

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fakultät Life Science

**Etablierung einer Methode zur Reprogrammierung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit nicht Integrierendem Sendaivirus**

**Bachelorarbeit**

im Studiengang Biotechnologie

zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science

Vorgelegt von

Jorna Boswinkel

Matrikelnummer: 1960185

Hamburg

27 September 2013

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Peter Andrä

Gutachter: Dr. rer. nat. Sandra Laufer

Die Bachelor-Thesis wurde betreut und erstellt im Labor der HEXT Facility Stem Cells in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

## Vorwort

Im Jahr 2006 gelang es Wissenschaftlern erstmals, durch Überexpression bzw. Unterdrückung einzelner Transkriptionsfaktoren somatische Zellen zu pluripotenten Zellen zu dedifferenzieren. Die Stammzell Core Unit dedifferenziert somatische Zellen (Fibroblasten) mit einem kombinierten Protokoll aus integrierendem Retrovirus und Lentivirus und unterstützt Wissenschaftler, die mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) arbeiten. In Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, mit der Arbeitsgruppe von Dr. Arne Hansen, soll die Dedifferenzierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit dem nicht integrierenden Sendai-Virus durchgeführt werden. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob diese Methode der Dedifferenzierung praktikabler ist. Bei der Dedifferenzierung von Fibroblasten muss dem Probanden eine Hautbiopsie entnommen und davon eine Primär-Kultur angelegt werden. Des Weiteren ist es nötig, die erhaltenen Zellen zwei Mal zu transduzieren, was sich negativ auf die Zellen auswirken kann. Die Verwendung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes hingegen stellt eine minimal invasive Methode der Probenentnahme dar. Die erhaltenen Zellen können relativ schnell nach der Entnahme transduziert werden und eine Transduktion ist ausreichend. Diese Methode wird erprobt und für die Bedürfnisse der Stammzell Core Unit optimiert, da das Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie in Kooperation mit dem Universitären Herzzentrum Hamburg eine Patientenstudie (Hamburg City Health Studie) mit 50 000 Personen plant.

Ich möchte mich recht herzlich bei Frau Dr. Sandra Laufer für die Möglichkeit bedanken, die Bachelorarbeit bei der Stammzell Core Unit durchzuführen und so die Möglichkeit erhalten zu haben, mit induzierten pluripotenten Stammzellen arbeiten zu können. Des Weiteren bedanke ich mich für die Unterstützung, die ich während der Bachelorarbeit von Frau Dr. Sandra Laufer und Dr. Michaela Mieke erhalten habe. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Manuela Kolster aus der Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, die mich bei den Versuchen zur CD3-Aktivierung tatkräftig unterstützt hat.

Prof. Dr. André danke ich für die Bereitschaft, sich als erster Gutachter zur Verfügung zu stellen.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	5
1.1	Stammzellen .....	5
1.2	Grundlegende Vorgänge bei der Reprogrammierung induzierter pluripotenter Stammzellen .....	7
1.2.1	Extrinsische Pluripotenzfaktoren .....	12
1.2.2	Verschiedene Möglichkeiten der Faktorkombination .....	13
1.3	Die Entscheidung für den richtigen Zelltypen .....	14
1.3.1	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes .....	15
1.3.1.1	T-Lymphozyten .....	15
1.4	Die verschiedenen Reprogrammierungsmethoden .....	17
1.4.1	Integrative Delivery-Systeme .....	17
1.4.2	Nicht-integrative Delivery-Systeme .....	17
1.4.2.1	Transient episodale Delivery-Systeme .....	18
1.4.2.2	RNA Delivery-System .....	18
1.4.2.3	Protein Delivery-System .....	18
1.4.2.4	Integrationsfreie virale Delivery-Systeme .....	19
1.5	Sendai-Virus .....	19
1.5.1	Verwendung .....	20
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit .....	21
2	Material und Methoden .....	23
2.1	Material .....	23
2.1.1	Verbrauchsmaterial .....	23
2.1.2	Verwendete Chemikalien .....	24
2.1.3	Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe und molekularbiologische Kits .....	25
2.1.4	Geräte .....	26
2.1.5	Verwendete Zellen .....	28
2.1.6	Medien und Medienzusätze .....	28
2.1.7	Medienbezeichnung und ihre Zusammensetzung .....	29
2.2	Methoden .....	31
2.2.1	Zellkulturtechniken .....	31
2.2.1.1	Herstellung des konditionierten Mediums .....	31
2.2.1.2	Beschichten der Kultivierungsgefäße .....	32
2.2.1.3	Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer .....	32
2.2.1.4	Zellzählung mittels CASY Cell Counter .....	33
2.2.1.5	Kultivierung humaner Zellen .....	33
2.2.1.6	Passagieren der induzierten pluripotenten Stammzellen .....	34
2.2.1.7	Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut .....	34
2.2.1.8	Einfrieren der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut .....	35
2.2.1.9	Einfrieren der induzierten pluripotenten Stammzellen .....	35
2.2.1.10	Auftauen der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut .....	36

2.2.1.11	Auftauen der induzierten pluripotenten Stammzellen .....	36
2.2.2	Durchflusszytometrie .....	37
2.2.3	Transduktion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit Sendai-Virus 39	
2.2.4	Isolierung der iPS-Klone aus den Generationsplatten.....	42
2.2.5	Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung.....	42
2.2.5.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese .....	43
2.2.5.2	PCR zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung.....	43
2.2.6	Alkalische Phosphatase-Färbung .....	45
2.2.7	Immunfluoreszenz-Färbung .....	45
2.2.8	Ausbildung von embryonalen Körperchen.....	47
2.2.8.1	Embryonale Körperchen Bildungs-Protokoll .....	47
2.2.8.2	Forced Aggregation.....	48
2.2.8.3	Differenzierungsprotokoll .....	49
3	Ergebnisse .....	51
3.1	Ermittlung eines geeigneten Antikörpers zum Nachweis der CD3+ T-Lymphozyten .....	51
3.2	Einstellen der Kultivierungsbedingungen vor der Transduktion .....	55
3.2.1	Vergleich von frisch isolierten und kryokonservierten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut, mit gleichzeitiger Untersuchung der optimalen Kultivierungsbedingungen .....	55
3.2.2	Durchflusszytometrie zum Vergleich der Kultivierung in Okt-3 beschichteten Wells oder mit Okt-3 im Medium.....	60
3.3	Auswirkung der Polybrenekonzentration auf die mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	63
3.4	Transduktion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit Sendai-Virus .....	64
3.4.1	Effizienz der Transduktion.....	66
3.5	Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung.....	68
3.6	Nachweis der Pluripotenz der induzierten pluripotenten Stammzellen .....	73
3.6.1	Alkalische Phosphatase-Färbung .....	74
3.6.2	Immunfluoreszenz-Färbung .....	76
3.6.3	Bildung von embryonalen Körperchen .....	83
3.6.3.1	Differenzierungsprotokoll .....	85
4	Diskussion .....	88
4.1	Kryokonservierung.....	88
4.2	Der geeignete Antikörper für die Identifizierung der CD3+ T-Lymphozyten .	89
4.3	Parameter der Kultivierung .....	89
4.4	Transduktion.....	91
4.5	Charakterisierung .....	93

---

Zusammenfassung .....	96
Literaturverzeichnis .....	98
Abkürzungsverzeichnis .....	102
Tabellenverzeichnis .....	105
Abbildungsverzeichnis .....	107
Anhang .....	111

# 1 Einleitung

Wie bereits zu Anfang erwähnt, konnte vor einigen Jahren gezeigt werden, dass erwachsene somatische Zellen (z. B. Fibroblasten) über eine definierte Kombination von Transkriptionsfaktoren zu iPS-Zellen reprogrammiert werden können. In den letzten Jahren sind bereits viele Versuche geglückt, bei denen verschiedenste somatische Zellen zu iPS-Zellen dedifferenziert wurden. Die häufigste Methode stellt dabei die Reprogrammierung mittels integrierendem Virus dar. Im Moment scheint die Erzeugung von patienten- oder krankheitsspezifischen iPS-Zellen besonders hilfreich, um Krankheitsmechanismen zu studieren, und bietet neue Möglichkeiten für die Entwicklung und Untersuchung neuartiger Medikamente oder Therapien. HiPSC repräsentieren eine wichtige Zellressource und sind wichtig für zukünftige biomedizinische Anwendungen. Jedoch dürfen hiPS-Zellen, die für die biomedizinische Anwendung eingesetzt, sprich in den Patienten zurückgeführt werden sollen, nicht genetisch manipuliert worden sein. Inzwischen haben viele Forschungsgruppen auf diesem Feld Untersuchungen angestellt und die ersten iPS-Zellen mit nicht integrierenden Viren oder anderen Methoden erhalten (Okano *et al.* 2003, 2006, Seki *et al.* 2010).

## 1.1 Stammzellen

Stammzellen können nach ihrem Differenzierungspotenzial und ihrem ontogenetischen Alter eingeteilt werden. Demnach sind die ontogenetischen frühen Stammzellen die pluripotenten embryonalen Stammzellen, aus ihnen differenzieren die primitiven Keimblätter, die somatischen Stammzellen und die Vorläuferzellen. Zu den postembryonalen Stammzellen gehören alle Zellen, die nach Abschluss der Embryonalentwicklung im Organismus von Säugetieren vorkommen. Sie werden in neonatale und adulte Stammzellen eingeteilt. Das Differenzierungspotenzial dieser Zellen ist nach bisheriger Auffassung auf die Ausreifung von genetisch festgelegtem Gewebe beschränkt, wie z. B. die der Leber, Nervenzellen oder der Haut. Sie werden daher nicht mehr als pluripotent bezeichnet, sondern als multipotent. Sowohl induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) als auch embryonale Stammzellen (ESC) können sich *in vivo* und *in vitro* in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) ausdifferenzieren (Ohnuki *et al.* 2009).

Im Jahr 1981 wurden das erste Mal ESCs aus Blastozysten der Maus isoliert und kultiviert. Dabei stellte man fest, dass diese *in vitro* zu spontaner Differenzierung neigten. Dieser spontanen Differenzierung der Zellen kann jedoch mit bestimmten Faktoren entgegengewirkt und so die Selbsterneuerung, also das Bilden von Tochterzellen, gefördert werden. Maßgeblich zur Identifizierung dieser Faktoren beigetragen hat die Gruppe um Austin Smith in Edinburgh Ende der 1980er Jahre. Seitdem können pluripotente Stammzellen prinzipiell unbegrenzt vermehrt und kultiviert werden, was auch mit der hohen Aktivität der Telomerase in den Zellen zusammenhängt. Dadurch unterscheiden sie sich auch von primären Zellen, die die Fähigkeit der Teilung in Kultur oft schnell verlieren und damit den Prozess der Seneszenz beginnen.

IPS-Zellen besitzen die gleichen Eigenschaften wie ESCs. Sie können Tochterzellen bilden, die auch wieder alle Stammzeleigenschaften besitzen, somit in alle Zelltypen oder Gewebe differenzieren (Hua *et al.* 2009). Grund dafür ist ein noch nicht vollständig geklärter Mechanismus, der die Zelle zur asymmetrischen Zellteilung befähigt. Daher sind sie für die Forschung von sehr großem Interesse.

Eines der Hauptinteressen der Forschung liegt darin, iPS-Zellen wie auch ESCs in Kultur gezielt in verschiedene Zelltypen zu differenzieren und krankheitsspezifische Gene an- und auszuschalten, um mit ihrer Hilfe zu klären, wie bestimmte Medikamente wirken oder welche Mechanismen eine Rolle bei der Entstehung der Krankheit spielen. Beispielsweise konnte durch die Differenzierung von ESCs Morbus Parkinson in Tierversuchen bereits behandelt werden, dies wurde jedoch noch nicht durch Versuche an größeren Säugetieren bestätigt (Kim *et al.* 2002, Cho *et al.* 2006, Kriks *et al.* 2011). Ein weiteres Interesse der Forschung liegt darin, die Zellen in spezialisierte Zellen zu differenzieren, um sie einmal Menschen als Zellersatztherapie zur Verfügung zu stellen. Seit dem Jahr 2011 finden die ersten Phase-1-Studien zu diesem Thema in Amerika statt. Die Firma Geron testet eine Therapie, bei der ESCs in das Rückenmark von Querschnittsgelähmten injiziert wurden. Diese Studie wurde jedoch nach einem Jahr, mit der Begründung der momentanen wirtschaftlich schlechten Lage des Unternehmens, wieder eingestellt. Eine weitere Phase-1-Studie wurde 2011 von dem Unternehmen Advanced Cell Technology gestartet. Bei dieser Studie wurden zunächst nur in Amerika, inzwischen auch in England, ESCs in der Kulturschale zu Zellen des Retinalen Pigmentepithels differenziert und anschließend Patienten, die an Morbus Stargardt oder an altersbedingter Makuladegeneration leiden, direkt hinter die Netzhaut injiziert. Ähnliche

Versuche zum gleichen Krankheitsbild treibt der Japaner Shinya Yamanaka voran, jedoch nicht mit ESCs, sondern mit iPS-Zellen. Eine große Angst bei der Transplantation von iPS-Zellen und ESCs ist die Möglichkeit, dass sich Tumore bilden (Bethge 2013).

Dadurch, dass iPS-Zellen aus eigenen Gewebezellen erzeugt werden, kann es zu keiner immunologischen Abstoßung kommen, wenn die iPS-Zellen wieder in den Wirt transplantiert werden. Außerdem können ethische Bedenken durch die Verwendung von iPS-Zellen vermieden werden, da bei der Gewinnung nicht wie bei ESC die Zerstörung der Embryonen in Kauf genommen werden muss, sondern lediglich somatische Zellen des Spenders benötigt werden. All diese Gründe machen humane iPS-Zelllinien zu einer idealen Ressource für die Gen- und Zelltherapie (Nakanishi and Otsu 2012).

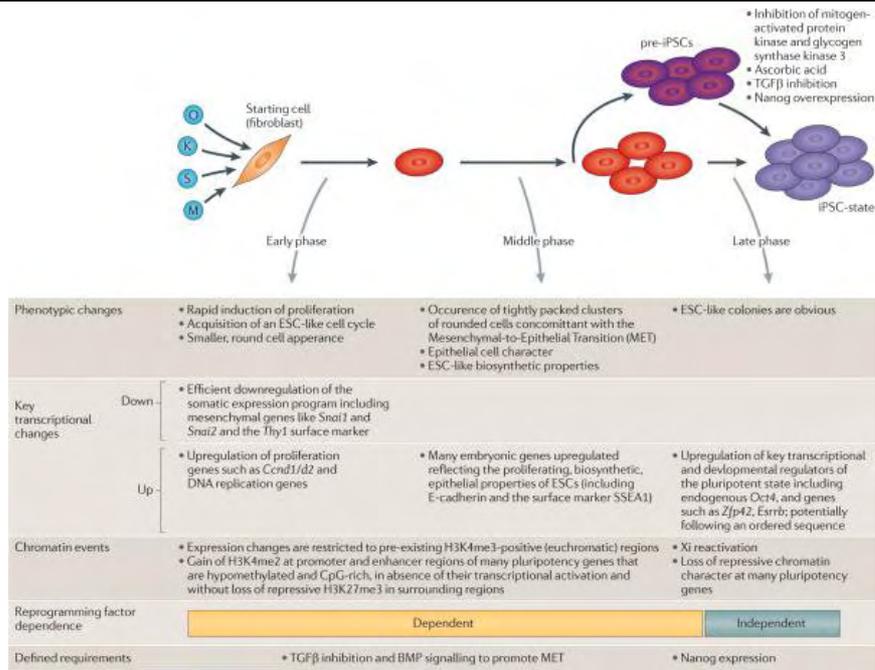
## **1.2 Grundlegende Vorgänge bei der Reprogrammierung induzierter pluripotenter Stammzellen**

Bereits vor 2006 gelang es, somatische Zellen durch Überexpression bzw. Unterdrückung einzelner Transkriptionsfaktoren zu transdifferenzieren (Boukamp 1995, Wilmut *et al.* 1997). Auf dieser Grundlage entwickelte Shin'ya Yamanaka die Hypothese, dass Gene, die in ESCs für die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren zuständig sind, eine zentrale Rolle spielen bei der Dedifferenzierung von somatischen Zellen zu pluripotenten Zellen. Zusammen mit Kazutoshi Takahashi führte er Experimente im Mausmodell durch, wobei sie die Expression der zentralen Transkriptionsfaktoren für die Pluripotenz in den Körperzellen durch das Einbringen der verantwortlichen DNA durch Retroviren ins Genom erreichten. Dabei gingen sie von 24 möglichen Genen aus und fanden heraus, dass mit einer Kombination aus Oct4, c-Myc, Sox2 und Klf4 die Reprogrammierung von einigen Zellen in den pluripotenten Zustand möglich war (Yamanaka and Takahashi 2006).

Seitdem werden auf diesem Gebiet mehr und mehr Erkenntnisse gewonnen und die sogenannten Yamanaka-Faktoren (Oct3/4, Sox2, Klf4 und Myc) werden üblicherweise zur Reprogrammierung verwendet. Wobei durch die Überexpression und der gleichzeitigen Herunterregulation zellspezifischer Gene iPS-Zellen entstehen können.

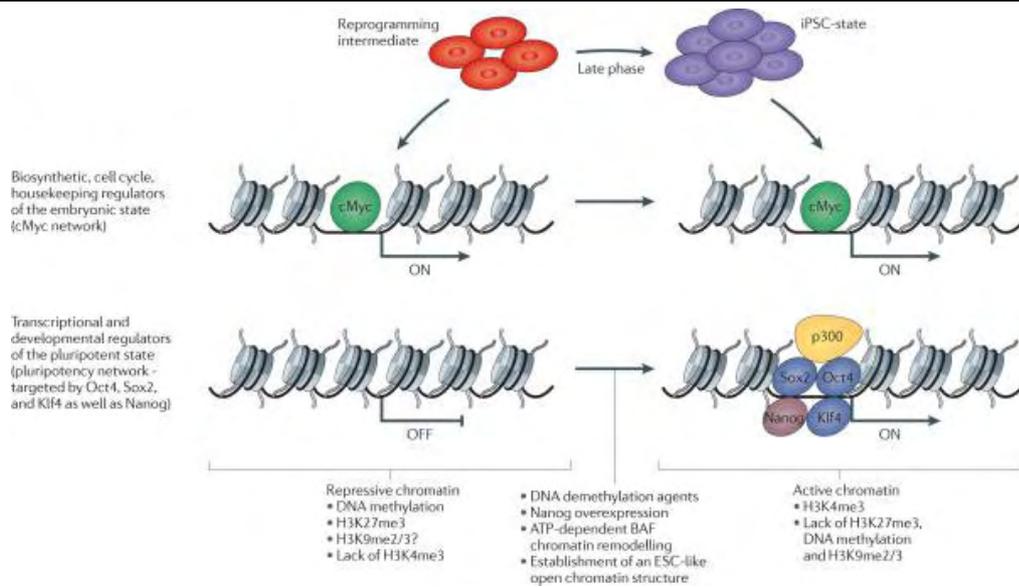
Die Reprogrammierung mit Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc dauert mindestens ein bis zwei Wochen, bis man die ersten umgewandelten Zellen in der Kulturschale hat. Ein wichtiges Merkmal dieses Verfahrens ist, dass nur einige der somatischen Zellen, die zunächst die Reprogrammierungsfaktoren exprimieren, nach einer gewissen Zeit schließlich bis zum Stadium der Pluripotenz gelangen (Kriks *et al.* 2011).

Die erfolgreiche Reprogrammierung erfordert den schrittweisen Übergang zur Pluripotenz durch wichtige Zwischenschritte (siehe Abbildung 1), dabei gehen jedoch bei jedem Schritt immer weniger Zellen ins nächste Stadium der Reprogrammierung über, durch sekundäre Ereignisse, wie die Induktion der Proliferation, das Herunterregulieren der zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren, gefolgt von dem Erwerb von epithelialen Eigenschaften, der Aktivierung bestimmter ESC-Marker und der späteren Aktivierung der Pluripotenz-Gene. Marker werden verwendet, um die Schritte zu erkennen, einschließlich der alkalischen Phosphatase und des Embryonalstadium-spezifischen-Antigens SSEA1 (*stage-specific embryonic antigen 1*) in einem Zwischenstadium und für das finale Stadium Nanog im Maussystem oder Nanog und der Oberflächenmarker TRA-1-60 in humanen Zellen. Die Schritte zur iPS-Zelle erfordern eine kontinuierliche Expression der Reprogrammierungsfaktoren, das Aufrechterhalten des Zustandes der Pluripotenz ist hingegen unabhängig von einer Überexpression dieser Faktoren (Stadtfeld *et al.* 2008, Mallanna and Rizzino 2010).



**Abbildung 1** Darstellung der frühen, mittleren und späten Phase der Reprogrammierung von Maus-Fibroblasten. Ereignisse in der frühen und späten Phase können weniger voneinander getrennt werden, im Vergleich zu denen, die später stattfinden. Die Herrunterregulierung der somatischen Expression und die Änderung im Histon H3K4me2 können zwar populationsübergreifend auftreten, sind jedoch für die frühe und mittlere Phase nicht ausreichend, um die Pluripotenz zu induzieren. Nur ein kleiner Teil der Zellen geht die weiteren Schritte bis zur Pluripotenz. Eine erfolgreiche Reprogrammierung erfordert die Expression der vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4 (O), Klf4 (K), Sox2 (S) und c-Myc (M), bis das iPSC-Stadium erreicht ist. Ansonsten fallen die Zellen wieder zurück in einen differenzierten Zustand. Die reprogrammierten iPSC-Zellen, die sich in der frühen und mittleren Phase befinden, bilden in Kultur ESC-ähnliche Kolonien aus, diese exprimieren jedoch noch kein Nanog oder andere Pluripotenz-Gene, die nur in der letzten Phase der Reprogrammierung identifiziert werden können (Brown *et al.* 2010).

Bei Fibroblasten der Maus zeigte eine rückwirkende Betrachtung der im Nachhinein wirklich reprogrammierten Zellen, dass eine Erhöhung der Proliferationsrate und eine gleichzeitige Abnahme der Zellgröße die ersten spürbaren Veränderungen innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Induzierung der Reprogrammierungsfaktoren waren (Cho *et al.* 2006). Diese morphologischen und proliferativen Veränderungen sind molekulare Begleiterscheinungen, die durch die Induktion der Proliferations-Gene und das Herunterregulieren des somatischen Expressionsprogrammes entstehen (Kim *et al.* 2002, Zhao *et al.* 2008). Die meisten Zellen, die die Reprogrammierungsfaktoren exprimieren, sind somit nicht erfolgreich reprogrammiert, da sie nach der ersten morphologischen Veränderung entweder so bleiben, die Seneszenz beginnen, im Zellzyklus stoppen und oft die Apoptose starten. Das Auslöschen des somatischen Programms ist wahrscheinlich eine niedrige Barriere im Gegensatz zur Reaktivierung des ESC-Programms. Die Induktion des pluripotenten Zustandes kann nur möglich sein, nachdem der somatische Zustand effizient zum Schweigen gebracht worden ist (Zhao *et al.* 2008).



**Abbildung 2** Rolle der Reprogrammierungsfaktoren und deren Wechselwirkung mit Chromatin während des letzten Schrittes der Reprogrammierung. Schematische Darstellung der unterschiedlichen Funktionen der Reprogrammierungsfaktoren in der späten Phase der Anpassung. Oct4, Sox2 und Klf4 vermitteln die Hochregulation des Pluripotenz-Netzwerkes (untere Grafik) und assoziieren mit der transkriptionalen Aktivität, indem sie während der letzten Schritte der Anpassung an viele der Gene binden (im Vergleich unten links zu unten rechts). Im Gegensatz dazu sind viele *c-Myc* Targets in einem Schritt vor der Aktivierung des Pluripotenz-Netzwerkes gebunden und aktiviert (obere Grafik links und rechts). Es scheint, als sei die Unfähigkeit des Oct4, Sox2 und Klf4, Pluripotenz-Gene zu binden und zu aktivieren, zumindest in einigen Fällen verbunden mit den repressiven Chromatin-Signaturen im Promotor dieser Gene (im Vergleich unten links zu unten rechts) (Brown *et al.* 2010).

ESCs und iPS-Zellen besitzen Eigenschaften von Epithelzellen, wie den engen interzellulären Kontakt und die Oberflächenexpression des epithelialen Schlüsselgens E-Cadherin. So müssen mesenchymale Zellen, wie periphere Zellen des Blutes, einen epithelialen Charakter während der Reprogrammierung erlangen. Nach der Unterdrückung des somatischen Transkriptionsprogramms bilden sich kleine, enge Zellgruppen, was ein Zeichen für die Änderung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion und für den Verlust der mesenchymalen Funktion und somit das Erlangen von epithelialen Charakteristika ist (Tsubooka *et al.* 2009). Dies unterstützt die Vermutung, dass die Zellen eine Anpassung durchlaufen – eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET), also die Umkehrung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), die während der Differenzierung von beispielsweise Fibroblasten *in vivo* auftritt (Kim *et al.* 2002, Tsubooka *et al.* 2009). Signalwege, die MET fördern oder unterdrücken, beeinflussen die Effizienz des Reprogrammierungs-Prozesses.

Nachdem die epithelialen Zellcharakteristika etabliert sind und sich größere Kolonien gebildet haben, werden andere ESC Marker wie SSEA 1 induziert, oft nur in einer Teilmenge von E-Cadherin-positiven Zellen (Mallanna and Rizzino 2010). An diesem Punkt ist das Expressionsprogramm auf der embryonalen Ebene, die Zellen teilen sich schnell und das Expressionsprogramm scheint sich etabliert zu haben. Experimente mit SSEA 1-positiven und negativen Zellpopulationen haben allerdings gezeigt, dass nur Zellen, die SSEA 1-positiv waren, wirklich reprogrammierte Zellen sind und aktiv das Pluripotenz-Netzwerk exprimieren, d. h. die Transkriptions- und Entwicklungsregulatoren werden stark exprimiert, einschließlich endogen codiertem Oct3/4, Sox2, Nanog und einigen anderen Pluripotenz-relevanten Genen.

Das Verständnis dafür, welchen Beitrag jeder der Reprogrammierungsfaktoren für die verschiedenen Stufen der Reprogrammierung leistet, ist letztlich erforderlich, um die molekularen Mechanismen der Induktion der Pluripotenz deutlich zu machen. Es wird angenommen, dass jeder Reprogrammierungsfaktor eine besondere Rolle spielt (Huangfu *et al.* 2008a). Diese Annahme wird durch den jeweiligen Beitrag zum MET bei der Fibroblasten-Reprogrammierung veranschaulicht. Es wurde gezeigt, dass Oct3/4 und Sox2 den promesenchymalen Regulator Snail unterdrücken, während Klf4 das epitheliale Programm durch die Bindung und Aktivierung der epithelialen Gene einschließlich E-Cadherin induziert (Tsubooka *et al.* 2009). Zur gleichen Zeit vermindert c-Myc den *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) Signalweg durch die Repression von Tgfb1 und Tgfb1. Das Zusammenwirken der Reprogrammierungsfaktoren kann erklären, warum die vier kanonischen Yamanaka-Faktoren solch einen effizienten Reprogrammierungs-Cocktail bilden.

Wie die Pluripotenz-Gene während der letzten Phase der Reprogrammierung hochreguliert werden, ist in **Abbildung 2** dargestellt; dabei wurden die Bindungsstellen von Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc in iPS- und Pre-iPS-Zellen von der Maus, die die proliferativen und Biosynthese-Eigenschaften von iPS-Zellen erworben haben, abgebildet. Die Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren in iPS-Zellen sind ähnlich definiert wie die Zielgene in ESC, wo Sox2 und Oct3/4 zusammen Promotoren von noch exprimierten Genen besetzen, einschließlich ihrer eigenen Promotoren. Klf4 teilt annähernd die Hälfte seiner Zielgene mit den beiden anderen Faktoren. Bezogen auf die geringe Überlappung der Zielgene wurde vermutet, dass sich die Funktion von c-Myc von der von Oct3/4, Sox2 und Klf4 in ESC und iPS-Zellen unterscheidet. Übereinstimmend damit ist, dass die Zielgene von c-Myc überwiegend in

Bereichen liegen, die an der Regulation der zellulären Proliferation, Metabolismus und Biosynthese beteiligt sind, während die Zielgene von Oct3/4, Sox2 und Klf4 in pluripotenten Zellen mehr im Bereich der Transkriptions- und Entwicklungsregulation des Pluripotenz-Netzwerkes liegen (Tsubooka *et al.* 2009).

Das bedeutet, dass c-Myc im Gegensatz zu Oct3/4, Sox2 und Klf4 nicht an der Hochregulation des Pluripotenz-Netzwerkes während der letzten Schritte der Reprogrammierung beteiligt sein kann. C-Myc ist daher wahrscheinlich für die Verbesserung der Transkription seiner Zielgene erforderlich. Dies könnte erklären, warum c-Myc für die Reprogrammierung entbehrlich ist, während es jedoch in der Lage ist, die Kinetik des Prozesses zu verbessern (Chung *et al.* 2010).

Die Reprogrammierung zum iPS-Stadium wird durch das Einbringen von Pluripotenz-Transkriptionsfaktoren ermöglicht. iPS-Zellen und ESC können oberflächlich nicht voneinander unterschieden werden. Allerdings haben zahlreiche Studien gezeigt, dass es molekulare Unterschiede zwischen iPS-Zellen und ESCs gibt, sowohl im Maus- als auch Humanmodell (Stewart *et al.* 1982, Miura *et al.* 2009), während andere Studien behaupten, dass es keine grundlegenden Unterschiede zwischen ihnen gibt (Blelloch *et al.* 2007). Die Pluripotenz von embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen wird aufrechterhalten durch ein präzises ausbalanciertes Transkriptionsnetzwerk, das von intrinsischen und extrinsischen Faktoren abhängig ist. Die intrinsischen beinhalten hauptsächlich die Transkriptionsfaktoren, die epigenetischen Faktoren sind jedoch auch sehr wichtig (Boyer *et al.* 2006).

### 1.2.1 Extrinsische Pluripotenzfaktoren

Die extrinsischen Faktoren ermöglichen das Aufrechterhalten der Pluripotenz von pluripotenten Stammzellen unter Zellkulturbedingungen. Dabei spielt das Zusammenwirken der extrinsischen Signale mit der intrinsischen transkriptionellen Architektur eine große Rolle dafür, ob die pluripotente Stammzelle sich selbst erneuert oder differenziert. Schon die ersten erhaltenen murinen ESCs wurden auf einer Schicht muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) kultiviert. Dies geschah, da die MEF-Zellen (Feederzellen) bestimmte lösliche Faktoren in das Kulturmedium sekretieren und so das Medium für die Kultivierung von ESCs mit den notwendigen Stimulanzen supplementieren. Bereits vor 25 Jahren konnte der Faktor *leukemia inhibitory factor* (LIF) als einer der wichtigen Bestandteile in konditioniertem Medium

ausgemacht werden (Smith *et al.* 1988). LIF inhibiert die Differenzierung von murinen pluripotenten ESCs, jedoch werden inzwischen einige pluripotente Stammzellen unter Stimulierung von LIF ohne Feederzellen in serumhaltigen Medien kultiviert.

Es kann davon ausgegangen werden, dass mindestens ein weiterer extrinsischer Faktor nötig ist, um die Pluripotenz bei pluripotenten Stammzellen aufrechtzuerhalten, da dies bei murinen embryonalen Stammzellen mit LIF nur unter serumhaltigen Bedingungen möglich war. Unter serumfreien Bedingungen werden Faktoren wie BMP4, BMP2 (*bone morphogenetic proteins*) oder GDF6 (*growth and differentiation factor-6*) dazu verwendet, um die Pluripotenz zu erhalten (Ying *et al.* 2003).

Momentan stellt die Kultivierung von humanen pluripotenten Stammzellen auf murinen Feederzellen jedoch die gebräuchlichste Methode dar, da diese die für den Erhalt der Pluripotenz notwendigen Faktoren ins Medium sekretieren. Seitdem sich das Kultivieren mit Serumersatz etabliert hat, wird für die Kultivierung von humanen pluripotenten Stammzellen auf die Zugabe von fötalem Kälberserum verzichtet (Freshney 2005). Eine weitere Methode, um humane pluripotente Stammzellen zu kultivieren, ist die Kultivierung in mit Matrigel beschichteten Schalen mit konditioniertem Medium. Matrigel ist ein gallertartiges Proteingemisch, das von murinen Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkom-Zellen ausgesondert und von BD Bioscience vertrieben wird. Dieses Proteingemisch ähnelt der extrazellulären Umgebung, die in vielen Geweben vorhanden ist. Bei beiden Kultivierungsmethoden muss dem Medium *basic fibroblast growth factor* (bFGF) zugegeben werden, um die Pluripotenz zu erhalten (Levenstein *et al.* 2006).

### 1.2.2 Verschiedene Möglichkeiten der Faktorenkombination

Seitdem Shin'ya Yamanaka im Jahr 2006 die vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 als Kombination zur Reprogrammierung einiger Zellen identifiziert hat, wurde auf diesem Gebiet intensiv weitergeforscht. Inzwischen sind weitere Kombinationsmöglichkeiten bekannt, da beispielsweise c-Myc und Klf4 potenzielle Onkogene sind. Die drei wichtigsten Faktoren für das Gelingen einer Reprogrammierung sind Oct3/4, Sox2 und Nanog. Wenn Nanog mit den vier Faktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 in murinen B-Zellen verwendet wird, verkürzt sich die Zeit um die Hälfte bis zum Auftreten der ersten Kolonien. Wird hingegen der *Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1* (UTF1), ein Transkriptions-Co-Aktivator, mit den Faktoren bei humanen Fibroblasten

verwendet, entstehen mehr Kolonien, die alkalische Phosphatase generieren (Zhao *et al.* 2008). Die Gesamtzahl der iPS-Kolonien verzehnfacht sich, wenn die drei Faktoren Oct3/4, Sox2 und Klf4 mit dem Transkriptionsfaktor SALL4 verwendet werden (Tsubooka *et al.* 2009). Die Anzahl der Klone, die den stabilen Zustand der Pluripotenz erreicht haben, kann durch spezifische chemische Inhibition des *mitogen-activated protein Kinase* (MEK) Signalweges erreicht werden. Auch die Verwendung von microRNAs beeinflusst die Pluripotenz und die Reprogrammierung (Mallanna and Rizzino 2010). Um c-Myc nicht verwenden zu müssen, kann eine Kombination aus Glycogensynthasekinase 3-Inhibitor mit Tranylcypromin (Parnate) verwendet werden, um beispielsweise humane Keratinozyten zu reprogrammieren. Bei *human neonatal foreskin fibroblast* (HFF) und Hautfibroblasten ermöglicht Valproinsäure die Induktion der Pluripotenz mit den Faktoren Oct3/4 und Sox2 (Huangfu *et al.* 2008b). Die Zugabe von Vitamin C kann die Reprogrammierung von MEF und Brustdrüsen-Fibroblasten positiv beeinflussen, indem es teilweise den Prozess der Seneszenz verhindert und die Demethylierung der DNA induziert (Chung *et al.* 2010).

### 1.3 Die Entscheidung für den richtigen Zelltypen

Bei der Reprogrammierung müssen bestimmte Faktoren in einem Zelltyp eingebracht und unter definierten Kultivierungsbedingungen adäquat für eine gewisse Zeit, je nach Zelltyp unterschiedlich, exprimiert werden. Abhängig vom Zelltyp werden so bei Reprogrammierung verschiedene Wirkungsgrade und Kinetiken erreicht. Für die Reprogrammierung von MEFs mit Retroviren werden beispielsweise acht bis zwölf Tage benötigt, wohingegen für die Reprogrammierung von HFFs 20 bis 25 Tage erforderlich sind. Momentan ist die Verwendung von Fibroblasten noch am gebräuchlichsten, jedoch sind in den letzten Jahren mehr Studien erschienen, in denen die Reprogrammierung von anderen Zelltypen, wie z. B. humanen primären Keratinozyten oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes, analysiert wurde – aufgrund ihrer leichten Reprogrammierbarkeit, der besseren Verfügbarkeit oder der therapeutischen Relevanz. Wird die Effizienz der Reprogrammierung von humanen primären Keratinozyten mit der von Fibroblasten verglichen, ist diese 100 Mal effizienter und doppelt so schnell. Des Weiteren können humane primäre Keratinozyten einfach beschafft werden, indem dem Spender Haare herausgezupft werden (Aasen *et al.* 2008). Auf die Effizienz der Reprogrammierung kann sich auch auswirken, wie weit die Spenderzelle bereits zuvor differenziert war. Durch die Verwendung von blutbildenden Stamm- und

Vorläuferzellen, wie mononukleären Zellen des peripheren Blutes, kann sich die Effizienz der Reprogrammierung bis zu 300-fach verbessern, im Gegensatz zu der Verwendung von ausdifferenzierten B- und T-Zellen (Eminli *et al.* 2009). Die Wahl des Zelltyps ist nicht nur für die Effizienz wichtig, sondern hat auch Auswirkung auf die spätere Qualität der iPS-Zellen (Miura *et al.* 2009).

