

**Reprogrammierung von somatischen Zellen des
Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) in den
pluripotenten Status**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Melanie Claudia Zuk
aus Herten
Dezember 2014

*I have not failed.
I've just found 10,000 ways that won't work.
(Thomas Edison)*

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Horn
2. Gutachter: Prof.'in Dr. Andrea Vortkamp

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof.'in Dr. Nicole Dünker

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	_____	8
Tabellenverzeichnis	_____	10
Abkürzungsverzeichnis	_____	11
1 Einleitung	_____	13
1.1 Stammzellen	_____	13
1.1.1 Pluripotente Stammzellen	_____	14
1.1.2 Molekulare Mechanismen von Selbsterneuerung und Pluripotenz pluripotenter Stammzellen <i>in vitro</i>	_____	14
1.1.2.1 Transkriptionsfaktoren	_____	14
1.1.2.2 Chromatinstatus	_____	15
1.1.2.3 Signaltransduktionswege	_____	15
1.1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen	_____	16
1.2 Reprogrammierung somatischer Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen	_____	17
1.2.1 Expression von Transkriptionsfaktoren	_____	17
1.2.2 Gezielte epigenetische Veränderungen	_____	18
1.2.3 Manipulation von Signaltransduktionswegen	_____	19
1.2.4 Kinetik des Reprogrammierungsprozesses	_____	19
1.3 Der Weißbüschelaffe als Modellorganismus	_____	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit	_____	22
2 Material und Methoden	_____	23
2.1 Material	_____	23
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	_____	23
2.1.2 Chemikalien	_____	25
2.1.3 Medien, Medienzusätze und Zytokine für die Zellkultur	_____	26
2.1.4 Kulturmedien	_____	27
2.1.4.1 Zellkulturmedien	_____	27
2.1.4.2 Bakterienkulturmedium	_____	28
2.1.5 Puffer und Lösungen	_____	28
2.1.6 Gebrauchsfertige Reaktionssystem	_____	30
2.1.7 Antikörper	_____	31
2.1.8 Oligodesoxynukleotide	_____	32
2.1.9 Plasmide	_____	34
2.1.10 Computergestützte Datenverarbeitungsprogramme	_____	34

2.1.11	Bakterien _____	35
2.1.12	Zelllinien, Primärzellen und embryonale Stammzellen _____	35
2.1.12.1	Zelllinien _____	35
2.1.12.2	Primärzellen _____	36
2.1.12.3	Embryonale Stammzellen des <i>Callithrix jacchus</i> _____	36
2.2	Zellbiologische Methoden _____	37
2.2.1	Passagieren der HEK293T/17 und HT1080 Zellen _____	37
2.2.2	Kryokonservieren und Auftauen der Zellen _____	37
2.2.3	Isolierung von Fibroblasten aus Hautbiopsien und anschließende Kultivierung _____	38
2.2.4	Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten und anschließende Arretierung ihrer Teilungsaktivität _____	38
2.2.5	Kultivierung von embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen _____	39
2.2.5.1	Gewinnung konditionierten Mediums von γ MEFs _____	39
2.2.5.2	Kultivieren und Passagieren von ES und iPS Zellen _____	39
2.2.5.3	Kryokonservieren und Auftauen pluripotenter Kolonien _____	40
2.2.6	Separation der Stromazellen _____	40
2.2.7	Kalzium Phosphat Transfektion zur Herstellung retroviraler Vektoren _	41
2.2.8	Bestimmung von Virentitern _____	42
2.2.9	Generierung von iPS Zellen _____	43
2.2.9.1	Transduktion der Fibroblasten mit einem polycistronischen lentiviralen Vektor _____	43
2.2.9.2	Transduktion der Fibroblasten mit mehreren bicistronischen lentiviralen Vektoren _____	44
2.2.9.3	Einfluss auf Signaltransduktionswege und Chromatinmodifikationen durch Reagenzienzugabe _____	44
2.2.10	Charakterisierung der iPS Zellen _____	45
2.2.10.1	Alkalische Phosphatase Färbung _____	46
2.2.10.2	Immunhistochemische Detektion von pluripotenzassoziierten Proteine _____	46
2.3	Molekularbiologische Methoden _____	49
2.3.1	Plasmidgewinnung mittels <i>Escherichia coli</i> _____	49
2.3.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> XL-10 Gold _____	49
2.3.1.2	Herstellung von transformationskompetenten <i>Escherichia coli</i> _	49
2.3.1.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i> _____	49
2.3.1.4	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> _____	50
2.3.2	Genexpressionsanalysen _____	50
2.3.2.1	Präparation zellulärer RNA _____	50
2.3.2.2	Reverse Transkription zur Synthese komplementärer DNA _____	51

2.3.2.3	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) _____	51
3	Ergebnisse _____	55
3.1	Analysestrategie zur Auswertung durchflusszytometrischer Daten _____	56
3.2	Reprogrammierung von Fibroblasten des <i>Callithrix jacchus</i> mit dem polycistronischen lentiviralen Expressionsvektor hOKSM _____	57
3.2.1	Reprogrammierungsstrategie _____	57
3.2.2	Charakterisierung der hOKSM-transduzierten primaten Zellen _____	60
3.3	Einfluss von DNA-Methylierung auf die Reprogrammierungseffizienz _____	67
3.3.1	Einfluss von 5-Azacytidin auf die mit hOKSM teilreprogrammierten <i>Callithrix jacchus</i> Zellen _____	67
3.3.2	Charakterisierung teilreprogrammierter Zellen nach Demethylierung _____	68
3.4	Aktivierung oder Inhibierung von Signaltransduktionswegen _____	70
3.4.1	Einfluss manipulierter Signaltransduktionswege auf mit hOKSM teilreprogrammierte <i>Callithrix jacchus</i> Zellen _____	70
3.4.2	Charakterisierung teilreprogrammierter Zellen nach Manipulation von Signaltransduktionswegen _____	70
3.5	Reprogrammierung von Mausfibroblasten mit dem polycistronischen Vektor hOKSM _____	73
3.5.1	Reprogrammierungsprozess _____	73
3.5.2	Charakterisierung hOKSM-transduzierter Zellen aus der Maus _____	74
3.6	Einfluss der stöchiometrischen Verteilung der Reprogrammierungsfaktoren _____	76
3.7	Entkoppelte Transduktion von <i>Callithrix jacchus</i> Zellen mittels separater Reprogrammierungsvektoren _____	77
3.7.1	Reprogrammierung mit 4 separaten lentiviralen Vektoren _____	78
3.7.2	Charakterisierung der vierfach transduzierten primaten Zellen _____	79
3.8	Einfluss von Stöchiometrie und Epigenetik _____	84
3.8.1	Einfluss von DNA-Methylierung auf die Reprogrammierungseffizienz mit vier separaten Expressionsvektoren _____	85
3.8.2	Charakterisierung der vierfach transduzierten Zellen nach Demethylierung _____	85
3.9	Transduktion der <i>Callithrix jacchus</i> Zellen mit <i>LIN28A</i> _____	91
3.9.1	Einfluss von <i>LIN28A</i> auf partiell reprogrammierte Zellen _____	91
3.9.2	Reprogrammierung mit 5 separaten lentiviralen Vektoren _____	93
3.10	Transkriptomanalyse der teilreprogrammierten primaten Zellen _____	96
4	Diskussion _____	99
5	Zusammenfassung _____	113
6	Summary _____	114

