTTGGGTGTGATTGGTTGTTGATAGGAGTTTTTGTGTTGGGTTATGTGTGGAGTAG  
GGTTTATTTTTAGTTAAGTTTATGGTTTGTGTTTTATTTAGTTTTAGATTTTATGAGTTATTTTTATAT  
GAGTAGATTTTTGTAGTGTGTTGAGGTGTAGATTTGATTGATTTTAGTTTTTTATTTTTTTTTGTA  
AATAAGAAAGGGATATTTTTGGGTAGGGGAGTTTTATTTTTAGGTTATTTAAGATTATTTGTG  
AGTGTATGGGTTTTGTTTAGTGTGTTGATGGTTATAGTTAGTATTTTGGAGTAAGTGAAGTAAT  
TAGTTTTAAGAATAAGGTGTGAGTGGATATTGATGTTTGTGGGAGTTTTGATAGTTTAGTGAT  
TGTTGTAGTAGGAGTTTTTTTTTTAAGTGTAGTTTTTGTGTTATTTTAGGTTTTGTATGTTGTTG  
GGAGTTTTTTAGGAAGGTATTAATAGTTTATTTTATATTTTAAATGGTTTTTAAATGAAGTAAGAGA  
TTTGAATTTTAGTTAAGTTAATTTTAAATTTTTAAAATAGGATTTAGAAAAGTTAAAGATATTGTT  
GAGGGTGATTATAAGTTTTGGTTTTTTGAGGAGTAGTTGGAGATGAAAGTTTTGTTTGAAGTTGA  
GAGAATTTTTTTTTATTGAAATGGTATTGAGGTGTGTTTTATTGGTTGTTGTTTTGTTTGTGTTT  
TGGGTTGGTTAGTTTTTGTGGAGTATTTTAGTTTTTTATTTTGGATTTTTGTTTTAATAATTTGTT  
TTTTTTTTGTTTTTAAAGGTTGATTTGTATTTTTTAGATGATTTTATTTTTGTTTTTTGTTAG



AGATAGAAAAGTTTGAGAAATTGATAGTTATTTTGGGGGGGGGGTTTGGTTTATATGTTGTA  
ATTTAGAAAAGTATATTTAATTGGTTATTTGTTATATTTTTTTTATTTGGTTTTAATTATTATTGTGT  
ATTATTGAGAAGAAGGTAGTTTTAGTTATATTTTTGAGTGTTTTTGTGTTTTATTGTTTATATAT  
TGATTGATATTTTTGTTTTAATTTTGAAAAAATAATTTTTTTTTTTTGTGGTGTGTGATGTTT  
GTTATTGTATATTTGTGGGTGTTAGAGGTGGTTTTTTGTATTTTTGGTTAGTATTGTATTTAGG  
GTGAGTTAGATGATTTTTTGTGGTTTTGGTTTTAAAGTTTTTTATTTTTAGAGTTTTTTAGTTTTGT  
TGTTTTGTTTTTTTTGTTGTATTTTAGTATAGTAGGAGTTTTTTTTGTATTTTGGAGTGTTGTTAG  
TTTTTGGGGTATGGATATTTGGTTATTTAGAGTGTGTTGTGTAGGTTTTTATTTAGAGTTGAATA  
GAGGGATGGATTTTATTATTTAGTTTTGAGATATTGAGGTAGGAGAGTTTTTTAGTGAGTTTT  
TGTTTTAATATTTTTATTAATATTGTGTTATATTTGGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAT  
TTTTTTTTTTTTTATATGAGTATAGTGTATTTGTTTTTAGATATATATTAGAAGAGGGTATTAGAT  
TTTATTATAGAAGGTTGTGAGTTATTTTGTGGTTGTTGGGAATTGAATTTTGGATTTTTGGAAGA  
GAAGTTTGTATATTAATTTTTGTATTAGTTAGGGTTTTTTAGAGTTATAGAATTTATGGATAGTTT  
TTAGATAGTAAAGGAATTTATTGATGATTTATAGTTGGTAGTTTAAATTTTAAATAATGGTTTAGTT  
GTAGTTGTGAATGGAAGTTAAGGATTTAGTAGTTATTTAGTTTTATGTAGTAAGTAGGTGAAG  
GAGTAAGAGTTAGAGTTTAAATTGTTGAGTTATGTGTTTTTTGAGTAAAGGGATTATATGTTTGTT  
TGTTTGGTTAATTTGTAGTTTTAAATTTTTTTAGAATAGGGTGATATTTTGTTTTTAGTGGGGT  
GGTTTTGAGTAATTTGTGAGTAGATAGGAATTTGTTGGGGTATTGTATAGAATTTTGGGTAGTG  
TGGTATTGTAGATGGTTAGGTTTTGGGGGGGAAAGAGTTATTTATGTTATTTAGGAATAGAGT  
GAATAATATTTATATAATTAGATTAGTTTTTGAGGAGTTGAGATTTTTTTATGGGGTATTTTAG  
GGTTATAGTTTTAGTTGGTGTGATTTTGATAAGTTTGTTTTTTTTATTATAGTTTTAGGATATGAA  
AGTTTTGTAGAAGGAGTTAGAATAGTTTGTAAAGTTGTTGAAGTAGAAGAGGATTATTTTGGGG  
TATATTTAGGTTGATGTGGGGTTATTTTGGGTGTTTTTTTTGGTGGGTTTTTTTTTAGTATGTTTT  
GATTTTATGGTTTTTAAATGTAGGTGTAAGGGGGTGGGGTATTTTAGGAGTTGTTTTTTTATAGG  
TAAGGGAGGATTAGATGTTTGTAGTTTGAATTGTTAGAGGTGGGGGTTTGGGTTTTTTTTTTGT  
TGTTTTATTTATTTTGTGATTGGTTTTTTAGGAAAGGTGTTTAGTTAGATTATTATTTGTTGTT  
TTGAGGTTTTGTAGTTTAGTTTTAAGAATATGTGTAAGTTGTGGTTTTTTGTTGGAGAAGTGGGT  
GGAGGAAGTTGATAATAATGAGAATTTTTAGGAGGTGAGGAGTGGTAGGATGTGTGTAATGTT  
TGTTAGGTATAGTTTTTTTTGTTGTTTTATTTTTGGTTTTGAAATTTTTTTTTTTAATTGGAGTT  
TGTAGGAGAAGTTTTGTGTTTTTATTTTGTGTTATGAATTGGAATTTAGAGTTTTAATATTTGTT  
AATTAATTAGGTTTTTTTTTTTTGAGTTATTTTTGTTTTTATTAGTTTGATAATGGTTTTTTTTTA  
GAATTTTGTTTAGTGTTGGTGAAGGTTTAGATTTAGGTTTATTAGTTTTTTTTTAGAGTTTTTTTTA  
GTAATTTTTGGTTTTGGGGTTATATTTAGTTAATGTTTTTTTAGTATAATTTTTTAGTGGTTTGTT  
TTTTAGTTTTATTTAAGGTGGGGTTGTTGTTAAGTTAAATATTAAGTTGTTTTTGTGTTTTTA  
TTTTTTTTTGTTTAGATATGTAAATTGGAGATTTTGGTGTAGGTTTGAAGAGAAAGTGAATTAG  
TATTGAGAATTGTGTGAGGTGGAGTTTGGAGATTATGTTTTTGAAGTGTTTGAAGTTTTTTTTAT  
AGTAGATTATTTATATTGTTAATTAGTTTGGGTTAGAGAAGGATGTGAGTGTTAAGATTTTGTTT  
TGTGGTATTTGGATGTTTTTTTTGTTTTTATTTTTATTTTTTTATTTTTTATTGTTGTTA  
TTGTTGATTGTAGTATTTTAGAGTTTATGATTTGATGTTTATTTTTGTGTTTATTTTAGGTGGTTT  
GAGTATGGTTTTGTAATTGGTGTAGAAGGGTAAAAGATTAAGTATTGAGTATTTTTAATGAGA  
AGAGTATGAGGTTATAGGGATATTTTTTTAGGGGGGGTTGTATTTTTTTTTTTGTTTTAGGTT