### 1.3.1 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

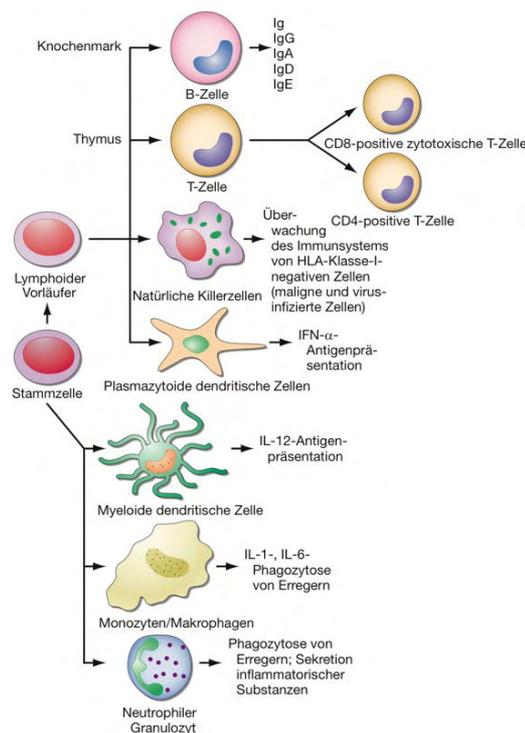
Bei PBMCs handelt es sich um einkernige Zellen des Blutes, mit einem runden Zellkern. Zu dieser Art der Zellen gehören beispielsweise Lymphozyten und Monozyten. Sie sind sehr wichtig bei der Bekämpfung und Abwehr von Infektionen und sind Teil des Immunsystems.

Lymphozyten gehören zu den zellulären Bestandteilen des Blutes. Sie gehören zu den weißen Blutkörperchen und zu ihnen zählen die B-Lymphozyten, die T-Lymphozyten und die natürlichen Killerzellen. Lymphozyten entstehen aus multipotenten Stammzellen des Knochenmarks als Vorläuferzellen im Becken, Brustbein und zum Teil aus dem Schädelknochen. Sie reifen dort im Bursa-Äquivalent oder im Thymus zu differenzierten B-Lymphozyten bzw. T-Lymphozyten. Von dort aus wandern die B- und T-Lymphozyten in das sekundäre lymphatische Gewebe, wo von den T-Lymphozyten abgegebene Zytokine die weitere Differenzierung der B-Lymphozyten unterstützen (Okita *et al.* 2008). B- und T-Lymphozyten haben eine ähnliche Größe wie die roten Blutkörperchen und eine kugelige Form. Beim Menschen beträgt ihr Durchmesser ca. 7,5  $\mu\text{m}$ .

#### 1.3.1.1 T-Lymphozyten

Die Zellen besitzen Oberflächenmoleküle, über die die Zellen identifiziert und einer bestimmten Zellentwicklung zugeordnet werden können. Wenn sie die gleichen Oberflächenstrukturen tragen, werden sie nach internationalen Workshops in *Cluster of Differentiation* (CD) eingeordnet; dadurch ist eine Klassifizierung fachdisziplinär übergreifend möglich. T-Lymphozyten erkennen durch ihren T-Zellen-Rezeptor (TCR) Peptide, die durch Antigen-präsentierende Zellen präsentiert werden, die *Major Histocompatibility Complex* Moleküle (MHC), aber auch andere Glykolipide im Komplex mit CD1 (Lin *et al.* 2011). Alle T-Lymphozyten besitzen einen CD3-Rezeptor, mit dem CD3 bildet der TCR einen Komplex, wodurch diese aktiviert werden. T-Lymphozyten lassen sich in funktionelle Untergruppen einteilen. Dafür verwendet man verschiedene Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Marker oder die verschiedenen Zytokine. Die wichtigsten dieser Untergruppen sind die mit den

Oberflächenmarkern CD4 und CD8 (Abbildung 3). CD4+ T-Lymphozyten stellen die Helferzellen dar, ihr Rezeptor erkennt ein MHC-Klasse-II-Molekül. CD8+ T-Lymphozyten stellen zytotoxische T-Zellen dar und ihr Rezeptor erkennt Antigene, die über ein MHC-Klasse-I-Molekül von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden (Wadia and Dowdy 2002, Warren *et al.* 2010). T-Helferzellen sezernieren verschiedene Zytokine in ihre Umgebung, sie werden danach eingeteilt, ob dadurch eine zellvermittelte Immunantwort entsteht oder ob eine humorale Immunantwort der B-Lymphozyten hervorgerufen wird (Kim *et al.* 2009).



Aus: Harrison's Innere Medizin, 18. Auflage (Copyright: ABW Wissenschaftsverlag GmbH)

**Abbildung 3** Darstellung der Zellen des Immunsystems. Ausgehend von den Stammzellen über die verschiedenen Differenzierungen, bis hin zu den CD4+ und CD8+ regulatorischen Zellen (Loh *et al.* 2010).

Der Nachweis einer lymphozytärer Subpopulation ist mit klassischen hämatologischen Methoden nicht möglich. Es ist erforderlich, durch zellspezifische Marker die Zellen direkt oder indirekt mit monoklonalen Antikörpern zu markieren, um sie zu charakterisieren. Die anschließende Auswertung wird mittels Fluoreszenzmikroskop oder durch zytometrische Methoden vorgenommen. Im Allgemeinen wird die Auswertung von lymphozytären Subpopulationen des peripheren Blutes in der Medizin mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ist die beste Möglichkeit, Zelle für Zelle eines Zellgemisches zu messen. Dabei können die Zellen immunologisch, funktionell und auf molekulare zelluläre Parameter hin untersucht werden. Die Zellen werden mit spezifischen

fluoreszierenden Molekülen markiert, in einer Durchflusskammer hydrodynamisch fokussiert und in einem sehr engen Flüssigkeitsstrom durch einen Messpunkt geleitet; dies kann inzwischen mit vier Farben gleichzeitig durchgeführt werden (Landazuri *et al.* 2007).

## 1.4 Die verschiedenen Reprogrammierungsmethoden

### 1.4.1 Integrative Delivery-Systeme

Die ersten Delivery-Systeme für die Transkriptionsfaktoren, in murine oder humane Fibroblasten, war das murine Moloney Leukämievirus (MMLV). Diese Vektoren ermöglichen das Einbringen von ca. 8 kb in sich teilende Zellen (Stewart *et al.* 1982). Lentivirale Delivery-Systeme werden auch sehr erfolgreich verwendet, um die verschiedenen Vektoren in die somatische Zelle einzubringen und sie zu dedifferenzieren (Blelloch *et al.* 2007). Das Lentivirale Delivery-System ist von dem HI-Virus abgeleitet, es besitzt eine höhere Kapazität, ca. 8–10 kb, weist einen höheren Wirkungsgrad auf als MMLV basierende Retroviren und kann sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen transduzieren (Stadtfeld *et al.* 2008). Die Transduktion mit diesen Systemen ist zwar effizient und reproduzierbar, birgt aber auch Gefahren, wie die Produktion potenziell schädlicher Viruspartikel, die starke Onkogene wie c-Myc exprimieren können. Diese Probleme konnten teilweise durch die Verwendung von induzierbaren Lentiviren gelöst werden, jedoch fehlt viralen Systemen die erforderliche Sicherheit für die therapeutische Verwendung (Brambrink *et al.* 2008).

### 1.4.2 Nicht-integrative Delivery-Systeme

Eine weitere Möglichkeit der nicht-integrativen Reprogrammierung ist die Verwendung von Liposomen oder Elektroporation. Verglichen mit Viren ist die Transduktionseffizienz jedoch um einiges niedriger, d. h. es sind wesentlich weniger Spenderzellen mit dem vollen Satz an Transduktionsfaktoren transduziert. Jedoch kann so die Verwendung von Viren vermieden werden. Bei der Verwendung von nicht-integrativen Delivery-Systemen werden einige Probleme der integrativen Delivery-Systeme umgangen, beispielsweise die permanente genetische Veränderung, wie bei der Integration durch Retro- oder Lentiviren. Mit den momentanen Systemen sind die Kinetiken der Reprogrammierung zwischen den verschiedenen Zelltypen jedoch sehr unterschiedlich und bis zur Erzeugung stabiler iPS-Zellen vergehen mehrere Wochen. Je nach Ausgangsmaterial kommt es bei nicht-integrativen

Systemen zu nicht wirkungsvollen Infektionen oder schlechten Transfektionseffizienzen, sodass wenige Zellen überleben, und zu schlechten Reprogrammierungskinetiken. Zwei der größten Probleme dieser Methoden sind die Ineffizienz und die schlechte Reproduzierbarkeit.

#### **1.4.2.1 Transient episomale Delivery-Systeme**

Eine Methode zur integrationsfreien Reprogrammierung ist die Verwendung von nicht replizierenden oder replizierenden episomalen Vektoren. Diese Methode kann relativ einfach mit Standard-Laboreinrichtungen und molekularbiologischer Erfahrung durchgeführt werden. Jedoch ist auch hier die Transduktionseffizienz eher gering, im Gegensatz zur integrativen Reprogrammierung (Okita *et al.* 2008).

#### **1.4.2.2 RNA Delivery-System**

Im Jahr 2010 wurde eine Methode entwickelt, bei der die Reprogrammierung von humanen somatischen Zellen durch das Einbringen synthetischer mRNA erreicht wurde. Die Effizienz dieser Methode war um ein Vielfaches höher als Reprogrammierungen mit anderen nicht-integrativen Methoden, es wurden zwei Prozent der humanen fötalen Fibroblasten in nur 17 Tagen reprogrammiert. Diese Methode ist aufgrund ihrer Einfachheit und Effizienz zwar sehr interessant, jedoch birgt sie die Gefahr, dass wegen der hohen Dosierungen der mRNA das Krebsrisiko steigt, aufgrund der höheren Expression von c-Myc, wodurch die genomische Stabilität beeinflusst wird (Warren *et al.* 2010).

#### **1.4.2.3 Protein Delivery-System**

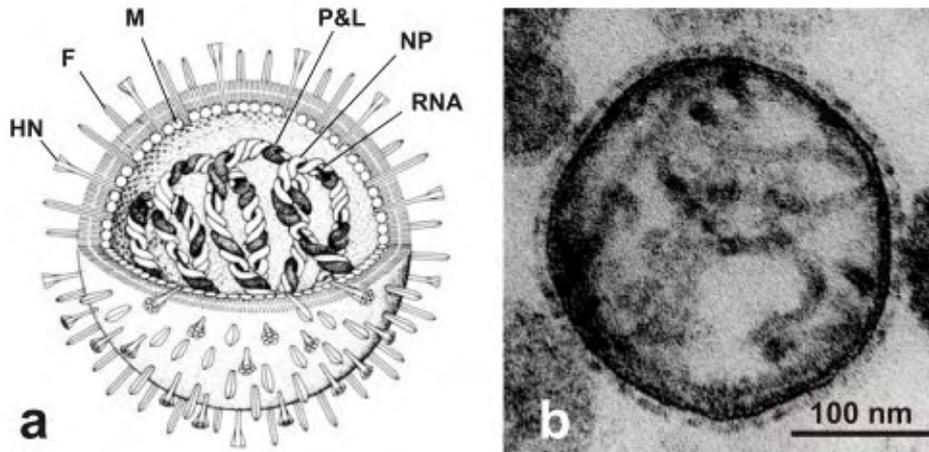
Eine weitere Möglichkeit der Reprogrammierung, ohne das Einbringen exogenen genetischen Materials, ist die Reprogrammierung mittels Proteinen. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Fusion von Proteinen mit Peptiden, wie dem HIV-Transaktivator der Transkription oder Poly-Arginin, das direkte Einbringen der Proteine in die Zelle *in vitro* und *in vivo*, die Transduktion vermittelt werden kann (Wadia and Dowdy 2002). Allerdings waren auch bei dieser Methode die Kinetik und der Wirkungsgrad schlecht. Des Weiteren ist die Reproduzierbarkeit dieser Methode schwer und die Produktion und Reinigung der rekombinanten Proteine routinemäßig im Labor nicht umsetzbar (Kim *et al.* 2009).

#### 1.4.2.4 Integrationsfreie virale Delivery-Systeme

Die ersten Versuche zur integrationsfreien viralen Reprogrammierung von murinen Hepatozyten wurden mit einem Replikations-defizienten Adenovirus durchgeführt (Stadtfeld *et al.* 2008). Anschließend folgten noch Versuche mit murinen fetalen Leberzellen und murinen adulten Fibroblasten. Bereits ein Jahr später wurden von einer anderen Arbeitsgruppe die ersten humanen fetalen Fibroblasten erfolgreich reprogrammiert, jedoch lag die Transduktionseffizienz zwischen 0,0001 und 0,0018 %, was ungefähr ein Drittel von dem ist, was mit integrativen Delivery-Systemen zu der Zeit möglich war (Fusaki *et al.* 2009). Ebenfalls wurden humane Fibroblasten und zirkulierende T-Zellen erfolgreich mit einem F-defizienten Sendai Vektor reprogrammiert (Seki *et al.* 2010) (siehe auch Kapitel 1.5).

### 1.5 Sendai-Virus

Bei dem Sendai-Virus handelt es sich um ein Virus mit einzelsträngigem, kontinuierlichem RNA-Genom in Negativstrangorientierung (Abbildung 4). Das RNA-Genom des Sendai-Virus besitzt nicht die Polarität einer mRNA und kann daher nicht direkt in Proteine umgesetzt werden. Dafür muss die vorhandene RNA erst in die komplementäre RNA umgeschrieben werden. Dieser Vorgang steht in Abhängigkeit mit dem Vorhandensein einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Das Virus gehört zu der Familie der Paramyxoviren, Gattung der Respiroviren, und wird auch Murines Parainfluenzavirus 1 genannt. Paramyxoviren sind bei Mensch und Tier weit verbreitet und für eine Vielzahl von Krankheiten verantwortlich. Der Sendai-Virus wurde 1952 von Masahiko Kuroya in der japanischen Stadt Sendai entdeckt und galt lange als gut erforschter Prototyp der Paramyxoviren. Zunächst wurde angenommen, dass es sich dabei um einen humanen Erreger handelt – dies stellte sich jedoch als falsch heraus. Das Virus ist bei Mäusen weit verbreitet und führt beim Menschen sehr selten zur Erkrankung (Modrow *et al.* 2010). Aus diesem Grund wird der Sendai-Virus auch für Anwendungen in der Gen-Therapie und der regenerativen Medizin in Betracht gezogen. Er infiziert eine Vielzahl an Zelltypen, ohne für den Menschen pathogen zu sein, und ist sehr effizient.



**Abbildung 4** Merkmale von Sendai-Virus. (a) Darstellung der schematischen Struktur des Sendai-Virus, mit dem genomischen RNA-Komplex und den Proteinen NP, P und L, der Hülle einer Lipiddoppelschicht aus den Proteinen F und HN und der Matrix aus M Proteinen. (b) Querschnitt: Ansicht des Sendai-Virus untersucht mit Transmissionselektronenmikroskopie (Nakanishi and Otsu 2012).

### 1.5.1 Verwendung

Ein Anwendungsgebiet des Sendai-Virus ist beispielsweise die molekulare Therapie. Zuvor wurden umfassende Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* an unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt. Der Sendai-Virus repliziert sich natürlich in den respiratorischen Epithelzellen der Maus und verursacht dort respiratorische Symptome. Ein rekombinanter Sendai-Virus kann neben der Lunge und den Atemwegen Epithelien des Herz-Kreislauf-Systems, Neuronen, dendritische Zellen, Kolonepithel, retinales Epithel, Hepatozyten und hämatopoetische Stammzellen infizieren und dort die Genexpression induzieren (Nakanishi and Otsu 2012). Das breite Wirkungsspektrum des Sendai-Virus beruht zum Teil auf der Sialinsäure, welche der primäre Rezeptor des Sendai-Virus und bei Tieren weit verbreitet ist. Die Sialinsäure ist für die vermittelte Membranfusion des Sendai-Virus unverzichtbar (Eguchi *et al.* 2000).

Die Anwendbarkeit des Sendai-Vektor in der molekularen Medizin ist in einigen Fällen abhängig und eingeschränkt durch die verwendeten transienten Gene, die breite Wirtszellspezifität, die geringe Pathogenität und die starke Immunogenität. Angewendet wird er zum Beispiel als Lebendimpfstoff, in der Krebs-Gentherapie und in der Gentherapie für kritische Ischämie der Gliedmaßen (Hurwitz 2008).

Des Weiteren wird die Verwendung des Sendai-Virus bei der Reprogrammierung von somatischen Zellen immer wichtiger. Der Sendai-Vektor ist ein einzigartiges Vektor-System für die genomische Reprogrammierung, da er ohne chromosomale Integration die Reprogrammierungs-Gene exprimiert. Im Jahre 2009 wurde zum ersten Mal darüber berichtet, dass mit einem Wildtyp Sendai-Vektor mit Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc die Generierung von integrationsfreien iPS-Zellen gelang, bei denen durch passive Elimination, durch Passagieren, das fremde RNA-Genom entfernt werden konnte (Okita *et al.* 2007). Dieser Prototyp wurde durch einen mit einem weniger zytotoxischen Rückgrat ersetzt und ist nun im Handel, bei Life Technologies, erhältlich. Die Firma entwickelte einen Sendai-Vektor mit einer Deletion des F-Gens, wodurch keine Replikation mehr stattfinden kann, und einer temperaturempfindlichen (ts) Mutation, um einerseits das Arbeiten mit ihm sicherer zu machen und andererseits die Entfernung des Virusgenoms aus der Zelle zu erleichtern (Brambrink *et al.* 2008).

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Stammzell Core Unit unterstützt Wissenschaftler, die mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) arbeiten, mit dem Fokus auf der Generierung von patienten- oder krankheitsspezifischen iPS.

In diesem Projekt soll auf Grundlage der in der Einleitung erwähnten Ergebnisse (Okano *et al.* 2003, 2006, Seki *et al.* 2010) die Dedifferenzierung von PBMCs zu iPS-Zellen mit dem nicht integrierenden Sendai-Virus Transduktions-Kit der Firma Life Technologies durchgeführt werden. Dieses Projekt wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Arne Hansen des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie durchgeführt, da eine Studie (Hamburg City Health Studie) mit ca. 50 000 Probanden in Kooperation mit dem Universitären Herzzentrum Hamburg geplant ist. Bei dieser Studie sollen einem Teil der Probanden Hautbiopsien und Blutproben entnommen werden, um anschließend iPS-Zellen zu generieren. Da jedoch nicht gleichzeitig von 50 000 Personen iPS-Zellen generiert werden können, muss eine SOP entwickelt werden, bei der die Proben zunächst kryokonserviert werden, um nach und nach die iPS-Zellen zu generieren und anschließend wieder zu kryokonservieren, damit mit den erhaltenen iPS-Zellen weitere Versuche durchgeführt werden können. Hierfür sollen die PBMCs für eine gewisse Zeit kryokonserviert und anschließend ihre Viabilität, Proliferation und CD3+ T-Lymphozyten Anzahl mit frisch

isolierten PBMCs verglichen werden, um Rückschlüsse auf ihre spätere Transduzierbarkeit ziehen zu können. Des Weiteren soll untersucht werden, in welchen Konzentrationen Polybrene eingesetzt werden kann, da es die Transduktion der Zellen deutlich verbessert, jedoch auch toxisch auf die Zellen wirken kann. Es sollen Versuche mit unterschiedlichen MOIs (*Multiplicity of infection*) durchgeführt werden, um möglichst sparsam, aber effizient iPS-Zellen zu generieren. Nachdem iPS-Zellen erhalten worden sind, soll die integrationsfreie Reprogrammierung nachgewiesen werden, d. h. der Sendai-Virus darf nach einiger Zeit nicht mehr in den Zellen nachweisbar sein. Parallel dazu werden die erhaltenen iPS-Zellen charakterisiert, d. h. es soll überprüft werden, ob es sich tatsächlich um induzierte pluripotente Stammzellen handelt. Dafür werden die üblichen Methoden, wie die alkalische Phosphatase-Färbung, Immunfluoreszenz-Färbungen, die Bildung von embryonalen Körperchen und die anschließende spontane Differenzierung durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller	Art.-Nr.
BD Vacutainer® CPT™ System	BD	
BKF-Adapter	Sarstedt	14.1110
Cell cultur dishes, 150 mm	Sarstedt	
Cell scraper, 16 cm x 13 mm	Sarstedt	83.1832
Chamber Slide™, 8 Well Permanox Slide	Thermo Scientific	177402
CryoPure Gefäße 1,6 mL, Farbmix	Sarstedt	72.380.992
Deckgläser, 24 x 60 mm	Carl Roth	H 878
Einkanalpipette 0,1–2 µl	Peqlab	91-P3960-2
Einkanalpipette 0,5–10 µl	Peqlab	91-P3960-10
Einkanalpipette 10–100 µl	Peqlab	91-P3960-100
Einkanalpipette 20–200 µl	Peqlab	91-P3960-20
Einkanalpipette 100–1000 µl	Peqlab	91-P3960-1000
Fluoromount-G	SouthernBiotech	0100-01
Konische Röhrchen 15 mL	Sarstedt	62.554.002
Konische Röhrchen 50 mL	Sarstedt	62.547.354
Mr. Frosty freezing Container	Thermo Scientific	5100-0001
Nunc 96 Well, Mikrowellplatten	Thermo Scientific	267334
Nunc 24 Well, Multischalen	Thermo Scientific	142475
Nunc 12 Well, Multischalen	Thermo Scientific	150628
Nunc 6 Well, Multischalen	Thermo Scientific	140675
Nunc 4 Well, Multischalen	Thermo Scientific	176740
Nunc CryoTube™ vials 1,8 mL	Thermo Scientific	377267

Pasteurpipetten, Glas 230 mm	Heinz Herenz Medizinbedarf	1100802
Pipettenspitzen, 2,5 µL mit Filter	Sarstedt	70.1130.212
Pipettenspitzen, 10 µL mit Filter	Sarstedt	70.1115.210
Pipettenspitzen, 100 µL mit Filter	Sarstedt	70.760.212
Pipettenspitzen, 200 µL mit Filter	Sarstedt	70.760.102
Pipettenspitzen, 1000 µL mit Filter	Sarstedt	70.762.100
Pipetus® 100–240 Volt	Hirschmann Laborgeräte	9907200
Safty-Multifly®-Set (100)	Sarstedt	85.1638.235
Serologische Pipetten, 2 mL wattiert	Sarstedt	86.1252.001
Serologische Pipetten, 5 mL wattiert	Sarstedt	86.1253.001
Serologische Pipetten, 10 mL wattiert	Sarstedt	86.1254.001
Serologische Pipetten, 25 mL wattiert	Sarstedt	86.1685.001
T25 Gewebekultur Flaschen, 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	83.1810.302
T75 Gewebekultur Flaschen, 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	83.1813.002
T175 Gewebekultur Flaschen, 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	83.1812.002
Vakuumfiltration 500, Rapid-Filtermax	TPP	99500

## 2.1.2 Verwendete Chemikalien

Material	Hersteller	Art.-Nr.
Polybrene	Sigma-Aldrich	107689
2-Mercaptoethanol 14,3 M		
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich	D8418
Ethanol, 96 % vergällt	Walter CMP	WAL10504 9010
Incidin® Plus	Ecolab Deutschland GmbH	30 115 20
Isopropanol, 99,5 %	Carl Roth	9866.6
Mitomycin c, 2 mg	Serva Electrophoresis	29805.01

---

 Paraformaldehyd
 

---

### 2.1.3 Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe und molekularbiologische Kits

Material	Hersteller	Art.-Nr.
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Life Technologies	A-11001
Albumin von Bovine Serum	Roth	8076.2
Alexa Fluor 488 goat anti-Mouse IgM $\mu$ chain	Molecular Probes®, Life Technologies	A21042
Alexa Fluor 546 goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Molecular Probes®, Life Technologies	A11035
Anti-Human CD3 PerCP-Cyanine5.5	eBioscience	45-0037-41
Collagenase		
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate)	Molecular Probes®, Life Technologies	D3571
dNTP Set	Thermo Scientific	R0181
Dream Taq DNA Polymerase Kit	Thermo Scientific	EP0702
Fibrinogen		
FITC Mouse Anti-Human CD2	BD Pharmingen™	555326
Leukozyt alkalische Phosphatase Kit	Sigma-Aldrich	86R-1KT
Matrigel	BD Biosciences	354230
Nanog Antibody Rabbit IgG	Cell Signaling	3580
Normal Goat Serum	Gibco®, Life Technologies	PCN5000
Oct-4A (C30A3) Rabbit mAb Rabbit IgG	Cell Signaling	2840S
Pacific Blue™ anti-human CD4	BioLegend	300524

Antikörper				
PE/Cy7	anti-human	CD8a	BioLegend	300913
Antikörper				
PeqGold Total RNA Kit (C-Line)			Peqlab	12-6634-02
SSEA4 (MC813) Mouse IgG3	Mouse mAb		Cell Signaling	4755
StemLight™ Antibody Kit	Pluripotency		Cell Signaling	9656
Thrombin				
TRA-1-60 (S) Mouse IgM	Mouse mAb		Cell Signaling	4746SS
TRA-1-81 (S) Mouse IgM	Mouse mAb		Cell Signaling	4745
Triton X-100			Sigma-Aldrich	X100-5ML
Trypsin			Life Technologies	R-001-100
UltraPure™ Agarose			Invitrogen	16500500

### 2.1.4 Geräte

Geräte	Hersteller	Modell
Analysewaage	Satorius	Genius
Autoklav	MediTech	Evo 120
Durchflusszytometer	BD Biosciences	Canto II
Elektrophoresekammer	Biorad	Sub-Cell® GT
Elektrophoresekammer	Apparatus corporation	Maxicell® PrimoEC940
Elektrophoresenetztteil	Bio Rad	Power Pac Basic
Elektrophoresenetztteil	Consort	E452
Elektrophoresenetztteil	Peqlab	EV243
Gel Bildgebungssystem	Syngene	Genius2

Inkubator	Thermo Scientific	Funktion Line Typ BB15
Inkubator	Thermo Scientific	Heracell 150i
Integral Wasseraufbereitungssystem	Millipore	Milli-Q plus
Kühlschrank	Bosch	
Mikroskop	AMG	EVOS fl
Mikroskop	Leitz	Labovert
Mikroskop	Nikon	Eclipse TS 100
NanoDrop	NanoDrop®	ND-1000 Spectrophotometer
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific	S2020
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific	HS 12
Stickstofftruhe	Panasonic	VIP Plus
Thermozykler	Applied Bioscience	GeneAmp PCR System 9700
Thermozykler	Peqlab	Primus 25
Tiefkühlschrank (-20 °C)	Liebherr	Premium No Frost
Tiefkühltruhe (-80 °C)	Thermo Scientific	Froma 900 Serie
Tischzentrifuge	VWR	MiniStar
Vakuumpumpe	Vacuubrand	BVC 21
Vortex	Heidolph	REAXtop
Waage	Ohaus	Precision Advanced
Wasserbad	Jürgens	GFL
Zellzähler	Schärfe System	CASY
Zentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Multifuge X3R
Zentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Instruments Labofuge 400R
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen	Rotina 35R

## 2.1.5 Verwendete Zellen

### Zellen

PBMCs von zwei Spendern	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> )
C25	Kontroll-hiPS
Con2 SV XY	hiPS aus dermalen Fibroblasten, zur Verfügung gestellt von der HEXT Stem Cell Facility
MEF-A1	Murine embryonale Fibroblasten ( <i>Murine Embryonic Fibroblasts</i> ), zur Verfügung gestellt von Arne Hansen
MEF-SC1	Murine embryonale Fibroblasten ( <i>Murine Embryonic Fibroblasts</i> ), zur Verfügung gestellt von der HEXT Stem Cell Facility
SV026	hiPS aus Stemgent BJ humanen Fibroblasten der Firma Miltenyi Biotec (Cat.no. 130-096-726)

## 2.1.6 Medien und Medienzusätze

Material	Hersteller	Art.-Nr.
D-PBS (ohne Ca <sup>++</sup> , Mg <sup>++</sup> )	Life Technologies	14190-144
0,05 % Trypsin/EDTA (1X)	Life Technologies	25200-056
AIM-V	Life Technologies	12055-091
b-FGF	Hannover	Zur Verfügung gestellt von Arne Hansen
BIOMYC-1 Solution, 100x	Antibiotic PromoKine	PK-CC03-036-1D
BIOMYC-2 Solution, 100x	Antibiotic PromoKine	PK-CC03-037-1D
DMEM/ F-12	Life Technologies	11330-032
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA	A15-101
IL-2	Life Technologies	
KnockOut™	Serum Life Technologies	10828-028

Replacement (KOSR)		
L-Glutamine 200 mM	Life Technologies	25030-081
MEM Non-Essential Amino Acids (100X)	Life Technologies	11140-050
Mitomycin c	Serva Electrophoresis	29805.01
OKT3 human anti-CD3 Mouse IgG2a	Bioxcell	BE0001-2
Penicillin-Streptomycin 1000U	Life Technologies	15140-122
Polybrene	Sigma-Aldrich	107689
ROCK Inhibitor (Y-27632)	Biaffin GmbH&Co. KG	PKI-Y27632

### 2.1.7 Medienbezeichnung und ihre Zusammensetzung

Medium	Zusammensetzung
PBMC-Medium	500 mL AIM-V
	5 mL L-Glutamine
	2,5 mL Pen/Strep
MEF-Medium	450 mL DMEM
	50 mL FCS
	5 mL 1000U Pen/Strep
	5 mL 200 mM L-Glutamine
hES-Medium (500 mL)	400 mL DMEM/F12
	100 mL KnockOut™ Serum Replacement
	5 mL 200 mM L-Glutamine
	5 mL 10 mM MEM-NEAA
	2,5 mL 1000U Pen/Strep
	3,5 µL 14,3 M 2-Mercaptoethanol
	50 µL 10 ng/mL bFGF
20 % FCS-Medium	400 mL DMEM/F12

---

	100 mL Fetal Calf Serum
	5 mL 200 mM L-Glutamine
	5 mL 10 mM MEM-NEAA
	2,5 mL 1000U Pen/Strep
	3,5 µL 14,3 M 2-Mercaptoethanol
20 % KOSR-Medium	400 mL DMEM/F12
	100 mL KnockOut™ Serum Replacement
	5 mL 200 mM L-Glutamine
	5 mL 10 mM MEM-NEAA
	2,5 mL 1000U Pen/Strep
	3,5 µL 14,3 M 2-Mercaptoethanol

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturtechniken

#### 2.2.1.1 Herstellung des konditionierten Mediums

Bei der Herstellung des konditionierten Mediums wird sich an die SOP Preparation of Conditioned Medium der HEXT Stem Cell Facility gehalten. Zur Herstellung des konditionierten Mediums (CM) werden primäre CF1 embryonale Maus-Fibroblasten (MEF) verwendet. Diese sind die empfohlenen Zellen zur Herstellung von CM. Die MEFs wurden bis Passage 3 kultiviert und dann mit Mitomycin C (10 µg/mL) für zweieinhalb bis drei Stunden mitotisch inaktiviert. Circa eine Stunde bevor mit den Zellen weitergearbeitet werden kann, müssen ausreichend T175 Flaschen mit 0,1-prozentiger Gelatine beschichtet und bei 37 °C inkubiert werden. Nachdem die MEF mit Mitomycin C inkubiert wurden, wurde das Medium abgesaugt und gründlich mit PBS gewaschen, damit keine Mediumrückstände in den Kulturschalen verbleiben. Diese würden das anschließende Lösen der Zellen mit Trypsin/EDTA erschweren. Es wurden pro Schale 5 mL Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und für ungefähr fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Zwischendurch wurde mittels Mikroskop überprüft, wie weit die Zellen sich bereits vom Schalenboden gelöst haben, da zu langes Einwirken des Trypsin/EDTA auf die Zellen schädliche Auswirkungen haben kann. Haben sich die Zellen ausreichend gelöst, wurde pro Kulturschale mit 10 mL MEF-Medium gestoppt und die Zellen in 50 mL konische Röhren überführt, um sie mit der Thermo Heraeus Multifuge X3R und dem Rotor 1724 bei 300 g für fünf Minuten zu zentrifugieren. Die Zellen werden mit DPBS resuspendiert und in einem 50 mL konischen Röhren zusammengeführt. Damit im Anschluss pro T175 Flasche  $0,9-1,0 \times 10^7$  Zellen als Passage 4 ausgesät werden können, werden die Zellen mit der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen werden erneut zentrifugiert und in ausreichend MEF-Medium resuspendiert, auf die T175 Flaschen verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wird das MEF-Medium abgesaugt, die Zellen erhalten 70 mL hES-Medium und werden über Nacht inkubiert. Den nächsten Tag wird das nun konditionierte Medium aus den T175 Flaschen mit einer 25 mL serologischen Pipette in einer Vakuumfiltrationseinheit (0,22 µm) gesammelt und den Zellen erneut 70 mL hES-Medium gegeben und über Nacht inkubiert – dieser Vorgang wiederholt sich sieben bis zehn Tage lang. Das so erhaltene CM kann bei -80 °C für eine spätere Verwendung gelagert oder für den sofortigen Gebrauch filtriert werden. Bevor

das CM verwendet werden kann, muss ihm bFGF in der finalen Konzentration 15 ng/mL zugesetzt werden. Das Medium kann nun für ein bis zwei Wochen bei 4 °C gelagert werden.

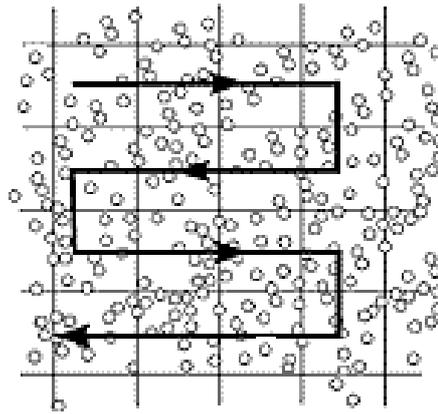
### 2.2.1.2 Beschichten der Kultivierungsgefäße

Für Matrigel beschichtete Wells wurde das Matrigel 1/60 mit kaltem DMEM/F12 verdünnt und zügig im Well verteilt. Die Kulturgefäße wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Matrigel abgesaugt und Medium in den Wells vorgelegt.

Für Gelatine beschichtete Wells bzw. Flaschen wurde eine 0,1-prozentige Gelatinelösung aus Gelatine und destilliertem, sterilem Wasser hergestellt. In die Wells bzw. Flaschen wurde die Gelatinelösung gegeben, sodass der Boden bedeckt ist. Anschließend wurden die Kultivierungsgefäße für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.1.3 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Die Zellen wurden in einer definierten Menge Medium gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden 10 µL der Zellsuspension abgenommen und mit 10 µL Trypanblau gemischt, um die lebenden von den toten Zellen zu unterscheiden. 10 µL dieses Gemisches wurden zwischen Zählkammer und Deckgläschen pipettiert. Je Probe wurden die vier großen Quadrate (siehe **Abbildung 5** Darstellung des Zählvorganges in einem Quadrat der Neubauer-Zählkammer **Abbildung 5**) mit einer zehnfachen Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt. Durch Bildung des Mittelwertes dieser Zählung und der Multiplikation mit  $1 \times 10^4$  konnte die Zellzahl pro Milliliter bestimmt werden – siehe Gleichung **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** Sollte die Zellsuspension verdünnt sein, muss der Verdünnungsfaktor wie in Gleichung **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** mit berücksichtigt werden. Multipliziert mit der Menge definierten Mediums wurde die Gesamtzellzahl ermittelt.



**Abbildung 5** Darstellung des Zählvorganges in einem Quadrat der Neubauer-Zählkammer.

$$Z_{mL} = \bar{Z} \times v \times 10^4 mL^{-1} \quad 2.1$$

$Z_{mL}$  = Zellzahl pro Milliliter

$\bar{Z}$  = Mittelwert der ausgezählten Quadrate

$v$  = Verdünnungsfaktor

$10^4$  = Faktor

#### 2.2.1.4 Zellzählung mittels CASY Cell Counter

Nach gleichmäßiger Verteilung der zu zählenden Zellen in ihrem Medium wurden 10  $\mu$ L der Zellsuspension in 10 mL isotonische Kochsalzlösung gegeben und mit dem CASY Cell Counter gezählt. Das Gerät nutzt ein elektrisches Feld, in dem mehrkanalig die lebenden und die gesamten Zellen gezählt werden. Die Lebensfähigkeit der Zellen wird anhand der Integrität der Plasmamembran beurteilt. Wenn die Zelle intakt ist, kann der elektrische Strom nicht durch Membran fließen, die wie ein Isolator wirkt, wohingegen bei toten Zellen diese Isolation nicht mehr besteht. Dies ist das Kriterium, um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. Als Ergebnis wird die totale Zellzahl, die lebend Zellzahl in Zellen pro Milliliter und die lebend Zellzahl in Prozent angegeben.