7	Literaturverzeichnis	115
8	Anhang	127
	Danksagung	131
	Lebenslauf	132

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Unterschiedliche Modelle zur Reprogrammierungskinetik	20
Abb. 2: Weißbüschelaffen	21
Abb. 3: Der Weißbüschelaffe als Modellorganismus	22
Abb. 4: Grafische Darstellung des Δ Ct-Wertes	53
Abb. 5: Ermittlung der Regressionsgeraden zur Berechnung der Amplifikationseffizienzen	53
Abb. 6: Aufbau des Ergebnisteils (Schematische Darstellung)	55
Abb. 7: Analysestrategie zur Detektion von <i>Callithrix jacchus</i> Zellen	56
Abb. 8: Schematischer Aufbau des Reprogrammierungsvektors hOKSM	57
Abb. 9: Zeitstrahl der Reprogrammierung mit dem lentiviralen Reprogrammierungsvektor hOKSM	58
Abb. 10: Transduktionseffizienz des polycistronischen Vektors	58
Abb. 11: Koloniebildung nach Transduktion mit hOKSM_dTomato	59
Abb. 12: Reprogrammierte Zellen in verschiedenen Kulturbedingungen	60
Abb. 13: Alkalische Phosphatase Färbung von hOKSM-transformierten Zellen	61
Abb. 14: Immunhistochemische Detektion pluripotenzassoziierter Proteine	64
Abb. 15: Expression pluripotenzassoziierter Oberflächenmoleküle in unterschiedlichen Medien	65
Abb. 16: Endogene Transkription von pluripotenzassozierten Genen in den reprogrammierten Zellen	67
Abb. 17: Morphologie der Kolonien nach Zugabe von 5-AZA	68
Abb. 18: Expression der Oberflächenmoleküle nach Zugabe von 5-AZA	69
Abb. 19: Morphologie der Kolonien nach manipulierter Signaltransduktion	71
Abb. 20: Expression der Oberflächenmoleküle nach manipulierter Signaltransduktion	72
Abb. 21: Zeitstrahl der Reprogrammierung mit hOKSM (Maus)	73
Abb. 22: Morphologie der Mauszellen und Kolonien	74
Abb. 23: Alkalische Phosphatase Färbung von Zellkolonien der Maus	74
Abb. 24: Immunhistochemische Detektion <i>pluripotenzassoziierter Proteine</i>	75
Abb. 25: Gerichtete hämatopoetische Differenzierung der iPS Zellen	76
Abb. 26: Relative Transkriptmengen in den ES Zellen im Bezug zu <i>POU5F1</i>	77
Abb. 27: Schematischer Aufbau der bicistronischen lentiviralen Reprogrammierungsvektoren	78
Abb. 28: Zeitstrahl der Reprogrammierung mit 4 separaten Vektoren	78
Abb. 29: Transduktionsnachweis mit Hilfe additiver Farbmischung	79
Abb. 30: Morphologie der vierfach transduzierten Zellen	80
Abb. 31: Koloniebildung nach Vierfach-Transduktion	80

Abb. 32: Alkalische Phosphatase Färbung der vierfach transduzierten Kolonien _____	81
Abb. 33: Vergleichbare endogene Expression von <i>KLF4</i> _____	81
Abb. 34: Expression der Oberflächenmoleküle und Fluoreszenzproteine _____	82
Abb. 35: Einfluss hypoxischer Kulturbedingungen auf die Reprogrammierung _____	83
Abb. 36: 4TF transduzierte Zellen ohne Zusatz von 5-AZA _____	84
Abb. 37: Morphologie der vierfach transduzierten Kolonien nach Zugabe von 5-AZA ____	85
Abb. 38: Zugabe von 5-AZA erweitert das Farbspektrum der Kolonien _____	86
Abb. 39: Erhöhte Alkalische Phosphatase Aktivität nach Zugabe von 5-AZA _____	87
Abb. 40: Einfluss von 5-AZA auf die Expression von Oberflächenmolekülen (normoxisch) _____	88
Abb. 41: Einfluss von 5-AZA auf die Expression von Oberflächenmolekülen (hypoxisch) _____	89
Abb. 42: Keine erhöhte Expression der pluripotenzassoziierten Faktoren nach Zugabe von 5-AZA (normoxisch) _____	90
Abb. 43: Ähnlich hohe Expression von <i>KLF4</i> nach Zugabe von 5-AZA (hypoxisch) __	90
Abb. 44: Transduktion teilreprogrammierter Zellen mit LIN28_dTomato _____	91
Abb. 45: Nachträgliche Transduktion mit LIN28A erhöht Anteil an Oberflächenmarker exprimierenden Zellen _____	92
Abb. 46: 4TF- und 5TF-transduzierte Zellen unter Normoxie und Hypoxie _____	93
Abb. 47: Expression Alkalischer Phosphatase bei 4TF- und 5TF-transduzierten Zellen _____	94
Abb. 48: Durchflusszytometrische Messung der Expression von Pluripotenzmolekülen bei 4TF- und 5TF-transduzierten Zellen _____	95
Abb. 49: Hauptkomponentenanalyse im Rahmen einer Transkriptomanalyse _____	96
Abb. 50: Unterschiede in der Genexpression zwischen ES Zellen und Fibroblasten: Die 50 Top-Gene _____	97

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Basalmedien _____	26
Tab. 2: Verwendete Medienzusätze (mit Konzentrationsangaben) _____	26
Tab. 3: Verwendete Medienzusätze (mit Chargennummer) _____	27
Tab. 4: Verwendete Zytokine _____	27
Tab. 5: Verwendete Reaktionssysteme _____	30
Tab. 6: Konjugierte Antikörper _____	31
Tab. 7: Unkonjugierte Antikörper _____	31
Tab. 8: Sekundärantikörper _____	32
Tab. 9: Für immunzytologische Färbung verwendete Seren _____	32
Tab. 10: Spezifität von eingesetzten Oligodesoxynukleotiden für qRT-PCR _____	33
Tab. 11: Verwendete Plasmide _____	34
Tab. 12: Für die Reprogrammierung verwendete Reagenzien _____	45

Abkürzungsverzeichnis

4TF	Reprogrammierung mit 4 separaten lentiviralen Vektoren
5-AZA	5-Azacytidin
ALK5-Inhibitor	<i>activin receptor-like kinase 5</i> Inhibitor
Anti/Anti	<i>Antibiotic-Antimycotic</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>Coding sequence</i>
CF1	<i>Carworth Farms</i> Mausstamm Nr. 1 (Auszuchtstamm)
CHIR	CHIR99021 (GSK-3 β -Inhibitor)
cjes001	<i>Callithrix jacchus</i> ES Zelllinie
CM	<i>conditioned medium</i> (ESML für 24 h auf γ MEF)
CMV	humanes Cytomegalievirus
Ct	<i>cycle threshold</i>
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.p.c.	<i>days post coitum</i>
ECD	<i>electron-coupled dye</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMT	<i>epithelial mesenchymal transition</i>
ES Zelle	embryonale Stammzelle
ESML	<i>Callithrix jacchus</i> ES Zell-Grundmedium
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	fetales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
fw	<i>forward</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h.i.	hitzeinaktiviert
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

hES Zelle	embryonale Stammzelle des Menschen
hOKSM	polycistronischer Reprogrammierungsvektor
IHC	Immunhistochemie
iPS Zelle	induzierte pluripotente Stammzelle
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
k.o.DMEM	<i>KNOCKOUT Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
KSR	<i>KNOCKOUT® Serum Replacement</i>
L-Gln	L-Glutamin
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MACS	<i>magnetic activated cell separation</i>
MEF	<i>mouse embryonic Fibroblast</i>
MEM	<i>non-essential Aminoacids</i>
mES Zelle	embryonale Stammzelle der Maus
MET	<i>mesenchymal epithelial transition</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NaPyr	Natriumpyruvat
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
piPS Zelle	partiell reprogrammierte iPS Zelle
PB	Pacific Blue™
PD	PD325901 (MEK-Inhibitor)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
rhLIF	rekombinanter humaner <i>leukemia inhibitor factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK-Inhibitor	Rho-Kinase-Inhibitor
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> Polymerase-Kettenreaktion
rv	<i>reverse</i>
SB	SB431542 (ALK5-Inhibitor)
SSC	<i>side scatter</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VPA	Valproinsäure
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
γMEF	gammabestrahlte embryonale Mausfibroblasten
ψ	Verpackungssignal

1 Einleitung

Der Einsatz patientenspezifischer, induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS Zellen) in der regenerativen Medizin ist vielversprechend, da iPS Zellen zwei grundsätzliche Vorteile aufweisen. Zum einen können sie sich selbst erneuern, zum anderen können sie in alle Zelltypen des Organismus differenziert werden. Da durch die Reprogrammierung die DNA-Sequenz nicht verändert wird, kann an den iPS Zellen die Pathogenese vieler Erkrankungen erforscht werden. Dabei ist es von Bedeutung, dass die krankheitsspezifischen iPS Zellen *in vitro* sehr lange in Kultur gehalten und expandiert werden können. So können die Zellen über einen langen Zeitraum hinweg untersucht werden. Zudem kann die Wirkung von Arzneimitteln anhand von spezifischen Effektorzellen, in die die iPS Zellen differenziert werden können, direkt *in vitro* getestet werden (Engle und Puppala, 2013). Darüber hinaus könnten monogenetische Erkrankungen therapiert werden, indem dem Patienten genkorrigierte Zellen transplantiert werden, die als autologe Transplantate keine immunologischen Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Dies konnte z. B. anhand eines Sichelzellenanämie-Mausmodell gezeigt werden, bei dem „erkrankte“ Mäuse durch die Transplantation von genkorrigierten iPS Zell-abgeleiteten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen „geheilt“ werden konnten (Hanna *et al.*, 2007). Obwohl murine Modellsysteme für das grundlegende Verständnis vieler Erkrankungen sehr gut geeignet sind, wäre es für die präklinische Evaluierung von zell- und gentherapeutischen Anwendungen durchaus sinnvoll, ein dem Menschen evolutionär näher verwandtes Tiermodell einzusetzen. In der Forschung hat sich dabei der Weißbüschelaffe (*Callithrix jacchus*) als Tiermodell etabliert (vgl. Kapitel 1.3).