TTTATTTTGGTATTTTAGGTTATGGAAGTTTTTATTTTATTATATTTTATTTAGTTTTTTTTTTTGA  
GGGTGAGGTTTTTTTTTTTGTTTTTGTTATTGTTTTGGTTTTTTTTATGTATTTAAATTGAGGTAT  
TAGTTTTTTTTGGGGATGTTGTGAGTTAAGGTAAGGGAGGTAGATAAGAGAATTTGGAGTTTTG  
GGGTAAATTTTTTTATTGAGGAGGGATTAAGTATAAATAGGGGTGGGGGGTGGGATGGGG  
AAAGAAGTTTAGTGATGTTGTTGATTAGGAGTTTGGTTTGTGTTATTTATTATTTTGTTTTTAA  
ATAAAGATTGGGATATATAGTAGATAGTTGAATTTTGTTTTTTTTTAGTTTTTAGAGAGTTTGTG  
GTTGGAGAAAGTTAGTAATGGATTTTTAAATTTTAGGTGATTTTTAAATAGGTGTTATTGAAAT  
TATTGGAGTTTTATAAAATGTTTAGGGATAGTTGGGGTTGGAGTTTAATTTATAGAGGAAGGTA  
TTGTATATTTGTTATTTTAGAGGTGGTAAGTTTTTGTAGTTGATGGATATTATTTATAGTTATT  
GTTTGGTAGTTGTTTTTTTTTTTTTGTATTTTGGGAGTTTTGGTGGGTTTATATTTAAAAAAA  
AGAGTTTTTTTTGGGGGGGTTAAGATTTATTTATTTATATGGGTATATTGTAGTTGTTTTTAGA  
TATATTAGAAGAGGGTATGGGATTTTATTATAGATGGTTGTGAGTTATTATGTGGTTGTTGGGA  
ATTGAATTTAGGATTTTTGGAAGAGTAGTTAGTGTTTTTAATTGTTGAGTTATTTTTTAGTTTTT  
AAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGATGAGTTTTGTGTAGTTTTGGTGGATTAGGTTGGTTTTA  
GATTAGTTTGTTTTTGTGTTTGTAGTGTGAGATTAAAGTTTTGTGTTATTTTAGGTTAAATTGTT  
ATGTTTTTATTTTAGTTGATGATTATTTTTTTTTGGGTGTAGTAGTGTGGGAGTAGGGTTTGTAT  
ATATGTTTATAATGTTAGAATAGGTTAAAGTTTTAGATTTTAAGGAATTGGATTTATAGAGAGT  
TGGGAGTAGTTATGTAGGTTTTGAGAATTAATTTGGTTTTTTGTAAGAAGAGTTATTGGTTTTT  
TTGTTTTGTTTGTGTTGAGATATTTTTGGTGTAGTTTTGGTTATTTGGAATTTGTAGGTTAGG  
TTGTTTTGAATTTAGATTTAGTTTATTTATTTTTGTTTTTAAGAGTTGGGATTAAGGTTATGTA  
TTATTATAGGTTAGTTAGTTATAGTTTTTAATTGTTGAATTATTTATT

### 8.2.2. Nanog

AAGAATGATTTTTATTTTTATTTGTATATAAAGTTTTGGTTATGGTTTTTTTTGTTAGTAATAAGAT  
AAGTATTAATTTTTATGTTTAGTTTTGTTTTAGAATAATAGTTTTTAAATAATATTAAGTAAAGATA  
TAGATAGTTTGTGGTGTGTGTATGTATGTGTGAATTTGTGTGTGTATGTATGTATATTTAT  
GTGTGTTAAGTGTGTGTGTTAATAAAGTATTAATTAAGGGTTTTTTTTATGGTAATTAGGAG  
TTTATTAATGAAATTTGTTTTATTAAGATAGAATTTAAGTTAGGTTTGGTGGTGTATGTTTTTA  
TTTTTAGTATTTGGAAGGTAGAGGTAGGTAGATTTTTGAGTTTGAAGTTAGTTGGTTTTATAGA  
GTGAGTTTTAGGATAGTTAGGGTTATATAGAGAAAATTTGTTTAAAAAATAAAATAAAATAAAAT  
AAAATAAAATAAAATAAAATAAAATGATAAATTTGGTAAGAAGGATATATGTTTTATTATGTTTATA  
GTAGTTTTATTTATAATAGTTAGAAGTTGGAAAGAATTTAGATGTTTTTAAATAGAGGAATGGAT  
ATAGAAAATGTGGTATATTTATATAATGGAGTATTATTTAGTTATTAAGAAGAAATGAATTTATGAA  
ATTTTTAGGTAAATGGATGGATTTGGAGGGTATTATTTTGTAGTAAGGTAATTTAATTATAAAGGA  
ATTTATAGGATATGTATTTATTGATAAGTGGATATTAGTTTAGAAATTTAGGATATTTAAGATATA  
AGATATAATTTGTTAAAAGTATGAAATTTAAGAAGAATGAAGATTAAGTGTGGATATTTTGTGTT  
TTTTTTGGAATTGGGAATAAAATATTTATGGAAGGAGTTATAGAGATAAAGTTTGGAGTTGTGA  
TGAAAGGATGGATTATTTAGAGATTATTATTTAGGGATTTATTTATAATTAGTTTTTAAATGT  
TGATATTATTGTATATATTAGTATGATTTTGTGAAAGGATTTAGATGTAGTTGTTTTTTGTGAGA  
TTATGTTGGGGTTTAGTAAATATATAAGTGGATGTTTATAGTTAGTTATTGGATGGATTATAGGG