#### 2.2.1.5 Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung der humanen mononukleären Zellen erfolgte zunächst auf beschichteten und auf unbeschichteten Wells. Da es sich bei mononukleären Zellen um Suspensionszellen

handelt, wurden die Wells mit einem Anti-CD3 monoklonalen Antikörper beschichtet – einerseits, um sie CD3 zu aktivieren, und andererseits, um sie an den Boden der Wells zu binden. Des Weiteren wird dem Medium der PBMCs vor der Transduktion Interleukin-2 (IL-2) beigemischt, um sie zu aktivieren und ihre Proliferation zu verbessern (Seki *et al.* 2012). Für die Vorversuche wurden die Zellen in 96 Well TPP Test Platten kultiviert.

Alle Zellen in diesem Projekt wurden in einen Inkubator bei 37 °C und einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.2.1.6 Passagieren der induzierten pluripotenten Stammzellen

Das Passagieren der induzierten pluripotenten Stammzellen wurde immer nach der SOP „Passaging of human induced pluripotent stem cells (hiPCs)“ von der HEXT Stem Cell Facility durchgeführt. Im Allgemeinen wurden die Zellen geteilt, wenn die pluripotenten Stammzellkolonien zu dicht oder zu groß geworden sind oder wenn vermehrt Differenzierungen auftraten. Das Teilungsverhältnis ist variabel, obwohl in der Regel von 1 : 2 bis 1 : 4 ausgegangen wurde.

Die folgende Beschreibung der Durchführung erfolgt am Beispiel von 6-Well-Platten, bei kleineren Wachstumsflächen wurden dementsprechend weniger Matrigel, EDTA und Medium verwendet. Nach morphologischer Begutachtung der Zellen wurde entschieden, in welchem Verhältnis die Zellen passagiert werden sollen, und die entsprechenden Wells nach der Methode 2.2.1.2 mit Matrigel vorbereitet. Nach der Inkubationszeit wurde das Matrigel abgesaugt und 1 mL CM in den Wells vorgelegt. Die zu passagierenden Wells der Zellen wurden zwei Mal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde 1 mL EDTA (0,5 mM, pH 8,0, auf Raumtemperatur, in kalium- und magnesiumfreiem DPBS) auf die Zellen gegeben und dort für zehn Minuten belassen. Das EDTA wurde anschließend vorsichtig von den Zellen abgesaugt und kräftig das CM auf die Zellen gegeben, sodass sie sich bereits etwas lösten. Je nachdem, in welchem Verhältnis die Zellen passagiert wurden, wurden 2 oder 4 mL CM verwendet. Die Kolonien wurden so schnell wie möglich aus dem Well gelöst, dispergiert und auf zwei oder vier neue Wells verteilt. Das Calcium und das Magnesium im Medium neutralisierten das übrige EDTA. Die Platten wurden mehrmals schnell und kurz, vor und zurück sowie hin und her bewegt, um sicherzustellen, dass die Zellsuspension gut gemischt und die Zellen gleichmäßig auf der Oberfläche des Wells verteilt sind. IPS-Zellen wurden alle zwei bis fünf Tage passagiert, je nach Erscheinungsbild. Die passagierten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung kultiviert und jeden Tag ein Mediumwechsel vorgenommen.

### 2.2.1.7 Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Bei der Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (*peripheral blood mononuclear cell*=PBMC) wurde die bereits standardisierte Methode von Manuela Kolster aus der Immunologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf verwendet. Um die PBMCs zu isolieren, wird den beiden Spendern (E und G) durch einen Berechtigten mittels Standardtechnik Blut direkt in BD Vacutainer® CPT™ System entnommen. Bei nicht sofortiger Weiterverwendung können die CPT-Röhrchen aufrecht bei Raumtemperatur für zwei Stunden gelagert werden. Die CPT-Röhrchen werden acht bis zehn Mal invertiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 1850 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden die CPT-Röhrchen erneut acht bis zehn Mal invertiert. Der Überstand, in dem sich nun das Blutplasma und die mononukleären Zellen befinden, wird in ein 50 mL konisches Röhrchen überführt, in dem sich 40 mL DPBS befinden. Das Röhrchen wird für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 300 g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 4 mL DPBS resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein 15 mL konisches Röhrchen überführt und die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau gezählt. Anschließend wird die Zellsuspension erneut für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 500 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und je nach gewünschter Weiterverwendung das Zellpellet in PBMC-Medium oder in CroyStor® Freezing Medium resuspendiert. Die Zellen werden in der gewünschten Zelldichte ausgesät oder nach standardisierter Methode eingefroren.

### 2.2.1.8 Einfrieren der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Die PBMCs werden mit dem CroyStor® Freezing Medium der Firma Sigma-Aldrich nach Gebrauchsanweisung eingefroren. Es wird eine Einfrierrate von  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$  benötigt, daher wird in diesem Projekt der Mr. Frosty freezing Container von Thermo Scientific verwendet. Der Mr. Frosty wird ca. eine Stunde vor dem Einfrieren der Zellen im Kühlschrank gelagert, um eine Temperatur von  $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  zu gewährleisten. Auch das CroyStor® Freezing Medium wird dauerhaft im Kühlschrank gelagert, um eine Temperatur von  $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  sicherzustellen. Das nach der letzten Zentrifugation der Standardmethode (siehe 2.2.1.7) erhaltene Zellsediment wird in CroyStor® Freezing Medium resuspendiert. Die Zellen werden in 1 mL CroyStor® in der Zelldichte  $0,5\text{--}10 \times 10^6$  Zellen/mL resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen werden in dem vorgekühlten Mr. Frosty freezing Container für zehn Minuten im Kühlschrank inkubiert. Anschließend werden die Kryoröhrchen im Mr. Frosty in ein -

80 °C Gefriergerät gebracht und am darauf folgenden Tag in die Gasphase von flüssigem Stickstoff umgelagert.

### **2.2.1.9 Einfrieren der induzierten pluripotenten Stammzellen**

Das Einfrieren der iPS-Zellen wird nach SOP der HEXT Stem cell facility durchgeführt. Die verwendeten Materialien sind fetales Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*), Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 1 mL Nunc cryo tubes von Thermo scientific. Das Medium wird von den Zellen abgesaugt und das Well zwei Mal mit DPBS gewaschen. Pro sechs Well wird 1 mL EDTA auf die Zellen gegeben und die Zellen für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das EDTA vorsichtig abgesaugt und 2 mL CM auf die Zellen gegeben. Nun müssen die Zellen schnell aus dem Well gelöst werden, da das Calcium und das Magnesium im Medium die Wirkung des EDTA neutralisieren würden. Die Zellen werden in ein konisches Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 200 g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wird das Einfrier-Medium hergestellt. Dafür wird die benötigte Menge FCS mit 10 % DMSO vermischt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und um das Zellpellet zu lösen gegen den Boden des konischen Röhrchen geschneippt. Das wird gemacht, damit die Zellen so kurz wie nötig dem Einfrier-Medium ohne Kühlung ausgesetzt sind, da das Einfrier-Medium DMSO enthält und dieses toxisch auf die Zellen wirkt. Nach dem Anlösen des Zellpellets werden 500 µL kaltes Einfrier-Medium zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension unverzüglich in ein Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen mit den Zellen wird in einen Mr. Frosty freezing Container in ein -80 °C Tiefkühlgerät gestellt, um eine kontrollierte Einfrierrate von -1 °C/Minute zu gewährleisten. Am darauf folgenden Tag werden die bereits gefrorenen Zellen in die Gasphase des Stickstofftanks überführt.

### **2.2.1.10 Auftauen der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut**

Zum Auftauen der eingefrorenen Zellen werden die Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten und anschließend der Inhalt in ein 15 mL konisches Röhrchen überführt, in dem sich die zehnfache Menge warmes PBMC-Medium befindet. Die Zellen werden mit der Neubauer-Zählkammer und Trypanblau gezählt, siehe 2.2.1.3. Während gezählt wird, werden die konischen Röhrchen mit den Zellen für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 300 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden mit PBMC-Medium resuspendiert und in der gewünschten Zelldichte ausgesät. Die Zellen werden im Inkubator bei 37 °C kultiviert.

### 2.2.1.11 Auftauen der induzierten pluripotenten Stammzellen

Die induzierten pluripotenten Stammzellen werden nach SOP der HEXT Stem cell facility aufgetaut. Die Kryoröhrchen werden so lange ins Wasserbad gehalten, bis noch ein Rest Gefrorenes zu sehen ist. Um die Zellen in ein 15 mL konisches Röhrchen zu überführen, wird eine 5 mL serologische Pipette verwendet. Anschließend wird die zehnfache Menge CM des Einfriervolumens tröpfchenweise in das konische Röhrchen gegeben und zum Schluss mit zusätzlich 1 mL CM das Kryoröhrchen ausgespült und in das konische Röhrchen überführt. Das konische Röhrchen mit den Zellen wird bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das konische Röhrchen wird am Boden angetippt, um das Zellpellet zu lösen, und die Zellen werden in CM mit Y-27632 (10 µM) resuspendiert und in die Wells überführt. Anschließend werden die Zellen bei 37 °C kultiviert.

## 2.2.2 Durchflusszytometrie

In diesem Projekt wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes auf ihre CD3 Expression hin untersucht; dafür wurden zwischen 50 000 und 100 000 Zellen/Well an Tag 0 und an Tag 5 analysiert. Durchgeführt wurde die Analyse zu Beginn des Projektes in der Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf von Manuela Kolster mit dem BD FACS CANTO II flow cytometer von BD Biosciences. Da die Zellen in mit OKT3 beschichteten Wells kultiviert werden, um das Wachstum der CD3-Zellen zu stimulieren, bestand die Vermutung, dass der CD3-Rezeptor bereits durch das OKT3 besetzt ist und für die Färbung nicht mehr zugänglich ist. Aufgrund dessen wurden die Zellen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen behandelt und vergleichend gemessen. Für die erste Messung mittels Durchflusszytometrie wurden PBMCs nach der Methode siehe 2.2.1.10 aufgetaut und über Nacht kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde nur mit PBMC-Medium kultiviert, der andere Teil der Zellen wurde in anti-CD3-Antikörper beschichteten Wells und mit unterschiedlichen Interleukin-Konzentrationen kultiviert.

Die erste Messung fand direkt an Tag -5 der Isolierung der PBMCs in PBMC-Medium statt. Die restlichen PBMCs wurden für fünf Tage weiter kultiviert. Nach Waschen mit DPBS wurde einmal nur der sekundäre Antikörper Alexa Fluor 488 Anti Mouse IgG, einmal eine Kombination aus CD2-FITC Mouse anti-human, CD4-PB und CD8-PeCy7 und eine Kombination aus sekundärem Antikörper Alexa Fluor 488, CD4-PB und CD8-PeCy7 verwendet (Kombination und Vorgehensweise siehe auch **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Auf die Proben (Sek-Ak und CD3/4/8) wurden jeweils 20 µL

sekundärer Antikörper Alexa Fluor 488 für 30 Minuten gegeben, auf die Proben CD2/4/8 wurde der gleiche Antikörper nur für 20 Minuten gegeben. Nach dem Waschen wurde die Probe CD3/4/8 für zehn Minuten mit 50  $\mu$ L Mausserum inkubiert, um die unspezifische Bindung der darauf folgenden Antikörper an anderen Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend folgte wieder ein Waschschritt und auf alle Proben wurden 80  $\mu$ L FACS-Puffer und 10  $\mu$ L CD4/8 für 30 Minuten gegeben. Nach zehn Minuten wurde zu den Proben CD2/4/8 10  $\mu$ L CD2-FITC für die restlichen 20 Minuten gegeben. Alle Zellen, die in Okt-3 beschichteten Wells mit 0/50/300 IU/mL IL-2 kultiviert wurden, wurden gemessen. Zusätzlich wurde eine frische Probe PBMCs mit dem sekundären Antikörper gemessen. Auf alle Proben wurde Pacific Orange gegeben, um die lebend/tot Zahl zu bestimmen. Vor der Messung wurde mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen in 250  $\mu$ L FACS-Puffer resuspendiert.

Gemessen wurde die Population der Lymphozyten, davon die einzelnen Zellen und lebenden Zellen und der entsprechende Rezeptor, die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**

**Tabelle 1** Vorgehensweise bei der Durchflusszytometrie, durchgeführt von Manuela Kolster.

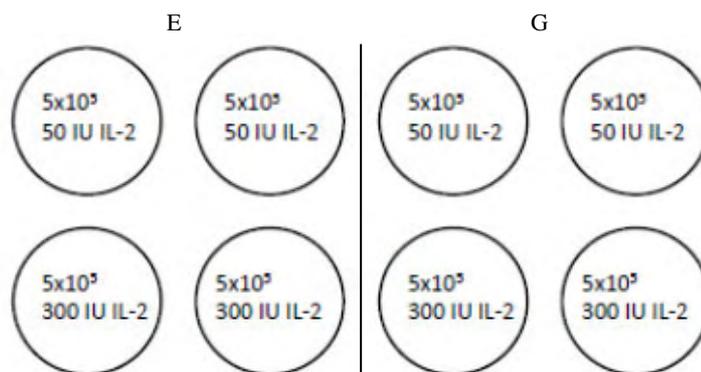
Fluoreszenzfarbstoffkombination	Abkürzung	Vorgehensweise
Sekundär Antikörper Alexa Fluor 488 Anti Mouse IgG 1 : 400	Sek-Ak	30 Min Sek-Ak
CD2-FITC Mouse anti-human	CD2/4/8	20 Min Sek-Ak
CD4-PB		10 Min Mausserum
CD8-PeCy7		20 Min CD2/4/8 Mix
Sekundär Antikörper Alexa Fluor 488 Anti Mouse IgG	CD3/4/8	30 Min Sek-Ak
CD4-PB		10 Min CD4/8 Mix
CD8-PeCy7		
Lebend/tot Pacific Orange	Lebend/tot	1 : 1000 auf alle Proben

Aufgrund dieser Messung konnte bei der späteren Messung, direkt vor der Transduktion mit dem CytoTune™-iPS Reprogramming Kit, auf die Kombination der verschiedenen

Antikörper verzichtet und nur mit dem sekundär Antikörper Alexa Fluor 488 gemessen werden.

### 2.2.3 Transduktion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit Sendai-Virus

Die PBMCs werden, wie in der Methode siehe 2.2.1.7, isoliert. Es werden 4 x 2 Wells von vier 24-Well-Platten mit 10 µg/mL Okt-3 anti-CD3 Antikörper in DPBS beschichtet und für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt werden die Zellen in PBMC-Medium zu der Zellkonzentration 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL resuspendiert. Bevor die Zellen auf die Wells verteilt werden, muss die Antikörperlösung abgesaugt und das Well mit DPBS gewaschen werden. Nun werden pro Donor in 2 x 4 Wells zweier 24-Well-Platten 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well ausgesät. In die bereits beschichteten Platten wird nur PBMC-Medium mit entsprechender IL-2 Konzentration gegeben, in die nicht beschichteten PBMC-Medium mit entsprechender IL-2 Konzentration und 10 ng/mL anti-CD3 Antikörper. Pro Donor ist eine Platte für die Infektion mit dem Sendai-Virus und die andere Platte für die Analyse, die an Tag -1 stattfinden wird, vorgesehen – siehe Abbildung 6.



**Abbildung 6** Pro Donor vier Wells einer 24-Well-Platte für die Analyse an Tag -1 mit links zwei Wells mit 10 µg/mL anti-CD3 Antikörper gecoatet, rechts zwei Wells mit 10 ng/mL gelösten anti-CD3 Antikörpern und der jeweiligen IL-2 Konzentration. Für die Transduktion an Tag 0 noch einmal vier Wells mit denselben Bedingungen.

Die restlichen PBMCs wurden nach der Methode 2.2.1.8 eingefroren. Am Tag -1 werden die Zellen der Analyse-Platte durch vorsichtiges Spülen mit Medium aus den Wells gelöst. Zur Bestimmung der Proliferation werden die Zellen gezählt (siehe 2.2.1.3). Die restlichen Zellen des entsprechenden Wells werden für die Durchflusszytometrie vorbereitet und anschließend mit dem FACS CANTO II von BD analysiert, um den T-Lymphozyten Anteil zu bestimmen. Am Tag der Transduktion, Tag 0, wurden die PBMCs gesammelt und nach 2.2.1.3 gezählt. Die Zellen wurden in der Thermo Heraeus Multifuge X3R und dem Rotor 1724 bei 200 g für fünf Minuten zentrifugiert. Die so erhaltenen Zellpellets wurden mit PBMC-Medium, welchem 50 IU IL-2 und 4 µg/mL Polybrene zugesetzt worden ist, zu einer Zellzahl von  $8,3 \times 10^5$  Zellen/mL resuspendiert. Pro Donor wurden drei Wells mit jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen ausgesät und mit MOI 1, MOI 3 und MOI 6 transduziert. Dafür wurde die benötigte Menge an CytoTune™ Sendai hX (X= Oct3/4, Sox2, Klf4 oder c-Myc) berechnet, da jede Produktion einen anderen Virus Titer hat (siehe **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.**).

**Tabelle 2** Titer des CytoTune™ -iPS Reprogramming Kit von Life Technologies, mit der Lot. No. 1264008A.

Komponente	Titer (IU/mL)
CytoTune™ Sendai hOct3/4	$6,5 \times 10^7$
CytoTune™ Sendai hSox2	$6,2 \times 10^7$
CytoTune™ Sendai hKlf4	$6,9 \times 10^7$
CytoTune™ Sendai hc-Myc	$9,0 \times 10^7$

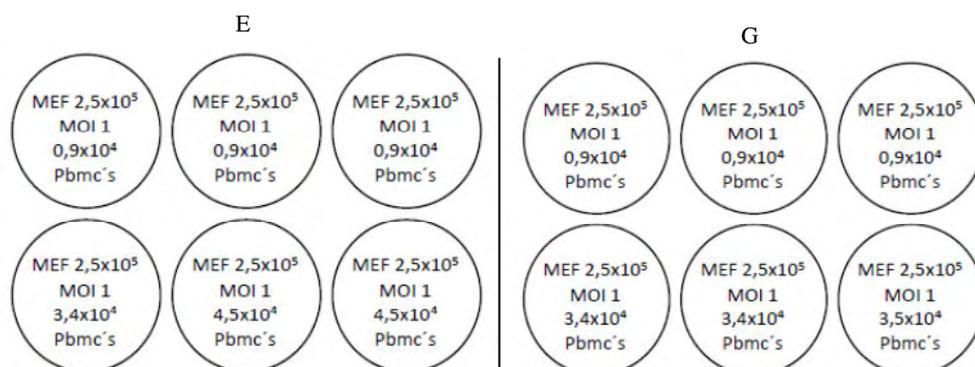
Da das Kit aufgebraucht werden muss und es nicht wieder eingefroren werden kann, wurde ein 25-facher Ansatz gemacht und anschließend die entsprechende Menge Mix für die jeweilige MOI auf die Zellen gegeben, siehe **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.** Anschließend wurden die PBMCs über Nacht bei 37 °C im Inkubator inkubiert.

**Tabelle 3** Berechnete Menge, die pro Vektor CytoTune verwendet werden muss, um mit entsprechender MOI zu transduzieren.

	MOI 1	MOI 3	MOI 6	25x Ansatz
Oct3/4	3,9 µL	11,71 µL	23,42 µL	97,5 µL
Sox2	4,0 µL	12,0 µL	24,0 µL	100,0 µL
Klf4	3,6 µL	10,8 µL	21,6 µL	90,0 µL
c-Myc	2,8 µL	8,4 µL	16,8 µL	70,0 µL

Mix	14,3 $\mu\text{L}$	42,91 $\mu\text{L}$	85,82 $\mu\text{L}$
-----	--------------------	---------------------	---------------------

Einen Tag nach der Transduktion muss das Virus und das Polybrene von den Zellen heruntergewaschen werden, da es eine toxische Wirkung auf die Zellen haben kann. Dafür wurden die PBMCs in ein 15 ml konisches Röhrchen überführt und mit der Thermo Hereaus Multifuge X3R und dem Rotor 1724 bei 200 g für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die PBMCs in PBMC-Medium mit 50 IU IL-2 resuspendiert und erneut über Nacht inkubiert. Am selben Tag wurde für jeden Donor eine 6-Well-Platte mit 0,1 % Gelatine beschichtet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde pro Platte ein Kryoröhrchen mit inaktivierten MEF ( $3 \times 10^6$  Zellen/Röhrchen) analog zu der Methode 2.2.1.10 aufgetaut und gleichmäßig auf die Wells verteilt ( $\sim 2,5 \times 10^5$  Zellen/Well) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am zweiten Tag nach der Transduktion wird das Replating der transduzierten PBMCs durchgeführt. Dafür wurden die transduzierten PBMCs nach der Methode 2.2.1.3 gezählt. Gleichzeitig wurden die Zellen mit der Thermo Hereaus Multifuge X3R und dem Rotor 1724 bei 200 g für fünf Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit PBMC-Medium mit 50 IU IL-2 resuspendiert und wie in Abbildung 7 zu sehen ausgesät.



**Abbildung 7** Generationsplatten des Donor E (links) und des Donor G (rechts). Dargestellt ist die Anzahl der MEF-Zellen und die Anzahl der PBMCs bei den verschiedenen MOIs. Die MEF-Zellen wurden einen Tag vor dem Replating ausgesät, die PBMCs am Tag des Replating.

Zwei Tage nach dem Replating wurde den Zellen 2 mL PBMC-Medium mit 50 IU IL-2 gegeben. Das alte Medium wurde nicht abgesaugt, damit die Zellen ausreichend Zeit haben, auf den MEF-Zellen zu adhären. Wieder zwei Tage später wurde das Medium abgesaugt

und durch hES-Medium ersetzt. Dadurch, dass die Zellen auf MEF-Zellen wachsen, erhalten sie alles, was sonst auch in CM enthalten wäre. Von nun an findet jeden Tag ein Mediumwechsel statt und die Wells werden nach iPS-Klonen unter dem Mikroskop abgesucht.

29 Tage nach dem Replating wird das hES-Medium gegen konditioniertes Medium (CM) getauscht, da die MEF nach einer gewissen Zeit nicht mehr in der Lage sind, die benötigten gelösten Faktoren in das Medium zu sekretieren, die für den Erhalt der Pluripotenz benötigt werden. Da es sich bei ihnen um Suspensionszellen handelt, wird durch die Kultivierung in beschichteten Wells und anschließend auf MEF eine gewisse Adhärenz erreicht. Da die Adhärenz der Zellen gewünscht ist und die Zellen im weiteren Verlauf der Reprogrammierung zu iPS-Zellen adhärent werden, werden sie in Zellkultur-Multiwellplatten statisch kultiviert.

#### **2.2.4 Isolierung der iPS-Klone aus den Generationsplatten**

Drei Wochen nach der Transduktion wurden zum ersten Mal Klone gepickt. Für jeden Klon wurde vor dem Picken ein Well einer 24-Well-Platte mit Matrigel beschichtet (siehe 2.2.1.2). Um wirklich nur den Klon und keine anderen Zellen aus der Generationsplatte ins Well zu transferieren, wurde das EVOS fl Mikroskop von AMG unter die Sicherheitswerkbank gestellt, um Kontaminationen zu verhindern. Das überschüssige Medium aus den Wells wurde abgesaugt und 500  $\mu$ L CM, mit 10  $\mu$ M Y-27632 (ROCK-Inhibitor), vorgelegt. Der entsprechende Klon wird mit einer 100  $\mu$ L Pipette aus der Platte isoliert, möglichst vollständig aufgesaugt und in das Well der 24-Well-Platte überführt. Die Klone wurden über Nacht inkubiert und ab dann fand jeden Tag ein Mediumwechsel statt. Nach einiger Zeit, werden sie in 12-Well- und anschließend in 6-Well-Nunc-Platten expandiert, wo sie weiter bis zu einer höheren Passage kultiviert werden. Die Zellen werden auf Matrigel oder inaktivierten MEF kultiviert und wachsen adhärent. Die Zellen, die auf Matrigel kultiviert werden, erhalten CM, die Zellen, die auf MEF kultiviert werden, erhalten hES-Medium

#### **2.2.5 Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung**

Um nachweisen zu können, dass die Zellen frei von genomischer Integration sind, werden zunächst Proben der zu untersuchenden Zellen einer niedrigeren und einer höheren Passage genommen (ca. Passage fünf und zehn). Die Zellen werden mit EDTA geerntet (siehe

2.2.1.6). Die Zellsuspension wird in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und für einige Minuten mittels Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren, da es nicht möglich ist, von mehreren Klonen gleichzeitig die niedrige und die hohe Passage als Probe zu nehmen und Proben alle gleich behandelt werden müssen, um die Ergebnisse vergleichen zu können.

### 2.2.5.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Nachdem ausreichend Proben gesammelt sind, wird zunächst die RNA aus den Proben isoliert, mit dem peqGOLD Total RNA Kit von Peqlab. Das Zellpellet wurde in 400 µL Lysis-Puffer lysiert und die RNA gemäß dem Manual des peqGOLD Total RNA Kit isoliert. Anschließend wurde mittels NanoDrop die RNA-Konzentration ermittelt, da bei der anschließenden Synthetisierung 1 µg total RNA verwendet werden soll (laut Instruktionen des CytoTune™-iPS Reprogramming Kit). Die cDNA-Synthese wird gemäß Protokoll des High Capacity RNA to cDNA Kit durchgeführt.

### 2.2.5.2 PCR zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung

Die PCR zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung wurde mit der DreamTaq DNA Polymerase von Thermo Scientific durchgeführt. Die PCR wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt, allerdings wurde anstelle eines 50 µL Ansatzes pro Probe ein 20 µL Ansatz gemacht und die zu verwendenden Bestandteile dementsprechend reduziert (siehe **Tabelle 5**). Anstelle der Zykler-Konditionen, die im Protokoll des DreamTaq DNA Polymerase Kits stehen, werden die Bedingungen, die in den Instruktionen des CytoTune™-iPS Reprogramming Kit von Life Technologies stehen, verwendet (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) und während des Projektes angepasst (siehe **Tabelle 7**). Des Weiteren wurden die Primer verwendet, die in den Instruktionen des CytoTune™-iPS Reprogramming Kit von Life Technologies stehen (Tabelle 4). Nach der PCR wurden die Proben auf einem 2 % Agarosegel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch bei 100 V für eine Stunde aufgetrennt und analysiert.

**Tabelle 4** Die folgende Tabelle zeigt die PCR-Primer zum Nachweis des SeV Genoms und der Transgene in Zellen, die mit den CytoTune™ Sendai Reprogrammierungs-Vektoren reprogrammiert wurden. \* Primer enthält Sendai-Vektor (SeV) Genom-Sequenzen. Paarung dieser Primer mit Transgenspezifischem Primer ermöglicht den spezifischen Nachweis von Transgenen, die durch die Reprogrammierung mit CytoTune™ Sendai-Vektoren eingebracht werden. Zum Nachweis von Sox2, Klf2 und Oct3 /4 wird der gleiche Reverse-Primer verwendet.

Ziel	Primer Sätze	Produkt Größe
SeV	Forward: GGA TCA CTA GGT GAT ATC GAG C*	181 bp

	Reverse: ACC AGA CAA GAG TTT AAG AGA TAT GTA TC*	
Sox2	Forward: ATG CAC CGC TAC GAC GTG AGC GC Reverse: AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA*	451 bp
Klf4	Forward: TTC CTG CAT GCC AGA GGA GCC C Reverse: AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA*	410 bp
c-Myc	Forward: TAA CTG ACT AGC AGG CTT GTC G* Reverse: TCC ACA TAC AGT CCT GGA TGA TGA TG	532 bp
Oct3/4	Forward: CCC GAA AGA GAA AGC GAA CCA G Reverse: AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA*	483 bp

**Tabelle 5** Die folgende Tabelle zeigt die Komponenten, die für die PCR mit der DreamTaq DNA Polymerase verwendet wurden.

Komponenten	50 µL Ansatz	20 µL Ansatz
10x DreamTaq Puffer	5 µL	2 µL
dNTP Mix, 2 mM	5 µL	2 µL
Forward Primer (10 pmol)	0.1-1.0 µM	1 µL
Reverse Primer (10 pmol)	0.1-1.0 µM	1 µL
DNA Template	10 pg - 1 µg	1 µL
DreamTaq DNA Polymerase (5 IU/µL)	1.25 U	1 µL
Nekleasefreies Wasser	to 50 µL	12 µL
Total volume	50 µL	20 µL

**Tabelle 6** PCR-Bedingung, laut Instruktion des CytoTune™-iPS Reprgramming Kit.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	30-35
Annealing	55 °C	30 Sekunden	
Elongation	72 °C	30 Sekunden	

**Tabelle 7** PCR-Bedingung nach der Optimierung der PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	35
Annealing	55 °C	30 Sekunden	

---

Elongation	72 °C	60 Sekunden
------------	-------	-------------

---

### 2.2.6 Alkalische Phosphatase-Färbung

Die alkalische Phosphatase-Färbung ist eine Methode zur Identifizierung von induzierten pluripotenten Stammzellen, da diese und undifferenzierte embryonale Stammzellen ein hohes Level dieses Enzyms vorweisen. Diese Färbung dient der Kontrolle, ob es sich wirklich um induzierte pluripotente Stammzellen handelt. Die alkalische Phosphatase-Färbung kann durchgeführt werden, sobald die Zellen eine einigermaßen stabile Passage erreicht haben. In diesem Projekt ist die Färbung nach dem Expandieren in ein sechs Well, ca. bei Passage 4–6, vorgenommen worden. Während der Passage wird ein kleiner Teil der iPS-Zellen in zuvor mit Matrigel beschichteten 4-Well-Multiplatten ausgesät. Die 4-Well-Multiplatten werden bis zu einer ausreichenden Zelldichte kultiviert und anschließend fixiert. Dafür wurden die Zellen einmal mit DPBS gewaschen, 15 Min. 300 µL 4 % Paraformaldehyd inkubiert und drei Mal für fünf Minuten mit DPBS gewaschen sowie mit DPBS gefüllt und mit Parafilm abgedichtet bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die alkalische Phosphatase-Färbung wurde mit einem Kit von Sigma-Aldrich durchgeführt; dafür wurden zunächst 1 mL der Natrium Nitrite Lösung und 1 mL der FRV-Alkaline Lösung gemischt und für zwei Minuten inkubiert. Zu diesem Mix wurden 45 mL destilliertes Wasser und 1 mL der Naphthol AS-BI Alkaline Lösung gegeben. Pro Well einer 4-Well-Multiplatte wurden 0,25 mL dieses Mix benötigt. Wenn weniger Mix benötigt worden ist, wurden die entsprechenden Bestandteile in geringerer Menge zusammengemixt. Nach einmaligem Waschen mit Wasser wurden 0,25 mL des Mix in die Wells gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Mix abgesaugt, die Wells zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend an der Luft trocknen gelassen. Anschließend kann die mikroskopische Auswertung vorgenommen werden.

### 2.2.7 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbung wurde mit dem StemLite™ Pluripotency Kit von Cell Signaling durchgeführt. Mit dieser Färbung werden bestimmte Proteine mithilfe von Antikörpern detektiert, deren Expression spezifisch für humane pluripotente Stammzellen ist. Die isolierten Klone wurden wie in der Methode 2.2.1.6 passagiert und in ein mit Matrigel

beschichtetes Well eines Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ System 8 Well ausgesät. Ein Klon wurde in vier Wells eines Chamber Slides ausgesät und weiter wie in der Methode 2.2.6 behandelt, bis zur Lagerung bei 4 °C. Da die Zellen einige Zeit bei 4 °C gelagert wurden, wurde vor der Färbung noch einmal mit DPBS gewaschen. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in Tabelle 8 dargestellt. Nach dem Waschschrift wurde für eine Stunde eine Block-Lösung in die Wells gegeben, bestehend aus 5 % normalem Ziegen Serum, 0,3 % Triton X-100 in DPBS. Dies wurde durchgeführt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Über Nacht wurde der erste Antikörper-Mix auf den Zellen im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde nach drei Mal fünf Minuten Waschen mit DPBS der zweite Antikörper-Mix für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert und wieder drei Mal für fünf Minuten mit DPBS gewaschen. Zuletzt wurde mit Fluoromount-G ein 24 x 60 mm Deckgläschen auf den Objektträger geklebt und bei 4 °C bis zur Auswertung gelagert. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden bei der Microscopy Imaging Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

**Tabelle 8** Antikörperlösungen und ihre Zusammensetzung.

Antikörper 1.1 Lösung	Verdünnungsfaktor
Oct-4A	1 : 500
TRA-1-60 (S)	1 : 500
Antikörper 1.2 Lösung	Verdünnungsfaktor
Sox2 (DCD9) XP rabbit mAB	1 : 200
TRA-1-81 mouse mAB	1 : 200
Antikörper 1.3 Lösung	Verdünnungsfaktor
Nanog Antikörper	1 : 200
SSEA4 mouse mAB	1 : 200
Antikörper 2.1 Lösung	
Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG	1 : 500
Alexa Flour 488 goat anti-Mouse IgM $\mu$ chain	1 : 500
DAPI	1 : 1000

---

**Antikörper 2.2 Lösung**

---

Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG	1 : 500
Alexa Flour 488 goat anti-Mouse IgM $\mu$ chain	1 : 500
DAPI	1 : 1000

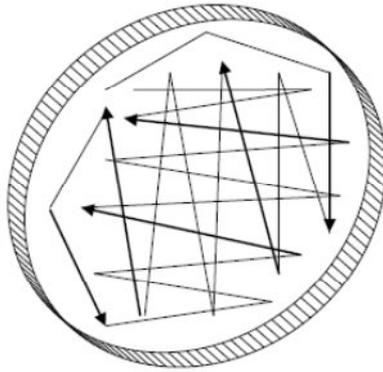
---

## 2.2.8 Ausbildung von embryonalen Körperchen

Embryonale Körperchen (EB=*Embryoid bodies*) sind Aggregate von pluripotenten Zellen, die in Suspension in Abwesenheit von selbsterneuerungsfördernden Faktoren gebildet werden. Nach deren Aggregation können sich diese Zellen in verschiedene Zelltypen differenzieren, bestenfalls in die drei Keimblätter der frühen Embryonalentwicklung.

### 2.2.8.1 Embryonale Körperchen Bildungs-Protokoll

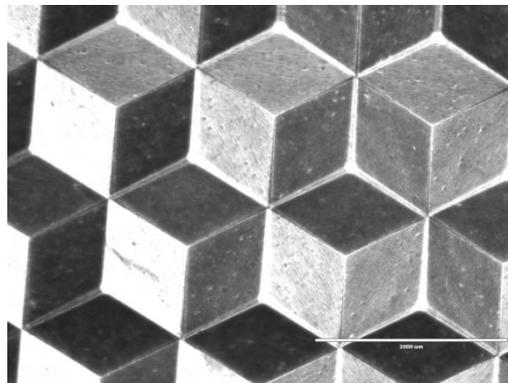
Mindestens einen Tag vor der Durchführung werden T75 Flaschen oder T25 Flaschen mit einprozentigem Pluronic® beschichtet und über Nacht inkubiert. Eine T75 Flasche ist ausreichend für fünf bis sechs Wells mit Zellen, eine T25 Flasche für drei Wells. Bevor mit der Bildung der EBs begonnen werden kann, müssen die benötigten Flaschen drei Mal mit reichlich DPBS gewaschen werden. Beim dritten Mal wird das DPBS in den Flaschen belassen, damit die beschichtete Oberfläche nicht austrocknet. Für die Bildung von EBs werden iPS-Zellen in einer 6-Well-Platte bis zur Konfluenz von 70–90 % kultiviert. Die Zellen werden einmal mit 2 mL DPBS gewaschen und für 15 bis 20 Minuten bei 37 °C mit 1 mL Collagenaselösung inkubiert. Sobald die Zellen sich abzulösen beginnen, wird die Collagenaselösung abgesaugt und die Zellen einmal mit DPBS gewaschen. In jedes Well wird 1 mL CM mit 10  $\mu$ M Y-27632 (ROCK-Inhibitor) zugegeben. Die Zellen werden sehr vorsichtig mit der Spitze einer 5 mL serologischen Pipette in einem bestimmten Muster, wie in Abbildung 8 zu sehen, vom Boden der Wells gekratzt. Der Rest der Zellen wird mit einem Zell-Schaber abgelöst. Die iPS-Zellstücke dürfen für die Bildung der EBs nicht zu groß und nicht zu klein sein. Das DPBS aus den Flaschen wird abgesaugt und die Zellen in die Flaschen überführt. Die Wells werden mit CM(+Y) gründlich gespült und in die Flaschen überführt und die Flaschen auf das entsprechende Endvolumen (T25/10 mL, T75/15-20 mL) mit CM(+Y) aufgefüllt. Die Flaschen wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert, um anschließend mit dem Differenzierungsprotokoll weiterverfahren zu können.



**Abbildung 8** Schematische Darstellung des Musters, in dem die iPS-Zellen für die EB-Formation vom Wellboden gekratzt werden.

### 2.2.8.2 Forced Aggregation

Die Forced Aggregation ist eine Methode zur Bildung reproduzierbarer und gleichmäßiger embryonaler Körperchen, analog zur AggreWell-Technologie der Firma Stemcell Technologies. Für diese Methode wurden sogenannte Mikrokavitätenoberflächen (MKO) aus Silikon verwendet, welche in 6-Well-Platten passen (eigene Herstellung, zur Verfügung gestellt vom Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie), siehe Abbildung 9.