1.1 Stammzellen

Als Stammzellen werden im Allgemeinen solche Zellen bezeichnet, die sich sowohl selbst erneuern als auch in Zellen anderer Identität und Funktion differenzieren können (Jaenisch und Young, 2008).

Stammzellen werden auf der Basis ihres Potentials weiter unterteilt. Pluripotente Stammzellen können in alle Zellen aller Keimblätter (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) differenzieren und sind *in vivo* nur in der inneren Zellmasse der Blastozyste zu finden. *In vitro* können diese als embryonale Stammzellen (ES Zellen) unter Beibehaltung ihrer pluripotenten Eigenschaften dauerhaft kultiviert werden. Im Gegensatz dazu sind multipotente und oligopotente Stammzellen für Regenerationsprozesse im adulten Gewebe verantwortlich und können zu den Funktionsträgern des Gewebes differenzieren (Hochedlinger und Plath, 2009). Sie können aber mit ihrem Differenzierungspotential nicht die Keimblattgrenzen überschreiten.

1.1.1 Pluripotente Stammzellen

Zur Charakterisierung pluripotenter Stammzellen werden verschiedene molekularbiologische Merkmale herangezogen. So zeigt sich bei allen ES Zellen eine erhöhte enzymatische Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Wobus *et al.*, 1984; Thomson *et al.*, 1996; Thomson *et al.*, 1998). Desweiteren werden typische Oberflächenmarker exprimiert: Während mES Zellen SSEA1 (*stage specific antigene 1*) exprimieren (Solter und Knowles, 1978), können hES Zellen über die Moleküle SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 (*tumor-related antigen*) und TRA-1-81 (Thomson *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 2002) sowie GCTM-2 (Reubinoff *et al.*, 2000) identifiziert werden. Diese Oberflächenmoleküle werden auch von primaten ES Zellen exprimiert (Thomson *et al.*, 1995). Zudem können ES Zellen anhand ihres Differenzierungspotentials charakterisiert werden, indem sie *in vitro* in die Zellen der drei Keimblätter differenziert werden (Doetschman *et al.*, 1985; Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000). Das Differenzierungspotential kann auch *in vivo* über eine Teratombildung (*teratoma assay*) bestimmt werden. Dafür werden die ES Zellen in immundefiziente Mäuse (z.B. NOD-SCID) subkutan injiziert. Die sich bildenden Teratome werden dann auf Zellen aller drei Keimblätter untersucht (Wobus *et al.*, 1984; Thomson *et al.*, 1998). Bei mES Zellen wird die Pluripotenz zudem anhand einer Chimärbildung überprüft (Bradley *et al.*, 1984). Dabei wird die mES Zelle in eine Blastozyste injiziert, die an der weiteren Embryonalentwicklung teilnimmt.

1.1.2 Molekulare Mechanismen von Selbsterneuerung und Pluripotenz pluripotenter Stammzellen *in vitro*

Die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status einer ES Zelle wird durch die Regelung des Transkriptionsfaktornetzwerks, des Chromatinstatus und der Signaltransduktionswege beeinflusst.

1.1.2.1 Transkriptionsfaktoren

Zur Aufrechterhaltung des pluripotenten Status tragen die Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 entscheidend bei (Boyer *et al.*, 2005). Oct4, Sox2 und Nanog bilden gemeinsam das Zentrum eines Netzwerkes, von dem aus sie ihre eigene Expression regulieren. Dabei binden sie gemeinsam an ihre eigenen Promotoren und formen so eine vernetzte autoregulatorische Schleife. Darüber hinaus regulieren die drei genannten Faktoren die Expression anderer Zielgene. Dabei werden verschiedene Gene gesteuert, von denen einige stets aktiv exprimiert wird, um den Pluripotenzstatus aufrecht zu halten. Andere Gene sind hingegen prinzipiell reprimiert und verweilen in einem sogenannten „poised“ Status, in dem die Genexpression aktiviert werden kann, sobald die ES Zelle differenzieren soll (Boyer *et al.*, 2005; Loh *et al.*, 2006). Zusätzlich zu

Oct4, Nanog und Sox2 wurden noch viele weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert, die in das angesprochene Netzwerk integriert sind und den pluripotenten Status einer Zelle aufrechterhalten. Neben Klf4 (Li *et al.*, 2005) sind bisher die Faktoren Utf1, Nr5a2, Stat3, Sall4, Dax1, Essrb, Tbx3, Tcl1, Rif1, Nac1 und Zfp281 bekannt (Wang *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007).

1.1.2.2 Chromatinstatus

Der Chromatinstatus einer ES Zelle wird von Chromatin-modulierenden Faktoren beeinflusst (Fisher und Fisher, 2011), die die DNA-Methylierung verändern oder zu Histonmodifikationen führen (Chen und Daley, 2008).

Durch die Methylierung von Cytosin an CpG reichen Promotorregionen kann die Transkription bestimmter Gene inaktiviert werden (Cedar und Bergman, 2009). Dabei wird die DNA-Methylierung durch die *de novo* DNA-Methyltransferase 3a/b (DNMT3a/b) katalysiert und von der DNMT1 aufrechterhalten. Eine Analyse über die globale DNA-Methylierung in Zellen zeigte, dass das Genom von mES Zellen weniger methyliert ist als das von somatischen differenzierten Zellen (Collas, 2009). Im Zuge einer Differenzierung werden vor allem die Promotoren stammzellspezifischer Gene neu methyliert und sind dadurch transkriptionell stillgelegt (Fisher und Fisher, 2011).

Histone können durch Acetylierung oder Methylierung an verschiedenen Aminosäuren modifiziert werden. Dabei beeinflusst die Modifikation die Dichte der auf den Histonen gewickelten DNA. Je enger die DNA-Wicklung dabei ist, desto schwerer können Gene, die auf dem gewickelten Abschnitt liegen, transkribiert werden (Loh *et al.*, 2008). Bei der Acetylierung werden Aminosäuren ausschließlich monoacetyliert; bei der Methylierung werden z. B. Lysine oder Arginine sowohl mono- als auch di- oder trimethyliert. So führt z. B. die Histonmodifikation von Lysin 4 am Histon 3 (H3K4me/ H3K4ac) grundsätzlich zu einer Genaktivierung, während eine Methylierung der Lysine 9 oder 27 am Histon 3 (H3K9me/ H3K27me) eine Genrepression bewirkt (Guenther *et al.*, 2007).

1.1.2.3 Signaltransduktionswege

In ES Zellen des *Callithrix jacchus* konnte bis *dato* lediglich nachgewiesen werden, dass der TGF β -(*Transforming growth factor*) Signaltransduktionsweg in Kombination mit dem Zytokin bFGF (*basic fibroblast growth factor*), das die PI3K/AKT (*phosphatidylinositide 3-kinase/protein kinase b*)-Kaskade aktiviert, zur Aufrechterhaltung des pluripotenten Status beiträgt (Nii *et al.*, 2014). Zudem müssen weitere Signaltransduktionswege daran beteiligt sein, da der pluripotente Status der ES Zellen des Weißbüschelaffen nicht nur mit bFGF (Fleischmann *et al.*, 2009) sondern auch mit LIF (*leukemia inhibitor factor*) (Sasaki *et al.*, 2005) aufrechterhalten wird.

Das Zytokin Lif spielt z. B. bei der Kultivierung von mES Zellen eine wichtige Rolle (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988), da drei zentrale Signaltransduktionswege, Jak/Stat, Pi3k/Akt und Mek/Erk, durch den Liganden Lif gesteuert werden. Darüber hinaus sind für die Erhaltung der Pluripotenz von mES Zellen der Bmp4- und der Wnt-Signaltransduktionsweg verantwortlich (Bieberich und Wang, 2013).

Im Gegensatz dazu ist für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status in humanen ES Zellen die Zugabe von bFGF essentiell (Amit *et al.*, 2000), das den FGF/ERK- und PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg steuert. Zudem wird der Pluripotenzstatus durch die Signaltransduktionswege TGF β /SMAD2,3 und Wnt gestützt (Dalton, 2013).