TTTTAATGGAGGAGTTAGAGAAAGTATTTAAGGAGTTAAAAGGATTTGTAATTTTATAGGTG  
GAATAATATTATGAATTAATTAGTATTTTAGAGTTTTTGTTTTAGTTGTATATGTATTAAGAT  
GGTTTTGTTGGTTATTAGAGGAAAGAAAGATTTATTGAATTTGTAAATTTTATATGTTTTAGTATA  
GGGAATATTAGGGTTAAAAGTGGGAGTGGGTAGGTAGGGGAGTGGGGGGGGTATGGGG  
GATTTTTGGGATAGTATTGAAAATGTAAATGAGGAAAATATTTAATAAAAAATATTTAAAAATA  
TAATAATAAGATAGAATTTTGTGGAGAGATGGTTTAGTGGTTAAGAGTATTGATAAAATTTTT  
TTTTATATATTTTGGTTGGTGATTTTTTTTTAAGGGTTAAGATTATAGGTTTGAGTTATTATATT  
TGTTTTAAGAAAGATTATAAAATATAGATTTATGGTTTTTATTATTAGTGAGGAGTAGTAGTATA  
GTTTATTGTTTTTTTTTAATATAATAGTTGTTTTGATATTGATGATGTTGGTAAAAGAATTTAG  
TATAGGGGGTTGGAGATATGGTTTAGAGGTTAAGAGTATTGATTGTTTTTTGAAGGTTTTGAG  
TTAAATTTAGTAATTATATGGTGGTTTATAAATATTTGTAATGGGATTTGATATTTTTTTTTGG  
TGTGTTTGAAGAGAGTTATAGTGTATTTATATAAATTAATAAGTGAATTTTTGAAAGAAAAGAT  
ATAATAAGTGGTATATTTTAGGTATGTTTTTTTTGAAAATTTATTTATTATATTGTTTGGTTGT  
GTGTGGGTGTATATAGAGAATAATTTGTGGGAATATATTTTTTTTTTTTTAAGTGAGATGGGG  
GAGAGAGGGAGGGATTTGGTTTTAGGAAGAATGAAGTTTTAATTGTTTTGTGGGTTTGAGTTTT  
TAGTGGAGATTTGATTTTGTTTTTGTGTGTTGGGATTTTAGATTTGATATTATGTTTTGTGTAG  
TGTTGGAGATTGAATGTATGTTTTTATTATGTAAAGTGAGTATTGTGTTAATTGAATTATATGT  
TTAGGTTTATGTTATGTTTTTTGAGTTTTTAAAATAGAGGTGTAGTTAGGTAAAGTAGTATAA  
AGTTTTTAATTTAGTTTTTAGAGTTAGAGGTAGATGGGTTTTAGTAGTTGAGGTTAGTTTG  
GTTTATAGTGTGAGTTTTAGGATAGTTAGGGTATAGAGAAATTTGTTTTAAAATAAAAAATAA  
AATTTAGAAGTGTGGAGTTTGTAAATTTTTTAAATTGTTAATTTGTTGGAATTTTTTTTTTAGGT  
TTGTTTTGTGGTTTTTTTTGGAGGATTTAAGGTTAGTGATTTATATTTTTTTTTATTTGTTTTAG  
TTTTGTTTTTTTTTAGTATTAATTATATAAGTTTATTTTTATTTTTGTTTTGATTGTTAATTATT  
AGAGGATTTATTTAATATTTTTTTTTTATTATATAGTTAGTTTTAATTAGGTTAAGGTATTTAG  
ATGTTTTTTTTTTATTTAAATTGTTTTTTGGATAAGGAATGTAGTAAGTTGTTTTTTGGTTATT  
AGTTATTTTTTTGTTGGATTTTTTATTAGAGATTTTAAAGATATTAAGAGGTAGGATAGGAAT  
GGGGTTGGGGAGGGATTTATTGTTGTTTTTAAAGTAGATTTTTTTGATTTGGAGTTGTGTGTT  
TTGTATTAATTTTTGTAGAATTTGGGGTAAATTTAAGGTTATGGTGGTTTTGATTTGTGGATT  
TAGAGGTAAGTTTTTTTTTTAGAGGATTTGTATGTATTTTGTTTTTAATTTGAAATGAGAATTGG  
TTAGAGTTTGAATTAGTTAGTTTTTTGATTTTTTTAGTTTTTATAATTTTTTTTTGGATGGTT  
TTAGAAGATAAAGGTAAGTTTATAAATTATGTTGTTTTTGGGATATATTTAGGGTTTTTTGGT  
GGTATTTTTTTTTTTTTATTATAAATAGGAGTAAATTTTTGTAAGGGTAGAGTTGGTAGTTGAGG  
GAGAGGAATTTTTTGGTTTAGTGAAGGTAGTTTGTGGGTTTTGTATTTTTGTTTTATTTTTTT  
GA  
GAGAGAGAGAGAGATTATGTGGTTATTTAAAATTTGAGTGTGGTAAAAGTATGTAATTGGGA  
TTAGTAAGTATTTTTTTTTTAGTGAGATTGGAGTAGAGGGTGGGAAAGGATTTAGAATTTTTG  
AATGTTGGGTTTAGGAATGGGGAGATAAGAGTTATTATAGAATGTTTATTGTTTTTAAATATGTT  
AGTGATGGGTTTTGTGTTTTAGATTTAGGTTTGTATTTTTTTGTGTGTGTGTGTTTGT  
GTTTTGTTTTTTAGGTAGTTGGAGATTAGGTTGGTTTTAATTTTTGTGATGTTTTATTTT  
TTTTGAGGTGTGAGTGGTAGAATGTTTAGTGGGTAATAATATTTGTATAAGTGAAGAGAATT  
AAGTTTTAAATATTGTTTTTTGATTTTTTAGGTATGTTTAGTTTTAATAAATAAATTGAAGAAA

AGGATTTTAAATTATGGTGAAGGTGTTATATTTTTGATTTTTTTAAGGTAGATAGAAGTAGAGGG  
ATTTTTGGGAGTTTAAAGTTAGGTTGGTTTTGTATATTGAGTTGGTTAGTTAGGAATATATATTGA  
GATTTTGTTTTTAAAAAAGTGTGAAGATTGTTTTTTTTGTTTTAGTATTTGGGAGAGAG  
GGAAAGAAATATAGTAGTTAGTTTTGTTTATATAGTGAGTTTTAGGTTAATTAGATTTGATATAG  
TGAGGTTTTGATTTAAATTAATAATTGGTTATAGATAATATTGTAGTTTTGGTTAGTTTGAGTA  
TTTAATTTAATATATTATTTTTGTTAAGTAAATTATGTGAAAGATTTTTATTGAAGGTTGTAAG  
TTTTAAATGATTTTGGTGATGTTTGGTTGATTGTTATTTTTGGAGTAGATTTATAAAGAATA  
TTTTTATTAAGTGTTGTATAAATTTGATATTTGAATGGTTATTTATTTTTGTTAATGATAA  
GAATTATATTAGGGATATATTTGTATTAGTTTAGTGAATAAGTAGAAGGTAGAATAGTTATTTTT  
TTGTTTTATGATTTTTATTAGGGGTTTTAGTTATTTGTTTATTGTTTAAATTTTTATTTTTATT  
AAGTAGTGGTGGTTATTTTTTAATTTAGTATTTTGAGAGATAGAAGTAGGTGGGTTTTTGTA  
GTTTGAGGTTAGTTGGTTATAGATTTAATTTAGGATAGTTGGGGTTATATAGAGAAATTTG  
TTTTAAATAAATAAGTAAATAAATAAGTAAATGATATATTTATATTATTATATTATAA  
ATTATATATGTGTTTTATAGAATATGTTATTATATATATTTTTTTTTGGTTTTTTGAGATAGGGTT  
TTATATAGTATTAGTTTTATATATATAATTTATATGTAATAATTTTTGAAAATGGAATTATTGGA  
ATTTAATTTAAAAGTATTGTTTTTTTTGTTTTAAAGTTTTTTATATTTAAAGTTGTTAGAGG  
AGGGTTAAGAGATGGGTTAGAGGGGTTGGAGAGATAGTTTAGTAGTTAAGAGTTTTGGTTGT  
TTTTTTAGAGGATTAGGTTTAATTTTAGTATTTATATGATAGTTTATAATTATTTGTAATTTAG  
TTTTAGGGGATTTGGTATTTTTTTTTATTTTTTTGTTGTTGTTGTTTTTTGAGATAGGGTTTTT  
TGTGTAGTTTTGGTTGTTTTGGAATTTATTTGTAGATTAGGTTGGTTTTGAATTTAGAAATTTAT  
TTGTTTTGTTGTTAAGTGTTGGGATTAAGGTGTGTGTTATTATGGTGGGTTTTTTATATTA  
AAATTTATGTAGGTAATAATTAATGTATATAAAAATAAAGGAAATTTAAAGAAAGAAGAAAAA  
GAAATAAAATTGGAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTGGTGTAAATAGTGGGTTTGAAGTTTTTGAG  
GGAGGAGGGTAAGATGTTGTGTTTTGTGTTTTTTAGTTGGATGTGGATAGAGGTTAATTAGTT  
ATATTAGTTTATGTTTAAAAGTGTTAATTGAAATAAGAAATGGTTGTTTTAGTTGGGTGTGGTG  
GTATATGTTTTAATTTTAGTATTTAGGAGGTAGAGGTAGGTAGATTTTTGAGTTAAGGTTAGT  
TTGTTTTATAGAGTGAGTTTTAGGATAGTTAGAGTTATATAGAGAAATTTGTTTTGAAAATTA  
ATTAATTAATTAATAAATAAATAAAAAAGGAAATGGTTGGTTAATTATATTATATTGTTTA  
TTAGAATAAAGAGAAAAATTTAAAAAAGAGGTTTAGTTAGGTTGGGTAA  
TGGAGGTAGTAGTGGTTGTGGTGGTTTTGGTAGTAGTGGAGGTTTTGGTGGTAGTGGTGATA  
GATAGTGATAGTGTGGTAGTAGTTGAGGTAGTGGTGGTTGTAGTGGTAGTGATGGTATTGGTG  
GTAGGGTTGGTGTGGTTAGAGGTGGTAGTGGTGGTAGTGGAGGATTGTAGGTTTTAGTGG  
TAATGGTAGTGGGTAGTAGTGGTAGTTATGGTGGTATAGTGGTAGTAATGGTGGTAGTGGTA  
GTTGTGGTGGTTGTAGAGGTAGTGGTAATAATGGTGGTTGGTGGTAGTGTTGATAGTGGTAG  
TATTGGTAGTATTGGTGGTAGTGGAGAAGGGAAGTGGTGGTAATGGTGGTAGGGGTGGTAG  
TAGAGGTAGATAGTGGTGATGATGGTGGTAGTGGTGGTGTGGTATAGTGGTGGTATTGGTGG  
TATGGTATAGTGGTGGTAATGATGGTGTGGTGTAGTGGTAGTAGTGGAGATAGTGGTGGTAGT  
GGAGATAGTAGTAGTATGGTGGTTGTGGTGGTTATGGTGGTAGTGGTGGTATATAGGTTTT  
TAATGTTAGTATATGGGAGGTAGAGGTAGTTGGTTTTTTGTGAGTTGGAAGTTAGTTTGTTTTA  
TAGAGTAAGTTTTAGGATAGTTAGGGTTATATAGAGAAATTTGTTTGAATAATAAATAAATTT  
AAATAAATATTATTAATTTTTGTGTTTTGTTTTTTTTAAAAAATTTAAATTAATAAAGAG