**Abbildung 9** Dargestellt ist die Oberfläche der MKO-Plättchen, aufgenommen mit dem Evos fl Mikroskop in der Vergrößerung 2 x. Deutlich zu erkennen die Vertiefung, in die die iPS-Zellen sinken und sich zu EBs zusammenlagern.

Die Vorbereitung der Wells wurde einen Tag vor der Forced Aggregation durchgeführt. Um die MKO in den Wells zu fixieren, wurde 2,5  $\mu\text{L}$  Fibrinogen pro 100  $\mu\text{L}$  DMEM/F12 gemischt und in jedes 6 Well 250  $\mu\text{L}$  der Lösung gegeben. In die Mitte der Lösung wurden anschließend 2  $\mu\text{L}$  Thrombin gegeben und die MKO-Plättchen in die Wells gedrückt. Durch die Zugabe des Thrombin polymerisieren das Thrombin und das Fibrinogen zu einem

Polymer, das die MKOs am Boden der Wells hält. Es muss darauf geachtet werden, dass unter den Plättchen keine Luftblasen sind, da sich diese sonst zu einem späteren Zeitpunkt lösen könnten. Zum Schluss wurden in jedes Well 2 mL 5% Pluronic® gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Bildung von EBs mit der Forced Aggregation werden iPS-Zellen in einer 6-Well-Platte bis zur Konfluenz von 70–90 % kultiviert. Die iPS-Zellen wurden drei Mal mit DPBS gewaschen und mit 1 mL EDTA für zehn Minuten inkubiert. Nach Absaugen des EDTA wurden die Zellen zügig mit DPBS vom Wellboden gelöst und wie in 2.2.1.4 beschrieben gezählt. Anschließend wurden die Zellen mit der Thermo Heraeus Multifuge X3R und dem Rotor 1724 für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert und mit CM (+Y) zu der Zelldichte  $1 \times 10^6$  Zellen/mL resuspendiert. Nach Absaugen des 5 % Pluronic® und drei Mal Waschen mit ausreichend DPBS wurden 2 mL CM (+Y) vorgelegt. Anschließend wurden 2 mL der Zellsuspension gleichmäßig in den Wells verteilt, sodass sich in jedem Well  $2 \times 10^6$  Zellen befanden, und die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Tag der Forced Aggregation wurden T75 Flaschen mit 1 % Pluronic® beschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden zunächst die T75 Flaschen drei Mal mit reichlich DPBS gewaschen und etwas CM (+Y) vorgelegt, da die Flaschen nicht trocken werden durften. Aus den Wells wurde vorsichtig das Medium abgesaugt und mit einer 1000 µL Pipette und CM (Y+) die aggregierten iPS vorsichtig aus den Vertiefungen gespült. Das Überführen der aggregierten iPS in die T75 Flasche wurde mit einer 5 mL serologischen Pipette vorgenommen, um die Aggregation nicht wieder zu zerstören. Anschließend wurden die T75 Flaschen bei 37 °C inkubiert und mit dem Differenzierungsprotokoll weiterverfahren.

### 2.2.8.3 Differenzierungsprotokoll

Mit den embryonalen Körperchen aus den Methoden *Embryoid body formation protocol* und der *Forced Aggregation* wurde anschließend das Differenzierungsprotokoll durchgeführt. Hierfür wurde alle zwei Tage das konditionierte Medium gewechselt, indem die Flasche für fünf Minuten in einen Ständer gestellt wurde, sodass die EBs zum Grund der Flasche sinken können und andere Schwebestoffe beim Mediumwechsel mit entfernt werden. Nach sieben bis acht Tagen wurden die EBs in 4-Well-Multiplatten überführt, die Wells wurden zuvor mit einem kleinen Deckgläschen versehen und mit Matrigel gecoatet. Die EBs aus den Flasche wurden in 15 mL konische Röhrchen überführt und fünf Minuten in den dazugehörigen Ständer gestellt, bis alle EBs zum Boden des konischen Röhrchens gesunken waren. Das Medium wurde abgesaugt und die EBs in ausreichend 20 % KOSR-Medium resuspendiert,

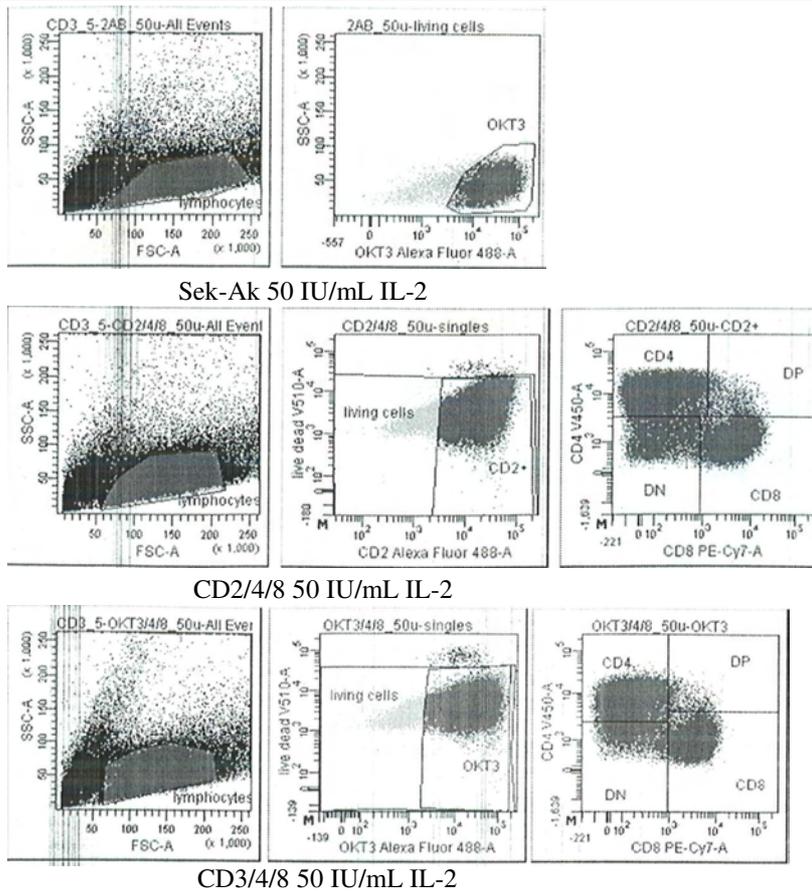
sodass pro Well ca. 200 bis 300  $\mu\text{L}$  Medium mit EBs gleichmäßig in die Mitte kamen. Anschließend wurde die eine Hälfte der Wells mit 20 % KOSR-Medium aufgefüllt, die andere Hälfte mit 20 % FCS-Medium. Sobald die EBs angeheftet (engl. *attached*) waren, wurde am darauf folgenden Tag sowie jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen, bis die EBs nach ca. zwei bis vier Wochen spontan differenzierten.

## 3 Ergebnisse

Im folgenden Teil werden die einzelnen Ergebnisse der Vorversuche, der Kultivierung der PBMCs, der anschließenden Transduktion bis zur Charakterisierung der iPS-Zellen dargestellt.

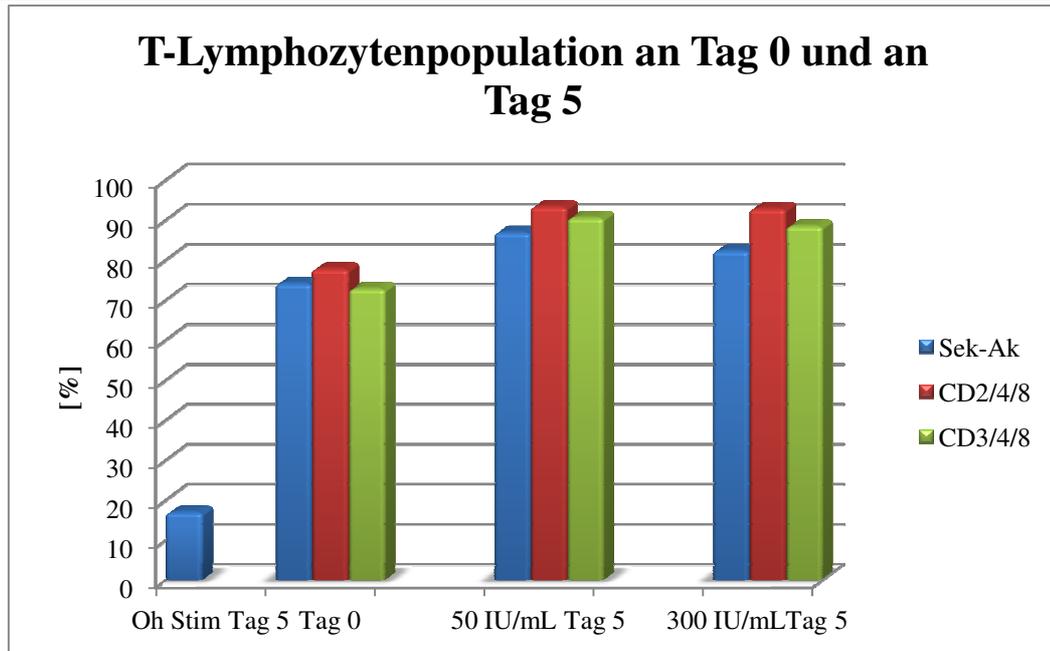
### 3.1 Ermittlung eines geeigneten Antikörpers zum Nachweis der CD3+ T-Lymphozyten

Zunächst soll getestet werden, welche Antikörper sich zum Nachweis der CD3+ T-Lymphozyten eignen, da die Vermutung bestand, dass der CD3-Rezeptor bereits während der Kultivierung durch den Okt-3 anti CD3 Antikörper besetzt wird. Zur Verfügung standen die folgenden Möglichkeiten, nur der sekundär Antikörper Alexa Fluor 488 Anti Mouse IgG (Sek-Ak), CD2-FITC Mouse anti-human/CD4-PB/CD8-PeCy7 (CD2/4/8) und sekundär Antikörper Alexa Fluor 488 Anti Mouse IgG/CD4-PB/CD8-PeCy7 (CD3/4/8). Im Folgenden sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Ermittlung der geeigneten Antikörperkombination für den Nachweis der CD3+ T-Lymphozyten der PBMCs dargestellt. Die Zellen wurden wie in 2.2.2 beschrieben an Tag 0 und Tag 5 behandelt. Bei der Durchflusszytometrie wurden 50 000 nicht stimulierte Zellen und 100 000 stimulierte Zellen gemessen. Von allen Proben wurde die Lymphozytenpopulation identifiziert, von den einzelnen die lebenden und von den lebenden Lymphozyten wiederum die CD3+ bzw. CD2+ T-Lymphozyten. Das Setzen der verschiedenen Gates ist auf Grundlage der Erfahrungen von Manuela Kolster aus der Immunologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt worden.



**Abbildung 10** Dot Plot aus der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die *Dot Plots* von den Zellen, die mit 50 IU/mL IL-2 kultiviert und mit den verschiedenen Antikörperkombinationen gemessen wurden. Ganz oben ist das *Dot Plot* nur mit sekundären Antikörpern, in der Mitte das *Dot Plot* der Antikörperkombination CD2/4/8 und ganz unten das *Dot Plot* der Antikörperkombination CD3/4/8 zu sehen. Gegatet wurde zunächst die Lymphozytenpopulation aus allen Zellen (links im *Dot Plot*), dann bei dem Sek-Ak nur die CD3+ (in der Mitte des *Dot Plot*), bei den CD2/4/8 und CD3/4/8 zunächst die lebenden und anschließend die CD2+ bzw. die CD3+ (in der Mitte des *Dot Plot*) und von diesen Zellen wurden wiederum die CD4+ und CD8+ Zellen gegatet (rechts im *Dot Plot*).

In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass jeweils ganz links im Histogramm zunächst nur ein geringer Teil der Zellen gegittert wird, da es sich nur bei einem Teil der Zellen um Lymphozyten handelt; diese Zellen werden mittels Vorwärtsstreuung und Seitwärtsstreuung gemessen. Von der Lymphozytenpopulation ausgehend werden dann die T-Lymphozyten identifiziert, die CD3+ oder CD2+ sind.



**Abbildung 11** Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie von Tag 0 ohne Stimulation mit Okt-3 und IL-2 sowie von Tag 5 mit und ohne Stimulation (Oh Stim) mit Okt-3 und IL-2. Verglichen werden die verschiedenen Antikörperkombinationen am Tag 0, an Tag 5 mit Stimulation von Okt-3 sowie mit verschiedenen IL-2 Konzentrationen. Als Vergleich ist ganz links im Diagramm das Ergebnis der Durchflusszytometrie von den Zellen, die ohne Stimulation kultiviert worden sind, dargestellt.

Insgesamt sind bei den stimulierten Zellen deutlich mehr CD3+ bzw. CD2+ T-Lymphozyten zu sehen als bei den nicht stimulierten (Abbildung 11). Werden die verschiedenen Antikörper bzw. Antikörperkombinationen am Tag 0 miteinander verglichen, sind bei den Zellen, die mit der Antikörperkombination CD2/4/8 gefärbt wurden, am meisten T-Lymphozyten und bei denen, die mit der Antikörperkombination CD3/4/8 gefärbt wurden, am wenigsten nachweisbar. Werden nun die Zellen der Durchflusszytometrie am Tag 5 miteinander verglichen, sind die Zellen ohne Stimulation am schlechtesten gewachsen – ganz links in der Abbildung zu sehen –, da sie am wenigsten T-Lymphozyten vorweisen. Auch am Tag 5 mit Stimulation zeigt sich, dass bei der Antikörperkombination CD2/4/8 die meisten T-Lymphozyten bei einer IL-2 Konzentration von 50 IU/mL sowie bei 300 IU/mL nachgewiesen werden konnten. Werden nun noch der sekundäre Antikörper mit der Antikörperkombination CD3/4/8, bei den IL-2 Konzentrationen von 50 IU/mL und 300 IU/mL, miteinander verglichen, wird festgestellt, dass bei dem sekundären Antikörper weniger T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten als mit der Antikörperkombination CD3/4/8, jedoch sind die Unterschiede sehr gering.

**Tabelle 9** Ergebnis der Durchflusszytometrie nach 0 und 5 Tagen mit und ohne Stimulation mit Okt-3 und IL-2 in verschiedenen Konzentrationen. Angegeben sind von allen Lymphozyten die einzelnen, lebenden Lymphozyten und von den einzelnen, lebenden Lymphozyten die T-Lymphozyten, in Prozent. Die Antikörperkombinationen sind Sekundär Antikörper Alexa Fluore 488 Anti Mouse IgG (Sek Ak), CD2-FITC Mouse anti-human/CD4-PB/CD8-PeCy7 (CD2/4/8) und Sekundär Antikörper Alexa Fluore 488 Anti Mouse IgG/CD4-PB/CD8-PeCy7 (CD3/4/8).

Antikörpermix und Stimulation	Lymphozyten [%]	T-Lymphozyten [%]
Tag 0 ohne Stimulation		
Ohne Antikörper	97,13	0
Sek-Ak	97,05	74,15
CD2/4/8	97,92	77,8
CD3/4/8	97,77	72,86
Tag 5 mit Stimulation		
Sek-Ak, ohne Stimulation	96,72	0,17
Sek-Ak, 50 IU/mL	96,84	86,89
Sek-Ak, 300 IU/mL	95,39	82,34
CD2/4/8, 50 IU/mL	97,66	93,34
CD2/4/8, 300 IU/mL	96,05	92,82
CD3/4/8, 50 IU/mL	97,30	90,58
CD3/4/8, 300 IU/mL	96,00	88,50

In Abbildung 11 und Tabelle 9 ist zu erkennen, dass der Nachweis der T-Lymphozyten mit dem Sek-Ak allein funktioniert hat. Zwar werden durchgängig weniger T-Lymphozyten mit dem Sek-Ak nachgewiesen, im Gegensatz zu den anderen Antikörperkombinationen jedoch sind diese Abweichungen so gering, dass sie toleriert werden können. Daher wird bei der Ermittlung der CD3+ T-Lymphozyten vor der Transduktion eine Durchflusszytometrie nur mit dem Sek-Ak durchgeführt, da die Verwendung der Antikörperkombinationen komplizierter und aufwendiger ist als die alleinige Verwendung des sekundären Antiköper.

Weiter kann davon ausgegangen werden, dass ohne Stimulation der Zellen von allen einzelnen, lebenden Lymphozyten ca. 74 % bereits T-Lymphozyten sind. Nach der

Stimulierung mit Okt-3 und IL-2 ist eine Zunahme bis ca. 87 % der T-Lymphozyten zu beobachten. Es ist auch ein Unterschied zwischen den Lymphozyten bzw. T-Lymphozyten, die mit 50 IU/mL und 300 IU/mL IL-2 kultiviert worden sind, zu erkennen. Die Zellen, die mit 50 IU/mL kultiviert wurden, sind besser gewachsen. Dieses Ergebnis lässt sich nicht nur bei den Zellen beobachten, die mit dem Sek-Ak untersucht, sondern auch bei denen, die mit den Antikörperkombinationen CD2/4/8 und CD3/4/8 untersucht worden sind.

Dies lässt zunächst vermuten, dass die Zellen mit 50 IU/mL IL-2 und in Okt-3 beschichteten Wells zu kultivieren sind. Dies wird in den folgenden Unterkapiteln weiter untersucht.

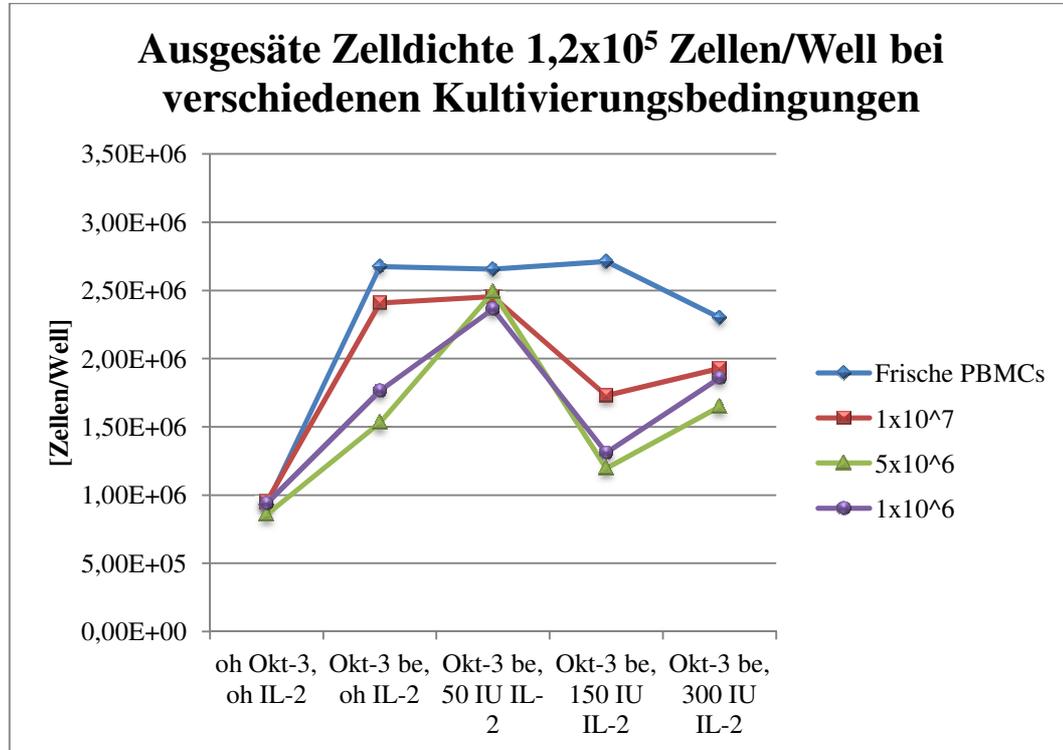
## **3.2 Einstellen der Kultivierungsbedingungen vor der Transduktion**

### **3.2.1 Vergleich von frisch isolierten und kryokonservierten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut, mit gleichzeitiger Untersuchung der optimalen Kultivierungsbedingungen**

Die Isolierung und anschließende Kryokonservierung der PBMCs wurde wie in 2.2.1.7 und 2.2.1.8 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden in verschiedenen Zelldichten kryokonserviert ( $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$  und  $1 \times 10^6$  Zellen/Kryo), um die optimale Zelldichte für die Kryokonservierung bzw. Überlebensrate nach dem Auftauen zu ermitteln. Mit den Zellen wurde nach einem Monat weitergearbeitet. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden am Tag des Auftauens erneut frische PBMCs isoliert. Mit den CPT-Röhrchen konnten nach der Methode 2.2.1.7 durchschnittlich zwischen  $6,25$  und  $7,5 \times 10^6$  Zellen/mL Spenderblut isoliert werden.

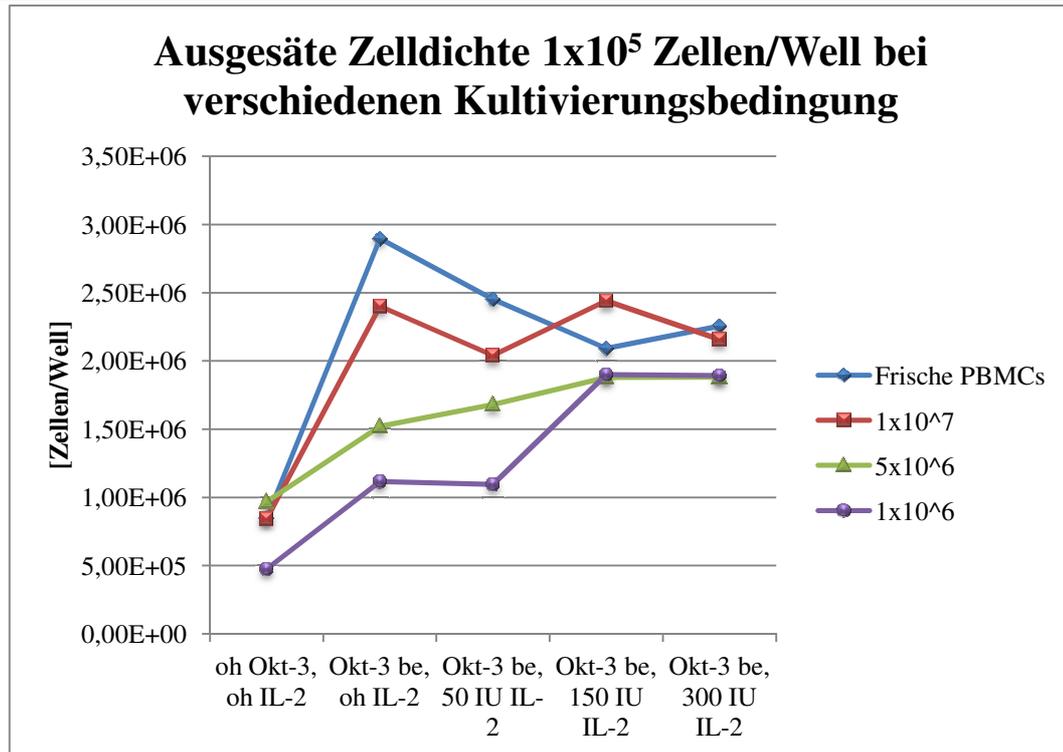
Die aufgetauten und die frischen Zellen wurden in verschiedenen Zelldichten ( $1,2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$  und  $0,8 \times 10^5$  Zellen/Well) in 96-Well-Platten ausgesät und unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Die eine Hälfte wurde in Okt-3 beschichteten Wells, die andere Hälfte in nicht beschichteten Wells kultiviert.

Die Zellen wurden fünf Tage ohne Mediumwechsel kultiviert und anschließend wie in 2.2.1.4 mit dem CASY Cell Counter gezählt. Die Messbereiche des CASY-Gerätes sind auf die PBMCs eingestellt und die Lebendzellzahl sowie das Lebend- zur Gesamt-Zellzahl-Verhältnis in Prozent gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 bis Abbildung 14 dargestellt.



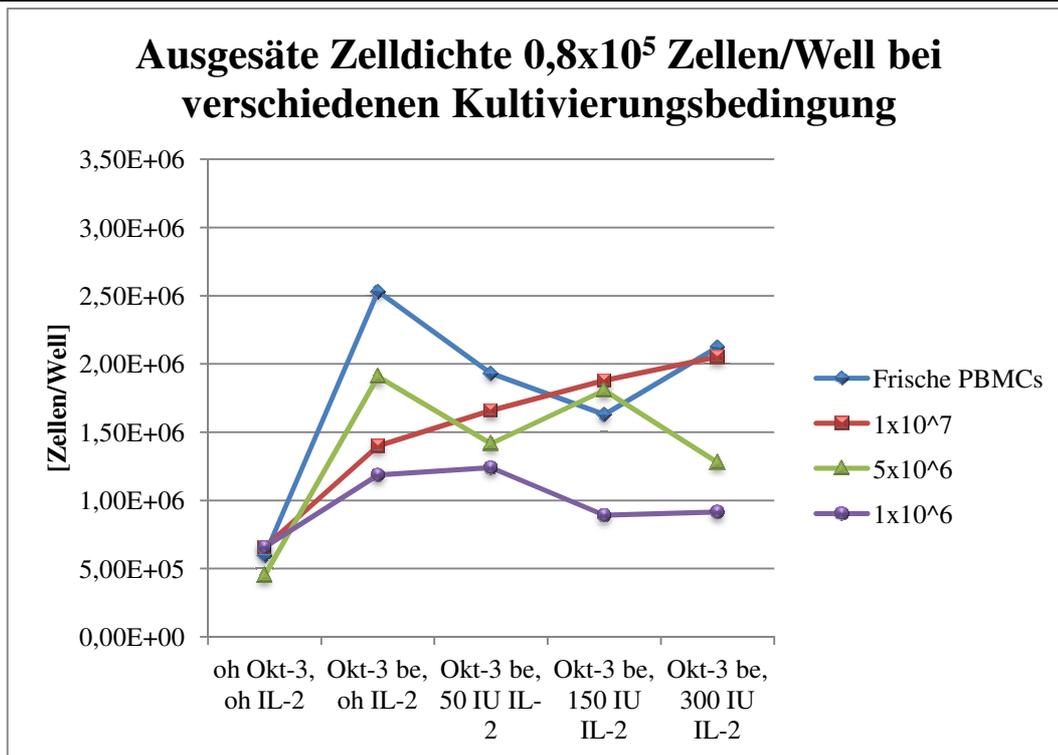
**Abbildung 12** Darstellung der Ergebnisse der Zellzählung nach fünf Tagen der frisch isolierten oder zuvor kryokonservierten PBMCs, bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen, mit dem CASY Cell Counter. Ausgesät wurden die Zellen in der Zelldichte  $1,2 \times 10^5$  einer 96-Well-Platte in Wells, ohne Okt-3 und ohne IL-2 (oh Okt-3, oh IL-2), mit Okt-3 und ohne IL-2 (Okt-3, oh IL-2) und mit Okt-3 und den IL-2 Konzentrationen 50-300 IU/mL (Okt-3, 50 IU, 150 IU, 300 IU IL-2).

In Abbildung 12 ist zu sehen, dass die Kultivierung in Okt-3 beschichteten Wells bereits eine positive Wirkung auf die PBMCs hat. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Kultivierung mit IL-2 eine positive Wirkung auf die PBMCs hat, jedoch mit steigenden IL-2 Konzentrationen, die Proliferation wieder sinkt, außer bei den frisch isolierten PBMCs.



**Abbildung 13** Darstellung der Ergebnisse der Zellzählung nach fünf Tagen, der frisch isolierten oder zuvor kryokonservierten PBMCs, bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen, mit dem CASY Cell Counter. Ausgesät wurden die Zellen in der Zelldichte  $1 \times 10^5$  in Wells einer 96-Well-Platte in Wells, ohne Okt-3 und ohne IL-2 (oh Okt-2, oh IL-2), mit Okt-3 und ohne IL-2 (Okt-3, oh IL-2) und mit Okt-3 und den IL-2 Konzentrationen 50-300 IU/mL (Okt-3, 50 IU, 150 IU, 300 IU IL-2).

In Abbildung 13 ist zu sehen, dass auch bei dieser Zelldichte die Kultivierung in Okt-3 beschichteten Wells bereits eine positive Wirkung auf die Proliferation der PBMCs hat. Bei den frisch isolierten PBMCs und denjenigen, die mit der Zelldichte  $1 \times 10^7$  kryokonserviert wurden, ist bei der Kultivierung mit IL-2 eine Verschlechterung der Proliferation, im Gegensatz zur Kultivierung nur in Okt-3 beschichteten Wells, zu beobachten. Bei den PBMCs, die in geringeren Zelldichten kryokonserviert wurden, ist hingegen eine Verbesserung der Proliferation mit steigenden IL-2 Konzentrationen zu beobachten.



**Abbildung 14** Darstellung der Ergebnisse der Zellzählung nach fünf Tagen, der frisch isolierten oder zuvor kryokonservierten PBMCs, bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen, mit dem CASY Cell Counter. Ausgesät wurden die Zellen in der Zelldichte  $0,8 \times 10^5$  in Wells einer 96-Well-Platte in Wells, ohne Okt-3 und ohne IL-2 (oh Okt-3, oh IL-2), mit Okt-3 und ohne IL-2 (Okt-3, oh IL-2) und mit Okt-3 und den IL-2 Konzentrationen 50-300 IU/mL (Okt-3, 50 IU, 150 IU, 300 IU IL-2).

In Abbildung 14 ist bereits eine Verbesserung der Proliferation bei der Kultivierung in Okt-3 beschichteten Wells zu erkennen. Bei der Kultivierung der frisch isolierten und der in der Zelldichte  $5 \times 10^6$  kryokonservierten PBMCs ist eher eine Verschlechterung der Proliferation mit steigender IL-2 Konzentration zu erkennen. Bei den PBMCs, die in den Zelldichten  $1 \times 10^7$  und  $1 \times 10^6$  kryokonserviert worden sind, ist zunächst eine Verbesserung der Proliferation zu sehen. Diese Verbesserung ist bei den PBMCs, die in der Zelldichte  $1 \times 10^7$  kryokonserviert wurden, auch weiter zu beobachten. Bei den PBMCs, die mit der Zelldichte  $1 \times 10^6$  kryokonserviert wurden, ist bei den IL-2 Konzentrationen 50 IU/mL noch eine Verbesserung zu erkennen, bei den höheren IL-2 Konzentrationen nimmt die Proliferation jedoch ab.

Werden die Abbildung 12 bis Abbildung 14 miteinander verglichen, fällt auf, dass die frisch isolierten PBMCs durchschnittlich am meisten proliferiert haben, unabhängig von der Ausgangszelldichte. Obwohl der Vergleich zwischen frischen und aufgetauten Zellen zeigt, dass die frischen Zellen im Durchschnitt besser gewachsen sind, ist der Unterschied nicht so deutlich, dass ausschließlich die Verwendung von frischen PBMCs zu empfehlen wäre. Bei

der Kultivierung mit Okt-3 und ohne IL-2 ist zunächst bei allen PBMCs eine Verbesserung der Proliferation, im Gegensatz zur Kultivierung in Wells ohne Okt-3 und IL-2, zu beobachten. Bei den frisch isolierten PBMCs, unabhängig von der ausgesäten Zelldichte, nimmt die Proliferation mit steigenden IL-2 Konzentrationen ab. Werden nun ausschließlich die zuvor kryokonservierten PBMCs betrachtet, haben die PBMCs, die in der Zelldichte  $1 \times 10^7$  kryokonserviert wurden, durchschnittlich am besten proliferiert. Die höchste Zellzahl der zuvor kryokonservierten PBMCs liegt bei ungefähr  $2,5 \times 10^6$  Zellen/Well – diese Zellzahl wird bei den ausgesäten Zelldichten  $1,2 \times 10^5$  von allen kryokonservierten PBMCs bei der Kultivierung mit Okt- und 50 IU/mL IL-2 erreicht. Aus diesem Grund und da mit steigender IL-2 Konzentration die PBMCs durchschnittlich schlechter proliferiert haben, wird für die spätere Kultivierung eine IL-2 Konzentration von 50 IU/mL verwendet und mit Okt-3 beschichteten Wells gearbeitet. Ansonsten wird diese Zellzahl noch bei der Kultivierung mit der Zelldichte  $1 \times 10^5$ , mit Okt-3 und 150 IU/mL IL-2, von den PBMCs, die in der höchsten Zelldichte kryokonserviert wurden, erreicht. Wird die Abbildung 14 mit Abbildung 12 und Abbildung 13 verglichen, fällt auf, dass die PBMCs, die in der Zelldichte  $5 \times 10^6$  kryokonserviert wurden, dort deutlich besser proliferiert haben als die anderen zuvor kryokonservierten. Da die PBMCs in den beiden anderen Abbildungen deutlich unter den frisch isolierten und den in der hohen Zelldichte kryokonservierten lagen, wird davon ausgegangen, dass es sich um Messfehler handelt.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Zellen, die mit  $1,2 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesät worden sind, am besten proliferiert haben, da die Zellen eine gewisse Zelldichte benötigen, um sich gegenseitig zu stimulieren. Diese Zelldichte wird dementsprechend auf größere Wells hochskaliert und in den weiteren Versuchen verwendet. Des Weiteren sollten die PBMCs nach der Isolierung in der Zelldichte  $1 \times 10^7$  kryokonserviert werden, um zu gewährleisten, dass bei der späteren Transduktion ausreichend Zellen vorhanden sind.

### 3.2.2 Durchflusszytometrie zum Vergleich der Kultivierung in Okt-3 beschichteten Wells oder mit Okt-3 im Medium

Die Durchflusszytometrie wurde durchgeführt, da die Kultivierung der PBMCs in Okt-3 beschichteten Wells teurer und aufwendiger ist als die Kultivierung der PBMCs mit Okt-3 im Medium. Für die Kultivierung in Okt-3 beschichteten Wells wurde die Methode 2.2.1.2 verwendet. Bei der Kultivierung mit Okt-3 im Medium wurden die Wells nicht beschichtet und dem Medium wurde Okt-3 (Finalkonzentration 10 ng/mL) zugegeben. Von zwei gesunden Spendern wurden frische PBMCs, nach 2.2.1.7, isoliert und mit PBMC-Medium, mit 50 IU/mL oder 300 IU/mL IL-2 kultiviert. Nach fünf Tagen wurde eine Durchflusszytometrie mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 Anti Mouse IgG, wie in 2.2.2, durchgeführt. Dabei wurden pro Probe 50 000 Zellen gemessen und ausgewertet. Die Lymphozyten wurden identifiziert und davon die lebenden und CD3+ T-Lymphozyten bestimmt (Abbildung 15).

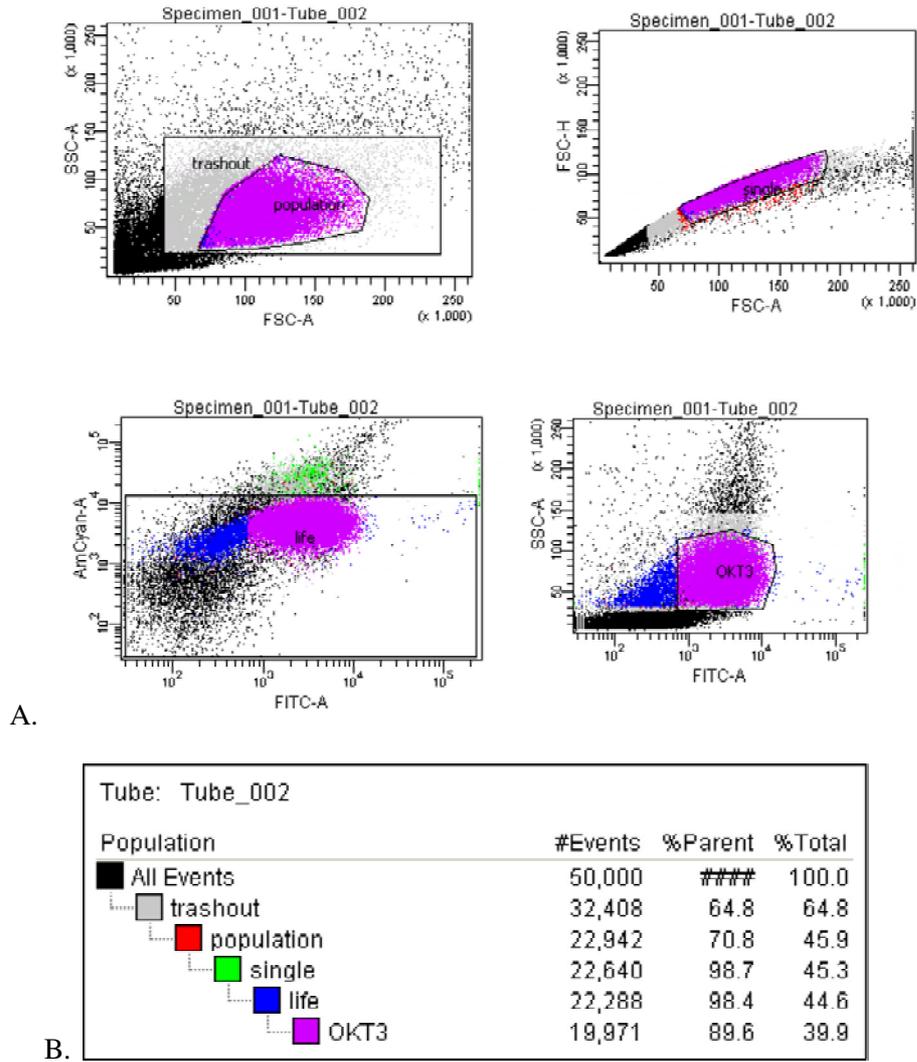
Da für dieses Projekt der prozentuale Anteil der T-Lymphozyten von Interesse ist, wurden die Daten, die mit dem BD FACS CANTO II erhalten wurden, zunächst nach **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** umgerechnet.

$$L_T[\%] = \frac{L_T}{\frac{L_P}{100}} \quad 3.1$$

$L_T$  = CD3+ T-Lymphozyten

$L_P$  = Lymphozytenpopulation

Aufgrund der Erfahrung von Manuela Kolster konnte die Lymphozytenpopulation gegatet werden, von der wiederum die lebenden Lymphozyten und von den lebenden die CD3+ T-Lymphozyten identifiziert wurden.