1.1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen

In den frühen 1950iger Jahren wurden erste SCNT-Experimente (*somatic cell nuclear transfer*) mit Froschzellen durchgeführt (Gurdon, 1962). Der größte Durchbruch im Bereich des somatischen Zellkerntransfers, welches auch als therapeutisches Klonen bezeichnet wird, wurde mit der Klonierung des Schafes Dolly erreicht (Wilmut *et al.*, 1997). Später wurden auch andere Spezies wie Mäuse (Wakayama *et al.*, 1998), Schweine (Polejaeva *et al.*, 2000), Kaninchen (Chesne *et al.*, 2002) und Rhesusaffen (Byrne *et al.*, 2007) auf diese Weise geklont. Klonierungsexperimente mit Zellen des *Callithrix jacchus* waren allerdings nicht erfolgreich (Sotomaru *et al.*, 2009).

Pluripotente Stammzellen können aber nicht nur durch den Transfer somatischer Zellkerne sondern auch durch die Fusion einer embryonalen mit einer somatischen Zelle künstlich erzeugt werden. Im Maussystem konnte die Pluripotenz in somatischen Zellen z. B. per spontaner oder elektro-induzierter Fusion induziert werden (Tada *et al.*, 2001; Terada *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2002). Solche Fusionsversuche konnten auch im humanen System erfolgreich durchgeführt werden (Cowan *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006). Daher ist es möglich, patientenspezifische pluripotente Zellen durch Zellfusion zu erzeugen. Allerdings wären die so generierten Zellen tetraploid und damit für den therapeutischen Einsatz ungeeignet.

Bei der Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS Zellen) wird dieses Problem umgangen, indem kein fremdes Genom in die Zelle eingebracht wird. Anstelle dessen werden die spezifischen Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und Myc in der Zelle überexprimiert, so dass diese die Pluripotenz induzieren (Takahashi und Yamanaka, 2006). Für eine erfolgreiche Reprogrammierung humaner Fibroblasten wurden entweder die vier Yamanaka-Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und MYC (Takahashi *et al.*, 2007) oder OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 verwendet (Yu *et al.*, 2007). Zudem wurden Zellen weiterer Spezies, z.B. der Ratte (Li *et al.*, 2009), des

Schweins (Esteban *et al.*, 2009), des Schafs (Bao *et al.*, 2011), des Hundes (Shimada *et al.*, 2010) oder des Rhesusaffen (Liu *et al.*, 2008), erfolgreich reprogrammiert.

1.2 Reprogrammierung somatischer Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen

Bei der konventionellen Generierung von iPS Zellen werden die Yamanaka-Faktoren retroviral in die somatischen Zellen eingebracht. Dabei liegt die Reprogrammierungseffizienz lediglich bei 0,01% bis 0,2% (Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007). Eine gezielte Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren, Chromatin-modulierender Proteine und Signaltransduktionswege könnte die Reprogrammierung effizienter gestalten und beschleunigen.

1.2.1 Expression von Transkriptionsfaktoren

Die konventionelle Reprogrammierung birgt hinsichtlich der therapeutischen Anwendung ein hohes Risiko für Insertionsmutagenesen (Woods *et al.*, 2003). Zudem besteht das Risiko, dass die im Zuge der Reprogrammierung inaktivierten Expressionsvektoren während des Differenzierungsprozesses unkontrolliert aktiviert werden (Okita *et al.*, 2007). Deshalb wurden lentivirale Vektoren entwickelt, die nach erfolgter Reprogrammierung fast vollständig aus dem Genom entfernt werden können (Sommer *et al.*, 2010; Voelkel *et al.*, 2010). Ähnliches gilt auch für transposonvermittelte Systeme: So können *piggy bac*- (Kaji *et al.*, 2009; Woltjen *et al.*, 2009; Yusa *et al.*, 2009) und *sleeping beauty*-Plasmide (Muenthaisong *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2013; Kues *et al.*, 2013) wieder aus den reprogrammierten Zellen entfernt werden. Eine weitere Alternative stellen nicht-integrierende Adenoviren dar (Stadtfeld *et al.*, 2008b; Zhou und Freed, 2009). Ebenso konnten somatische Zellen durch transiente Expression von Plasmiden und nichtviraler Minicircles reprogrammiert werden (Gonzalez *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2010; Montserrat *et al.*, 2011). Zudem kann die mRNA der Transkriptionsfaktoren direkt in die Zellen überführt werden (Warren *et al.*, 2010). Somatische Zellen können auch erfolgreich reprogrammiert werden, indem die Transkriptionsfaktoren als rekombinante Proteine in die Zellen eingebracht werden (Kim *et al.*, 2009a; Zhou *et al.*, 2009).

Anstelle der Yamanaka-Faktoren können somatische Zellen auch mit einem Transkriptionsfaktorensatz aus OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 vollständig reprogrammiert werden (Yu *et al.*, 2007). Ebenso ist es möglich, iPS Zellen mit drei der vier Yamanaka-Faktoren, ohne den Faktor MYC, zu generieren (Nakagawa *et al.*, 2008). Desweiteren können einzelne Transkriptionsfaktoren des Yamanaka-Sets durch andere Faktoren ersetzt werden, insoweit diese das Pluripotenznetzwerk aus Oct4, Nanog und Sox2

ebenso aktivieren (Buganim *et al.*, 2012). Z. B. kann Oct4 durch Nr5a2 (*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2*) (Heng *et al.*, 2010) oder E-Cadherin (Redmer *et al.*, 2011) ersetzt werden.

1.2.2 Gezielte epigenetische Veränderungen

Für eine Reprogrammierung somatischer Zellen müssen die methylierten Promotoren und die durch die Methylierung modifizierten Histone demethyliert werden, so dass die pluripotenzassoziierten Gene aktiv transkribiert werden können (Cedar und Bergman, 2009). Durch die Zugabe von Reagenzien, die entweder DNA-Methyltransferasen inhibieren oder Histonmodifikationen verändern, kann der Reprogrammierungsprozess gezielt unterstützt werden (Huangfu *et al.*, 2008a).

Obwohl viele Promotoren während des Reprogrammierungsprozesses demethyliert werden, sind die Methylome von ES und iPS Zellen nicht gleich (Deng *et al.*, 2009; Lister *et al.*, 2009). iPS Zellen weisen nach der Demethylierung weiterhin eine epigenetische Erinnerung auf. Diese beeinflusst, wie erfolgreich sich die iPS Zellen in unterschiedliche Zelltypen differenzieren lassen (Kim *et al.*, 2010). Werden die iPS Zellen länger in Kultur gehalten, wird ihr Methylom dem der ES Zellen allerdings ähnlicher (Nishino *et al.*, 2011). Dies wird durch serielle Reprogrammierungen oder chromatin-modifizierende Reagenzien unterstützt (Kim *et al.*, 2010). Eine ungenügende Demethylierung der Cytosine an den Promotoren- oder Enhancer-Regionen führt hingegen zu lediglich partiell reprogrammierten Zellen (Guenther *et al.*, 2010). Durch Zugabe von Methyltransferase-Inhibitoren, wie z. B. dem Cytidin-Analogon 5-Azacytidin (5-AZA), können die partiell reprogrammierten Zellen in den pluripotenten Status überführt werden (Mikkelsen *et al.*, 2008).

Histonmodifikationen, wie z. B. die Acetylierung der Lysine, destabilisieren die Chromatinstruktur. So können die Transkriptionsfaktoren leichter an die DNA binden, woraufhin die pluripotenzassoziierten Gene effizienter transkribiert werden. Wenn Histondeacetylasen (HDAC) die Acetylierung entfernen und so die Transkription erschweren bzw. verhindern, können HDAC-Inhibitoren wie Valproinsäure (VPA) eingesetzt werden (Huangfu *et al.*, 2008a; Huangfu *et al.*, 2008b). Im Gegensatz zur Acetylierung kann sich eine Methylierung von Histonen sowohl positiv als auch negativ auf die Reprogrammierung auswirken. Dies hängt davon ab, welche Aminosäuren an den jeweiligen Histonen methyliert werden. So blockiert eine Methylierung von H3K9 beispielweise die Reprogrammierung. Die lediglich partiell reprogrammierten Zellen können aber durch die Zugabe von Vitamin C in vollständige iPS Zellen überführt werden (Chen *et al.*, 2013). Eine Demethylierung von H3K79me2 führt hingegen dazu, dass fibroblastentypische Gene nicht weiter transkribiert werden können (Onder *et al.*, 2012).