TTATTTAAGTTTAGTTTTTGTAGAATAAAATTTAGGAAGAATTATTTTTATTAATATTTATTGTGG  
TAGAGTTTTTATATGGGAGATGTTATGAGAGGATGGTTTTTTTTTTTTTTGTTTATATATAGAAGTT  
GATTTAAGTTGGGTTAGAGTGTTTTTATTTATTTATTTGTGAGTATAAGGATTGATTGGTAAATT  
TTGAATTTGGGATGTGGAAATAGGAAGATTAGGAGTTTGGGATTAGTTAGAGTAATAGATTGTG  
AGGTTAGTTTTGGGTATGTGAAATTTATTTAAAGAAATGATTAATAATTAATTTGAAATATGAT  
AAATTTTTTTTTTTTATTGTTTAGATGGTTGAGGTATTTGGGATTGTAGTAAGTTTGAAGTTAGTTT  
AGGTTTTATAGTGAGAATTTGTTTTAAAATAAAATAGAAGGTTTTTATTAATTTAAATATTTTTT  
AAATTGGGTATGGTGGTAGATAAGTTTGGTTTATATATTGAGTATAAGTTATTTAAGGTAATAGA  
GAAAAATTTGTTTTAAAATTAAGTATGATTAATTTATTAAGGTAGTTTGAGTTTTAAGTAGGAT  
ATAGGTTTTTTTTTTAGATTTGTGTTAAAAAGTTGTATTTTTGGAGGGAAGATTTTTTTAGGTTTT  
TTAATGTGAAGAGTAAGTAAGAAATGTTGAGTGTGAAAGGAAAGTTGTGTATAAATAGAGATT  
TTGGTAGTAAGGTTTGATTTTTTATGTTTGTAGAAAGAATGGAAGAGGAAATTTAGATTTTTTA  
TTTGATTTGAAATTTTTTATTAGAGATTGTTAGGGTTGGAGGTGTAGTTGTGGTTAAAAGATGA  
ATAAAGTGAAATGAGGTAAGTTTTTTTTTTGGGGGGGGGGATGTTTTTAGATTAGAGGATGTT  
TTTTAAGTTTTTTTTTTTTTTAGTTTGGGTTATTTTATAGTTTTTTTTGTATTATAATGTTTATGGT  
GGATTTTGTAGGTGGGATTAATTGTGAATTTATAGGTTGGTGGGGTGTGGGTGTTGTTTGGG  
TGTTTGGGAGAATAGGGGTGGGTAGGGTAGGAGGTTTGGAGGGGGAGGAGTAGGATTTAT  
TTTTTAAATTTATTGTTTTGAGTTGTTGGTTTTTAGATAGGTTGATTGCGTGTTTTTGTTTTT  
TTTGTGGGAAGGTTGTGGTTATTTTTTTTTGATTTTTTGATAATTTTGTATTAGATATTTAATTTT  
TTTTTTTTATGATTTTTTTTTTTAGATATTGAGTTTTTTGGTTGTTGTTTAAAATTTTTTTAGAAATTT  
TTTTTTTTGTTATTATATTGATATGAGTGTGGGTTTTTTTTGGTTTTTATAGTTTGTTTAGTTTTGA  
GGAAGTATTGAATTTTGGGAATGTTTTATTAATGTTTGTAGTTTTTTATTTTGAGAATTATTTTTG  
TTTATAAGGGTTTGTATTGAGATGTTTTGTATAGAGGTTGGTAAGGAATTTAGTTTTTGAAGAA  
TTTAGTAAATTAGGGTAAGAGTAGAAAAAATGGGTTGAAGGTTATTGTTTTTTATGAATTGTA  
GTAGTTATTAATATAAGTGGGTGTTTTTATTATTTTTTTGGAAATTTTTTTGAGTTTGATTGGTGA  
TATGTTGGTTTTTTAGTTTGAATAGAGATTTGGGATATAGGATGGAGTAATATAAGGTTTTTTGT  
GTGATTTGAGAATTTAAATATTTGGGTTTTTTGGAATATGTTTGGGGTAGTGAGTGGTGT  
TTAGTAGTAGGGAGATTTAATATTTTAGTTTGGAAATGAGTATTTTATTTTTTTGGTGAGGTTATA  
TAGTTAGTTTGAATTTGTTTAAATGGTTGTTTTTTTTAGTAGAAGTAGTTAGTATTTTTTTTTAATT  
TTTGGGAATATGGATGTTATTTAGTAGTTTTGGGTTTGTGAGTTTGTGTTTTTTTTAAATTTTAA  
ATAAGTGTATATAGTTAAGTTATTTATTTTTTATAGTTAGTATTTGGAGTTAAGGTTTGAAGTTTA  
TTGTTTGTATAGAGTTAGTTTAGTATTTAGGTTTGTAAATGGTAGAATTAAGAGGTTGTTAGGTT  
GTGTGTGTTATGGTGTTTAGGTGTGTGTTGTGATGTTTGGGTGTGTGTAGTGATGTTTGGGTG  
TGTGTAGTGATGTTGGGTGTGTGTAGTGGTGTGTTGGGTGTGTGGAGTGTTAGGAAGTGTGTG  
TTTTTTTTTTTTTTGAGTTTTTAAGTTAATGTTTGTATTGTTTTGATTTTTTTGATTTATGGGTTAATTT  
TTGATTTTTTTTTTTGTTTGTTTTTTTTTGTTTTTTGAGATAGGGTTTTTTGTGTAGTTTTGGTTG  
TTTTGGAATTTATTTGTAGATTAGGTTGGTTTTAAATTTAGAAATTTGTTTGTTTTTGTTTTGTT  
TTTTTAAATTTTTGATTTTGGAGGTGGGAAAAGTGTGGGTTAGGAATGAATGGGTGGGGATA  
GTTTTTGTAAAGTGTGTGTTTTTGTAGATATGTGTGTAGAGTATGTGTGTTTGTAGTGTGTGT  
TTTTAGTGTTAGTAGATGGTATAATTTTTTATTAGAAAGTTGTTTTTAGGGTTGTTATTTATTTG  
TTAGATTGTAGGTTAATTTTAGTATTGTTATTAGTGTGGAGTATAGATGTTTTTAGTGTAGGAGG