**Abbildung 15** Repräsentatives Beispiel aus der Durchflusszytometrie zur Ermittlung der Kultivierungsbedingungen. In A. dargestellt ist die Probe des Spenders E nach Kultivierung in Okt-3 beschichteten Wells mit 50 IU/mL IL-2. Links oben ist das Gate zu sehen, das zur Identifizierung der gesamten Lymphozytenpopulation (population) gesetzt wurde. Oben rechts ist das Gate zu sehen, das gesetzt wurde, um die einzelnen Lymphozyten (single) von Lymphozyten zu unterscheiden, die zusammenkleben. Links unten ist das Gate zu sehen, mit dem die lebenden Lymphozyten (live) identifiziert wurden und unten rechts ist das Gate zur Identifizierung der CD3+ T-Lymphozyten (OKT-3) zu sehen. In B. dargestellt sind die berechneten Ergebnisse, wie sie vom BD FACS CANTO II aufgrund der Gates ermittelt werden.

**Tabelle 10** Ergebnis der Durchflusszytometrie. Aufgelistet ist die Lymphozytenpopulation in Prozent und die CD3+ T-Lymphozyten der beiden Spender, bei den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

Spender	IL-2 Konzentration [IU/mL]	Lymphozyten [%]	CD3+ Lymphozyten [%]	T- Proliferation	
Okt-3 beschichtet	E	50	97,15	87,05	1,25
		300	96,91	85,63	1,79
	G	50	94,35	89,29	1,10
		300	96,75	85,69	1,60
Okt-3 im Medium	E	50	97,34	85,42	1,29
		300	94,09	76,07	1,04
	G	50	96,72	87,41	1,19
		300	95,45	88,10	1,07

In Tabelle 10 ist zu erkennen, dass die Kultivierung in den beschichteten Wells mehr T-Lymphozyten mit durchschnittlich besserer Proliferation hervorgebracht hat. Wenn die Proben mit denselben IL-2 Konzentrationen verglichen werden, sind bei den Proben, die in beschichteten Wells kultiviert wurden, prozentual mehr T-Lymphozyten vorhanden. Eine Ausnahme sind die Proben des Spenders G bei der IL-2 Konzentration 300 IU/mL. Dies kann jedoch daran liegen, dass bei der Probe des Spenders G, die mit Okt-3 im Medium und der IL-2 Konzentration 300 IU/mL kultiviert wurde, merklich weniger Zellen gewachsen sind als bei den anderen Proben (siehe im Anhang Tabelle 23). Aus diesen Gründen wird empfohlen, die PBMCs für die Transduktion in Okt-3 beschichteten Wells zu kultivieren. Werden nun noch die verschiedenen IL-2 Konzentrationen miteinander verglichen, so fällt auf, dass bei der Kultivierung in den beschichteten Wells zwar die T-Lymphozyten Anzahl bei 50 IU/mL besser ist, jedoch die Zellen bei der Kultivierung mit 300 IU/mL besser proliferiert haben. Bei der Kultivierung mit Okt-3 im Medium ist dies nicht zu beobachten. Hier sind mehr Zellen bei der IL-2 Konzentration von 50 IU/mL, die auch besser proliferiert haben als bei der Kultivierung mit 300 IU/mL. Da die Anzahl der T-Lymphozyten mindestens genauso wichtig ist wie die Proliferation der Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion, würden diese Ergebnisse

dafür sprechen, für die Kultivierung der PBMCs eine IL-2 Konzentration von 300 IU/mL zu verwenden.

### 3.3 Auswirkung der Polybrenekonzentration auf die mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Untersuchung der Auswirkung von Polybrene auf die PBMCs wird durchgeführt, da Polybrene die Interaktion zwischen Virus und Zelle verbessert, wodurch die Zahl der transduzierten Zellen steigt. Allerdings kann Polybrene auch eine toxische Wirkung auf die Zellen haben und es soll ermittelt werden, ob und wenn ja ab welcher Konzentration dies der Fall ist. Für die Untersuchung mit unterschiedlichen Polybrenekonzentrationen wurden zwei Kryos mit jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen nach der Methode 2.2.1.10 aufgetaut und gezählt. Die Zellen wurden in der Zelldichte  $8 \times 10^4$  Zellen/Well in acht Wells einer 96-Well-Platte ausgesät und zwei Tage unter Normalbedingungen kultiviert. Anschließend wurde bei den Zellen ein Mediumwechsel vorgenommen und jeweils zwei Wells ohne Polybrene mit 2  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$  und 8  $\mu\text{g/mL}$  kultiviert. Nach zwei Tagen Kultivierung mit und ohne Polybrene wurden die Zellen mittels CASY Cell Counter, wie in 2.2.1.4 beschrieben, gezählt. Die Ergebnisse dieser Zellzählung sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11** Ergebnis der Zellzählung mit dem CASY Cell Counter. Die Zellen wurden für zwei Tage in verschiedenen Polybrenekonzentrationen kultiviert. Dargestellt sind der Mittelwert der lebend Zellzahl pro Well, das Verhältnis lebend/gesamt und die Proliferation der Zellen.

Polybrenekonzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/gesamt [%]	Proliferation
0	$8,884 \times 10^4$	76,37	1,11
2	$1,054 \times 10^5$	76,88	1,32
4	$1,148 \times 10^5$	75,1	1,44
8	$1,204 \times 10^5$	74,8	1,51

In Tabelle 11 ist zu erkennen, dass sich mit steigender Polybrenekonzentration das Wachstum der Zellen verbessert und das Polybrene keine negativen Auswirkungen auf die Zellen zu haben scheint. Werden die Konzentrationen 4 µg/mL und 8 µg/mL miteinander verglichen, liegt die Zelldichte zwischen  $1,1 \times 10^5$  und  $1,2 \times 10^5$  lebenden Zellen pro Well, das Verhältnis Lebendzellzahl zu Gesamtzellzahl bei 75 % und die Zellen haben eine Proliferation von 1,4–1,5. Da es kaum einen Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen gibt und bei der späteren Transduktion noch der toxische Effekt des Virus hinzukommt, wird für die Transduktion die geringere Polybrenekonzentration von 4 µg/mL verwendet.

### 3.4 Transduktion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit Sendai-Virus

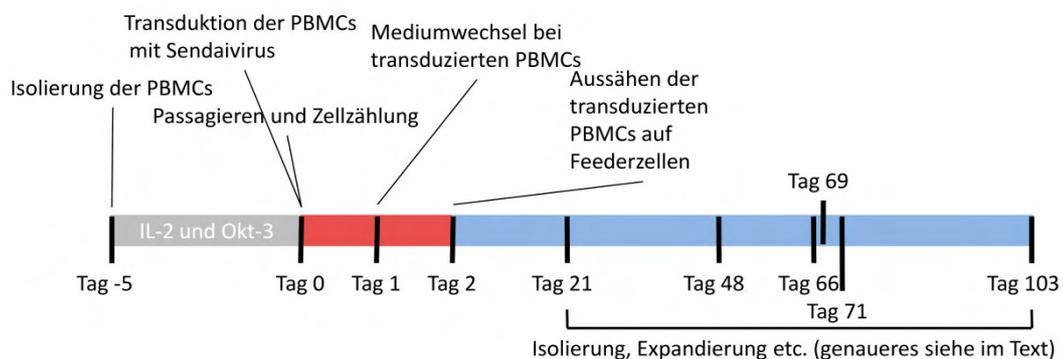
Bei der Transduktion der PBMCs ist der Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion wichtig. Es muss ermittelt werden, wie viele Zellen für die Transduktion zur Verfügung stehen und wie ihre Proliferation ist. Für die Transduktion mit dem CytoTune™-iPS Sendai Reprogramming Kit wurden, wie in 2.2.1.7 beschrieben, PBMCs von zwei Spendern isoliert. Die Kultivierung der PBMCs fand unter denselben Bedingungen wie in 3.2.2 beschrieben statt. Die Zellen wurden vor der Transduktion mittels Durchflusszytometrie und Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind in 3.2.2 zu sehen, die Ergebnisse der Zellzählung sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12** Darstellung der Ergebnisse der Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer.

	Spender	IL-2 Konzentration [IU/mL]	Gesamte Zellen (lebend und tot)	Lebende Zellen [%]	Proliferation
Okt-3 beschichtet	E	50	$1,48 \times 10^6$	84,46	1,25
		<b>300</b>	<b><math>2,19 \times 10^6</math></b>	<b>81,74</b>	<b>1,79</b>
	G	50	$1,49 \times 10^6$	73,83	1,10
		<b>300</b>	<b><math>1,71 \times 10^6</math></b>	<b>93,57</b>	<b>1,60</b>

Okt-3 im Medium	E	50	$1,48 \times 10^6$	87,16	1,29
		300	$1,20 \times 10^6$	86,67	1,04
	G	50	$1,40 \times 10^6$	85,00	1,19
		300	$1,28 \times 10^6$	83,59	1,07

Die Proliferation der Zellen gibt an, inwieweit sich die Zellen vermehrt haben. Laut CytoTune™-iPS Reprogramming Kit Manual sollten sich die Zellen vor der Transduktion ungefähr verdoppelt haben, was einer Proliferation von 2 entsprechen würde. Wie in Tabelle 12 jedoch zu erkennen ist, liegt die Proliferation der Zellen bei ca. 1 bis 1,8. Die beste Proliferation hatten die Zellen, die mit 300 IU/mL IL-2 und in Okt-3 beschichteten Wells kultiviert wurden. Da die Proliferation mindestens genauso wichtig ist wie die Anzahl der CD3+ T-Lymphozyten und wie in Tabelle 10 zu sehen, bei der Ermittlung der CD3+ T-Lymphozyten zwischen den Zellen mit 50 IU/mL und 300 IU/mL nur ein geringer Unterschied besteht, wurde mit diesen Zellen weitergearbeitet.



**Abbildung 16** Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Projektes. Von der Isolierung der PBMCs über die Transduktion bis zum letzten Kryokonservieren des letzten Klones.

Es wurde wie in der Methode 2.2.3 weiterverfahren. Die PBMCs der Spender E und G, die in beschichteten Wells mit der IL-2 Konzentration 300 IU/mL kultiviert wurden, sind in jeweils drei Wells einer 24-Well-Platte mit der Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  ausgesät worden. Die Zellen wurden in PBMC-Medium mit 50 IU/mL IL-2 und  $4 \mu\text{g/mL}$  Polybrene und mit den MOIs 1, 3 und 6 transduziert. Einen Tag nach der Transduktion wurde das Medium gewechselt und zwei Tage nach der Transduktion wurde das Replating durchgeführt, wie in 2.2.3 beschrieben. Weiter ist in Abbildung 16 zu sehen, dass an Tag 21 nach der Transduktion zum ersten Mal

iPS-Klone aus den Generationsplatten isoliert werden konnten. Es konnten bis Tag 71 nach der Transduktion insgesamt 39 iPS-Klone isoliert werden. Am Tag 48 konnten die ersten Klone, die gepickt wurden (Abbildung 17), von einem Well einer 24-Well-Platte in ein Well einer 12-Well-Platte expandiert werden. Von den 12-Well-Platten wurden die iPS-Klone in ein Well einer 6-Well-Platte expandiert. Nachdem die iPS-Klone das erste Mal 1 : 2 in einem Well einer 6-Well-Platte passagiert werden konnten, wurde ein Teil der Zellen in *Chamber Slides* für die Immunfluoreszenz-Färbung und in ein Well einer 4-Well Multiplatte für die alkalische Phosphatase-Färbung gegeben sowie ein Pellet genommen, welches das erste Mal an Tag 66 und während des gesamten Projektes mit allen Klonen durchgeführt wurde, um den Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung erbringen zu können. Des Weiteren wurden von allen Klonen jeweils fünf Kryos eingefroren, was das erste Mal an Tag 71 durchgeführt wurde. Nachdem von jedem Klon Chamber Slides, Wells einer 4-Well-Multiplatte, zwei Pellets (eins am Anfang und eins am Ende der Kultivierung) und fünf Kryos vorhanden waren, war der Klon abgeschlossen und die Kultivierung konnte beendet werden. Dies war an Tag 103 nach der Transduktion bei allen Klonen der Fall.

### 3.4.1 Effizienz der Transduktion

Die Effizienz der Transduktion berechnet sich aus der Anzahl der transduzierten Zellen und den anschließend erhaltenen Klonen **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, da davon auszugehen ist, dass aus einer transduzierten Zelle ein Klon entsteht.

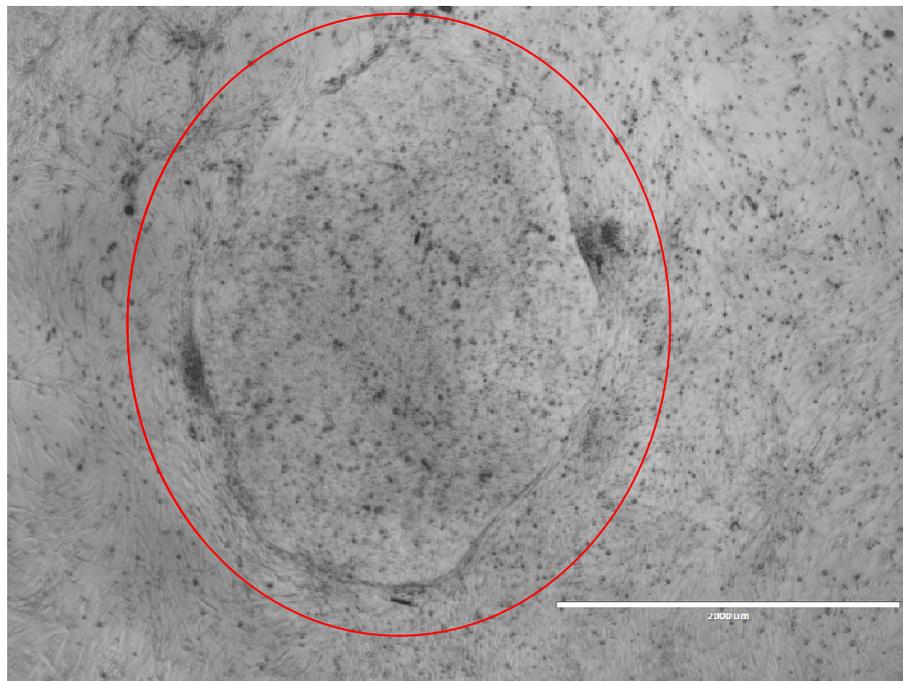
$$E = \frac{K}{\frac{Z_t}{100}} \quad 3.2$$

E = Effizienz [%]

K = erhaltene Klone

Z<sub>t</sub> = Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion

Die PBMCs der Probanden sind wie in 2.2.3 nach der Transduktion wieder ausgesät worden. Es konnten lediglich bei den Zellen, die mit der MOI 6 transduziert wurden und in der Zellzahl  $4,5 \times 10^4$  (Spender E) bzw.  $3,9 \times 10^4$  (Spender G) ausgesät wurden, Klone gepickt werden (Bsp. siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17** Aufnahme des Klons E SV132 in der Generations-Platte (2x). Am selben Tag Transfer in ein Well einer 24-Well-Platte.

**Tabelle 13** Darstellung der Ergebnisse der Transduktion und der berechneten Effizienz.

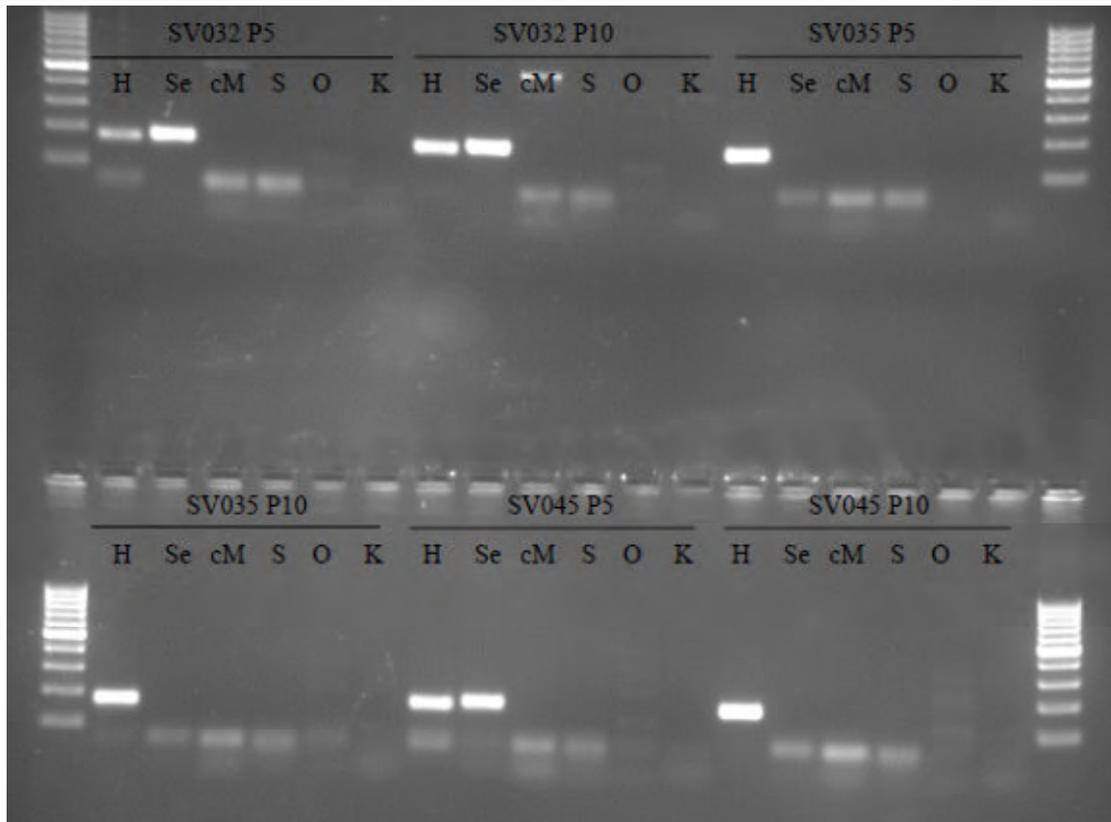
Proband	MOI	Replattierte Zellen	Gepickte Klone	Beendete Klone	Effizienz [%]
E	6	$4,5 \times 10^4$	31	21	0,05
G	6	$3,5 \times 10^4$	8	0	0

Die Effizienz der Transduktion liegt, wie in Tabelle 13 zu sehen, unter der Effizienz ( $\sim 0,1\%$ ), die laut Literatur mit dieser Methode erreicht werden kann (Seki *et al.* 2010). Warum die Reprogrammierung der PBMCs des Spenders G nicht funktioniert hat, lässt sich nicht erklären. Allerdings schnitten während des gesamten Projektes die Zellen dieses Spenders schlechter ab als die PBMCs des anderen Spenders. Da bei den Transduktionen mit geringeren MOIs keine Klone gepickt werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Zellen mindestens mit einer MOI von 6 transduziert werden sollten. In diesem Projekt wurde sich an

den Empfehlungen des Herstellers (Manual des CytoTune™-iPS Sendai Reprogramming Kit) orientiert. Jedoch sollten erneut Versuche mit höheren MOIs durchgeführt werden, da zum Beispiel in (Seki *et al.* 2010) mit einer MOI von 20 gearbeitet wurde.

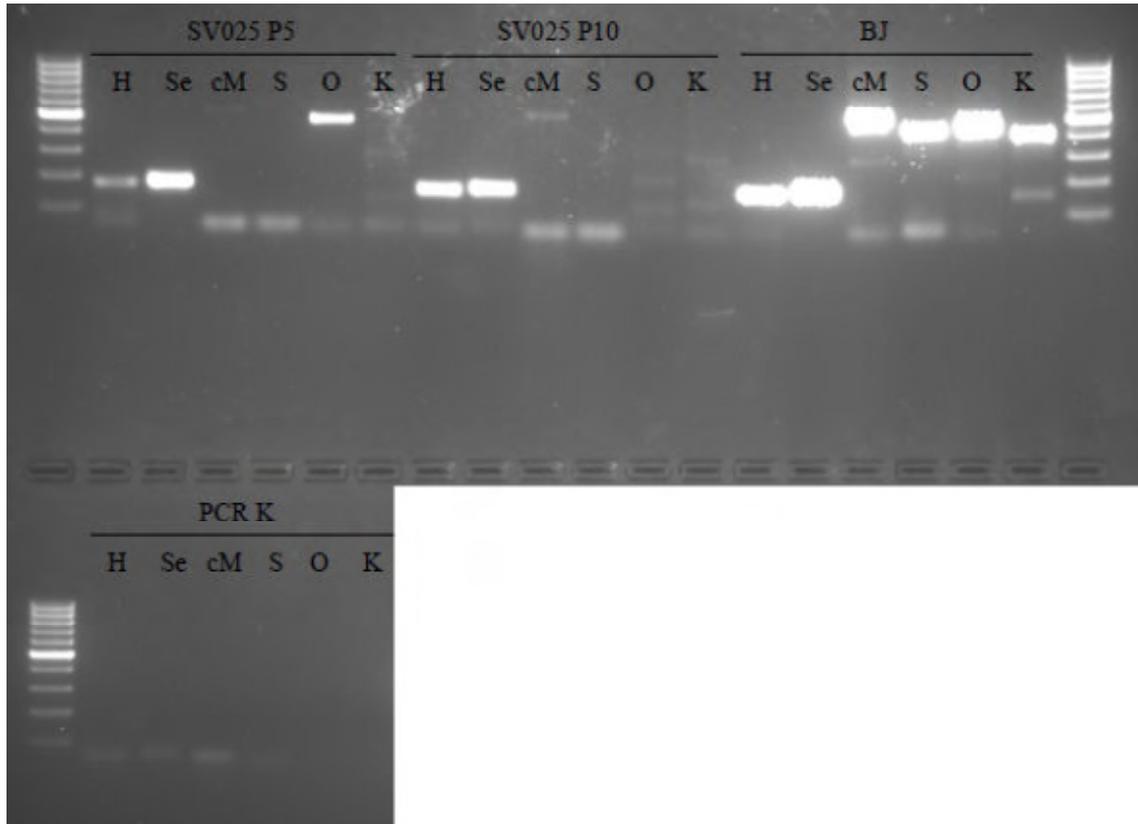
### 3.5 Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung

Die CytoTune™-iPS Sendai Reprogramming Kit Vektoren basieren auf SeV, einem RNA-Virus. Der Sendai-Vektor kann sich nur im Zytoplasma replizieren und enthält eine Deletion des F-Gens, wodurch keine Produktion von infektiösen Partikeln mehr möglich ist, sowie zusätzlich eine Mutation als letzte Sicherheitsmaßnahme, wodurch er temperaturempfindlich wird und so nach ca. zehn Passagen nicht mehr nachweisbar sein sollte. Die Primer für den Nachweis enthalten SeV Genom-Sequenzen bzw. Sequenzen der vier Transgene. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Nachweises der integrationsfreien Reprogrammierung dargestellt. Damit mittels PCR der Nachweis der Integrationsfreiheit erbracht werden kann, musste zunächst wie in 2.2.5.1 beschrieben die RNA isoliert, die Konzentration spektrophotometrisch mittels Nanodrop ermittelt und die cDNA synthetisiert werden. Zunächst wurde die PCR zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung an vier iPS-Klonen der HEXT Stem Cell Facility durchgeführt. Die Klone der HEXT Stem Cell Facility sind iPS-Zellen, die aus Fibroblasten mit Sendai-Virus dedifferenziert wurden.



**Abbildung 18** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung von Klon SV032, SV035 und SV045 aus Fibroblasten, mit den dazugehörigen Primern, Haushaltsgen (H), SeV (Se), c-Myc (cM), Sox2 (S), Oct3/4 (O), Klf4 (K) und dem Marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, von Thermo Scientific.

In Abbildung 18 und Abbildung 19 sind die zweiprozentigen Agarosegele der PCR für den Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung von Fibroblasten mit Sendai-Virus zu sehen.

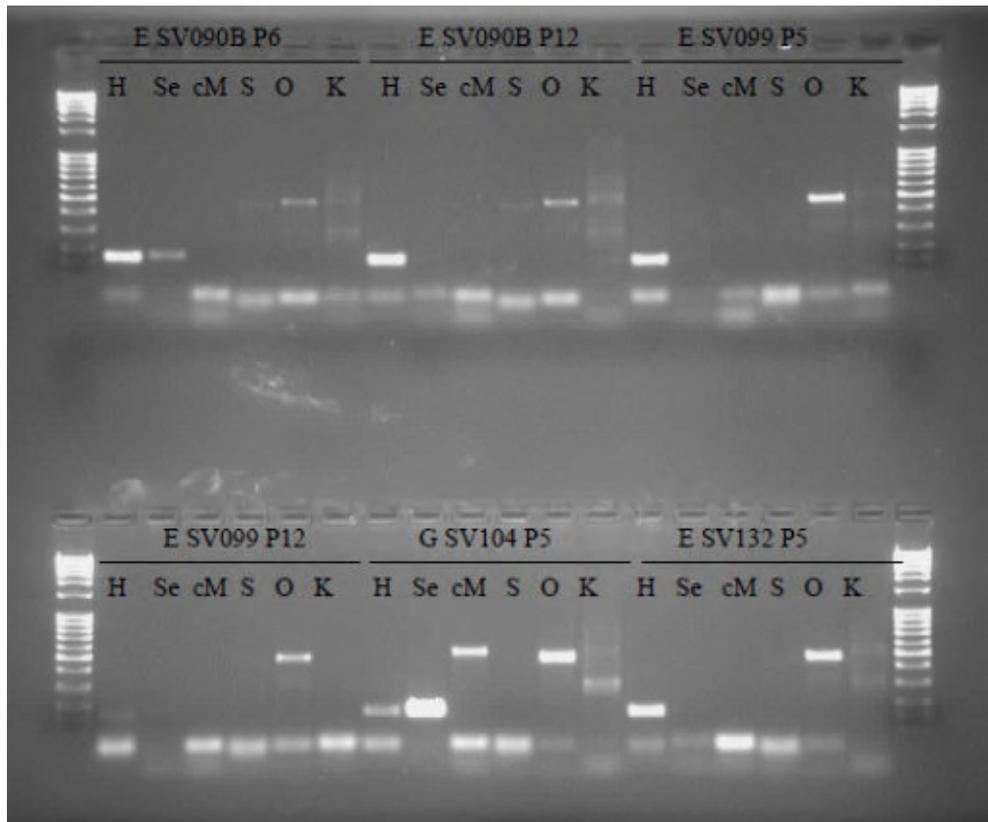


**Abbildung 19** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung vom Klon SV025 und BJ (als Positiv-Kontrolle) aus Fibroblasten sowie Negativ-Kontrolle der PCR (PCR K), mit den dazugehörigen Primern, Haushaltsgen (H), SeV (Se), c-Myc (cM), Sox2 (S), Oct3/4 (O), Klf4 (K) und dem Marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, von Thermo Scientific.

Die Reprogrammierungsvektoren sollten im Laufe der Zeit in der Zelle nicht mehr nachweisbar sein. Dieser zeitliche Verlauf ist bei den Klonen SV035, SV045, SV025 und SV032 sehr gut nachvollziehbar. Bei Klon SV035 hat die integrationsfreie Reprogrammierung sehr gut funktioniert, da hier weder in der frühen noch in der späten Passage SeV nachgewiesen werden kann. Dass der Vorgang auch etwas länger dauern kann, ist bei Klon SV045 zu sehen. In der frühen Passage ist SeV noch nachweisbar, in der späteren dann nicht mehr. Dass sich die Reprogrammierungsvektoren auch sehr lange in der Zelle halten können und eine zusätzliche Inkubation über fünf Tage bei 38–39 °C vonnöten wäre, um die Vektoren zu zerstören, ist bei den Klonen SV032 und SV025 zu sehen. Bei Klon SV032 sind der Sendai-Vektor sowie c-Myc sowohl in der frühen als auch in der späten Passage nachweisbar. Bei Klon SV025 ist sowohl in der frühen als auch in der späten Passage SeV nachweisbar.

Nachdem der Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung an den iPS-Klonen aus Fibroblasten getestet worden war, wurde er an iPS-Klonen aus PBMCs durchgeführt. Es

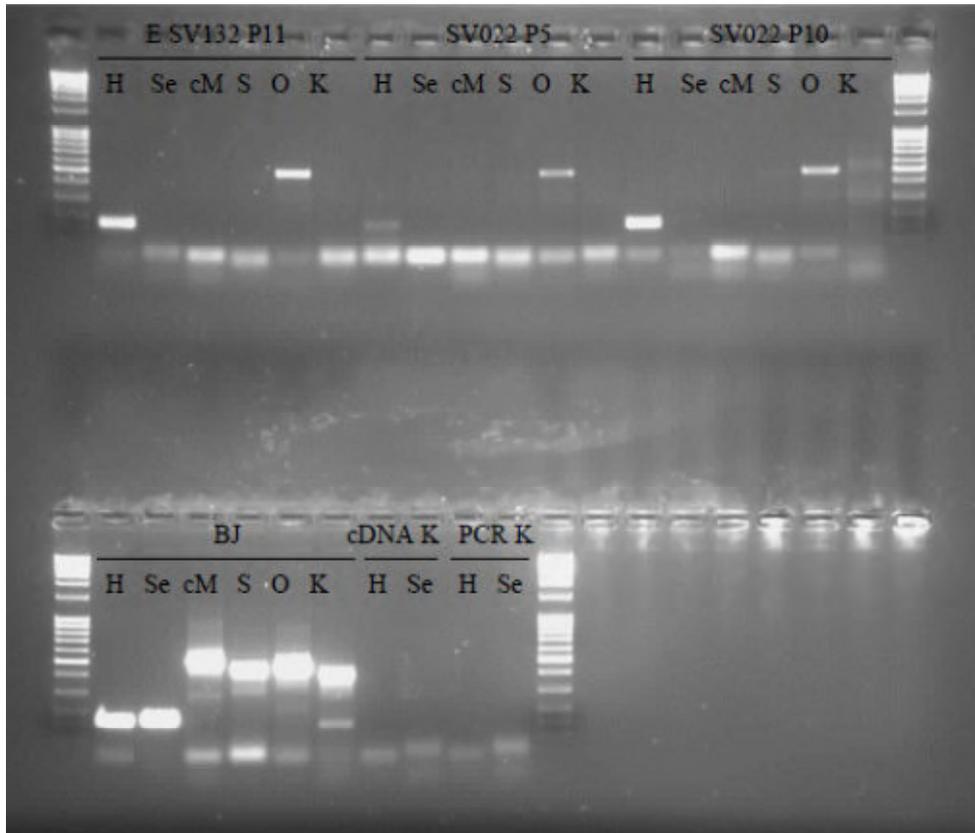
wurden zwei Klone von Proband E, ein Klon von Proband G und Proben von der HEXT Stem Cell Facility zu jeweils unterschiedlichen Passagen untersucht. Bei den Proben E SV132 P5, E SV132 P11 und G SV104 P5 konnte für die Synthetisierung der cDNA nicht wie bei den anderen Proben 1 µg RNA eingesetzt werden, sondern lediglich das maximal einzusetzende Volumen von 10 µL. Zum Vergleich als Ladekontrolle dient das Haushaltsgen.



**Abbildung 20** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung von Klon E SV090B, E SV099, G SV104 und E SV132 mit den dazugehörigen Primern, Haushaltsgen (H), SeV (Se), c-Myc (cM), Sox2 (S), Oct3/4 (O), Klf4 (K) und dem Marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, von Thermo Scientific.

In Abbildung 20 ist zu sehen, dass in der früheren Passage von E SV090B SeV noch nachgewiesen werden kann, in der späteren Passage nicht mehr. Auch zu beobachten ist, dass in beiden Proben von SV090B noch Oct3/4 nachgewiesen werden kann, allerdings handelt es sich hierbei wahrscheinlich um ein Artefakt. In der Probe G SV104 sind alle Sendai-Vektoren außer Sox2 nachgewiesen. Das kann daran liegen, dass der Klon auf dem Weg zur Pluripotenz stehengeblieben ist, da auch in späteren Nachweismethoden der Pluripotenz dieser Klon negativ war. Betrachtet man nun die Probe E SV132 (Abbildung 20 und

Abbildung 21), ist dort augenscheinlich kein Unterschied zwischen der frühen und der späten Passage auszumachen.



**Abbildung 21** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung von Klon E SV0132 und SV022 sowie BJ als Positiv-Kontrolle, die Negativ-Kontrollen für die cDNA Synthese (cDNA K) und die PCR (PCR K), mit den dazugehörigen Primern, Haushaltsgen (H), SeV (Se), cMyc (cM), Sox2 (S), Oct3/4 (O), Klf4 (K) und dem Marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, von Thermo Scientific.

In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass bei Probe SV022 nur das Haushaltsgen und Oct3/4 amplifiziert wurden. Die Positiv- und Negativ-Kontrollen haben gezeigt, dass die PCR- und die cDNA-Synthese funktioniert haben. Allerdings kann zu Oct3/4 keine Aussage gemacht werden, da für Oct3/4 keine PCR-Kontrolle durchgeführt wurde; es handelt sich bei der überall auftauchenden Bande wahrscheinlich um ein Artefakt.

Abschließend lässt sich jedoch sagen, wenn ausschließlich der SeV-Primer betrachtet wird, dass bei den iPS-Zellen aus PBMCs bereits in den frühen Passagen teilweise kein SeV mehr nachweisbar ist (siehe E SV099 und E SV132). Werden hingegen iPS-Zellen aus Fibroblasten betrachtet, wie in Abbildung 20 und Abbildung 21 zu sehen, ist SeV überwiegend in den frühen und teilweise auch noch in den späten Passagen nachweisbar.

### 3.6 Nachweis der Pluripotenz der induzierten pluripotenten Stammzellen

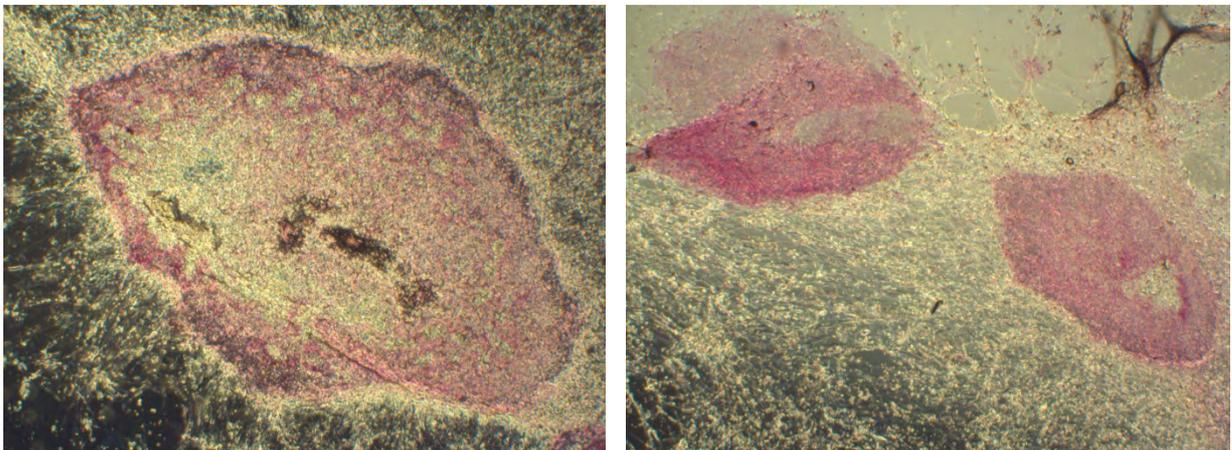
Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, um die Pluripotenz der iPS-Klone nachzuweisen und zu zeigen, dass die Reprogrammierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit dem nicht integrierenden Sendai-Virus funktioniert hat. Welche Nachweise bei welchem Klon durchgeführt wurden, ist in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14** Übersicht der Zellen, mit denen verschiedene Nachweismethoden durchgeführt wurden. Abkürzungen in der Tabelle bedeuten: Alkalische Phosphatase-Färbung (AP-Färbung), Immunfluoreszenz-Färbung (If-Färbung), *Embryoid body formation protocol* (EB formation protocol), *Forced Aggregation* (FA), Zellen des Spenders E (E) und Zellen des Spenders G (G).