1.2.3 Manipulation von Signaltransduktionswegen

Während ein aktiver TGF β -Signaltransduktionsweg für die Aufrechterhaltung des Pluripotenzstatus in ES Zellen von besonderer Bedeutung ist, muss dieser für eine erfolgreiche Reprogrammierung inhibiert werden, damit die Fibroblasten in einer Frühphase der Reprogrammierung den Übergang vom mesenchymalen zum epithelialen Stadium passieren können („*mesenchymal-epithelial transition*“, MET) (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). Um die Inhibition des TGF β -Signaltransduktionswegs zu stabilisieren, können sogenannte *Small Molecules*, wie z.B. der TGF β -Inhibitor RepSox (Ichida *et al.*, 2009) oder eine Kombination aus dem MEK-Inhibitor PD325901 und dem TGF β -Inhibitor SB431542 (Lin *et al.*, 2009), hinzugefügt werden.

Dahingegen führt eine Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionswegs zur Expression diverser pluripotenzassoziiierter Zielgene, die entweder durch Zugabe seines Liganden Wnt3a (Marson *et al.*, 2008) oder durch Inhibierung von GSK-3 β z.B. mit CHIR99021 (Silva *et al.*, 2008) herbeigeführt wird. Zudem bewirkt die 2i-Bedingung, eine Kombination aus CHIR99021 (GSK-3 β -Inhibitor) und PD325901 (MEK-Inhibitor), bei gleichzeitiger Zugabe des Zytokins Lif eine hohe und stabile Regulierung der mit Pluripotenz assoziierten Gene *Pou5f1* und *Nanog* (Silva *et al.*, 2008).

1.2.4 Kinetik des Reprogrammierungsprozesses

Der Reprogrammierungsprozess wurde von Samavarchi-Tehrani *et al.* in drei Phasen unterteilt, die sie als Startphase (*initiation*), Reifephase (*maturation*) und Stabilisierungsphase (*stabilization*) bezeichnen (Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010).

In der Startphase wird die Transkription spezifischer somatischer Gene in den Zellen herunter reguliert und die Telomeraseaktivität reaktiviert (Brambrink *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*, 2008a). Zudem durchlaufen Fibroblasten die MET (Downing *et al.*, 2013). Außerdem werden wichtige Mechanismen aktiviert, die Apoptose und Seneszenz inhibieren (Utikal *et al.*, 2009).

In der im Vergleich zur Startphase längeren Reifephase wird die Transkription für pluripotenzassoziierte Gene hochreguliert (Hansson *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012). Anschließend wird die autoregulatorische Schleife der Pluripotenzgene aktiviert und die Zellen erreichen den pluripotenten Status (Golipour *et al.*, 2012).

In der Stabilisierungsphase erhält die iPS Zelle ihren Status selbstständig aufrecht (Jaenisch und Young, 2008) und die epigenetischen Erinnerungen der Zelle werden schrittweise gelöscht (Ohi *et al.*, 2011).

Neben den erwähnten Studien, die einzelne Phasen bzw. Prozessabschnitte beschreiben, existieren vier anerkannte Modelle, mit Hilfe derer versucht wird, die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Phasen zu erklären.

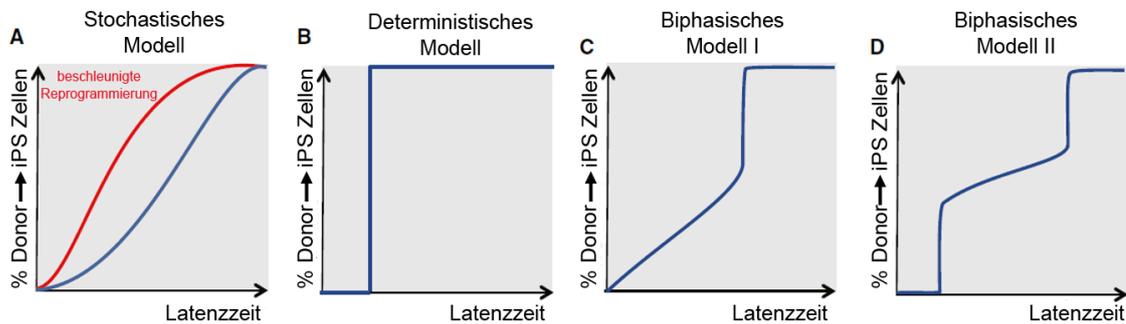


Abb. 1: Unterschiedliche Modelle zur Reprogrammierungskinetik

(A) *Stochastisches Modell (inkl. Szenario der beschleunigten Reprogrammierung)*, (B) *Deterministische Modell*, (C) *Biphasisches Modell I*, (D) *Biphasisches Modell II*. Modifiziert aus (Theunissen und Jaenisch, 2014)

Im stochastischen Modell (Abb. 1 A) wird Pluripotenz ungerichtet und auf zufälligem Wege erreicht. Dabei werden in den unterschiedlichen Phasen der Reprogrammierung unterschiedliche geschwindigkeitsbestimmende Ereignisse (z. B. die Aktivierung oder Deaktivierung von Genen) zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchlaufen. Demnach erreichen die einzelnen somatischen Zellen den pluripotenten Zustand ebenfalls zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Durch aktives Eingreifen in den Prozess kann dieser beschleunigt werden (Hanna *et al.*, 2009). Das deterministische Modell (Abb. 1 B) geht im Gegensatz dazu davon aus, dass jede somatische Zelle die gleiche Latenzzeit benötigt, da die Zellen eine definierte Reihenfolge an unterschiedlichen Ereignissen, die hierarchisch angeordnet sind, durchlaufen (Rais *et al.*, 2013). Einzelzellanalysen (Buganim *et al.*, 2012) sowie Analysen von teilreprogrammierten Zellen (Polo *et al.*, 2012) zeigten jedoch, dass sich deterministische und stochastische Phasen möglicherweise abwechseln. Im biphasischen Modell I (*early stochastic and late deterministic model*) (Abb. 1 C) geschehen die ersten Veränderungen zufällig. Nur die Zellen mit den notwendigen epigenetischen Voraussetzungen gehen dabei in die nächste Reprogrammierungsphase über. Ab diesem Zeitpunkt durchlaufen die Zellen einen festgelegten, hierarchisch strukturierten Veränderungsprozess (Buganim *et al.*, 2012). Das biphasische Modell II (*biphasic model*) (Abb. 1 D) fügt zu Beginn des Reprogrammierungsprozess eine weitere deterministische Phase hinzu (Polo *et al.*, 2012). Anschließend folgt eine stochastische Phase. Der gesamte Prozess schließt dann mit einer deterministischen Phase ab.

1.3 Der Weißbüschelaffe als Modellorganismus

Die in Brasilien beheimateten Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) gehören zu der Familie der Krallenaffen (*Callithrichidae*) und werden der Gattung der Büscheläffchen (*Callithrix*) zugeordnet. Die Neuweltaffen (*Platyrrhini*) haben ohne Schwanz eine Größe von 12-18 cm; mit Schwanz kommen sie auf eine Gesamtgröße von 40-53 cm und ein Gesamtgewicht von 250-500 g (Zuhke und Weinbauer, 2003). Nach ca. 18 Monaten erreichen sie ihre Geschlechtsreife. Nach einer Tragezeit von etwa 144 Tagen bringen sie meistens Zwillinge zur Welt (Mansfield, 2003). In Gefangenschaft können die Tiere bis zu 20 Jahre alt werden.

In der Forschung hat sich das Modell des Weißbüschelaffen schon seit längerer Zeit etabliert. So wird es in der Neurologie, Immunologie, Toxikologie, Reproduktionsbiologie, Ethologie sowie in der Arzneimittelforschung und der Erforschung von Infektionskrankheiten eingesetzt (Abbott *et al.*, 2003; Mansfield, 2003).



Abb. 2: Weißbüschelaffen

Gruppe von Weißbüschelaffen (Schatten und Mitalipov, 2009)

Für die Stammzellforschung erweist sich der Weißbüschelaffe ebenso als wertvolles Tiermodell, da es zahlreiche zwischen Mensch und Weißbüschelaffe kreuzreaktive Antikörper und Zytokine gibt (Neubert *et al.*, 1996; Hibino *et al.*, 1999; Brok *et al.*, 2001). Zudem existieren mehrere etablierte ES Zelllinien, die bei der Charakterisierung von iPS Zellen zum Vergleich herangezogen werden können. Thomson *et al.* etablierten bereits 1996 acht ES Zelllinien, die heutzutage jedoch nicht mehr verfügbar sind (Thomson *et al.*, 1996). Deshalb isolierten Sasaki *et al.* drei weitere Zelllinien (Sasaki *et al.*, 2005). Diese und weitere Linien wurden inzwischen gänzlich charakterisiert (Muller *et al.*, 2009). Dabei wurden dieselben Merkmale untersucht, die auch bei der Begutachtung humaner pluripotenter Zellen herangezogen werden (vgl. Kapitel 1.1.1). Überdies ist der *Callithrix jacchus* bislang das einzige transgene Affenmodell mit Keimbahntransmission (Sasaki *et al.*, 2009). Dies eröffnet neue Forschungsmöglichkeiten wie z.B. die Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen oder Erkrankungen des

blutbildenden Systems anhand spezifisch generierter Tiermodelle. Da das Genom eines weiblichen *Callithrix jacchus* inzwischen vollständig sequenziert werden konnte (Worley et al., 2014), können daraus möglicherweise Erkenntnisse für das Verständnis von Reprogrammierungsprozessen gewonnen werden.