TGTTTTTATTTGTTGTTGGATTTAGGAAATGTTGGGGTAAAGTTTGGTGGAGGAGTATTTGTTT  
TTTGTGAAGTTTTGGAAAAAATAAAAAAGTTAATTGAAGAGTTAGAGGGTTAAGGATAAGA  
GAAATGAATTTGGTTAATTGAAATTTTATTTAGTAATTAATAATTAATTGGATTTTTGATTGGT  
TGTTTTGTATTAGTAGAAAAGATGGTGGGATATTTTTATTTATTTATTTTTTAAAGATTTATTTA  
TTATATGTAAGTATATTGTAGTTGTTTTAGATATTTAGAAAGAGGGTGTAGATTTTGTATAGA  
TGGTTGTGAGTTATTATATGGTTGTTGGGATTTGAATTTTAGATTTTTGGAAGAGTAGTTGGGT  
GTTTTATTTATTGAGTTGTTGGATGTTTTATTTATTGAGTTATTTATTAGTTTTAGTGGGATT  
ATTTAAAATATATTTTTAAAAAAAATTGGGGGTGGGGGGTGTAAATTTAGGATTGTGTATT  
TTAATAATAAGTGATTTAATTTTGGAAATTTTTTAGATAATTTAGTATAATGGATTTTGTAT  
GATATTTTTGTTTATAAATATTAGTTATTTTTAAATGTTAATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
GTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATATGTATGTATGTATAGATATAGTTGATTTAGTGGT  
AGTAGAGTATGAAAGGTTTTAATAGGATTTTATTTATTTAGTATTATGTAAAAATTTAGGTGAGA  
TAAAAGTTTTTTAAATTTGAGTTTTTGGATAAATTTTTATTTAGAAGGTAGAGAGGTAGGATTTA  
GAGAGTAGGTTAGTTTTGGTTATTTGAGATTTTTTTTTTAGAAAGAAAAGAAAATTATAAATAT  
AGATTAGATTTTTGTTGTTAAGTTTTGTGTTGTTTTGTTGTTTGTTTTTATTTGTTGAGATG  
GGTTGATTTAAATTTTTTATTTAGTTATTGGAGTAGGGGGTTTTAGATTTGTGTTATTTATT  
GTTAGGATTAGAGGTTTATAGTGTAGATGTGGTTATGGTTTTAATGAAGAGGGAGTAGGGAGA  
AGGGATTGGAAGAGTAGATTATAAATTTAAATTTGTTTTATTTGTTATTGAATTGAGTATTGT  
TTGGTTAGTTGTTTTTTTTTTTTTAAATAGGATTTTAGGGTTAATTGTATAATTTAAATAATT  
AATGAAATTTAAAATATTGTATGTAGGGTTGGTGTAGATGGTTAATAGGTAAAAGTATTGATTG  
TTTTTTTTAAAGTTTTGAGTTTAAATTTAGTAATTATATGGTGGTTTATAATTATTTGTAATGAGA  
TTTGATGTTTTTTTTGGTGTGTTTGAAGATAGTTATAGTGTATTTATATAATAATAATAAAT  
ATTTAGTAGAGATATTTTTTTTTTTTTTAAATTAATTAATTTTATGTGGTTGTTGGGAATTGAATTT  
AGGATTTTTGGAAGAGTAGTTTGTATTTTTAATTTAATTGTTGAGTTATTTTTTAGTTTTTAA  
GTAGAAATATTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATTATAAAAGGGAGATTTATGAAA  
ATGGTGTATTTAGGGGTGATAAAGTATTTAAGAATATTTTTAAAATTTAGTTTTTTTTGTTA  
TTTAGATTTATGAAGATAATTGTTTTGAAAGTAAATATAGTTGGGTGTTAATTTTAGTATTTGG  
GAGGTAGAGGTAGGTGTATTTTTGAGTTTGAGGTTAGTTTGGTTTATAAAGTGAGTTTTAGGAT  
AGTTAGGGTTATATAGAGAAATTTGTTTTGAAAAATTAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGTAAGTAAATATATTTAA  
TGTAATATTTAATTATTTGGGAAAATGATTTATTTGTTTGGTTGGTTTTGTTTTGTTTTTTGGT  
TAGGGTTTTTTGTGTAGTTTTGGTTATTTTGAATTTATTTTGTAAAATTGATTGGTTTTTTTAA  
AATTTATTTATTATATGTAAGTATATTGTAGTTGTTTTAGATATATTAGAAGAGGGTATTAGATT  
TTATTATGGATGGTTGTGAGTTATTATGTGGTTGTTGGGATTTGAATTTAGGATTTTTGGAAGA  
GTAGTTAGTGTTTTTAATTGTTGAGTTATAATTTTTATTTATTTTGTGAATTGATTGGATTTAAT  
TTATAATTTGTTTGTGTTGAGTGTAAAAGTGTGGGATTAAGGTATGTATTATTATGTTAGGTT  
GAGAATGTTTTATTTAATAAGTTATTTATTTATTTTAAATAGTTTTTTTTGTTTTTTTTTGA  
GATTTGTTTTTTAAGGTAGTTTTGATTTTTTATTAGTTTTAAATAAAAGTTTTTAAGTTTTGAGG  
TTGATAAGGGTTTTGAGGAGGAGGAGAATAAGGTTTTTGTAGGAAGTAGAAGATGTGGATTG  
TGTTTTTTAGGTTTAGTTGTGTGTATTTAAGGATAGGTTTTAGAAGTAGAAGTATTTTAGTTTT  
AGTAGATGTAAGAATTTTTTTTTATTTTGAATTTGAGTTATAAGTAGGTGGGGTTTTTAGAAGTT