Klon	E	E	E	E	G	E	E	E	E
	SV090	SV091	SV093	SV099	SV104	SV111	SV113	SV132	SV162
AP-Färbung	+	+	+	+	+	+	-	+	-
If-Färbung	+	+	+	+	-	+	+	+	+
FA	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Klon	E	E	E	E	E		Con2	Con2	
	SV190	SV193	SV194	SV195	SV196	SV026	SV082	SV083	
AP-Färbung	-	-	-	-	-	-	-	-	
If-Färbung	+	+	+	+	+	-	-	-	
EB formation	-	-	-	-	-	+	-	-	
FA	-	-	-	-	-	-	+	+	

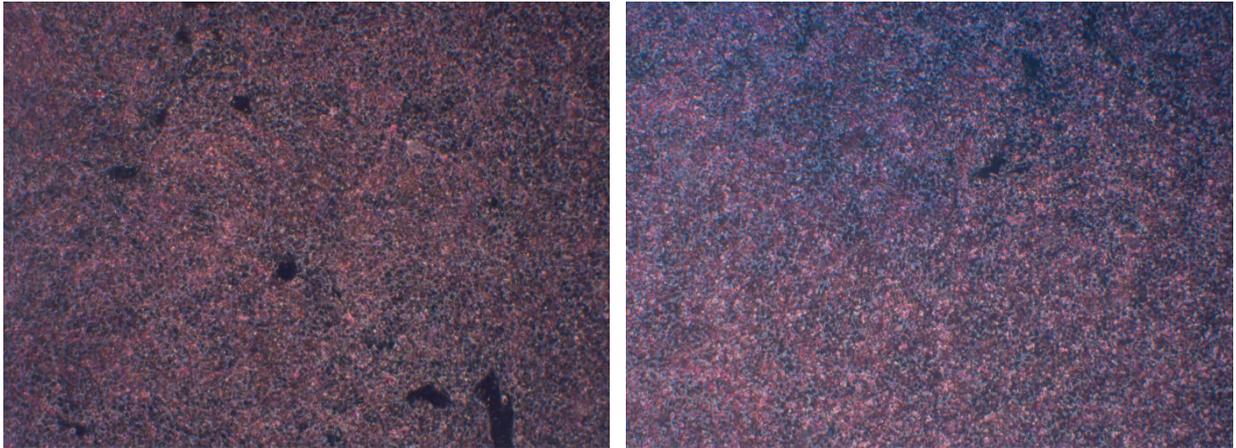
### 3.6.1 Alkalische Phosphatase-Färbung

Bei undifferenzierten ESC und iPS-Zellen wird alkalische Phosphatase exprimiert. Alkalische Phosphatase ist ein Hydrolase-Enzym, das für die Dephosphorylierung von Molekülen, wie Nukleotiden, Proteinen und Alkaloiden, unter alkalischen Bedingungen zuständig ist. Werden die iPS-Zellen mit der alkalischen Phosphatase-Färbung gefärbt, erscheinen undifferenzierte Zellen rot oder violett, während differenzierte Zellen farblos erscheinen. Die alkalische Phosphatase-Färbung wurde wie in Methode 2.2.6 beschrieben durchgeführt. Diese Untersuchung wurde mit der Generations-Platte, d. h. dem Well, aus dem alle iPS-Zellen stammen, und einigen Klonen von Spender E durchgeführt. Zusätzlich wurde der Klon G SV104 untersucht.



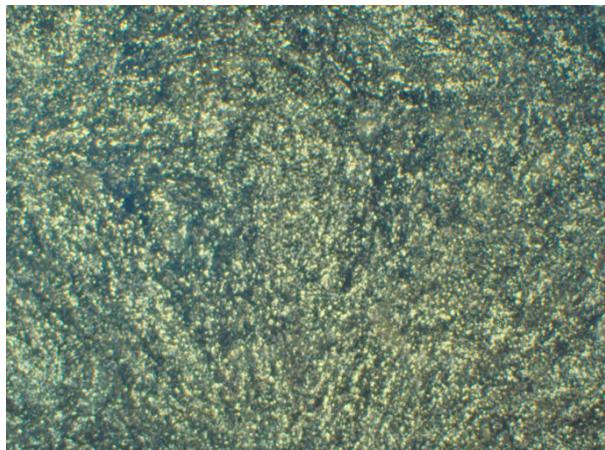
**Abbildung 22** Aufnahme der alkalischen Phosphatase-Färbung, zu sehen sind einzelne Klone in der Generations-Platte von Spender E.

In Abbildung 22 ist ein Ausschnitt der alkalischen Phosphatase-Färbung des Wells dargestellt, das  $4,5 \times 10^4$  Zell enthielt und mit der MOI 6 transduziert wurde. Es sind deutlich die abgegrenzten Bereiche zwischen den rot gefärbten iPS-Zellen und den umliegenden Zellen zu erkennen.



**Abbildung 23** Gezeigt ist die alkalische Phosphatase-Färbung der Klone E SV099 P5 (links) und E SV132 P5 (rechts).

Da es sich bei den beiden Klonen um Zellen handelt, die aus der Generations-Platte isoliert und durch das Passagieren der Zellen selektiert wurden, sind bei diesen beiden Klonen nur rot gefärbte Zellen zu sehen und nicht wie in Abbildung 23 rot gefärbte iPS-Klone und farblose, nicht gefärbte andere differenzierte Zellen. Daher lässt sich eindeutig sagen, dass es sich um Zellen handelt, die alkalische Phosphatase positiv sind.



**Abbildung 24** Aufnahme der alkalischen Phosphatase-Färbung bei dem Klon G SV104 P5.

In Abbildung 24 ist ein Ausschnitt der alkalischen Phosphatase-Färbung des Klons G SV104 P5 zu sehen. Dieser Klon unterschied sich morphologisch bereits bei der Kultivierung von den anderen iPS-Zellen. Durch die alkalische Phosphatase-Färbung wurde dieser Eindruck bestätigt. Es konnten keine positiven roten Zellen im Well ausgemacht werden.

### 3.6.2 Immunfluoreszenz-Färbung

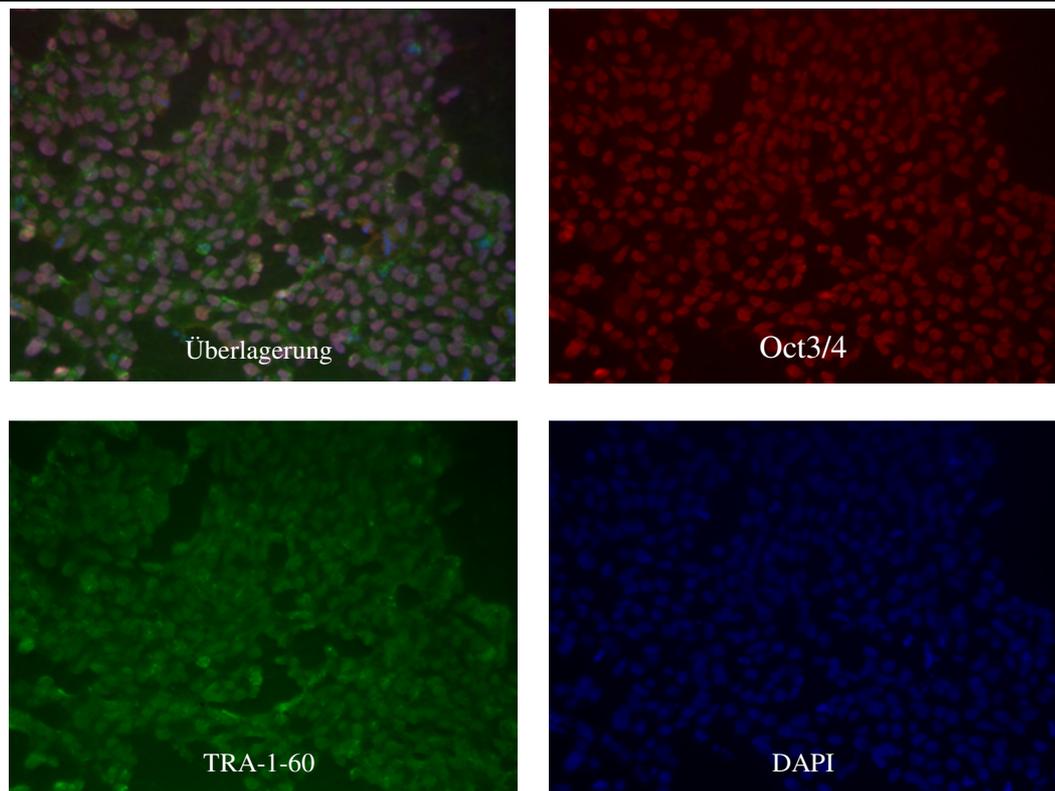
Bei der Immunfluoreszenz-Färbung werden bestimmte Proteine mithilfe von Antikörpern detektiert, deren Expression spezifisch für humane pluripotente Stammzellen sind, und mikroskopisch untersucht. Oct3/4, Sox2 und Nanog sind wichtige Pluripotenzfaktoren, die in embryonalen Stammzellen, embryonalen Karzinomen und induzierten pluripotenten Stammzellen exprimiert werden. Zusammen bilden sie ein Netzwerk, das die Zelle im pluripotenten Zustand hält. Zusammen mit Klf4 und c-Myc sind sie wichtige Regulatoren des Transkriptionsnetzwerkes und sorgen für den Erhalt und die Erneuerung der Pluripotenz in einer Zelle. Bei differenzierten Zellen sind diese Faktoren herunterreguliert.

Die Antikörper SSEA4, TRA-1-81 und TRA-1-60 erkennen Antigene auf der Zelloberfläche von pluripotenten Zellen. SSEA4 erkennt beispielsweise ein Glykolipid Kohlenhydrat Epitop, die Antikörper TRA-1-60 und TRA-1-81 erkennen unterschiedliche proteoglykan Epitope. Bei der Differenzierung der Zelle gehen diese Zelloberflächenmarker verloren, was einem Verlust des pluripotenten Potenzials entspricht.

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist eine Verbindung, um den Zellkern zu färben, sie lagert sich in der kleinen Furche der DNA an AT-Cluster an. Wenn die Verbindung mit ultraviolettem Licht angeregt wird, fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe. Zusammen mit doppelsträngiger DNA liegt das Emissionsmaximum bei 461 nm und das Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge 358 nm.

Bei der HEXT Stem Cell Facility werden üblicherweise nur Oct3/4 und TRA-1-60 untersucht. In diesem Projekt wurden teilweise auch die anderen Pluripotenzmarker verwendet. Die einzelnen Antikörperkombinationen sind in der Methode 2.2.7 beschrieben.

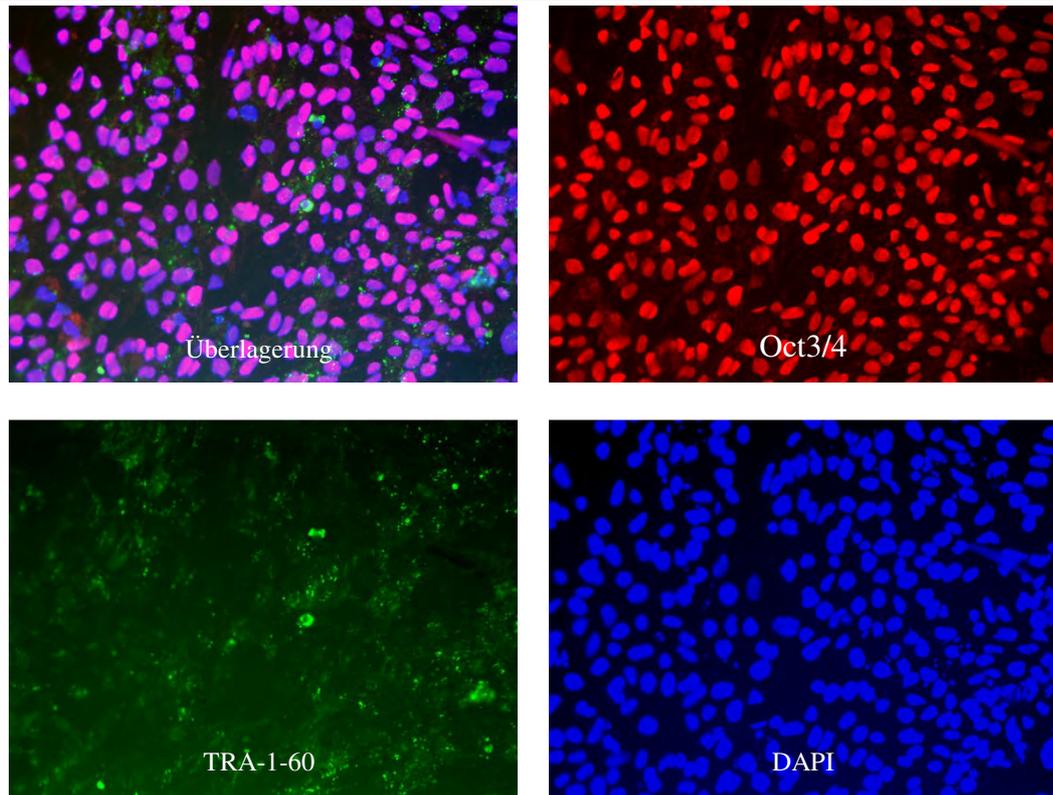
Im Folgenden sind Beispiele des Klons E SV099 Passage 5 (Abbildung 25), der mit der Antikörperkombination Oct3/4 und TRA-1-60 untersucht wurde, und des Klons E SV132 Passage 5 (siehe 115 bis Abbildung 28), der mit allen Antikörperkombinationen untersucht wurde, dargestellt.



**Abbildung 25** Aufnahmen des Klons SV099 Passage 5 mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Links oben ist die überlagerte Darstellung der einzelnen Bilder von Oct3/4, TRA-1-60 und DAPI zu sehen. Rechts oben ist Oct3/4, links unten ist TRA-1-60 und rechts unten ist DAPI abgebildet.

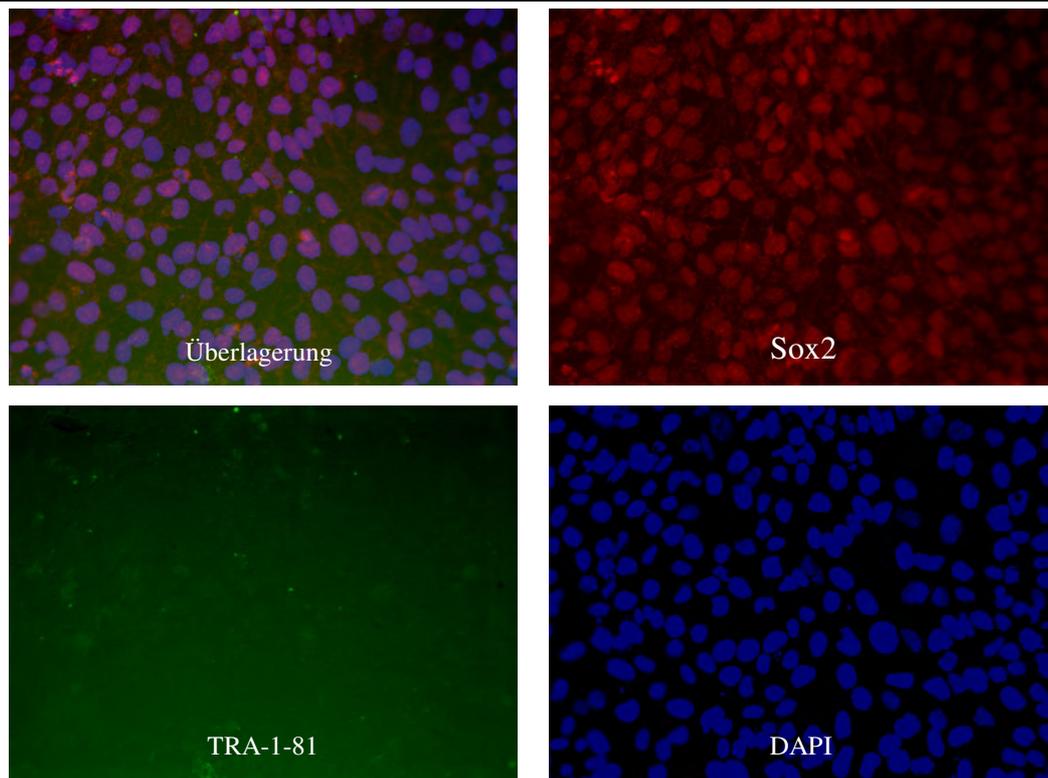
Wie die Abbildung 25 zeigt, sind bei Klon SV099 alle Zellen, die sich im repräsentativen Bildausschnitt befinden, Oct3/4 und TRA-1-60 positiv. Da dieser Klon auch alkalische Phosphatase positiv war und mit ihm das Differenzierungsprotokoll durchgeführt werden konnte, handelt es sich bei diesem Klon um induzierte pluripotente Stammzellen, die aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes dedifferenziert wurden.

Im Folgenden ist Klon SV132 dargestellt, der mit allen zur Verfügung stehenden Markern untersucht wurde.



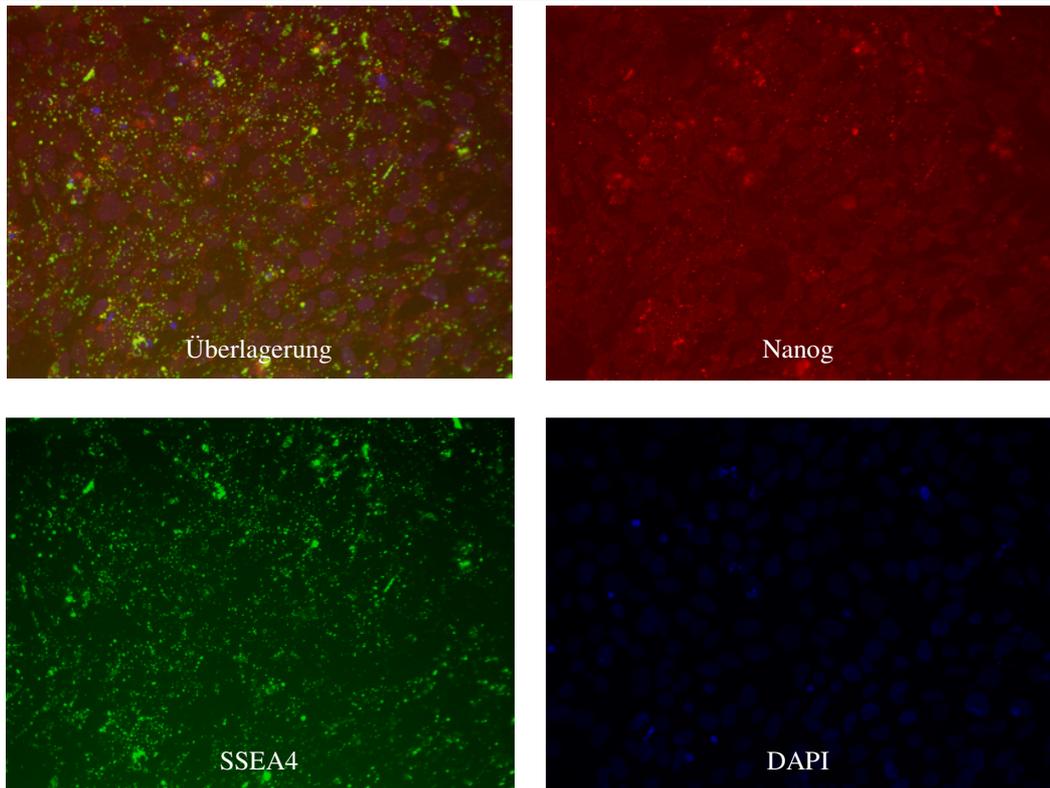
**Abbildung 26** Aufnahmen des Klons SV132 Passage 5 mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Links oben ist die überlagerte Darstellung der einzelnen Bilder von Oct3/4, TRA-1-60 und DAPI zu sehen. Rechts oben ist Oct3/4, links unten ist TRA-1-60 und rechts unten ist DAPI abgebildet.

Wie die 115 zeigt, sind bei SV132 bei dieser Färbung die Zellen, die sich im repräsentativen Bildausschnitt befinden, Oct3/4 und TRA-1-60 positiv.



**Abbildung 27** Aufnahmen des Klons SV132 Passage 5 mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Links oben ist die überlagerte Darstellung der einzelnen Bilder von Sox2, TRA-1-81 und DAPI zu sehen. Rechts oben ist Sox2, links unten ist TRA-1-81 und rechts unten ist DAPI abgebildet.

Wie die 115 zeigt, sind bei Klon SV132 alle Zellen, die sich im repräsentativen Bildausschnitt befinden, Sox2 positiv. TRA-1-81 ist bei diesem Klon augenscheinlich nicht nachweisbar, auch ist bei Sox2 sehr viel Hintergrund zu erkennen. Dies ist jedoch nicht bei allen Färbungen mit Sox2 und TRA-1-81 der Fall. Die Begründung dafür kann sein, dass jede Zelle anders ist und sie sich in unterschiedlichen Stadien der Reprogrammierung befinden können oder technische Probleme bzw. schlechte Bindung der Antikörper im Vergleich zu Oct3/4 und TRA-1-60 auftreten.



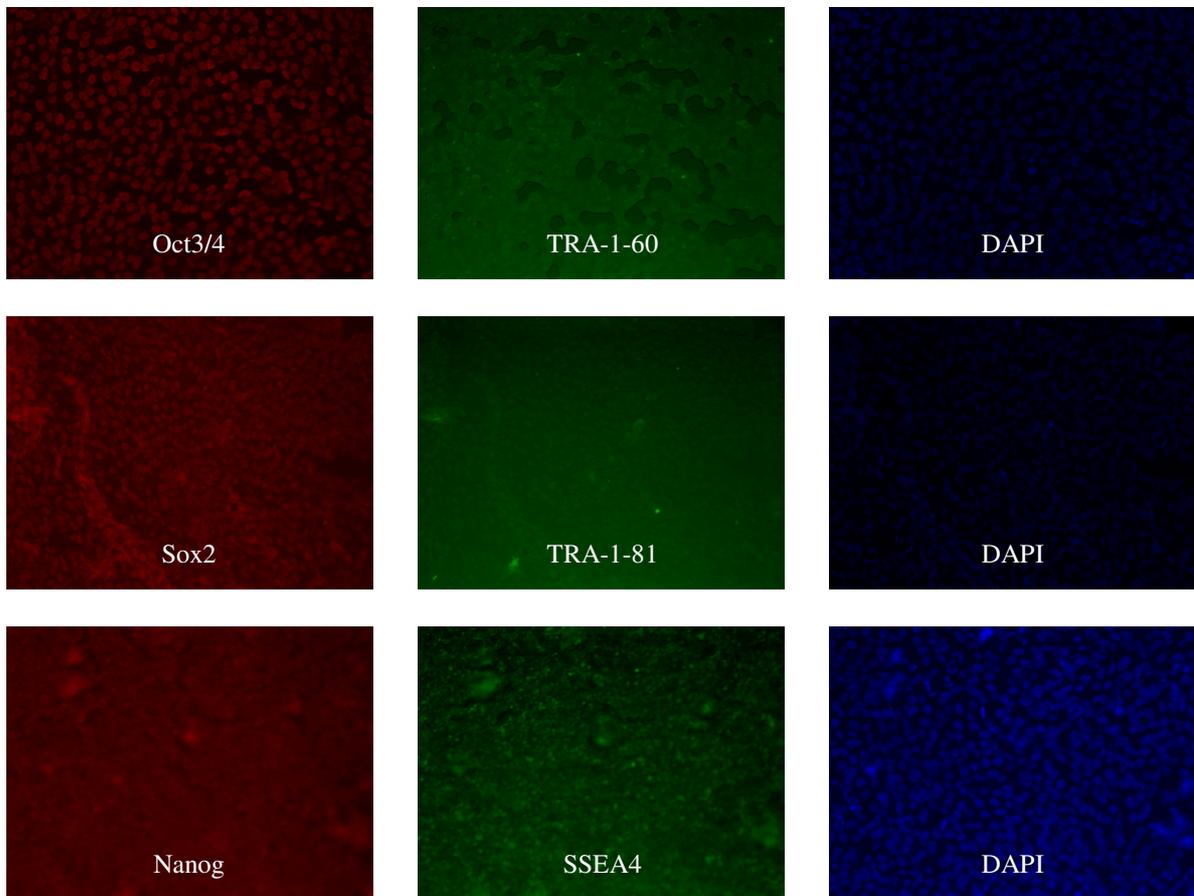
**Abbildung 28** Aufnahmen des Klon SV132 Passage 5 mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Links oben ist die überlagerte Darstellung der einzelnen Bilder von Nanog, SSEA4 und DAPI zu sehen. Rechts oben ist Nanog, links unten ist SSEA4 und rechts unten ist DAPI abgebildet.

Wie die Abbildung 28 zeigt, sind bei SV132 bei dieser Färbung die Zellen, die sich im repräsentativen Bildausschnitt befinden, SSEA4 positiv, Nanog stellt sich unklar dar. Die DAPI-Färbung ist nur sehr schwach zu sehen, obwohl einige Zellen im Kern gefärbt sind. Auch bei dieser Färbung fällt auf, dass bei Nanog sehr viel Hintergrund zu sehen ist. Die Begründung dafür kann dieselbe sein wie bei der Färbung mit Sox2 und TRA-1-81.

Auffällig bei Klon SV132 ist, dass die Färbungen der Oberflächenmarker (60/81/SEAA) sehr unterschiedlich ausfallen. Das kann daran liegen, dass TRA-1-60 und SSEA4 an verschiedene Epitope der Oberfläche binden oder daran, dass es unterschiedliche Antikörper sind.

Wenn Bilder der spezifischen Marker für die Transkriptionsfaktoren in Abbildung 26 bis Abbildung 28 miteinander verglichen werden, so ist auffällig, dass die Färbung mit Oct3/4 am klarsten ist, wohingegen bei den Färbungen mit Sox2 und Nanog sehr viel Hintergrund zu erkennen ist. Dies ist auch bei den anderen Bildern bei dieser Untersuchung festzustellen.

Da der Klon SV132 jedoch alkalische Phosphatase positiv und nur bei der Immunfluoreszenzfärbung bei TRA-1-81 negativ ist, handelt es sich um induzierte pluripotente Stammzellen, die aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes dedifferenziert wurden.



**Abbildung 29** Aufnahmen des Klons SV195 Passage 4, abgebildet sind die einzelnen Bilder, die mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. Links ganz oben ist Oct3/4, in der Mitte ganz oben ist TRA-1-60. Links in der Mitte ist Sox2, in der Mitte ist TRA-1-81. Links unten ist Nanog, in der Mitte unten ist SSEA4 und rechts ist DAPI dargestellt.

Dass bei einigen Zellen Oct3/4 und Sox2 positiv und Nanog und die Zelloberflächen-spezifischen Antikörper negativ sind, kann daran liegen, dass Oct3/4 und Sox2 künstlich in die Zellen eingebracht wurden, wohingegen Nanog und die Zelloberflächenrezeptoren erst exprimiert werden, wenn sich die Zelle in einem stabilen pluripotenten Zustand befindet. Der Klon SV195 ( 115) stellt ein sehr gutes Beispiel dafür dar. In der Abbildung ist zu erkennen, dass der Klon Oct3/4 und Sox2 positiv ist, jedoch Nanog und die Zelloberflächenrezeptoren, außer SSEA, nicht nachgewiesen werden können.

In der folgenden Tabelle 15 werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung zusammengefasst. Es sind die einzelnen Antikörperkombinationen und die Klone aufgetragen worden. Wenn die Zellen mikroskopisch positiv erschienen, wurden sie in der dazugehörigen Reihe mit einem Plus versehen, negativ erscheinende mit einem Minus.

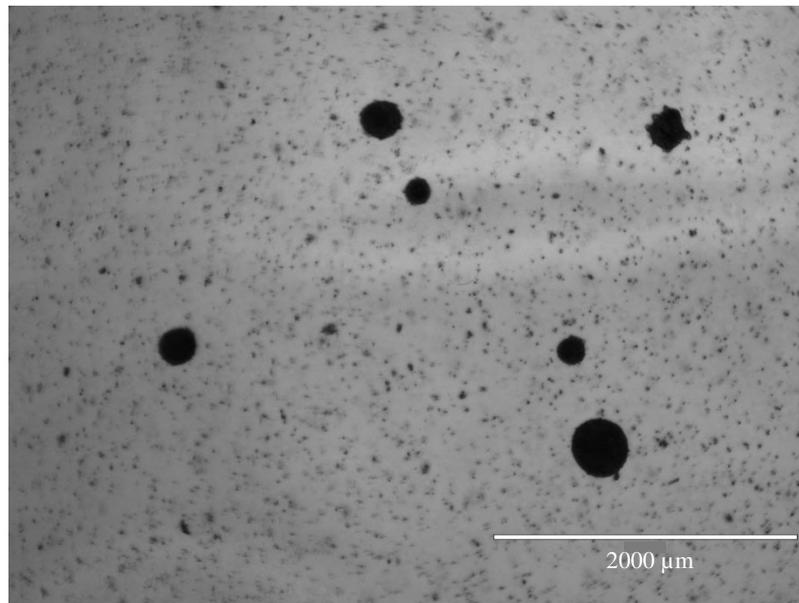
**Tabelle 15** Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung. In der Tabelle sind die verwendeten Antikörperkombinationen dargestellt; wenn diese positiv erschienen, wurden sie mit einem Plus markiert.

Klon	E SV090	E SV093	E SV113	E SV132	E SV162
Oct3/4/TRA-1-60	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Sox2/TRA-1-81	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-
Nanog/SSEA4	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+
Klon	E SV190	E SV193	E SV196	E SV194	E SV195
Oct3/4/TRA-1-60	+/+	+/-	+/+	+/-	+/-
Sox2/TRA-1-81	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-
Nanog/SSEA4	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+
Klon	E SV091	E SV099	E SV111		
Oct3/4/TRA-1-60	-/+	+/+	+/-		

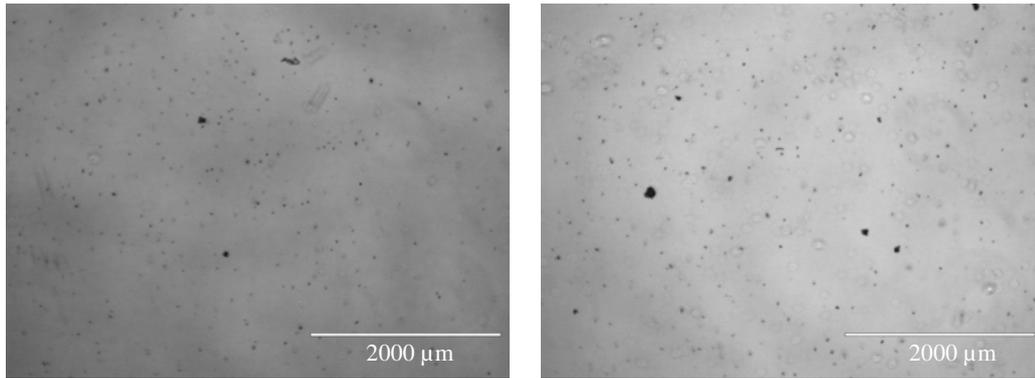
Es ist auffällig, dass die Zellen in den meisten Fällen für den Transkriptionsfaktor positiv waren und manchmal für den Zelloberflächen-Marker negativ, wahrscheinlich aufgrund von technischen Problemen. Nur bei dem Klon E SV091, der bei Passage 5 mit der Antikörperkombination Oct3/4 und TRA-1-60 untersucht wurde, ist Oct3/4 augenscheinlich negativ und TRA-1-60 positiv. Da jedoch alle immunhistochemisch untersuchten Klone bereits mit der alkalischen Phosphatase-Färbung untersucht worden sind und positiv waren, ist davon auszugehen, dass es sich um induzierte pluripotente Zellen handelt.

### 3.6.3 Bildung von embryonalen Körperchen

Das Ziel bei der Bildung der embryonalen Körperchen ist der Nachweis der spontanen Differenzierung nach dem Differenzierungs-Protokoll. Zunächst wurde das embryoid body Bildungs-Protokoll mit iPS-Zellen der HEXT Stem Cell Facility durchgeführt. Wie in 2.2.8.1 beschrieben wurde mit den Zellen SV026 und C25 verfahren. Begonnen wurde mit dem hiPS-Klon SV026 aus BJ humanen Fibroblasten. Aufgrund der geringen Anzahl der EBs von SV026 wurde das Protokoll zur Bildung von EBs mit den hiPS-Klonen Con2 SV082 und Con2 SV083 erneut durchgeführt. Dabei wurden jedoch gar keine EBs gebildet (Abbildung 31). Deswegen wurde als Alternative das Protokoll der *Forced Aggregation* getestet. Die EBs sollten nach dem *embryoid body* Bildungs-Protokoll oder der *Forced Aggregation* einen gleichmäßigen und definierten Rand haben (Abbildung 30), stabil sein und in ausreichender Zahl vorhanden sein, damit mit dem Differenzierungsprotokoll fortgefahren werden kann.

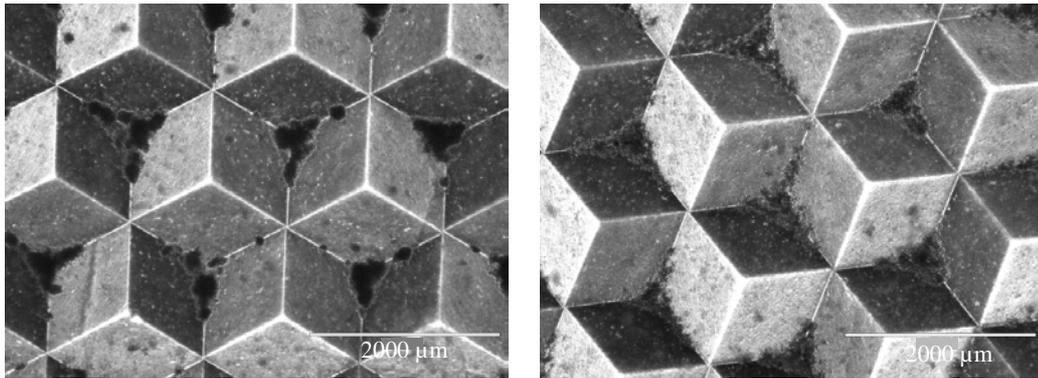


**Abbildung 30** Mikroskopische Aufnahme der embryonalen Körperchen von den Zellen SV026, einen Tag nachdem das *embryoid body* Bildungs-Protokoll durchgeführt wurde. Aufgenommen mit dem Evos fl Mikroskop von AMG (2x).

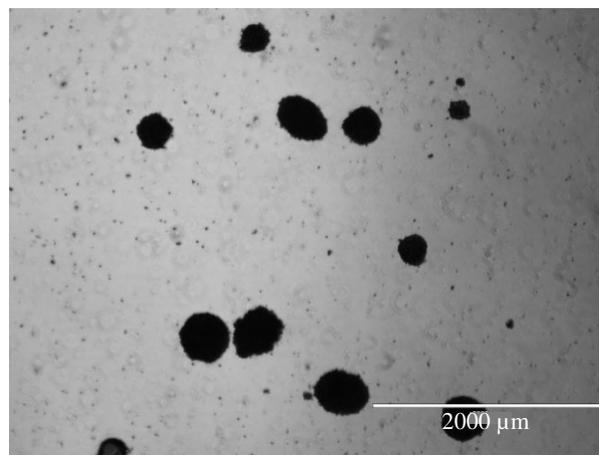


**Abbildung 31** Mikroskopische Aufnahme der hiPS-Klone Con2 SV083 (links) und Con2 SV082 (rechts), einen Tag nachdem das *embryoid body* Bildungs-Protokoll durchgeführt wurde. Aufgenommen mit dem Evos fl Mikroskop von AMG (2x).

Die Zellen wurden einen Tag nach Durchführung der Methode 2.2.8.2 in Pluronic beschichtete T75 Flaschen überführt. Die undifferenzierte Kultur von SV083 sah vor der *Forced Aggregation* vielversprechender aus als SV082, nach der *Forced Aggregation* sahen jedoch wieder die Zellen bei SV082 (Abbildung 31, links) besser aus als SV083 (Abbildung 31, rechts). Die iPS-Zellen von SV082 haben sich auf der MKO-Oberfläche bereits zu Zellhaufen zusammengeschlossen, wohingegen die iPS-Zellen von SV083 in den Vertiefungen der MKO-Oberfläche noch sehr vereinzelt erscheinen. Einige Tage nachdem die Zellen in die Flaschen umgesetzt wurden, waren jedoch bei Con2 SV082 kaum und nicht besonders gute EBs zu erkennen, wohingegen bei Con2 SV083 mehr und bessere EBs gebildet waren. Um die Menge der EBs zu erhöhen, wurde die *Forced Aggregation* erneut durchgeführt, nachdem die iPS-Zellen Con2 SV082 und SV083 in ausreichender Zahl gewachsen waren. Bei diesem Versuch wurden mit Con2 SV083 mehr EBs erzeugt. Die EBs des iPS-Klon SV083 wurden in eine Pluronic beschichtete T75 Flasche überführt und das Differenzierungsprotokoll durchgeführt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde von Michaela Mieke mit einem Klon, der von Spender E mit nicht integrierendem Sendai-Virus erzeugt wurde, die *Forced Aggregation* durchgeführt. Aus dieser Aggregation resultierten sehr viele, gut gebildete EBs (Abbildung 33).