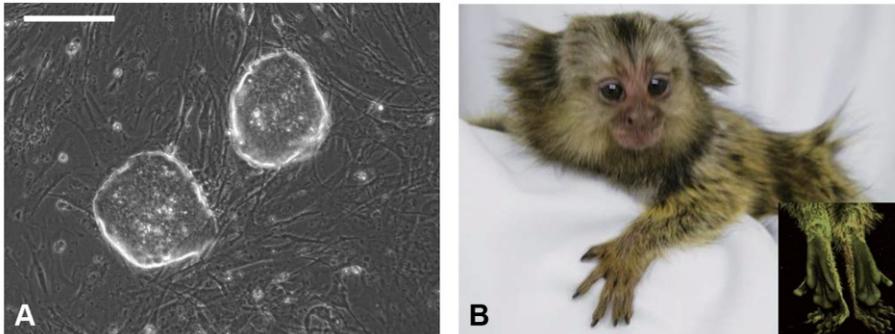


Abb. 3: Der Weißbüschelaffe als Modellorganismus

(A) Embryonale Stammzellen der Linie cjes001, Maßstabsbalken = 100 μm , 100x Vergrößerung, (B) transgener Weißbüschelaffe (Sasaki et al., 2009)

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war es, somatische Zellen des *Callithrix jacchus* zu induzierten pluripotenten Stammzellen zu reprogrammieren. In späteren Versuchen könnten diese in unterschiedliche Effektorzellen differenziert werden, um sie beispielsweise in der zelltherapeutischen Anwendung zu testen.

Obwohl der Weißbüschelaffe ein etabliertes Versuchstier ist, gab es zu Beginn der dieser Arbeit zugrunde liegenden Forschungen keine Veröffentlichungen, in denen die Reprogrammierung von *Callithrix jacchus* Zellen beschrieben wurde. Deshalb wurden die hier verwendeten Methoden aus etablierten Praktiken in der Forschung an Menschen- und Mauszellen abgeleitet und dem Affenmodell angepasst (vgl. Kapitel 1.2).

Für die Herstellung von iPS Zellen wurden in einem ersten Schritt dermale Fibroblasten aus Hautbiopsien gewonnen. Diese wurden mit unterschiedlichen lentiviralen Vektoren und unter verschiedenen Bedingungen reprogrammiert. Einerseits wurden die Zellen mit einem polycistronischen Vektor, der die cDNA der humanen Yamanaka-Faktoren *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* und *MYC* ko-exprimierte, transduziert. Andererseits wurde der Reprogrammierungsprozess mit separaten Vektoren initiiert, die mit den genannten Faktoren einzeln in die Zelle eingebracht wurden. Weitere Ansätze wurden unter Hinzunahme eines *LIN28A*-Expressionsvektors durchgeführt. Zur Unterstützung des Reprogrammierungsprozesses wurden sogenannte *Small Molecules* zu den Zellen gegeben, die epigenetische Blockaden beseitigten oder Signaltransduktionswege aktivierten oder inhibierten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät	Modell (Hersteller)
Bestrahlungsanlage für Zellen	Röntgenanlage ISOVOLT 320 HS (GE/Pantak)
Durchflusszytometer	FACSAria (BD Bioscience) FACSCalibur (BD Bioscience)
Einfrierhilfen für Zellen	Typ 5100 (Nalgene)
Heizblock	HX-2 (PeQLab)
Magnetische Zellseparation	MACS MultiStand (Miltenyi Biotec) MidiMACS™ Separator (Miltenyi Biotec)
Mikroskope	CKX41 (Olympus) Axio Vert.A1 (Zeiss)
Pipetten:	Multipette® (Eppendorf)
2 µl - 20 µl, 20 µl - 200 µl, 100 µl - 1000 µl	Eppendorf Research® (Eppendorf)
P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Pipetman Classic™ (Gilson)
Pipettierhelfer	Accu-Jet® Pro (Brand)
pH-Meter	pH526 Wtw (Xylem)
Real-Time PCR System	CFX96 (BioRad)
Schüttler	TS 100 (Thermo Scientific)
Sicherheitswerkbänke	HERAsafe KS (Thermo Scientific) HERAsafe 2000 (Thermo Scientific)
Spektralphotometer	NanoDrop 2000 (PeQLab)
Ultrazentrifuge	Optima L-80 XP (Beckman Coulter)
Waagen	AJ H220CE (Vibra) 572 (Kern)
Wärmeschränke:	
Inkubator für Bakterienkulturen	MaxQ™ 6000 (Thermo Scientific)
CO ₂ -Inkubatoren für Zellkulturen	HERAcell 240i (Thermo Scientific) CB53 (Binder)
Zentrifugen	5810R und 5424 (Eppendorf) Pico21 (Heraeus) Avanti J-26 XP (Beckman Coulter)

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aufsatzfilter 0,22 µm (250 ml, 500 ml)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Deckgläser	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Einfrierröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Einmalskalpelle (Gr. 21)	Mediware (Lenexa, KS, USA)
Einmalspritzen (1 ml, 5 ml, 20 ml, 40 ml)	Braun (Melsungen)
Flachbodenplatten („6 Well“)	Greiner (Frickenhausen)
Flachbodenplatten („24 Well“)	Costar (Tewksbury, MA, USA)
Injektionsnadeln (G21)	BD Bioscience (San Jose, CA, USA)
LS Säulen	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Lumox™ Multiwellplatten (24er)	Greiner (Frickenhausen)
MACS Separationssäulen (LS)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mediumflaschen (100 ml, 500 ml)	Greiner (Frickhausen)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
PCR-Platten	PeQLab (Erlangen)
PCR-Spezialfolien	BioRad (Hercules, CA, USA)
Pipettenspitzen:	
200 µl, 1000 µl	Starlab (Ahrensburg)
10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	PeQLab (Erlangen)
Polypropylen-Röhrchen (14 ml, 50 ml)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Polypropylen-Rundbodenröhrchen (5 ml)	
mit Sieb (40 µm Porengröße)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Polypropylen-Rundbodenröhrchen (5 ml)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Spritzenvorsatzfilter (Zelluloseacetat)	
(0,22 µm, 0,45 µm)	Sartorius (Göttingen)
Stabpipetten	
(1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Verschlussfolie Parafilm	Bemis Flexible Packaging (Neenah; WI, USA)
Wägebapier, Mn 226, 9x11,5cm	Macherey-Nagel (Düren)
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (300 cm ²)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellsiebe (Porengröße: 40 µm)	Partec (Münster)
Zentrifugationsröhrchen (40 ml)	Beckman Coulter (Krefeld)

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
5-Azacytidin	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
ALK5-Inhibitor II (E-616452)	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bacto™ Agar	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Bacto™ Hefeextrakt	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Bacto™ Trypton	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Bovines Serum Albumin (98%, Fraktion V)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Calciumchlorid	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Cell-Dissociation-Buffer	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
CHIR99021 (GSK-3β-Inhibitor)	Stemgent (San Diego, CA, USA)
Chloroform	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Chloroquin Diphosphat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem (Darmstadt)
EDTA Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol	Carlo Erba (Cornaredo, Italien)
Gelatine (porcin)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
HEPES-Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isopropanol	Carlo Erba (Cornaredo, Italien)
Mangandichlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Carlo Erba (Cornaredo, Italien)
NaCl	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
NaOH	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Paraformaldehyd	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
PD325901 (MEK-Inhibitor)	Stemgent (San Diego, CA, USA)
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
ROCK-Inhibitor Y-27632	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
SB431542 (ALK5-Inhibitor)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
StemPro® Accutase®	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
TRIS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

TRIS-HCl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TRIzol®	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Trypanblau	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tween-20	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Valproinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
VECTASHILD® Mounting Medium mit DAPI (1,5 µg/ml)	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)