GTTGTAATGTAATATAATGAGATTGATTTGTTAATGAATTGAATTAATGTTTGGATGTTTTTTTAA  
TTATTTATTTTTTATTTTATGTGTTTGTAAAATTATAATTATGTGATTGATTGATTGATTGATT  
ATGTATAAGTATATTATAGTTGTTTTAGATATATTAGAAGAGGGTATTAGATTTTATTATGGATG  
GTTGTGAGTTATTATGTGGTTGTTGGGATTTGAATTTAGGATTTTTGGAAGAGTAGTTAGTGTT  
TTAATTGTTGAGTTATTTTTTTAGTTTTAATTATGTGATTTATATATTTTTTTAGTTTGTTTTATTG  
GTTATTTATTTTTATTTTATTTTTTATATTTATTTTTAAATTAGGGTTTTATTGTAGTTTTGATTG  
GTTTTGTAGATTAGGTTGGGAGAGGTTTATTTGTTTTGTTTTTGGGTGTTGGAATAAAGGT  
GTGTTTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGATTGTTATTTTTAAATTTTTTTAGTTTATTGG  
TGTTTTGTTTGTATGTGTTTGTGTTTGTGAGAGTATTAGATTTTTTGGATTAGAGTTATAGATAGT  
TGTGAGTTGTTATGTGGTTGTTGAGAATTGAATTTAGGTTTTTGGAAAGAGTAGTTAGTGTTTTT  
AATAGAAGAGTTATTTTTTTAGTATTTGTTTTTTAAGAAAGAGTTTTATTTTATAGGTTTGGT  
TGTTATGTTAAGGTTGGGTTGTAGATTTGTTTGTATTTTGTATGTTTTAGTTTGTGGAATGTTT  
TGTTATTTTGTAGGTTAAGATTTGGTTTTAAATTAAGGATGAAGTGTAAGTGGTGGTAGAAA  
AATTAGTGGTTGAAGATTAGTAATGGTTTGATTTAGGTAATAAGATGTTTTTTTTGTTTTTTTTT  
TTTTTTTTATTTTATTATTTTATTTTATGTGTTTGTGTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
GGTTGATTTATGGTTGTTGGGTATGGATTTTAGATTTTTTGTAAAGAGTAGTTAGTGGTTTTGTTT  
TTGTTTTTATGTTATTTTGAATTTATTTATGTTTATTAGTTTTGTTTTTTTTTATTTTTTTTTTTT  
ATGATTTTTTTTTGTGATTTTTGGTTTTTGGAGTAGTTTTTTTTATGTAGTTTTGGTAGTTAG  
AGATTTGTTTGTAGTTTATAGGAGTGTGGGGTTAATGGTTTGTGTTGTTATGTTAATTTTTTT  
AGTATTTTTGTAGTTTATTTTTAGAGTTTTTTTTTTATTTATTGTATTAATTATTTTTTTTAGAAG  
GGTTTAGTATTAGTGGAGTATTTAGTATTTATTGTAGTTATTTTTAGGGTTATTTGGTGAATGT  
ATTTGGAAGTTTTTTATGTGGGGTAGTTAGATTTGGATTAATTTAATTTGGAGTAGTTAGATTT  
GGATTAATTTAATTTGGAATAATTAGATTTGGATTAATTTAATTTGGAGTAGTTAGGTTTGGATT  
GTTTAGTTTTGGAATGGTTAGTTTTGGAATGTTGTTTTGTTTTATAATTTGGGGAGGATTTTTT  
GTAGTTTTATGTATAGTTGTAGTAAAATTTTTTGTAGTGATTTGGAGGTGAATTTGGAAGTTA  
TTAGGGAAAGTTATGTGTATTTTAGTATTTATAAGTTTTGGAATTTTTTGAATTTTTTGTGA  
TTTTATTAGGTGAAATATGAGATTTATGTAATATTTGGGTTTAAAGTTAGGGTAAAGTTAGGTTT  
TTTTTTTTTTTTAAATATTTTTATTTTTTTTTAAAGATTTATTTATTTATTATATGTAAGTATATTGT  
AGTTGTTTTTAGATATTTTAGAAGAGGGTGTAGATTTTGTATGTATGGTTGTGAGTTATTATG  
TGGTTGTTGGGATTTGAATTTTTGATTTTTGGAAGAGTAGTTGGGTGTTTTTATTTATTGAGTTA  
TTTTATTAGTTTTTGGTTATTTTTTTAATTATTATTTGTTTTTGTATTATAAGATAGGGTTTTTTT  
GTATAGTTTTAATTGTTTTTGAATTAGTTTTGTAGATTAGTTTGGTTTTGAATTTAGAGATTTGTT  
TATTTATTTTTGTTTTTGAATGTTGGGATTAAGGTTGGTATATTATTATATTTGGTATATATATT  
GTTATTTTTATTTTTATTTTTATTGGTGTAGAGTAAATTTAGGATTTAGAATATGTTGGGTATT  
AATTTAATTTTTGAGTTTTATTTATAATTTGGTGTGTTAGTGATTTGTTTTAGTTTTGAATTTGTT  
TTTTTTTTTAGTGTTAATTTTAGGTTTTGGAGATAGTGAGGTGTATATATTTTTTTTTTTTTAAGAA  
TAAGTGTTTGAATATTTTTATTTATGTTTATTTATTTATGTTAGTTTTTTTTTTTAGAAGTGTGGGT  
TTTGGTATATATTGTGTTATTTGAGGGGTGAGGTTTTAAAGTATATATAAAGTATAATGATATG  
GTGGTTATTTTTGAGGATGAGATAGAAGGATTAGGAGTTTGGGGTAGTTTAGATATGTAATAA  
GTTAAGGTTAATTTGTATTATGTTTAAATAGTAAGATAGTATTTTGATAAAATAATAAAATTA  
GTTTAATAAAATAAAAGTTTTTATTTATTAAGGTGTTTGTGTTTTTGGAGTTTTTTAAGAGTA

ATTGTTATGTTAATATTTGTAGAAAGATGTTTATATTTGATTGTATTATGATGAATTGATGTTAGT  
TGGATTAGTTTAAATAAAAATAAATATTAATTTTATTTTTAGTGGTTTTATTTTTGTTTAGTGGG  
GTTAATATATTTTTTATTTGGTATGTGAAGGGGAGGGTTTTAATTGAGGGTTTAGGAAAATGG  
GTTTTTTTTGGTTAATTGGTTGGGAGGGTTATATTATAATAGTTGGAATGGTTTGGTAATTAGA  
GTAGGAGGTTAGTTATTTATAATGTATTTAGTTAAGAATTGGAGAGTAATGAATAAGAAATGAAT  
GTTTTAGTGTGGGTATGGGTTTTGAGGAGGTTAGAAGTATTTGATGATTTTTGGAGATGAAGT  
TATGTGAAGTTATTTGATTATTTGATGTGGTAGGTTGTAGGGAAATAAGTTTTAGTTTTTTGGAA  
GAATAAATATTTAATTGGG

### 8.2.3. Sox-2

GAGTTTGTGAGTGTAGTTTAAATGTTATTTTTGTGTTTTGTGGTGGGATGTTAGGAAGTTGTGT  
GATTTTTTTTTTATTTTTGTATTTGGGAGTTTTTTTTGTTGATGTTTTGTTTTAAGTTTTTT  
TTGAAATTGTTATTATTAATAAATTTTTGTGTTAGGGTTGGGAGTTAGAAAGAGTGGGAGTAG  
AGTTTTAGTTTTGTTTTGTATTTTTGGATGGGGTAGGTTGGTGGAGTAGGGAATTAGGGGT  
GAGGATATGTGTTGTGGTTTTTTGAGTTATATTTGAGTTGTTTTAGGAAAAGTTGGGAATAAG  
GTTTGGTTTTAGTTTTGTTTTATAGTTAGTTATATGGGTAGAGGATTTGTGTTGGGAATTGAGT  
TGATGATATGGAAGTTAGGAGGGTGTGAGGTTTGGGTTTAATTTTTGTTTGTATG  
GTGAGAAGAGGGGGTGTGAGTGGGTGTTGGTGATAAGTTGGAAGAGGGGTGTGATAGAGTG  
TAGTGTGTTGGATGAGTGTAGAAATAATGGTATATTTTTGGTTTTGTTAGTTTTTTGAATA  
TTAGTTGGATAGTTGTTTTGAATTATTTATGGGTTTTGTTTTATTTGGTTTTAGTTTTTTGTGTT  
TTATTTATTTTTATGTATTTAAGAGAGAGTTAATATTTTGTAGTATGGGGGAAAGGAGTTGTTGT  
TTTGGTGTGTTTATTTATTTTTTTGAATAGGTGTGTGTTGTGATTTGTTGTTGAAAATGGGGG  
GTGGGGGGGGGGATATAAAGTTTTTTAGTGGTTGGTTGTGGGTTTTTTTTTTGTGTGGT  
TTGGGGTATAGTGTGTTTTGTTGGTTTTGTTTGGTGGTGTGGTAGGTTTTTTTTTTTTATGTAA  
AATTTTTGGTGAGTTGGGTTTGGGTGTAGGAGTTGGTGTGTTGTTGATTGGTTGTTGGAAATT  
TATTTATTTTTGATAGTTTTTATTATATGGATGGTTGTTTATTAATTTGTTTAAAAAGTATTAGG  
AGTTGTTAAGGTAGAGAAGAGAGTGTTTTGTA AAAAGGAAAAGTATTTGTTGTTTTTTAAGA  
TTAGGGTTGGGAGAAAGAAGAGGAGAGAGAAAGAAGGAGAGAAGTTGGAGTTTGGGTTT  
AAGTTTTTTAAAAATTAATTATAATAATTGTGGTGGTTTGGGAGGAGAGTGTGTTTTTTTTAT  
TTAATTGTATTTTGTGTTTTGAGTTTTGTTTTTTTTAATTATTTTTGTTAGATTTTTGTGTA  
GGGTTGTGTATGTTGAGGTTTTGTTTGTGGTTTTGTATTTGGTTTTGAGTGTGGTTTTAT  
AGTTTTGGTTGGGTTGAGGGTTGGTGGTTGTTGGTGGGTTGTGTTGTTTAGTGTGTTGTATGTA  
TAATATGATGGAGATGGAGTTGAAGTTGTTGGGTTTGTAGTAAGTTTTGGGGGTGGTGGTGG  
AGGAGGTAATGTTATGGTGGTGGTATTGGTGGTAATTAGAAGAATAGTTTGGATTGTGTTAA  
GAGGTTTATGAATGTTTTATGGTATGGTTTTGGGGTAGTGGTGTAAAGATGGTTTAGGAGAA  
TTTTAAGATGTATAATTTGGAGATTAGTAAGTGTGTTGGGTGTGGAGTGGAATTTTTGTTTGA  
TTGAGAAGTGGTTGTTTATTGATGAGGTTAAGTGGTTGTGTGTTTTGTATATGAAGGAGTATTT  
GGATTATAAATATTGGTTGTGGTGGAAAATTAAGATGTTTATGAAGAAGGATAAGTATATGTTTT  
TTGGAGGTTTGTGTTTTTGGTGGGAATAGTATGGTGTGAGTGGGGTTGGGGTGGGTGTTGGT