**Abbildung 32** Mikroskopische Aufnahme der MKO-Oberfläche und der hiPS-Klone Con2 SV082 (links) und Con2 SV083 (rechts), mit einer Zweifach-Vergrößerung, am Tag der *Forced Aggregation*.

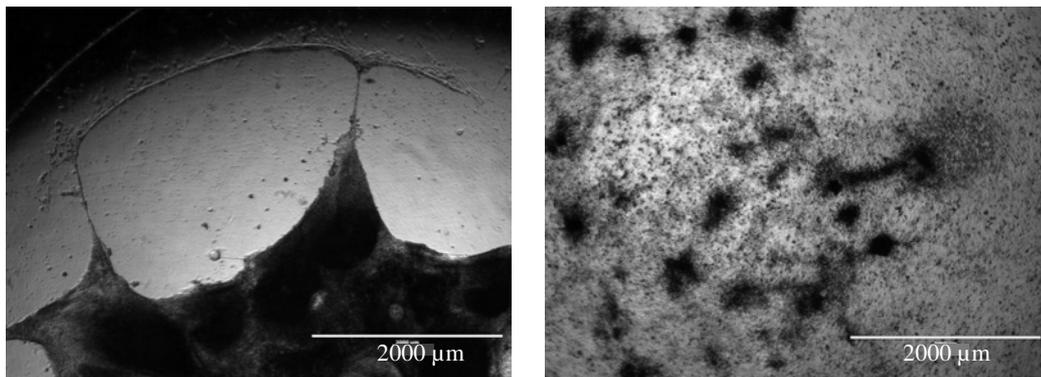


**Abbildung 33** Embryonale Körperchen vom iPS-Klon E SV099 P14, mit der *Forced Aggregation* von Michaela Miede erzeugt. Aufgenommen in den Pluronic beschichteten T75 Flaschen mit dem Evos fl Mikroskop (2x).

### 3.6.3.1 Differenzierungsprotokoll

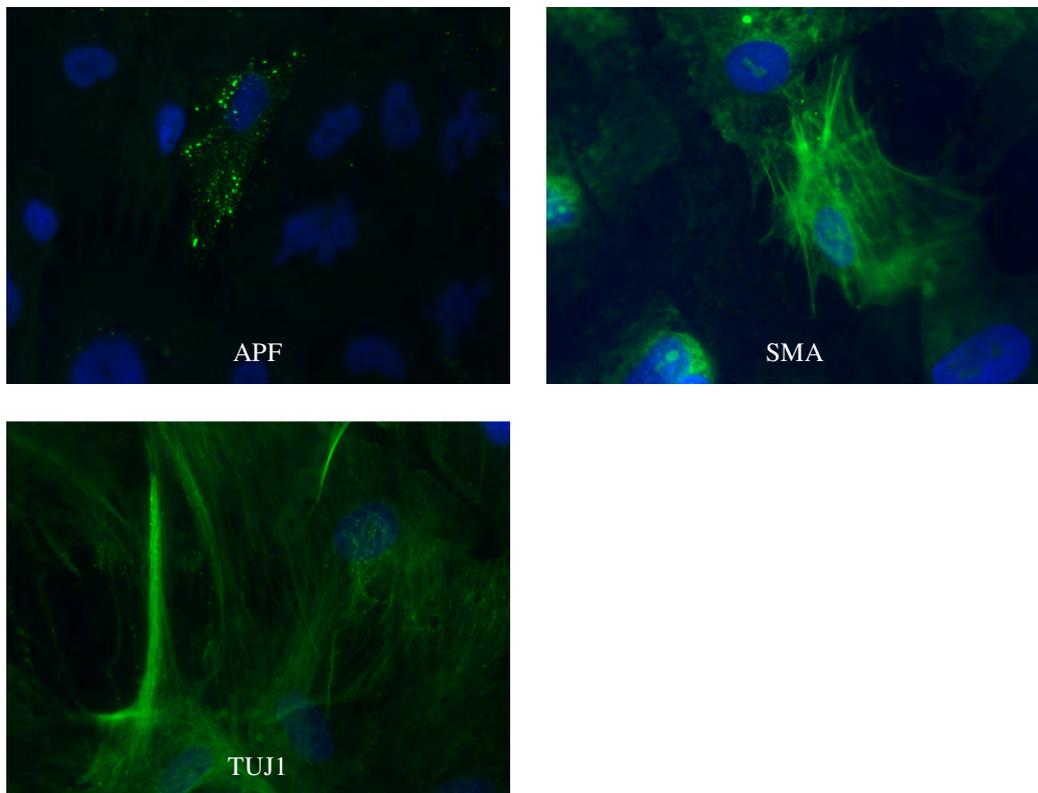
Das Differenzierungsprotokoll wurde wie in der Methode 2.2.8.3 beschrieben durchgeführt. Die EBs von SV026 mit dem embryoid body Bildungs-Protokoll wurde nach zwei Wochen aus der T25 Flasche in vier Wells einer 4-Well-Multischale überführt. Zwei Wells der 4-Well-Multischale wurden mit 20 % KOSR-Medium, die anderen beiden Wells mit 20 % FCS-Medium versorgt. Die EBs des iPS-Klon Con2 SV083, die als Erstes mit der *Forced Aggregation* erzeugt worden waren, wurden nach zwei Wochen wie in der Methode 2.2.8.3 beschrieben in ein Well einer 24-Well-Platte überführt und erhielten 20 % FCS-Medium. Die EBs des iPS-Klons Con2 SV083, die als Zweites erzeugt worden waren, wurden auf sieben Wells einer 24-Well-Platte verteilt, drei Wells erhielten 20 % FCS-Medium, die anderen vier Wells erhielten 20 % KOSR-Medium. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Entwicklung der Zellen wurde jeden Tag mittels Mikroskop verfolgt.

Bei den EBs SV026 in 20 % KOSR-Medium haben sich nach ca. zwei Wochen andere Zellen gebildet, d. h. die Zellen haben ihren undifferenzierten Zustand verloren und fangen an zu differenzieren. Es könnte sich um neuronale Zellen handeln (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Dies muss jedoch noch mit einem spezifischen Marker getestet werden. Auch in den anderen Wells der EBs SV026 sind Veränderungen an den Zellen zu erkennen, jedoch muss auch bei diesen mit spezifischen Markern getestet werden, um welche Zellen bzw. welches Keimblatt es sich handelt. Dafür war im Rahmen dieses Projektes allerdings keine Zeit mehr. Auch bei den EBs SV083 sind augenscheinlich leichte Veränderungen zu erkennen gewesen. Allerdings musste nach ca. zwei Wochen festgestellt werden, dass die EBs nicht stabil waren und auseinanderfielen. In Abbildung 34 ist die mikroskopische Aufnahme der EBs dargestellt. Es handelt sich dabei um EBs, die bei der zweiten *Forced Aggregation* entstanden sind; sie sind sechs Tage mit 20 % FCS-Medium kultiviert worden.



**Abbildung 34** Links: Differenzierte, angeheftete EBs SV026, die in 20 % KOSR-Medium kultiviert worden sind. Rechts: Aufnahme der EBs des iPS-Klons SV083 angeheftet und sechs Tage kultiviert mit 20 % FCS. Die EBs sind nicht mehr zu erkennen und die Zellen sind wieder vereinzelt. Beide Aufnahmen wurden mit dem Evos fl bei zweifacher Vergrößerung aufgenommen.

Im Folgenden dargestellt ist die Abbildung mit den spezifischen Markern zum Nachweis der Differenzierung in Entoderm, Ektoderm und Mesoderm des Klons SV099, durchgeführt von der HEXT Stem Cell Facility.



**Abbildung 35** Aufnahmen des Klons SV099 zum Nachweis der Differenzierung mit den Markern *polyclonal rabbit anti-human alpha-1-fetoprotein* (AFP) links oben, *mouse anti-actin smooth muscle* (SMA) rechts oben, *anti-tubulin beta III monoclonal* (TUJ1) links unten.

In Abbildung 35 ist das Differenzierungspotenzial des iPS-Klons SV099 in Feeder-freien Bedingungen dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung der EBs in alle drei Keimblätter Entoderm, Ektoderm und Mesoderm und somit die Reprogrammierung des Klons SV099 aus PBMCs funktioniert hat.

## 4 Diskussion

### 4.1 Kryokonservierung

Die PBMCs, die mit der Methode 2.2.1.7 isoliert wurden, sollten nach der Isolierung zunächst kryokonserviert werden, da es logistisch unmöglich ist, von 50 000 Probanden innerhalb eines ziemlich kurzen Zeitraumes iPS-Zellen zu generieren. Bei den Versuchen zu der Kryokonservierung wurden die PBMCs direkt nach der Isolierung in verschiedenen Zelldichten eingefroren und über einige Wochen in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert, um die späteren Bedingungen zu simulieren. Um die Ergebnisse der kryokonservierten PBMCs vergleichen zu können, wurden am Tag des Auftauens frische PBMCs isoliert. Die PBMCs wurden in verschiedenen Zelldichten ausgesät und nach fünf Tagen die Zellen gezählt. Die Ergebnisse zeigten, dass die frisch isolierten PBMCs am besten proliferiert haben, alle kryokonservierten PBMCs haben in diesem Versuch schlechter proliferiert. Jedoch müssen die PBMCs bei der Studie kryokonserviert werden. Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass es durch die Kryokonservierung eine Verschlechterung in der Proliferation der PBMCs gibt (Mallone *et al.* 2011). Betrachtet man daher nur die kryokonservierten PBMCs, zeigte sich in Abbildung 12 bis Abbildung 14 in den Ergebnissen, dass die Zellen, die in der Zelldichte  $1 \times 10^7$  kryokonserviert wurden, am besten proliferiert haben. Diese Zellen hatten eine Proliferation von 2 oder mehr, die für die Transduktion benötigt wird. Des Weiteren werden für die spätere Transduktion der PBMCs mit Sendai-Virus ca.  $7,5 \times 10^5$  Zellen benötigt und aus eigener Erfahrung sterben durch die Kryokonservierung ungefähr 70 % der Zellen. Daher wird empfohlen, die PBMCs in der Studie in dieser Zelldichte zu kryokonservieren. So erhält man ungefähr drei Kryos pro Studienteilnehmer, da bei der Isolierung zwischen  $6,25 \times 10^5$  und  $3,1 \times 10^6$  (Brown *et al.* 2010) bzw. 6,25 und  $7,5 \times 10^6$  Zellen pro mL Blut (eigene Ergebnisse) Zellen erhalten werden können. Die Versuche haben gezeigt, dass die Kryokonservierung möglich ist, genügend Zellen das Auftauen überleben und diese für die Transduktion ausreichend proliferieren.

## 4.2 Der geeignete Antikörper für die Identifizierung der CD3+ T-Lymphozyten

Die PBMCs wurden zunächst in Okt-3 beschichteten Wells kultiviert, um die Proliferation anzuregen und sie zu stimulieren. Da der Okt-3 anti-CD3 Antikörper jedoch, wie der Name bereits sagt, an den CD3-Rezeptor bindet, bestand die Annahme, dass der CD3-Rezeptor durch diesen bereits besetzt ist und für eine Färbung nicht mehr zur Verfügung steht. Daher wurden verschiedene Antikörper und Antikörperkombinationen ausprobiert, um die T-Lymphozyten zu identifizieren. Bei der Durchflusszytometrie mit den verschiedenen Antikörperkombinationen konnte gezeigt werden, dass der beste Antikörper zur Identifizierung der T-Lymphozyten der sekundäre Antikörper Alexa Fluor 488 Anti Mouse IgG ist (Abbildung 11). Die Verwendung der Antikörperkombinationen ist deutlich komplizierter und aufwendiger und identifiziert nur wenig mehr Zellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zu Beginn der Kultivierung (Tag 0) ca. 74 % der Lymphozyten bereits T-Lymphozyten sind und dass diese Population nach fünf Tagen der Kultivierung mit Stimulation auf ca. 87 % anwächst. Diese Beobachtung bestätigt die Angaben, die bereits bei einer anderen Arbeitsgruppe, die eine solche Reprogrammierung durchgeführt hat, gemacht wurden. Allerdings waren dort zu Beginn nur 71 % T-Lymphozyten und nach fünf Tagen bereits 96 % T-Lymphozyten vorhanden (Seki *et al.* 2012).

## 4.3 Parameter der Kultivierung

In Seki *et al.* wird die Kultivierung der PBMCs in mit Okt-3 human anti-CD3 Antikörper beschichteten Wells und in Anwesenheit von IL-2 (xy IU/mL) durchgeführt. Auch in Brown *et al.* wird die Kultivierung der PBMCs mit IL-2 (300 IU/mL) durchgeführt, um T-Lymphozyten Signalwege, Zytokin Promotortranskription, Zellüberleben und das Wachstum zu aktivieren. Zunächst wurden die PBMCs für fünf Tage in Okt-3 beschichteten Wells mit verschiedenen IL-2 Konzentrationen kultiviert und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. In Abbildung 11 in den Ergebnissen ist erkennbar, dass durch die Stimulation mit Okt-3 und IL-2 nach fünf Tagen eine Zunahme der T-Lymphozyten bis zu 87 % erreicht werden kann. Zunächst schien es so, als erziele die Stimulation mit 50 IU/mL IL-2 die besten Ergebnisse. Jedoch wurde bei der Kultivierung für die Transduktion die beste Proliferation mit 300 IU/mL IL-2 erreicht. Bei näherer Betrachtung der Zellen, die mit  $1 \times 10^7$  kryokonserviert wurden bei

der ersten Durchflusszytometrie (Abbildung 12 bis Abbildung 14), wurden bei IL-2 (150/300) bei den anderen Zelldichten auch Proliferationen von ungefähr 2 erreicht. Weiter konnte gezeigt werden, welche negativen Auswirkungen die Kultivierung ohne Okt-3 und IL-2 auf die PBMCs hat, da bei diesen nach fünf Tagen Kultivierung nur noch 17 % der Lymphozyten T-Lymphozyten waren.

Aufgrund wirtschaftlicher Ersparnis, einfacherer Handhabung und der Erfahrung der Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem die PBMCs in Okt-3 beschichteten Wells und mit Okt-3 im Medium kultiviert wurden. Es zeigte sich, dass die PBMCs zwar durch das Okt-3 im Medium ebenfalls stimuliert werden, jedoch wurden die besseren Ergebnisse mit den Zellen erzielt, die in Okt-3 beschichteten Wells kultiviert wurden. Auch bei dieser Kultivierung zeigte sich, dass bei der IL-2 Konzentration 50 IU/mL mehr T-Lymphozyten vorhanden waren, jedoch die Proliferation bei 300 IU/mL besser war.

Die Optimierung der Zelldichte ist sowohl für die Kultivierung als auch bei der Transduktion der PBMCs wichtig, da unterschiedliche Zellen unterschiedlichen Platzbedarf haben. Einige Zellen brauchen den Zell-Zell-Kontakt, um zu wachsen und zur Teilung angeregt zu werden. Bei anderen Zellen kann dieser Zell-Zell-Kontakt jedoch schon dazu führen, dass sie die Apoptose einleiten. Weiter ist bei der Transduktion wichtig, dass die Zellen nicht so dicht beieinander liegen und die Viren gut an die Oberflächenrezeptoren herankommen und so die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die Viren in die Zelle eindringen können. In den Vorversuchen zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurden frisch isolierte sowie zuvor kryokonservierte PBMCs in drei verschiedenen Zelldichten ausgesät und für fünf Tage kultiviert (Abbildung 12 bis Abbildung 14). Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die in der Zelldichte  $1 \times 10^5$  ausgesät wurden, am besten proliferiert haben. Da die Kultivierung in einer 96-Well-Platte durchgeführt wurde, musste die Zellzahl für die Transduktion dementsprechend hoch skaliert werden.

Daher wird empfohlen, die PBMCs für die Transduktion in der Zelldichte von  $6 \times 10^5$  in Okt-3 beschichteten Wells einer 24-Well-Platte und mit der IL-2 Konzentration 150 IU/mL zu kultivieren.

## 4.4 Transduktion

Nachdem die Kultivierungsbedingungen für die PBMCs feststanden, musste noch getestet werden, mit welcher Polybrene-Konzentration die Transduktion durchgeführt werden sollte. Es ist allgemein bekannt, dass Polybrene die Interaktion zwischen Virus und Zelle verbessert (Landazuri *et al.* 2007), allerdings auch ab einer gewissen Konzentration negativ auf die Zelle wirkt (Lin *et al.* 2011). Im Rahmen dieses Projektes und da ein Transduktionsexperiment mit dem CytoTune™-iPS Sendai Reprogramming Kit 1 629 Euro kostet, konnte kein separater Vorversuch gemacht werden, wie Polybrene die Effizienz der Transduktion verbessert. Daher wurde zunächst nur untersucht, wie verschiedene Polybrene-Konzentrationen auf die PBMCs wirken. Entgegen den Erwartungen (Lin *et al.* 2011) hatte Polybrene (0/2/4/8 µg/mL) keine negative Auswirkung auf die Zellen, ganz im Gegenteil. Mit steigender Polybrene-Konzentration verbesserte sich die Proliferation der Zellen (Tabelle 11). Bei den Zellen, die ohne Polybrene kultiviert wurden, fand fast keine Proliferation statt, wohingegen bei den Zellen, die mit Polybrene kultiviert wurden, eine Proliferation von 1,5 erreicht werden konnte.

Da die Unterschiede in den Proliferationsraten bei den verschiedenen Konzentrationen jedoch sehr gering sind und bei der späteren Transduktion noch der toxische Effekt des Virus hinzukommt, wird empfohlen, die PBMCs mit einer mittleren Polybrene-Konzentration von 4 µg/mL zu transduzieren (analog zu Brown *et al.* 2010).

In (Seki *et al.* 2012) wird die Transduktion der PBMCs bei einer MOI von 20 durchgeführt, wohingegen laut Manual des CytoTune™-iPS Sendai Reprogramming Kit die Transduktion mit der MOI von 3 durchgeführt werden soll. In diesem Projekt wurde aufgrund dessen die Transduktion mit den MOIs 1, 3 und 6 durchgeführt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass mindestens mit der MOI 6 gearbeitet werden muss, da lediglich bei dem Spender E bei der MOI 6 iPS-Klone erhalten wurden. Bei dem Spender G konnten zwar auch Klone gepickt werden, jedoch differenzierten diese relativ schnell wieder. Die transduzierten Zellen wurden zudem in zwei verschiedenen Zelldichten auf MEF ausgesät, um die optimale Zelldichte für das Replattieren zu ermitteln. Es hat sich gezeigt, dass nur bei den Zellen, die in den hohen Zelldichten ausgesät wurden, Klone gewachsen sind.

Des Weiteren wird in (Seki *et al.* 2012) eine Effizienz von 0,1 % publiziert – diese Effizienz konnte in diesem Projekt nicht erreicht werden. Allerdings wurde, wie oben beschrieben, von dieser Arbeitsgruppe auch eine MOI von 20 verwendet. In diesem Projekt konnte jedoch eine Effizienz von 0,05 % erreicht werden, wenn der Spender G außer Acht gelassen wird. Damit liegt die erreichte Effizienz deutlich über der, die mit herkömmlichen Methoden üblicherweise erreicht wird und zwischen 0,0008 und 0,001 % liegt (Loh *et al.* 2010). In den verschiedenen Publikationen werden die ersten Klone zwischen Tag 15 und Tag 35 gepickt, in diesem Projekt konnten die ersten Klone an Tag 21 gepickt werden, was damit im guten Mittel liegt. Dass bei Spender G keine iPS-Zellen erhalten wurden, kann nicht erklärt werden. Jedoch waren die Zellen dieses Spenders bereits während des gesamten Projektes in einem schlechteren Zustand. Bei der alkalischen Phosphatase-Färbung der Generations-Platte des Spenders E zeigte sich, dass noch weitere iPS-Klone hätten gepickt werden können, da es Bereiche gab, in denen gut abgegrenzte Kolonien mit roten Zellen zu sehen waren. Dies war aus zeitlichen Gründen nicht möglich, hätte die Effizienz der Transduktion jedoch noch weiter verbessern können (siehe Abbildung 22). Andererseits muss berücksichtigt werden, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass manche Klone doppelt gepickt wurden.

Da die Effizienz dieser Reprogrammierung unter der von (Seki *et al.* 2012) liegt, jedoch nur mit MOI 6 gearbeitet wurde, wird empfohlen, erneut eine Transduktion mit höheren MOIs durchzuführen und zukünftig die MOI mit den besten Ergebnissen zu verwenden.

Die PCR für den Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung hat gezeigt, dass bei den untersuchten Klonen der Reprogrammierung der PBMCs ausschließlich integrationsfreie Klone entstanden sind, im Gegensatz zu der Reprogrammierung von Fibroblasten. Nur bei Klon E SV090B wurde in der Passage 6 noch SeV amplifiziert, in der höheren Passage 12 ist kein Amplifikat mehr zu sehen. Bei den anderen getesteten Klonen aus PBMCs konnte bereits in den frühen Passagen kein SeV mehr nachgewiesen werden. Vergleicht man nun die Reprogrammierung der Fibroblasten mit der der PBMCs, so fällt auf, dass bei den Fibroblasten bei dem Großteil der Klone SeV auch noch in den späteren Passagen (P10) nachweisbar ist. Zum einen wäre es interessant gewesen, die Klone aus Fibroblasten zu einer noch etwas höheren Passage zu untersuchen. Zum anderen, die Klone die zunächst noch positiv für SeV waren, wie im Manual (des CytoTune™-iPS Sendai Reprogramming Kit) zu behandeln und für fünf Tage bei 38–39 °C zu inkubieren, um die restlichen SeV zu zerstören und anschließend zu untersuchen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die reprogrammierten PBMCs bereits in den früheren Passagen integrationsfrei sind. Die PCR zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung sollte zunächst mit dem Housekeeping und den SeV Primern durchgeführt werden. Wenn bei einem Klon dann SeV amplifiziert wurde, sollte bei diesem die PCR mit allen Primern wiederholt werden, um zu klären, welche Faktoren noch vorhanden sind.

## 4.5 Charakterisierung

Zunächst muss gesagt werden, dass nicht mit allen Klonen aus der Reprogrammierung alle Charakterisierungen durchgeführt werden konnten – dies wäre zu zeitaufwendig gewesen. Später bei der Studie werden voraussichtlich auch nur mit einzelnen Klonen verschiedene, weiterführende Untersuchungen durchgeführt. Dafür werden die Klone, die augenscheinlich am vielversprechendsten aussehen, ausgesucht und anschließend die Charakterisierung durchgeführt. Wenn die Klone dann aufgrund der Ergebnisse als sicher pluripotent eingestuft wurden, können weitere Untersuchungen mit ihnen gemacht werden.

Der zunächst einfachste Nachweis der Pluripotenz ist die alkalische Phosphatase-Färbung, diese Färbung konnte an allen erhaltenen Klonen durchgeführt werden und identifiziert insbesondere solche Klone, die ganz offensichtlich keine iPS-Zellen sind. Bei den Klonen, die sich durchgängig oder fast durchgängig rot färben, handelt es sich um iPS-Zellen. Die Klone, die farblos sind und nicht gefärbt wurden, sind differenzierte andere Zellen und brauchen bei den weiteren Charakterisierungen nicht weiter berücksichtigt werden. Bei der alkalischen Phosphatase-Färbung der Generations-Platte von Spender E sind die roten, klar abgegrenzten iPS-Klone sehr gut zu sehen (Abbildung 22). In Abbildung 23 ist sehr gut zu erkennen, wie die iPS-Zellen durch das Passagieren weiter selektiert werden, da ausschließlich rote iPS-Zellen zu erkennen sind. Des Weiteren konnte anhand des Klons G SV104 dargestellt werden, wie die alkalische Phosphatase-Färbung an differenzierten Zellen aussieht.

Bei der Immunfluoreszenz-Färbung wurden neben dem von der HEXT Stem Cell Facility üblicherweise verwendeten Antikörpermix (Oct3/4 und TRA-1-60) noch zwei weitere Antikörpermixe (Sox2 und TRA-1-81, Nanog und SSEA4) verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Untersuchung mit Oct3/4 und TRA-1-60 zum Nachweis der Pluripotenz ausreicht. Möchte man jedoch auch das Stadium wissen, in dem sich die Zelle befindet, muss auch der

Antiköpermix Nanog und SSEA4 verwendet werden, da die Antikörper, die an die Oberflächenrezeptoren binden, nicht immer ganz eindeutig waren. Oct3/4 war bei allen getesteten Zellen positiv, was jedoch daran liegen kann, dass Oct3/4 künstlich in die Zelle eingebracht wird, genau wie Sox2. Die Oberflächenrezeptoren TRA-1-60 und TRA-1-81 sowie Nanog bilden sich erst im letzten Stadium der Reprogrammierung und sind ein eindeutiges Indiz dafür, dass es sich um einen stabilen pluripotenten iPS-Klon handelt. Wie jedoch in den Ergebnissen in Tabelle 15 zu sehen ist, ist bei einigen Klonen die Färbung der Oberflächenrezeptoren negativ und Nanog positiv.

Daher wird geraten, die Immunfluoreszenz-Färbung an den iPS-Klonen, die alkalische Phosphatase positiv sind und für weitere Versuche benötigt werden, mit den Antiköpermixen (Oct3/4/TRA-1-60 und Nanog/SSEA4) durchzuführen.

Die Bildung der EBs wurde durchgeführt, um zu zeigen, dass es sich um pluripotente Zellen handelt, die wieder in die drei Keimblätter differenzieren können. Die Bildung der EBs gelang zunächst nicht mit der üblichen SOP (Methode 2.2.8.1). Dies widerspricht jedoch der Publikation von (Hua *et al.* 2009), in der von der Herstellung der iPS-Zellen bis zu Charakterisierung alles genau beschrieben wird. Jedoch besteht im Institut seit einiger Zeit das Problem, dass die Bildung der EBs mit der SOP nicht mehr zufriedenstellend ist, und es wurde eine Alternative gefunden. Die EBs wurden schließlich mit der Forced Aggregation-Methode hergestellt, die von der Firma Stem Cell Technologies entwickelt wurde. Auch hiermit konnten zunächst nicht ausreichend EBs generiert werden, was jedoch einerseits an der Durchführung gelegen haben kann und andererseits an den Zellen selbst. Beim zweiten Versuch konnten ausreichend EBs generiert werden, was dagegen spricht, dass es an den Zellen lag.

Im Verlauf des Differenzierungs-Protokolls wurden zwei verschiedene Medien verwendet: einmal ein Medium mit 20 % FCS und einmal ein Medium mit 20 % KOSR. In der Literatur wird beschrieben, dass die EBs mit Medium, das FCS enthält, deutlich besser differenzieren als mit KOSR – dies konnte in diesem Projekt bestätigt werden. Die EBs, die in FCS-haltigem Medium kultiviert wurden, sind nach ca. zwei Wochen differenziert. Die EBs, die in KOSR-haltigem Medium kultiviert wurden, sind nach ca. zwei Woche instabil geworden und haben sich gelöst. Es kann ausgeschlossen werden, dass die Instabilität an den Zellen lag, denn die EBs, die in FCS und KOSR kultiviert wurden, waren die gleichen und kamen aus derselben Flasche.

---

Wenn die Bildung und Differenzierung von EBs bei späteren Versuchen nötig ist, wird empfohlen, diese mit der Forced Aggregation zu generieren und die Differenzierung mit 20 % FCS-haltigem Medium durchzuführen.

Üblicherweise wird bei den differenzierten Zellen mittels spezieller Marker untersucht, um welche Zellen es sich handelt. Jedoch war aufgrund des zeitlichen Rahmens und des anfänglichen Scheiterns bei der Bildung der EBs während dieses Projektes keine Zeit mehr dafür. Im Nachhinein konnte von der HEXT Stem Cell Facility, anhand des iPS-Klons SV099 gezeigt werden, dass die Differenzierung der EBs in alle drei Keimblätter Entoderm, Ektoderm und Mesoderm und somit die Reprogrammierung des Klons funktioniert hat.

## Zusammenfassung

Die bisherige Reprogrammierung dermalen Fibroblasten mithilfe integrierendem Retrovirus dauert lange und ist aufwendig. Die Effizienz dieser Reprogrammierung liegt bei der HEXT Stem Cell Facility derzeit bei 0,01 %.

In diesem Projekt konnten mit einem minimal invasiven Eingriff PBMCs isoliert (entweder kryokonserviert oder ausreichend für drei Reprogrammierungen) und nach fünf Tagen erfolgreich mit nicht-integrierendem Virus transduziert werden. Innerhalb von 108 Tagen konnten 21 Klone gepickt, expandiert und kryokonserviert sowie von einem Teil der iPS-Klone weitere Charakterisierungen durchgeführt werden. Es konnte mittels PCR nachgewiesen werden, dass die reprogrammierten PBMCs bereits überwiegend in den frühen Passagen integrationsfrei sind. In den Vorversuchen konnte ermittelt werden, wie die PBMCs am besten für die anschließende Transduktion kultiviert werden müssen. Die endgültige MOI für die Transduktion konnte im zeitlichen Rahmen dieses Projektes nicht ermittelt werden, jedoch konnte mit der durchgeführten Reprogrammierung eine Effizienz von 0,05 % erreicht werden, was bereits deutlich über der Effizienz der bisher durchgeführten Methode der HEXT Stem Cell Facility liegt.

Bei der Charakterisierung der erhaltenen iPS-Klone hat sich gezeigt, dass die alkalische Phosphatase-Färbung bereits sehr zuverlässig ist und einen ersten Überblick über die Pluripotenz der iPS-Klone gibt. Um jedoch ausreichend Sicherheit über das Stadium der Pluripotenz der iPS-Klone zu erhalten, ist die weitere Untersuchung mittels Immunfluoreszenz-Färbung nötig. Hierbei wird empfohlen, die Antikörpermixe Oct-4/TRA-1-60 und Nanog/SEEA4 zu verwenden, um sicherzustellen, dass es sich um stabile iPS-Klone im letzten Stadium der Reprogrammierung handelt. Die Bildung der embryonalen Körperchen sollte nach der neueren Methode mit den MKO-Plättchen und die anschließende Differenzierung der EBs mit 20 % FCS-Medium durchgeführt werden.

**Tabelle 16** Zusammenfassung der Ergebnisse dieses Projektes. Dargestellt sind die getesteten Parameter und die endgültige Wahl, die für die Reprogrammierung der PBMCs sowie die anschließende Charakterisierung der iPS-Klone verwendet werden sollte.

Getestet	Fazit	
Kryokonservierung	1 x 10 <sup>7</sup> Zellen/Kryo	
Durchflusszytometrie zum Antikörper Nachweis der CD3+ T- Lymphozyten	Sekundär Antikörper Alexa Fluor 488 Anti Mouse IgG	
Kultivierungsbedingungen	Zelldichte	6 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Well einer 24- Well-Platte
	Okt-3 human anti-CD3	Beschichtete Wells
	IL-2 Konzentration	150 IU/mL
Transduktion	Zelldichte	2,5 x 10 <sup>5</sup> Zellen/Well einer 24-Well-Platte
	Polybrene	4 µg/mL
	MOI	> 6
Replattieren	Zelldichte	4,5 x 10 <sup>4</sup> Zellen/Well einer 6- Well-Platte
PCR zum Nachweis der Primer integrationsfreien Reprogrammierung	Zunächst nur Housekeeping und SeV, wenn SeV amplifiziert, Wiederholung mit den anderen Primern	
Charakterisierung	Alkalische Phosphatase- Färbung	Immer
	Immunfluoreszenz-Färbung	Oct-4/TRA-1-60 und Nanog/SEEA4
	Embryonale Körperchen	Forced Aggregation
	Differenzierungs-Protokoll	Mit 20 % FCS-Medium

## Literaturverzeichnis

Immunologie. Grundlagen für Klinik und Praxis (2006). 1. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.

Aasen, Trond; Raya, Angel; Barrero, Maria J.; Garreta, Elena; Consiglio, Antonella; Gonzalez, Federico et al. (2008): Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. In: *Nat. Biotechnol.* 26 (11), S. 1276–1284.

Bethge, P., 2013. Der Zellenzüchter. In: *Der Spiegel*, 2013(14), 102–105.

Blelloch, Robert; Venere, Monica; Yen, Jonathan; Ramalho-Santos, Miguel (2007): Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. In: *Cell Stem Cell* 1 (3), S. 245–247.

Boukamp, P. (1995): Transdifferentiation induced by gene transfer. In: *Semin. Cell Biol.* 6 (3), S. 157–163.

Boyer, Laurie A.; Plath, Kathrin; Zeitlinger, Julia; Brambrink, Tobias; Medeiros, Lea A.; Lee, Tong Ihn et al. (2006): Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. In: *Nature* 441 (7091), S. 349–353.

Brambrink, Tobias; Foreman, Ruth; Welstead, G. Grant; Lengner, Christopher J.; Wernig, Marius; Suh, Heikyung; Jaenisch, Rudolf (2008): Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. In: *Cell Stem Cell* 2 (2), S. 151–159.

Brown, Matthew E.; Rondon, Elizabeth; Rajesh, Deepika; Mack, Amanda; Lewis, Rachel; Feng, Xuezu et al. (2010): Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood T lymphocytes. In: *PLoS ONE* 5 (6), S. e11373.

Cho, Yoon Hee; Kim, Dae-Sung; Kim, Peter Geon; Hwang, Yong Sup; Cho, Myung Soo; Moon, Shin Yong et al. (2006): Dopamine neurons derived from embryonic stem cells efficiently induce behavioral recovery in a Parkinsonian rat model. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341 (1), S. 6–12.

Chung, Tung-Liang; Brena, Romulo M.; Kolle, Gabriel; Grimmond, Sean M.; Berman, Benjamin P.; Laird, Peter W. et al. (2010): Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. In: *Stem Cells* 28 (10), S. 1848–1855.

Eguchit, Akiko; Kondoht, Toru; Kosakat, Hirokazu; Suzukit, Takashi; Momotat, Hiroshi; Masagot, Akinori et al. (2000): Identification and characterization of cell lines with a defect in a post-adsorption stage of Sendai virus-mediated membrane fusion. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (275), S. 17549–17555.

Eminli, Sarah; Foudi, Adlen; Stadtfeld, Matthias; Maherali, Nimet; Ahfeldt, Tim; Mostoslavsky, Gustavo et al. (2009): Differentiation stage determines potential of

- hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. In: *Nat. Genet.* 41 (9), S. 968–976.
- Freshney, R. Ian (2005): Culture of animal cells. A manual of basic technique. 5. Aufl. Hoboken, NJ: Wiley-Liss. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0626/2005281585-b.html>.
- Fusaki, Noemi; Ban, Hiroshi; Nishiyama, Akiyo; Saeki, Koichi; Hasegawa, Mamoru (2009): Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. In: *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 85 (8), S. 348–362.
- Hua, Jinlian; Yu, Haisheng; Liu, Sheng; Dou, Zhongying; Sun, Yadong; Jing, Xiaoqi et al. (2009): Derivation and characterization of human embryonic germ cells: serum-free culture and differentiation potential. In: *Reprod. Biomed. Online* 19 (2), S. 238–249.
- Huangfu, Danwei; Maehr, René; Guo, Wenjun; Eijkelenboom, Astrid; Snitow, Melinda; Chen, Alice E.; Melton, Douglas A. (2008a): Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. In: *Nat. Biotechnol.* 26 (7), S. 795–797.
- Huangfu, Danwei; Osafune, Kenji; Maehr, René; Guo, Wenjun; Eijkelenboom, Astrid; Chen, Shuibing et al. (2008b): Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. In: *Nat. Biotechnol.* 26 (11), S. 1269–1275.
- Hurwitz, Julia L. (2008): Development of recombinant Sendai virus vaccines for prevention of human parainfluenza and respiratory syncytial virus infections. In: *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27 (10 Suppl), S. S126-8.
- Kim, Dohoon; Kim, Chun-Hyung; Moon, Jung-Il; Chung, Young-Gie; Chang, Mi-Yoon; Han, Baek-Soo et al. (2009): Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. In: *Cell Stem Cell* 4 (6), S. 472–476.
- Kim, Jong-Hoon; Auerbach, Jonathan M.; Rodríguez-Gómez, José A.; Velasco, Iván; Gavin, Denise; Lumelsky, Nadya et al. (2002): Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. In: *Nature* 418 (6893), S. 50–56.
- Kriks, Sonja; Shim, Jae-Won; Piao, Jinghua; Ganat, Yosif M.; Wakeman, Dustin R.; Xie, Zhong et al. (2011): Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. In: *Nature* 480 (7378), S. 547–551.
- Landazuri, Natalia; Krishna, Delfi; Gupta, Monique; Le Doux, Joseph M. (2007): Retrovirus-polymer complexes: study of the factors affecting the dose response of transduction. In: *Biotechnol. Prog.* 23 (2), S. 480–487.
- Levenstein, Mark E.; Ludwig, Tenneille E.; Xu, Ren-He; Llanas, Rachel A.; VanDenHeuvel-Kramer, Kaitlyn; Manning, Daisy; Thomson, James A. (2006): Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. In: *Stem Cells* 24 (3), S. 568–574.