2.1.3 Medien, Medienzusätze und Zytokine für die Zellkultur

In den Tabellen 1-4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Medien, Medienzusätze und Zytokine mit Herstellerangaben und Bestellnummern aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Basalmedien

Medium	Hersteller	Bestellnummer	Verwendete Chargen
DMEM high Glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)	E15-810	E81011-0859 E81010-2360 E81010-1942
Knockout™ DMEM	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	10829-018	818697 910663 1142121 1379596

Tab. 2: Verwendete Medienzusätze (mit Konzentrationsangaben)

Medienzusätze	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
2-Mercapto-ethanol	50 mM	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	31350-010
Antibiotic-Antimycotic, 100x (Anti-Anti)	10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	15240-096
L-Glutamin	200 mM	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	25030-081
Natriumpyruvat	100 mM	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	1130-070
Penicillin/ Strep-tomycin 100x (Pen/Strep)	10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycinsulfat	ccrpo (Oberdorla)	Z-13-M

Tab. 3: Verwendete Medienzusätze (mit Chargennummer)

Medienzusätze	Hersteller	Bestellnummer	Verwendete Charge(n)
FBS (fetales bovines Serum) Gold	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)	A15-151	A-15111-1801
GlutaMAX™	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	35050-061	898608 1253048
Heparin-Natrium 5000 i.e. (niedermolekular)	Ratiopharm (Ulm)	PZN-3029820	L08388 (155 mg/ml)
KSR (<i>KNOCKOUT® Serum Replacement</i>)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	10828-028	941518 1027925 1088169 1136524
MEM NEAA, 100x	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	11140-035	815411 909994 1311311

Tab. 4: Verwendete Zytokine

Zytokin	Aktivität/mg Protein	Indikatorzelllinie	Hersteller
bFGF	$\geq 2 \times 10^6$ U/mg	BaF3 Zellen	PeptoTech (Rocky Hill, NJ, USA)
rhLIF	$\geq 1 \times 10^7$ U/mg	TF-1 Zellen	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

2.1.4 Kulturmedien

Im Folgenden werden die verwendeten Zell- und Bakterienkulturmedien und deren Zusammensetzung aufgeführt.

2.1.4.1 Zellkulturmedien

Medium für HEK293T Zellen

10% ($\frac{v}{v}$) FBS, 1 mM Natriumpyruvat, 1 x Pen/Strep, in DMEM (4,5 g/l Glucose)

Medium für HT1080 Zellen

10% ($\frac{v}{v}$) FBS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1x MEM, 1x Pen/Strep, in DMEM (4,5 g/l Glucose)

Medium für CF1-MEFs

10% ($\frac{v}{v}$) FBS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1 x MEM, 1 x Pen/Strep, 5×10^{-2} mM 2-Mercaptoethanol, in DMEM (4,5 g/l Glucose)

Medium für *Callithrix jacchus* Fibroblasten (cj Medium)

10% (v/v) FBS, 1 x GlutaMAX™, 1 x MEM, 1 x Anti-Anti, in DMEM (4,5 g/l Glucose)

Grundmedium für pluripotente *Callithrix jacchus* Zellen (ESML)

20% (v/v) KSR, 1 mM L-Glutamin, 1 x MEM, 5×10^{-3} mM 2-Mercaptoethanol, 1 x Pen/Strep, in Knockout™ DMEM

Medium für cjes001 (*Callithrix jacchus* ES Zelllinie)

$\frac{3}{4}$ ESML + (bFGF (1 ng/ml) + Heparin (10 ng/ml)) + $\frac{1}{4}$ CM (konditioniertes ESML, Herstellung vgl. Kapitel: 2.2.5.1.)

Einfriermedium für (Einzel-)Zellen

90% (v/v) FBS, 10% (v/v) DMSO

Einfriermedium für pluripotente Kolonien

60% (v/v) Knockout™ DMEM, 20% (v/v) DMSO, 20% (v/v) KSR, 10^{-2} mM ROCK-Inhibitor (Y-27632)

2.1.4.2 Bakterienkulturmedium

LB-Medium (Luria-Bertani)

1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 85,5 mM NaCl und 1 mM NaOH wurden in H₂O gelöst und anschließend autoklaviert (121°C, 20 min).

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar (anschließend autoklaviert, 121°C, 20 min)

2.1.5 Puffer und Lösungen

5-Azacytidin (Stammlösung: 50 mM)

50 mg 5-AZA [244,21 g/mol] wurden in 4,1 ml sterilem H₂O gelöst. Die Lösung wurde anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

ALK5-Inhibitor II (E-616452, RepSox) (Stammlösung: 25 mM)

2 mg des Inhibitors [287,32 g/mol] wurden in 278 µl DMSO gelöst. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

bFGF (Stammlösung: 0,1 mg/ml)

50 µg bFGF wurden zunächst in 500 µl 5 mM TRIS (pH 7,6) gelöst. Diese Lösung wurde zu 44,5 ml 5 mM TRIS und 5 ml 1% (w/v) BSA gegeben. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert (0,22 µm, Zelluloseacetat), aliquotiert und bei -80°C gelagert.

BSA (Stammlösung: 1% (w/v))

100 mg BSA wurden in 10 ml 1 x PBS gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert (0,22 µm, Zelluloseacetat), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

CHIR99021 (Stammlösung: 3 mM)

2 mg CHIR [465,34 g/mol] wurden zunächst in 430 µl DMSO gelöst. Diese Lösung wurde mit 1 ml Knockout™ DMEM verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

FACS-Proben-Puffer

Zur Erstellung des Puffers wurden 1 x PBS und FBS in einem Verhältnis von 9:1 gemischt und bei 4°C gelagert.

Gelatine, porcine (Stammlösung: 0,1% (w/v))

500 mg Gelatine wurden in 500 ml H₂O gelöst, anschließend wurde die Lösung autoklaviert (121°C, 20 min) und bei RT gelagert.

2 x HeBS (HEPES-buffered saline)

0,28 M NaCl, 0,05 M HEPES-Natriumsalz und 1,5 mM Na₂HPO₄ wurden in H₂O gelöst. Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH auf 7,02 eingestellt. Im Anschluss wurde die Lösung steril filtriert (0,45 µm, Zelluloseacetat), aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Heparin (niedermolekular, Stammlösung: 0,031 mg/ml)

200 µl Heparin wurden mit sterilem H₂O auf 100 ml aufgefüllt. 10 ml dieser Lösung wurden anschließend mit 90 ml H₂O versetzt und bei 4°C gelagert.

HEPES (Stammlösung: 1 M)

23,8 g HEPES [238,31 g/mol] wurden in H₂O gelöst und mit 10 M NaOH auf pH 7,3 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt, autoklaviert (121°C, 20 min) und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Hitzeinaktiviertes FBS (h.i. FBS)

500 ml FBS wurden für 30 min bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert, anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

rhLIF (Stammlösung: 10 µg/ml)

10 µg rhLIF wurden in 1000 µl 1 x PBS mit 0,1% (w/v) BSA gelöst. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

ROCK-Inhibitor (Y-27632) (Stammlösung: 10 mM)

1 mg ROCK-Inhibitor [338,3 g/mol] wurde in 296 µl sterilem H₂O gelöst. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

PD0325901 (Stammlösung: 0,5 mM)

2 mg PD [482,19 g/mol] wurden zunächst in 415 µl DMSO gelöst. 100 µl dieser Lösung wurden mit 1900 µl Knockout™ DMEM verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

SB 431542 (Stammlösung: 2 mM)

5 mg SB [384,4 g/mol] wurden in 650 µl DMSO gelöst. 100 µl dieser Lösung wurden mit 900 µl Knockout™ DMEM verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

TFB1 (Transfromationspuffer 1, zur Herstellung kompetenter Zellen)

30 mM Kalium-Acetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂ und 15% (v/v) Glycerin wurden in H₂O gelöst. Der pH-Wert dieses Puffers wurde mit 0,2 M Essigsäure auf 6,1 eingestellt. Anschließend wurden 50 mM MnCl₂ hinzugegeben und die Lösung steril filtriert (0,22 µm, Zelluloseacetat).

TFB2 (Transfromationspuffer 2, zur Herstellung kompetenter Zellen)

10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl und 15% (v/v) Glycerin wurden in H₂O gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M Kaliumhydroxyd auf 6,5 eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert (0,22 µm, Zelluloseacetat), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

TRIS (Stammlösung: 5 mM)

30 mg TRIS [121,14 g/mol] wurden in H₂O gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 7,6 eingestellt. Schließlich wurde die Lösung mit H₂O auf 50 ml aufgefüllt, autoklaviert (121°C, 20 min) und bei RT gelagert.