TTGGGTGTGGGTGTGAATTAGTGTATGGATAGTTATGTGTATATGAATGGTTGGAGTAATGGT  
AGTTATAGTATGATGTAGGAGTAGTTGGGTTATTTGTAGTATTTGGGTTTTAATGTTTATGGTGT  
GGTATAGATGTAATTGATGTATTGTTATGATGTTAGTGTTTTGTAGTATAATTTTATGATTAGTTT  
GTAGATTTATATGAATGGTTTGTTTATTTATAGTATGTTTTATTTGTAGTAGGGTATTTTTGGTAT  
GGTGTGGGTTTTATGGGTTTTGTGGTTAAGTTTGAGGTTAGTTTTAGTTTTTTTTGTGGTTATTT  
TTTTTTTTTATTTAGGGTGTTTTGTAGGTTGGGGATTTTTGGGATATGATTAGTATGATTTTTT  
TTGGTGTGAGGTGTTGGAGTTTGTGTGTTTAGTAGATTGTATATGGTTTAGTATTATTAGAGT  
GTTTTGGTGTGTTGGTATGGTTATTAATGGTATATTGTTTTTGTGTATATGTGAGGGTTGGATT  
GTGAATTGGAGAAGGGGAGAGATTTTTAAAGAGATATAAGGGAATTGGGAGGGGTGTAAAAA  
GAGGAGAGTAGGAAAAATTTGATAATGTTTAAAAGGAAAAAAAATTTTTGTAGTGAAATGATAG  
TTGTGGAAAAAATTATTAATTTTATTTAAATTAATGTAAAAATTGTGATGTTGATTAGAAAATTT  
TTATGAGAGATTTTGGGATTTTTTTTTGGGGGATTATTTTTGTATAGAGAAAATTTGAGGGTGGT  
GGGGAGGGTGGGGGAATTGGATTATGTATAGATTTGGAGGAAAAAATTATGTAAAATTTTTTT  
TTAAAGTTTTAGTGGTATGTTAGGTGTTTTGTAGGGAGTTTGTAAAAGTTTTTATTAGTAATATT  
TAGAGTTAGATTTTGGGTGATGAAAAAAAAGTTTTAATATTTGTAAGTAATTTTTGTATAGTATTT  
ATTGAGATAAATATGGTAATTAATGTTTATTGTTTATAAGTTGAGAATTTGTTAATTTTTTTGA  
GGAAAGGGTTTTTGTGGGTTTTGATTTTGTAGTTTAAATTTAGGATTGTTATAAATAAGGAAGG  
AGTTTATTTGGATTTGAATATTTAGTTTTAAAATTGTATAAAAGGAAAATATGAGAGTAAGTATT  
GGTAAGATTGTTTTGTGGTTTTGTTAAGGTAAATGTTTATAGATTGATTAAATTTTTAATTTAT  
TGTTAAAGGTAAAAAAAATGTTTATGTAGGTTGATATTGTTGGTAATTTATAATAGTTTTTTGTT  
TAATTTTATTTTTTATTTTGTATATAAAAAATATGGAATTATTGTGTTTGAATATTTTTTTATG  
GTTTGTAAATTTTTTGTAAATTGTGATATTTAAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGTTGTA  
TTTTAAAAGATTTGGTTTTGTTATTGGAATTAGGTTGTTGAGAATTTATGTATATATTTGAATTAA  
TATTATTTTATAATAGTTATATTTTTAATTTAAGTTTTTATTTTATTATGTATAGTTTGGAGATAAAT  
AAATTTTTGAAATATGGATATTGAAATTATGTTTGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGGTTAGTATGTTT  
ATATATAATTTTTTGGGGAATTGGATAATTGTTTAGTTATTAAGATTTTGTATGTTATTAGTAATGT  
TTGTTAGTTTTAATTGTAGAAGAAAAAATGGTTGAATGATTAATAATGGGGAATTGAAATGTGT  
TGATATTTTTAGAATAGAAATTAGAAGTATATATTGTAAGTTTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGTAGTG  
TGAATAAGTGTGATGTGGGTTTAAAGTTTGTTTTAGTATTTGTTGTTAGAATGAGTTAATTTTGAA  
AATTTTTGTGTAGTTTGTAGATGAGATATTGTGTTAAATTAGAATTAGGTTGGTTGGGTTGGTT  
TTATTTTTTTTTATAATATAATGGTTTTTTGAAATGTGGTTTATAGGGGAAAATGATGTTTTTTGT  
ATTGGAATAATTATAAAGTAGATGTGTTGAGTGTGTTGTTGGGGTAGGTTGGTTGGGTGATTTTTA  
GTTTTGTTTGTATTGTGTGAGGAAATAAGTGGTTTTTTGT

### 8.3. Sequenzierungsergebnis Oct-4, Nanog und Sox-2 forward und reverse

#### 8.3.1. Oct-4 Abschnitt 1

D3 Oct4-1 reverse (Kontrolle)

**CTCCTCAAAAACAAAACCTCAAATA**AAAATACCCTACTTCCCTTCTCCAAAACTCCAATATTC  
ATCCTCATCACCCACCCCTCCCCATTCTATACTAA**CG**AAAAAACACTAAAAAA**CG**AAATTA  
AAAAAAAAAATACAAAAACCTACCCTAACTTCCCTAAAATAA**TTTTCTAAACCCAATCTAAA**  
**AATCCC**

BLC6 Oct4-1 reverse (Kontrolle)

**CTCCTCAAAAACAAAACCTCAAATA**AAAATACCCTACTTCCCTTCTCCAAAACTCCAATATTC  
ATCCTCATCACCCACCCCTCCCCATTCTATACTGACAAAAAACACTAAAAAACAAAATTA  
AAAAAAAAAATACAAAAACCTACCCTAACTTCCCTAAAATAA**TTTTCTAAACCCAATCTAAA**  
**AATCCC**

iPS Oct4-1 reverse (Kontrolle)

**CTCCTCAAAAACAAAACCTCAAATA**AAAATACCCTACTTCCCTTCTCCAAAACTCCAATATTC  
ATCCTCATCACCCACCCCTCCCCATTCTATACTAACAGAAAAACACTAAAAAACAAAATTA  
AAAAAAAAAATACAAAAACCTACCCTAACTTCCCTAAAATAA**TTTTCTAAACCCAATCTAAA**  
**AATCCC**

#### 8.3.2. Oct-4 Abschnitt 2

D3 Oct4-2 reverse

**AAAATTAATTCCACCTTCTCCA**ACT  
TCACAACATTAAAACAATCAACACAAAACCTCAAAAAAATTCCCTCTAAATTACTTTCCAACTCAT  
ACTCCTACCTAACCCCTCAAACCTACAAAATCTCCACACCAACTTAAAAACCTAAACCCAATCCAA  
CCTAAAATCCACAATATACCATCCCTCCACAAAACCTCATATACAAACAA  
**ACATAAAAAAATCCCAATACCTCT**