- Lin, Paul; Correa, Diego; Lin, Yuan; Caplan, Arnold I. (2011): Polybrene inhibits human mesenchymal stem cell proliferation during lentiviral transduction. In: *PLoS ONE* 6 (8), S. e23891.
- Loh, Yui-Han; Hartung, Odelya; Li, Hu; Guo, Chunguang; Sahalie, Julie M.; Manos, Philip D. et al. (2010): Reprogramming of T cells from human peripheral blood. In: *Cell Stem Cell* 7 (1), S. 15–19.
- Mallanna, Sunil K.; Rizzino, Angie (2010): Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. In: *Dev. Biol.* 344 (1), S. 16–25.
- Mallone, R.; Mannering, S. I.; Brooks-Worrell, B. M.; Durinovic-Belló, I.; Cilio, C. M.; Wong, F. S.; Schloot, N. C. (2011): Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. In: *Clin. Exp. Immunol.* 163 (1), S. 33–49.
- Miura, Kyoko; Okada, Yohei; Aoi, Takashi; Okada, Aki; Takahashi, Kazutoshi; Okita, Keisuke et al. (2009): Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. In: *Nat. Biotechnol.* 27 (8), S. 743–745.
- Modrow, Susanne; Falke, Dietrich; Truyen, Uwe; Schätzl, Hermann (2010): Molekulare Virologie. Heidelberg: Spektrum.
- Nakanishi, Mahito; Otsu, Makoto (2012): Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. In: *Curr Gene Ther* 12 (5), S. 410–416.
- Ohnuki, Mari; Takahashi, Kazutoshi; Yamanaka, Shinya (2009): Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells. In: *Curr Protoc Stem Cell Biol* 4, S. Unit 4A.2.
- Okano, S.; Yonemitsu, Y.; Nagata, S.; Sata, S.; Onimaru, M.; Nakagawa, K. et al. (2003): Recombinant Sendai virus vectors for activated T lymphocytes. In: *Gene Ther.* 10 (16), S. 1381–1391.
- Okita, Keisuke; Ichisaka, Tomoko; Yamanaka, Shinya (2007): Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. In: *Nature* 448 (7151), S. 313–317.
- Okita, Keisuke; Nakagawa, Masato; Hyenjong, Hong; Ichisaka, Tomoko; Yamanaka, Shinya (2008): Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. In: *Science* 322 (5903), S. 949–953.
- Seki, Tomohisa; Yuasa, Shinsuke; Fukuda, Keiichi (2012): Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. In: *Nat Protoc* 7 (4), S. 718–728.

- Seki, Tomohisa; Yuasa, Shinsuke; Oda, Mayumi; Egashira, Toru; Yae, Kojiro; Kusumoto, Dai et al. (2010): Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. In: *Cell Stem Cell* 7 (1), S. 11–14.
- 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. In: *Nature* 336 (6200), S. 688–690.
- Stadtfeld, Matthias; Maherali, Nimet; Breault, David T.; Hochedlinger, Konrad (2008a): Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. In: *Cell Stem Cell* 2 (3), S. 230–240.
- Stadtfeld, Matthias; Nagaya, Masaki; Utikal, Jochen; Weir, Gordon; Hochedlinger, Konrad (2008b): Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. In: *Science* 322 (5903), S. 945–949.
- Stewart, C. L.; Stuhlmann, H.; Jähner, D.; Jaenisch, R. (1982): De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (13), S. 4098–4102.
- Tsubooka, Noriko; Ichisaka, Tomoko; Okita, Keisuke; Takahashi, Kazutoshi; Nakagawa, Masato; Yamanaka, Shinya (2009): Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. In: *Genes Cells* 14 (6), S. 683–694.
- Wadia, Jehangir S.; Dowdy, Steven F. (2002): Protein transduction technology. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (1), S. 52–56.
- Warren, Luigi; Manos, Philip D.; Ahfeldt, Tim; Loh, Yui-Han; Li, Hu; Lau, Frank et al. (2010): Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. In: *Cell Stem Cell* 7 (5), S. 618–630.
- Wilmut, I.; Schnieke, A. E.; McWhir, J.; Kind, A. J.; Campbell, K. H. (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. In: *Nature* 385 (6619), S. 810–813.
- Yamanaka, Shinya; Takahashi, Kazutoshi (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures. In: *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 51 (15), S. 2346–2351.
- Ying, Qi Long; Nichols, Jennifer; Chambers, Ian; Smith, Austin (2003): BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. In: *Cell* 115 (3), S. 281–292.
- Zhao, Yang; Yin, Xiaolei; Qin, Han; Zhu, Fangfang; Liu, Haisong; Yang, Weifeng et al. (2008): Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. In: *Cell Stem Cell* 3 (5), S. 475–479.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic proteins
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation(CD)
cDNA	complementary DNA
CM (+Y)	Konditioniertes Medium mit Y-ROCK
cMyc	Humanes Myelocytomatose-Onkogen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPT	Cell Preparation Tube
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EB	Embryoid bodies
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Umkehrung der epithelialen zur mesenchymalen Transition
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ESC	Embryonic stem cells
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
GDF6	Growth and differentiation factor-6
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
H3K4me2	Histone H3 dimethyl Lys

---

hES	Human embryonic stem cell
HEXT	Hamburg Zentrum für Experimentelle Therapieforschung
HFF	Human neonatal foreskin fibroblast
hiPS	Human induced pluripotent stem cell
Id	Inhibitors of differentiation
IL	Interleukin
iPS	induced pluripotent stem cell
IU	International Unit
Klf4	Kruppel-like factor 4
KOSR	Knockout serum replacement
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MEK	Mitogen-activated protein Kinase
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MHC	Major Histocompatibility Complex
MKO	Mikrokavitätenoberfläche
MMLV	Murines Moloney Leukämievirus
MOI	Multiplicity of Infection
Oct3/4	Octamer binding transcription factor 3/4
OKT3	Human anti-CD3 Antikörper
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho Kinase
SALL4	Sal-like protein 4
Sek-Ak	Sekundärer Antikörper
SeV	Sendai-Virus
SOP	Standard Operating Procedure

Sox2	Sex determining region Y (SRY)- box 2
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
Tbx3	T-box transcription factor 3
TFG $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Tgfbr1	Transforming growth factor $\beta$ receptor 1
UTF1	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Vorgehensweise bei der Durchflusszytometrie, durchgeführt von Manuela Kolster.....	38
<b>Tabelle 2</b> Titer des CytoTune™ -iPS Reprogramming Kit von Life Technologies, mit der Lot. No. 1264008A. ...	40
<b>Tabelle 3</b> Berechnete Menge, die pro Vektor CytoTune verwendet werden muss, um mit entsprechender MOI zu transduzieren.....	40
<b>Tabelle 4</b> Die folgende Tabelle zeigt die PCR-Primer zum Nachweis des SeV Genoms und der Transgene in Zellen, die mit den CytoTune™ Sendai Reprogrammierungs-Vektoren reprogrammiert wurden. * Primer enthält Sendai-Vektor (SeV) Genom-Sequenzen. Paarung dieser Primer mit Transgen-spezifischem Primer ermöglicht den spezifischen Nachweis von Transgenen, die durch die Reprogrammierung mit CytoTune™ Sendai-Vektoren eingebracht werden. Zum Nachweis von Sox2, Klf2 und Oct3 /4 wird der gleiche Reverse-Primer verwendet. ..	43
<b>Tabelle 5</b> Die folgende Tabelle zeigt die Komponenten, die für die PCR mit der DreamTaq DNA Polymerase verwendet wurden.....	44
<b>Tabelle 6</b> PCR-Bedingung, laut Instruktion des CytoTune™-iPS Reprgramming Kit.....	44
<b>Tabelle 7</b> PCR-Bedingung nach der Optimierung der PCR.....	44
<b>Tabelle 8</b> Antikörperlösungen und ihre Zusammensetzung. ....	46
<b>Tabelle 9</b> Ergebnis der Durchflusszytometrie nach 0 und 5 Tagen mit und ohne Stimulation mit Okt-3 und IL-2 in verschiedenen Konzentrationen. Angegeben sind von allen Lymphozyten die einzelnen, lebenden Lymphozyten und von den einzelnen, lebenden Lymphozyten die T-Lymphozyten, in Prozent. Die Antikörperkombinationen sind Sekundär Antikörper Alexa Fluore 488 Anti Mouse IgG (Sek Ak), CD2-FITC Mouse anti-human/CD4-PB/CD8-PeCy7 (CD2/4/8) und Sekundär Antikörper Alexa Fluore 488 Anti Mouse IgG/CD4-PB/CD8-PeCy7 (CD3/4/8). ....	54
<b>Tabelle 10</b> Ergebnis der Durchflusszytometrie. Aufgelistet ist die Lymphozytenpopulation in Prozent und die CD3+ T-Lymphozyten der beiden Spender, bei den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. ....	62
<b>Tabelle 11</b> Ergebnis der Zellzählung mit dem CASY Cell Counter. Die Zellen wurden für zwei Tage in verschiedenen Polybrenekonzentrationen kultiviert. Dargestellt sind der Mittelwert der lebend Zellzahl pro Well, das Verhältnis lebend/gesamt und die Proliferation der Zellen. ....	63
<b>Tabelle 12</b> Darstellung der Ergebnisse der Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer. ....	64
<b>Tabelle 13</b> Darstellung der Ergebnisse der Transduktion und der berechneten Effizienz. ....	67
<b>Tabelle 14</b> Übersicht der Zellen, mit denen verschiedene Nachweismethoden durchgeführt wurden. Abkürzungen in der Tabelle bedeuten: Alkalische Phosphatase-Färbung (AP-Färbung), Immunfluoreszenz-Färbung (If-Färbung), Embryoid body formation protocol (EB formation protocol), Forced Aggregation (FA), Zellen des Spenders E (E) und Zellen des Spenders G (G).....	73
<b>Tabelle 15</b> Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung. In der Tabelle sind die verwendeten Antikörperkombinationen dargestellt; wenn diese positiv erschienen, wurden sie mit einem Plus markiert. ....	82
<b>Tabelle 16</b> Zusammenfassung der Ergebnisse dieses Projektes. Dargestellt sind die getesteten Parameter und die endgültige Wahl, die für die Reprogrammierung der PBMCs sowie die anschließende Charakterisierung der iPS-Klone verwendet werden sollte. ....	97
<b>Tabelle 17</b> Dargestellt sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit den verschiedenen Antikörpern. Bei Tag 0 und Tag 5 sind bei den PBMCs ohne Stimulation 50 000 Zellen, bei den anderen PBMCs 100 000 Zellen gemessen worden. Die Antikörperkombinationen sind Sekundär Antikörper Alexa Fluore 488 Anti Mouse IgG	

<i>(Sek Ak), CD2-FITC Mouse anti-human/CD4-PB/CD8-PeCy7 (CD2/4/8) und Sekundär Antikörper Alexa Fluore 488 Anti Mouse IgG/CD4-PB/CD8-PeCy7 (CD3/4/8).</i> .....	111
<b>Tabelle 18</b> Ergebnis der Zellzählung des CASY Cell Counters der Zellen, die in Okt-3 beschichteten Wells mit 50 IU/mL IL-2 kultiviert wurden. ....	111
<b>Tabelle 19</b> Ergebnis der Zellzählung des CASY Cell Counters der Zellen, die in Okt-3 beschichteten Wells mit 150 IU/mL IL-2 kultiviert wurden. ....	112
<b>Tabelle 20</b> Ergebnis der Zellzählung des CASY Cell Counters der Zellen, die in Okt-3 beschichteten Wells mit 300 IU/mL IL-2 kultiviert wurden. ....	112
<b>Tabelle 21</b> Ergebnis der Zellzählung des CASY Cell Counters der Zellen, die in Okt-3 beschichteten Wells ohne IL-2 kultiviert wurden.....	113
<b>Tabelle 22</b> Ergebnis der Zellzählung des CASY Cell Counters der Zellen, die in Wells kultiviert wurden ohne Okt-3 und IL-2.....	114
<b>Tabelle 23</b> Ergebnis der Durchflusszytometrie. Die Probenbezeichnung: E und G sind die verschiedenen Spender. Okt-3 beschichtet (be), Okt-3 im Medium (lös), IL-2 Konzentrationen 50 IU/mL (50), 300 IU/mL (300). ....	114
<b>Tabelle 24</b> Darstellung der Proben, der isolierten RNA-Konzentration aus den Proben sowie der für die cDNA-Synthese eingesetzte Menge RNA in $\mu\text{L}$ .....	115
<b>Tabelle 25</b> Darstellung der Proben, der isolierten RNA-Konzentration aus den Proben sowie der für die cDNA-Synthese eingesetzte Menge RNA in $\mu\text{L}$ .....	115

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Darstellung der frühen, mittleren und späten Phase der Reprogrammierung von Maus-Fibroblasten. Ereignisse in der frühen und späten Phase können weniger voneinander getrennt werden, im Vergleich zu denen, die später stattfinden. Die Runterregulierung der somatischen Expression und die Änderung im Histon H3K4me2 können zwar Populationsübergreifend auftreten, sind jedoch für die frühe und mittlere Phase nicht ausreichend, um die Pluripotenz zu induzieren. Nur ein kleiner Teil der Zellen geht die weiteren Schritte bis zur Pluripotenz. Eine erfolgreiche Reprogrammierung erfordert die Expression der vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4 (O), Klf4 (K), Sox2 (S) und cMyc (M), bis das iPS-Stadium erreicht ist. Ansonsten fallen die Zellen wieder zurück in einen differenzierten Zustand. Die reprogrammierten iPS-Zellen, die sich in der frühen und mittleren Phase befinden, bilden in Kultur ESC-ähnliche Kolonien aus, diese exprimieren jedoch noch kein Nanog oder andere Pluripotenz-Gene, die nur in der letzten Phase der Reprogrammierung identifiziert werden können (Brown et al. 2010).....	9
<b>Abbildung 2</b> Rolle der Reprogrammierungsfaktoren und deren Wechselwirkung mit Chromatin während des letzten Schrittes der Reprogrammierung. Schematische Darstellung der unterschiedlichen Funktionen der Reprogrammierungsfaktoren in der späten Phase der Anpassung. Oct4, Sox2 und Klf4 implizieren die Vermittlung der Hochregulation des Pluripotenz-Netzwerkes (untere Grafik) und assoziieren mit der transkriptionalen Aktivität, indem sie während der letzten Schritte der Anpassung an viele der Gene binden (im Vergleich unten links zu unten rechts). Im Gegensatz dazu sind viele c-Myc Targets in einem Schritt vor der Aktivierung des Pluripotenz-Networks gebunden und aktiviert (obere Grafik links und rechts). Es scheint, als sei die Unfähigkeit des Oct4, Sox2 und Klf4, Pluripotenz-Gene zu binden und zu aktivieren, zumindest in einigen Fällen verbunden mit den repressiven Chromatin-Signaturen im Promotor dieser Gene (im Vergleich unten links zu unten rechts) (Brown et al. 2010). .....	10
<b>Abbildung 3</b> Darstellung der Zellen des Immunsystems. Ausgehend von den Stammzellen über die verschiedenen Differenzierungen, bis hin zu den CD4+ und CD8+ regulatorischen Zellen (Loh et al. 2010). .....	16
<b>Abbildung 4</b> Merkmale von Sendai-Virus. (a) Darstellung der schematischen Struktur des Sendai-Virus, mit dem genomischen RNA-Komplex und den Proteinen NP, P und L, der Hülle einer Lipiddoppelschicht aus den Proteinen F und HN und der Matrix aus M Proteinen. (b) Querschnitt Ansicht des Sendai-Virus untersucht mit Transmissionselektronenmikroskopie (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Takao Senda, Fujita Health University School of Medicine) (Nakanishi and Otsu 2012). .....	20
<b>Abbildung 5</b> Darstellung des Zählvorganges in einen Quadrat der Neubauer-Zählkammer. ....	32
<b>Abbildung 6</b> Pro Donor vier Wells einer 24-Well-Platte für die Analyse an Tag -1 mit links zwei Wells mit 10 µg/mL anti-CD3 Antikörper gecoatet, rechts zwei Wells mit 10 ng/mL gelösten anti-CD3 Antikörpern und der jeweiligen IL-2 Konzentration. Für die Transduktion an Tag 0 noch einmal vier Wells mit denselben Bedingungen.....	39
<b>Abbildung 7</b> Generationsplatten des Donor E (links) und des Donor G (rechts). Dargestellt ist die Anzahl der MEF-Zellen und die Anzahl der Pbmcs bei den verschiedenen MOIs. Die MEF-Zellen wurden einen Tag vor dem Replating ausgesät, die Pbmcs am Tag des Replating. ....	41
<b>Abbildung 8</b> Schematische Darstellung des Musters, in dem die iPS-Zellen für die EB-Formation vom Wellboden gekratzt werden. ....	48

- Abbildung 9** Dargestellt ist die Oberfläche der MKO-Plättchen, aufgenommen mit dem Evos fl Mikroskop in der Vergrößerung 2 x. Deutlich zu erkennen die Vertiefung, in die die iPS-Zellen sinken und sich zu EBs zusammenlagern..... 48
- Abbildung 10** Dot Plot aus der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Dot PLOTS von den Zellen, die mit 50 IU/mL IL-2 kultiviert und mit den verschiedenen Antikörperkombinationen gemessen wurden. Ganz oben ist das Dot Plot nur mit sekundären Antikörpern, in der Mitte das Dot Plot der Antikörperkombination CD2/4/8 und ganz unten das Dot Plot der Antikörperkombination CD3/4/8 zu sehen. Gated wurde zunächst die Lymphozytenpopulation aus allen Zellen (links im Dot Plot), dann bei dem Sek-Ak nur die CD3+ (in der Mitte des Dot Plot), bei den CD2/4/8 und CD3/4/8 zunächst die lebenden und anschließend die CD2+ bzw. die CD3+ (in der Mitte des Dot Plot) und von diesen Zellen wurden wiederum die CD4+ und CD8+ Zellen gegatet (rechts im Dot Plot)..... 52
- Abbildung 11** Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie von Tag 0 ohne Stimulation mit Okt-3 und IL-2 sowie von Tag 5 mit und ohne Stimulation (Oh Stim) mit Okt-3 und IL-2. Verglichen werden die verschiedenen Antikörperkombinationen am Tag 0, an Tag 5 mit Stimulation von Okt-3 sowie mit verschiedenen IL-2 Konzentrationen. Als Vergleich ist ganz links im Diagramm das Ergebnis der Durchflusszytometrie von den Zellen, die ohne Stimulation kultiviert worden sind, dargestellt. .... 53
- Abbildung 12** Darstellung der Ergebnisse der Zellzählung nach fünf Tagen der frisch isolierten und zuvor kryokonservierten PBMCs, bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen, mit dem CASY Cell Counter. Ausgesät wurden die Zellen in der Zelldichte  $1,2 \times 10^5$  einer 96-Well-Platte in Wells, ohne Okt-3 und ohne IL-2 (oh Okt-3, oh IL-2), mit Okt-3 und ohne IL-2 (Okt-3, oh IL-2) und mit Okt-3 und den IL-2 Konzentrationen 50-300 IU/mL (Okt-3, 50 IU, 150 IU, 300 IU IL-2). .... 56
- Abbildung 13** Darstellung der Ergebnisse der Zellzählung nach fünf Tagen, der frisch isolierten und zuvor kryokonservierten PBMCs, bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen, mit dem CASY Cell Counter. Ausgesät wurden die Zellen in der Zelldichte  $1 \times 10^5$  in Wells einer 96-Well-Platte in Wells, ohne Okt-3 und ohne IL-2 (oh Okt-3, oh IL-2), mit Okt-3 und ohne IL-2 (Okt-3, oh IL-2) und mit Okt-3 und den IL-2 Konzentrationen 50-300 IU/mL (Okt-3, 50 IU, 150 IU, 300 IU IL-2)..... 57
- Abbildung 14** Darstellung der Ergebnisse der Zellzählung nach fünf Tagen, der frisch isolierten und zuvor kryokonservierten PBMCs, bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen, mit dem CASY Cell Counter. Ausgesät wurden die Zellen in der Zelldichte  $0,8 \times 10^5$  in Wells einer 96-Well-Platte in Wells, ohne Okt-3 und ohne IL-2 (oh Okt-3, oh IL-2), mit Okt-3 und ohne IL-2 (Okt-3, oh IL-2) und mit Okt-3 und den IL-2 Konzentrationen 50-300 IU/mL (Okt-3, 50 IU, 150 IU, 300 IU IL-2)..... 58
- Abbildung 15** Repräsentative Probe aus der Durchflusszytometrie zur Ermittlung der Kultivierungsbedingung. In A. dargestellt ist die Probe des Spenders E nach Kultivierung in Okt-3 beschichteten Wells mit 50 IU/mL IL-2. Links oben ist das Gate zu sehen, das zur Identifizierung der gesamten Lymphozytenpopulation (population) gesetzt wurde. Oben rechts ist das Gate zu sehen, das gesetzt wurde, um die einzelnen Lymphozyten (single) von Lymphozyten zu unterscheiden, die zusammenkleben. Links unten ist das Gate zu sehen, mit dem die lebenden Lymphozyten (live) identifiziert wurden und unten rechts ist das Gate zur Identifizierung der CD3+ T-Lymphozyten (OKT-3) zu sehen. In B. dargestellt sind die berechneten Ergebnisse, wie sie vom BD FACS CANTO II aufgrund der Gates ermittelt werden. .... 61
- Abbildung 16** Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Projektes. Von der Isolierung der PBMCs über die Transduktion bis zum letzten Kryokonservieren des letzten Klones. .... 65
- Abbildung 17** Aufnahme des Klons E SV132 in der Generations-Platte (2x). Am selben Tag Transfer in ein Well einer 24-Well-Platte. .... 67

<b>Abbildung 18</b> Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung von Klon SV032, SV035 und SV045 aus Fibroblasten, mit den dazugehörigen Primern, Housekeeping (H), SeV (Se), cMyc (cM), Sox2 (S), Oct3/4 (O), Klf4 (K) und dem Marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, vom Thermo Scientific.....	69
<b>Abbildung 19</b> Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung vom Klon SV025 und BJ (als Positiv-Kontrolle) aus Fibroblasten sowie Negativ-Kontrolle der PCR (PCR K), mit den dazugehörigen Primern, Housekeeping (H), SeV (Se), cMyc (cM), Sox2 (S), Oct3/4 (O), Klf4 (K) und dem Marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, vom Thermo Scientific.....	70
<b>Abbildung 20</b> Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung von Klon E SV090B, E SV099, G SV104 und E SV132 mit den dazugehörigen Primern, Housekeeping (H), SeV (Se), cMyc (cM), Sox2 (S), Oct3/4 (O), Klf4 (K) und dem Marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, vom Thermo Scientific.....	71
<b>Abbildung 21</b> Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zum Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung von Klon E SV0132 und SV022 sowie BJ als Positiv-Kontrolle, die Negativ-Kontrollen für die cDNA Synthese (cDNA K) und die PCR (PCR K), mit den dazugehörigen Primern, Housekeeping (H), SeV (Se), cMyc (cM), Sox2 (S), Oct3/4 (O), Klf4 (K) und dem Marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, vom Thermo Scientific.....	72
<b>Abbildung 22</b> Aufnahme der alkalischen Phosphatase-Färbung, zu sehen sind einzelne Klone in der Generations-Platte von Spender E. ....	74
<b>Abbildung 23</b> Gezeigt ist die alkalische Phosphatase-Färbung der Klone E SV099 P5 (links) und E SV132 P5 (rechts). ....	75
<b>Abbildung 24</b> Aufnahme der alkalischen Phosphatase-Färbung bei dem Klon G SV104 P5.....	75
<b>Abbildung 25</b> Aufnahmen des Klons SV099 Passage 5 mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Links oben ist die überlagerte Darstellung der einzelnen Bilder von Oct-4, TRA-1-60 und DAPI zu sehen. Rechts oben ist Oct-4, links unten ist TRA-1-60 und rechts unten ist DAPI abgebildet. ....	77
<b>Abbildung 26</b> Aufnahmen des Klons SV132 Passage 5 mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Links oben ist die überlagerte Darstellung der einzelnen Bilder von Oct-4, TRA-1-60 und DAPI zu sehen. Rechts oben ist Oct-3, links unten ist TRA-1-60 und rechts unten ist DAPI abgebildet. ....	78
<b>Abbildung 27</b> Aufnahmen des Klons SV132 Passage 5 mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Links oben ist die überlagerte Darstellung der einzelnen Bilder von Sox2, TRA-1-81 und DAPI zu sehen. Rechts oben ist Sox2, links unten ist TRA-1-81 und rechts unten ist DAPI abgebildet.....	79
<b>Abbildung 28</b> Aufnahmen des Klons SV132 Passage 5 mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Links oben ist die überlagerte Darstellung der einzelnen Bilder von Nanog, SSEA4 und DAPI zu sehen. Rechts oben ist Nanog, links unten ist SSEA4 und rechts unten ist DAPI abgebildet. ....	80
<b>Abbildung 29</b> Aufnahmen des Klons SV195 Passage 4, abgebildet sind die einzelnen Bilder, die mit dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. Links ganz oben ist Oct-4, in der Mitte ganz oben ist TRA-1-60. Links in der Mitte ist Sox2, in der Mitte ist TRA-1-81. Links unten ist Nanog, in der Mitte unten ist SSEA4 und rechts ist DAPI dargestellt.....	81
<b>Abbildung 30</b> Mikroskopische Aufnahme der embryonalen Körperchen von den Zellen SV026, einen Tag nachdem das embryoid body Bildungs-Protokoll durchgeführt wurde. Aufgenommen mit dem Evos fl Mikroskop von AMG (2x). ....	83

- Abbildung 31** Mikroskopische Aufnahme der hiPS-Klone Con2 SV083 (links) und Con2 SV082 (rechts), einen Tag nachdem das embryoid body Bildungs-Protokoll durchgeführt wurde. Aufgenommen mit dem Evos fl Mikroskop von AMG (2x). ..... 84
- Abbildung 32** Mikroskopische Aufnahme der MKO-Oberfläche und der hiPS-Klone Con2 SV082 (links) und Con2 SV083 (rechts), mit einer Zweifach-Vergrößerung, am Tag der Forced Aggregation. .... 85
- Abbildung 33** Embryonale Körperchen vom iPS-Klon E SV099 P14, mit der Forced Aggregation von Michaela Miede erzeugt. Aufgenommen in den Pluronic beschichteten T75 Flaschen mit dem Evos fl Mikroskop (2x)..... 85
- Abbildung 34** Links: Differenzierte, angeheftete EBs SV026, die in 20 % KOSR-Medium kultiviert worden sind. Rechts: Aufnahme der EBs des iPS-Klons SV083 angeheftet und sechs Tage kultiviert mit 20 % FCS. Die EBs sind nicht mehr zu erkennen und die Zellen sind wieder vereinzelt. Beide Aufnahmen wurden mit dem Evos fl bei zweifacher Vergrößerung aufgenommen. .... 86
- Abbildung 35** Aufnahmen des Klons SV099 zum Nachweis der Differenzierung mit den Markern Polyclonal rabbit anti-human alpha-1-fetoprotein (AFP) links oben, mouse anti-actin smooth muscle (SMA) rechts oben, anti-tubulin beta III monoclonal (TUJ1) links unten. .... 87

## Anhang

**Tabelle 17** Dargestellt sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit den verschiedenen Antikörpern. Bei Tag 0 und Tag 5 sind bei den PBMCs ohne Stimulation 50 000 Zellen, bei den anderen PBMCs 100 000 Zellen gemessen worden. Die Antikörperkombinationen sind Sekundär Antikörper Alexa Fluore 488 Anti Mouse IgG (Sek Ak), CD2-FITC Mouse anti-human/CD4-PB/CD8-PeCy7 (CD2/4/8) und Sekundär Antikörper Alexa Fluore 488 Anti Mouse IgG/CD4-PB/CD8-PeCy7 (CD3/4/8).

Antikörpermix Stimulation	Lymphozyten	Lebende Zellen	T-Lymphozyten
Tag 0 ohne Stimulation			
Ohne Antikörper	16204	15740	2
Sek Ak	45616	44270	33823
CD2/4/8	60805	59542	47304
CD3/4/8	56380	55124	41080
Tag 6 mit Stimulation			
Sek Ak, ohne Stimulation	21583	20875	37
Sek Ak, 50 IU/mL	59186	57318	51431
Sek Ak, 300 IU/mL	55496	52938	45693
CD2/4/8, 50 IU/mL	71545	69868	66781
CD2/4/8, 300 IU/mL	64359	61820	59736
CD3/4/8, 50 IU/mL	66458	64664	60196
CD3/4/8, 300 IU/mL	55318	53103	48955

**Tabelle 18** Ergebnis der Zellzählung des CASY Cell Counters der Zellen, die in Okt-3 beschichteten Wells mit 50 IU/mL IL-2 kultiviert wurden.

Ausgesät	1,2 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	0,8 x 10 <sup>5</sup>
[Zellen/Well]			
Verwendete Zellen	Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/gesamt [%]	Lebendzellzahl [Zellen/Well]
			Lebend/gesamt [%]

FrISChe		$2,657 \times 10^6$	90,01	$2,452 \times 10^6$	91,05	$1,931 \times 10^6$	89,61
PBMCs							
Kryo	mit	$2,454 \times 10^6$	90,09	$2,040 \times 10^6$	91,19	$1,66 \times 10^6$	92,71
1 x 10 <sup>7</sup> Zellen							
Kryo	mit	$2,487 \times 10^6$	93,64	$1,68 \times 10^6$	91,54	$1,416 \times 10^6$	93,28
5 x 10 <sup>6</sup> Zellen							
Kryo	mit	$2,364 \times 10^6$	93,34	$1,095 \times 10^6$	90,92	$1,241 \times 10^6$	94,01
1 x 10 <sup>6</sup> Zellen							

**Tabelle 19** Ergebnis der Zellzählung des CASY Cell Counters der Zellen, die in Okt-3 beschichteten Wells mit 150 IU/mL IL-2 kultiviert wurden.

Ausgesät		$1,2 \times 10^5$		$1 \times 10^5$		$0,8 \times 10^5$	
[Zellen/Well]							
Verwendete Zellen		Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/gesamt [%]	Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/gesamt [%]	Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/gesamt [%]
FrISChe		$2,712 \times 10^6$	89,96	$2,091 \times 10^6$	89,33	$1,629 \times 10^6$	89,61
PBMCs							
Kryo	mit	$1,728 \times 10^6$	92,85	$2,44 \times 10^6$	93,75	$1,879 \times 10^6$	92,71
1 x 10 <sup>7</sup> Zellen							
Kryo	mit	$1,196 \times 10^6$	92,91	$1,88 \times 10^6$	93,36	$1,807 \times 10^6$	93,28
5 x 10 <sup>6</sup> Zellen							
Kryo	mit	$1,309 \times 10^6$	92,67	$1,899 \times 10^6$	92,62	$0,8923 \times 10^6$	94,01
1 x 10 <sup>6</sup> Zellen							

**Tabelle 20** Ergebnis der Zellzählung des CASY Cell Counters der Zellen, die in Okt-3 beschichteten Wells mit 300 IU/mL IL-2 kultiviert wurden.

Ausgesät		$1,2 \times 10^5$		$1 \times 10^5$		$0,8 \times 10^5$	
[Zellen/Well]							
Verwendete Zellen		Lebendzellzahl	Lebend/gesamt	Lebendzellzahl	Lebend/gesamt	Lebendzellzahl	Lebend/gesamt

Zellen	[Zellen/Well]	gesamt [%]	[Zellen/Well]	gesamt [%]	[Zellen/Well]	gesamt [%]
Frische PBMCs	2,301 x 10 <sup>6</sup>	90,49	2,255 x 10 <sup>6</sup>	91,07	2,122 x 10 <sup>6</sup>	90,79
Kryo mit 1 x 10 <sup>7</sup> Zellen	1,929 x 10 <sup>6</sup>	91,13	2,158 x 10 <sup>6</sup>	93,07	2,053 x 10 <sup>6</sup>	93,22
Kryo mit 5 x 10 <sup>6</sup> Zellen	1,647 x 10 <sup>6</sup>	93,54	1,881 x 10 <sup>6</sup>	93,43	1,278 x 10 <sup>6</sup>	94,38
Kryo mit 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen	1,858 x 10 <sup>6</sup>	93,25	1,893 x 10 <sup>6</sup>	94,29	0,9139 x 10 <sup>6</sup>	95,18

**Tabelle 21** Ergebnis der Zellzählung des CASY Cell Counters der Zellen, die in Okt-3 beschichteten Wells ohne IL-2 kultiviert wurden.

Ausgesät [Zellen/Well]	1,2 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	0,8 x 10 <sup>5</sup>			
Verwendete Zellen	Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/ gesamt [%]	Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/ gesamt [%]	Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/ gesamt [%]
Frische PBMCs	2,674 x 10 <sup>6</sup>	90,75	2,898 x 10 <sup>6</sup>	92,27	2,533 x 10 <sup>6</sup>	92,42
Kryo mit 1 x 10 <sup>7</sup> Zellen	2,407 x 10 <sup>6</sup>	91,92	2,401 x 10 <sup>6</sup>	94,20	1,40 x 10 <sup>6</sup>	94,60
Kryo mit 5 x 10 <sup>6</sup> Zellen	1,529 x 10 <sup>6</sup>	93,04	1,521 x 10 <sup>6</sup>	94,71	1,9076 x 10 <sup>6</sup>	95,65
Kryo mit 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen	1,764 x 10 <sup>6</sup>	94,02	1,115 x 10 <sup>6</sup>	94,34	1,187 x 10 <sup>6</sup>	93,74

**Tabelle 22** Ergebnis der Zellzählung des CASY Cell Counters der Zellen, die in Wells kultiviert wurden ohne Okt-3 und IL-2.

Ausgesät	$1,2 \times 10^5$		$1 \times 10^5$		$0,8 \times 10^5$	
[Zellen/Well]						
Verwendete Zellen	Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/gesamt [%]	Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/gesamt [%]	Lebendzellzahl [Zellen/Well]	Lebend/gesamt [%]
Frische PBMCs	$0,929 \times 10^6$	88,09	$0,846 \times 10^6$	86,72	$0,5957 \times 10^6$	85,63
Kryo mit $1 \times 10^7$ Zellen	$0,9493 \times 10^6$	83,70	$0,843 \times 10^6$	83,08	$0,6571 \times 10^6$	82,11
Kryo mit $5 \times 10^6$ Zellen	$0,8559 \times 10^6$	81,11	$0,9683 \times 10^6$	85,98	$0,4487 \times 10^6$	82,08
Kryo mit $1 \times 10^6$ Zellen	$0,9389 \times 10^6$	81,55	$0,4755 \times 10^6$	90,91	$0,6571 \times 10^6$	96,05

**Tabelle 23** Ergebnis der Durchflusszytometrie. Die Probenbezeichnung: E und G sind die verschiedenen Spender. Okt-3 beschichtet (be), Okt-3 im Medium (lös), IL-2 Konzentrationen 50 IU/mL (50), 300 IU/mL (300).

Probe	Lymphozyten	Einzelzellen	Lebende Zellen	Stimulierte Zellen
E CD3be50	22942	22640	22288	19971
E CD3be300	16830	16613	16310	14413
E CD3lös50	20685	20324	20135	17464
E CD3lös300	19879	19059	18705	15122
G CD3be50	15084	14688	14232	13469
G CD3be300	16819	16335	16273	14413
G CD3lös50	17392	16909	16822	15202
G CD3lös300	13197	12684	12597	11626

**Tabelle 24** Darstellung der Proben, der isolierten RNA-Konzentration aus den Proben sowie der für die cDNA-Synthese eingesetzte Menge RNA in  $\mu\text{L}$ .

Probe	Probenbezeichnung	RNA Konzentration [ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ]	Für 1 $\mu\text{g}$ RNA [ $\mu\text{L}$ ]
E SV090B P6	A	259	3,86
E SV090B P12	B	343	2,92
E SV099 P5	C	268	3,73
E SV099 P12	D	237	4,22
E SV132 P5	F	36	27,78
E SV132 P11	G	68	14,71
G SV104 P5	E	44	22,73
SV022 P5	I	510	1,96
SV022 P10	J	279	3,58

**Tabelle 25** Darstellung der Proben, der isolierten RNA-Konzentration aus den Proben sowie der für die cDNA-Synthese eingesetzte Menge RNA in  $\mu\text{L}$ .

Probe	Probenbezeichnung	RNA Konzentration [ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ]	Für 1 $\mu\text{g}$ RNA [ $\mu\text{L}$ ]
E SV090B P6	A	259	3,86
E SV090B P12	B	343	2,92
E SV099 P5	C	268	3,73
E SV099 P12	D	237	4,22
E SV132 P5	F	36	27,78
E SV132 P11	G	68	14,71
G SV104 P5	E	44	22,73
SV022 P5	I	510	1,96
SV022 P10	J	279	3,58