BLC6 Oct4-2 reverse

**AAAATTAATTCCACCTTCTCCA**ACT  
TCACAACATTAAAACAATCAACACAAAACCTCAAAAAAGGTTCCCTCTAAATTACTTTCCAACTCAT  
ACTCCTACCTAACCCCTCAAACCTACAAAATCTCCACACCAACTTAAAAACCTAAACCCAATCCAA  
CCTAAAATCCACAATATACCATCCCTCCACAAAACCTCATATACAAACAA  
**ACATAAAAAAATCCCAATACCTCT**

iPS Oct4-2 reverse

AAAATTAATTCCACCTTCTCCAAC

TCACAACATTAACAGTCAACACAAAACCTCAAAAAAGATTCTTCTAAATTACTTTCCAACAT  
ACTCTACCTAACCTCAAACCTACAAAATCTCCACACCAACTTAAAAACTAAACCCAATCCAA  
CCTAAATCCACAATATACCATCCCTCCACAAAACCTCGTATACAAACAA

ACATAAAAAAATCCCAATACCTCT

### 8.3.3. Nanog

D3 Nanog forward:

ATGAATAAAGTGAAATGAGGTAAAG

TTTTTTTTTGGGGGGGGGGATGTTTTTAGATTAGAGGATGTTTTTAAGTTTTTTTTTTTTTCA  
GTTTGGGTATTTTATAGTTTTTTTTGTATTACAATGTTTATGGTGGATTTTGTAGGTGGGATTA  
ATTGTGAATTTATAGGGTTGGTGGGGTGTGGGTGTTGTTGGGTGTTTGGGAGAATAGGGGG  
TGGGTAGGGTAGGAGGTTTGAGGGGG

-STOPP-

### 8.3.4. Sox-2

D3 Sox-2 forward

GTATTTAAGAGAGAGTTAATATT

TTGTAGTATGGGGGAAAGGAGTTGTTGTTTTGGTGTGTTATTTATTTTTTTGAATAGGTGTG  
TGTGTGATTTGTTGTTGAAAATGGGGGGTGGGGGGGGGATATAAAGGTTTTTTAGTGGTTG  
GTTGTGGGTTTGTTTTTTTGTGTGTTTGGGTATAGTGTGTTTGTGGCTTGGTTTGGTGGT  
GTGGTAGGTTTTGTTTTTT

-STOPP-

BLC6 Sox-2 reverse

TAAACAAATTAATAAACAACCATCCATATAATAAAAACTATCAAAAAATAAATAAATTTCCAACAA  
CCAATCAACAAACACCAACTCCTACACCAAACCCAACCTCACCAAAAAATTTTACATAAAAA  
AAACAAAACCTGCCACACCACCAAACCAAACCAAACAAACACTATACCCCAAACCACATAAA  
AAAAACAAGCCCACAACCGACCACTAAAAACCTTTGTATCCCCCCCCCACCCTTTTC  
ACAACAAATCACAACACACACCTGTTCAAAAAATAAATAAACAACACCAAACAACAACCTC  
CTTCCCCCATACTACGAAATATTAACCTCTCTCTTAAATAC

iPS Sox-2 reverse

misslungen

## 8.4. Sequenzierungsergebnis Zusammenfassung

### 8.4.1. Methylierte CG- Sequenzen Oct-4-1

	Oct4-1			
p	52	71	103	116
D3	+	+	-	-
BLC6	-	-	-	-
iPS	-	-	-	-

Tab. 10: Dargestellt ist der Genabschnitt (p) und die zugehörige Stelle im Genabschnitt (52, 71, 103 und 106), welcher ein methyliertes C (vor jedem G) im Originalabschnitt zeigt im Vergleich zu den Zelllinien und dem ebenfalls vorhanden (+) oder nicht vorhandenen (-) CG- Abschnitt nach Bisulfitsequenzierung und Methylierung des Genabschnitts Oct-4-1.

### 8.4.2. Methylierte CG- Sequenzen Oct-4-2

	Oct-4-2								
p	2	6	12	21	78	115	159	163	174
D3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BLC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
iPS	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tab. 11: Dargestellt ist der Genabschnitt (p) und die zugehörige Stelle im Genabschnitt (2,6,12,21,78,115,159,163 und 174), welcher ein methyliertes C (vor jedem G) in Originalabschnitt zeigt im Vergleich zu den Zelllinien und dem ebenfalls vorhanden (+) oder nicht vorhandenen (-) CG- Abschnitt nach Bisulfitsequenzierung und Methylierung des Genabschnitts Oct-4-2.

### 8.4.3. Methylierte CG- Sequenzen Sox-2

	Sox-2	
p	2	128
D3	-	-
BLC6	+	+

Tab. 12: Dargestellt ist der Genabschnitt (p) und die zugehörige Stelle im Genanschnitt (2 und 128), welcher ein methyliertes C (vor jedem G) in Originalabschnitt zeigt im Vergleich zu den Zelllinien und dem ebenfalls vorhanden (+) oder nicht vorhandenen (-) CG-Abschnitt nach Bisulfitsequenzierung und Methylierung des Genabschnitts von Sox-2.

## 9. Danksagungen

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Rohwedel und seinem Team in der AG Regenerative Medizin, vor allem Alexandra Tiedtke und Heiko Steenbock, sowie der Abteilung Virologie und Zellbiologie der Universität zu Lübeck danken. Vielen Dank für eure ewige Geduld, euer Verständnis, eure Schaffenskraft, eure Leidenschaft und euren steten Humor! Es war mir eine Freude mit euch zu wirken.

Mein Dank gilt natürlich auch dem Institutsleiter, Prof. Dr. rer. nat. N. Tautz, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten.

Mein innigster Dank geht an meine Familie und Freunde, welche mich auf diesem langen Weg begleitet haben- was ewig wehrt wird endlich gut! Danke für euer offenes Ohr, insbesondere in Zeiten der Verzweiflung! Danke, dass ihr mit mir nie aufgegeben habt!

Danke an meinen Liebling, der, während ich diese letzten Zeilen schreibe, geduldig wieder einmal mit unserem Sohn und der Fellnase am Wasser spaziert, um mir eine ruhige Umgebung zu schaffen. Ohne dich wäre ich immer noch nicht fertig.

## 10. Lebenslauf



Annalice Gode, geb. 14.02.1990

### Hochschulstudium

05/2015	2. Ärztliche Prüfung, Mündlich-Praktischer Teil, Universität zu Lübeck, Deutschland (Note "sehr gut")
12/2014 – 04/2015	Praktisches Jahr, Wahltertial Plastische Chirurgie, Universität zu Lübeck, Deutschland
11/2014 – 12/2014	Praktisches Jahr, Chirurgie Tertial, BG Unfallkrankenhaus Hamburg, Deutschland
09/2014 – 11/2014	Praktisches Jahr, Chirurgie Tertial, GZF Fricktal in Laufenburg, Schweiz
05/2014 – 09/2014	Praktisches Jahr, Innere-Tertial, Universität zu Lübeck, Deutschland
10/2010 – 04/2014	Klinisches Studium, Universität zu Lübeck, Deutschland
09/2010	1. Ärztliche Prüfung, Universität zu Lübeck, Deutschland
10/2008 – 09/2008	Vorklinisches Studium, Universität zu Lübeck, Deutschland

### Berufliche Erfahrung & Weiterbildung

03/2018 – 11/2018	Intensivrotation, UKSH Lübeck, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin (Prof. Nau)
07/2017	QMB und maßgebliche Beteiligung zur Zertifizierung zum Endoprothesenzentrum der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, UKSH Lübeck, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie (Prof. Jürgens, Prof. Paech)
07/2017	Teilnahme am AMG Kurs für klinische Studien und Start der Betreuung klinischer Studien als Prüffärztin
07/2015 – dato	Assistenzärztin in Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie, UKSH Lübeck, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie (Prof. Jürgens, Prof. Paech)
02/2012 – dato	Dissertation in der AG Regenerative Medizin (Prof. Rohwedel) Institut für Virologie und Zellbiologie, Universität zu Lübeck, Deutschland
04/2011 – 06/2014	Study Assistant der KLB Gesundheitsforschung Lübeck GmbH, Deutschland Betreuung von über 50 klinischen Studien (Phase I – Phase IV)