VPA (Stammlösung: 200 mM)

332 mg VPA wurden in 10 ml 1 x PBS gelöst, steril filtriert (0,22 µm, Zelluloseacetat) und bei 4°C gelagert.

2.1.6 Gebrauchsfertige Reaktionssystem

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Reaktionssysteme mit Herstellerangaben aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Hersteller	Bestellnummer
Alkalische Phosphatase Detection Kit	Merck Millipore	SCR004
Feeder Removal MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec	130-095-531
Qiagen® Plasmid Plus Maxi Kit	Qiagen	12965
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen	205311
QuantiTect SYBR® Green PCR Kit	Qiagen	204145
RNeasy Microkit	Qiagen	74004

2.1.7 Antikörper

Den Tabellen 6-8 sind die verwendeten Antikörper zu entnehmen. Tabelle 9 zeigt die für die immunzytologischen Färbungen verwendete Seren.

Tab. 6: Konjugierte Antikörper

Spezifität/ Reaktivität	Klon	Spezies/ Isotyp	Konjugation	Bestellnummer	Hersteller
CD29/ Maus, Ratte	eBioHMB 1-1	arm. Ham- ster/IgG	PE-Cy7	25-0291	eBioscience
CD29/ Maus, Ratte	HMB1-1	arm. Ham- ster/IgG	Pacific Blue™	102224	BioLegend
SSEA4/ Mensch	MC-813- 70	Maus/ IgG3,κ	FITC	330410	BioLegend
SSEA3/ Mensch	MC-631	Ratte/ IgM	Alexa Flu- or®488	FCMAB141A4	Millipore
TRA-1-60/ Mensch	TRA-1- 60	Maus/ IgM	Alexa Flu- or®488	MAB4360A4	Millipore
TRA-1-81/ Mensch	TRA-1- 81	Maus/ IgM	Alexa Flu- or®488	MAB4381A4	Millipore

Tab. 7: Unkonjugierte Antikörper

Spezifität/ Reaktivität	Klon	Spezies/Isotyp	Bestellnummer	Hersteller
SSEA4/ Mensch, Maus	MC-813-70	Maus IgG3	MAB4304	Millipore
SSEA3/ Mensch, Maus	MC-631	Ratte IgM	MAB4303	Millipore
TRA-1-60/ Mensch	TRA-1-60	Maus IgM	MAB4360	Millipore
TRA-1-81/ Mensch	TRA-1-81	Maus IgM	MAB4381	Millipore
GCTM-2/ Mensch, Pavian	N/A	Maus IgM	433140	Life Techno- logies
E-Cadherin/ Mensch, Maus	24E10	Kaninchen IgG	3195	Cell Signaling
Nanog/ Mensch, Maus	N/A	Kaninchen IgG	09-0020	Stemgent
Oct4/ Mensch, Maus	C30A3	Kaninchen IgG	2840	Cell Signaling
Sox2/ Mensch, Maus	L1D6A2	Maus IgG1	4900	Cell Signaling

Tab. 8: Sekundärantikörper

Spezies und Reaktivität	Konjugation	Bestellnummer	Hersteller
Esel gegen Kaninchen	Alexa Flour®647	705-605-003	Dianova
Esel gegen Maus	Alexa Flour®647	715-605-151	Dianova
Esel gegen Maus	FAB Fragmente	715-007-003	Dianova
Esel gegen Ratte	Alexa Flour®647	712-605-153	Dianova
Ziege gegen Maus	Alexa Flour®488	A-11001	Life Technologies
Ziege gegen Ratte	DyLight™ 488	112-545-003	Dianova

Tab. 9: Für immunzytologische Färbung verwendete Seren

Spezies	Bestellnummer	Hersteller
Esel	017-000-121	Dianova
Ziege	005-000-121	Dianova

2.1.8 Oligodesoxynukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Die Nukleotidsequenz von *GAPDH* wurde aus der Literatur übernommen (Vandesompele *et al.*, 2002). Die darüber hinaus aufgeführten Primer wurden mit der Online-Datenbank der National Library of Medicine des National Institute of Health mit Hilfe von Primer3 und BLAST entworfen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Um die Primer für *LIN28A* zu entwickeln, wurde zusätzlich die Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) verwendet. Alle Oligodesoxynukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Die in der Tabelle aufgeführten Effizienzen der Primerpaare wurden ermittelt, um die relative Genexpression einzelner Gene zueinander möglichst genau zu bestimmen (vgl. dazu Kapitel 2.3.2.3).

Tab. 10: Spezifität von eingesetzten Oligodesoxynukleotiden für qRT-PCR

Gen-symbol	Registrier-nummer	Sequenz (5' -> 3')	Bindungs-stelle	Größe des Amplifikats	Amplifika-tionseffizienz
<i>GAPDH</i>	XM_0027 59682.2	TGCACCACCAAC TGCTTAGC	511-530	87 bp	109,4%
		GGCATGGACTGT GGTCATGAG	577-592		
<i>RPL13A</i>	XM_0027 62345.2	CCATCGTGGCTA AACAGGTACT	89-110	112 bp	102,9%
		AGGAAAGCCAGG TACTTCAACTT	178-200		
<i>DNMT3B</i>	XM_0027 47292.2	AGATGTGATTCC TGAAAGCATCC	2240-2262	79 bp	94,3%
		GGAGGGAAGTGA GGTACATGCTAT	2295-2318		
<i>KLF4</i>	XM_0028 06507.2	CTGCCAGAGGAG AATTCAGTATTT	1771-1794	93 bp	98,6%
		CTTGACCATGAT TGTAGTGCTTTC	1840-1863		
<i>LIN28A</i>	ENSCJAG 00000022 770	TTGAGGAGCAGG CAGAGTGG	1269-1289	162 bp	98,9%
		TGCATTTGGACA GAGCATGG	1411-1431		
<i>MYC</i>	XM_0027 59229.2	GTAAGGAAAAG ATTCCGTCACAC	1786-1809	151 bp	95,7%
		GAAGTCCAATTT GAGGCAGTTTAC	1913-1936		
<i>NANOG</i>	XM_0027 63004.1	AGAATGAAATCT AAGAGGTGGCAG	433-456	104 bp	106,6%
		TAGGAAGAGTAG AGGCTGGGGTAT	513-536		
<i>POU5F1</i>	NM_0012 65584.1	AGGAGAAGCTGG AACAAAACACG	377-399	73 bp	105,6%
		CATAGTCACTGC TTGATCGCTTG	855-877		
<i>SOX2</i>	XM_0038 00094.1	AGTATCAGGAGT TGCAAGGCAG	39-61	79 bp	93,7%
		TCCTAGTCTTAAA GAGGCAGCAA	95-117		
<i>ZFP42</i>	XM_0037 32392.1	AGCTCCCTTCTG GAATGTTCTTT	340-362	150 bp	91,7%
		TGATAAGTCCAT GCCAGGTATCC	470-492		

2.1.9 Plasmide

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide tabellarisch aufgeführt. Die zugehörigen Plasmidkarten sind dem Anhang zu entnehmen (vgl. Kapitel 8).

Tab. 11: Verwendete Plasmide

Plasmid	Expression	Publiziert/Erhalten von	
pRSV/Rev	HIV-1 Rev Gens	(Dull <i>et al.</i> , 1998)	
pMD.G2	VSV-G Hüllproteins	(Burns <i>et al.</i> , 1993)	
pcDNA3.GP.4xCTE	<i>gag/pol</i> Gene von HIV1	A. Schambach, Abteilung für Experimentelle Hämatologie, Medizinische Hochschule Hannover (Voelkel <i>et al.</i> , 2010)	
pRRL.PPT.SF.hOKSM. dTomato.Pre.SIN.Frt	codonoptimierten kodierenden Sequenz (CDS) der humanen Gene: <i>OCT4</i> , <i>KLF4</i> , <i>SOX2</i> und <i>MYC</i> .		
pRRL.PPT.SF.hOCT4_ eGFP.wPRE	CDS vom humanen <i>OCT4</i>		
pRRL.PPT.SF.hSOX2_ dTomato.wPRE	CDS vom humanen <i>SOX2</i>		
pRRL.PPT.SF.hKLF4_ Cerulean.wPRE	CDS vom humanen <i>KLF4</i>		
pRRL.PPT.SF.hMYC_ Venus.wPRE	CDS vom humanen <i>MYC</i>		
pRRL.PPT.SF.cjLIN28_IRES_ dTomato_wPRE_FRT	CDS von <i>Callithrix jacchus LIN28A</i>		AG Klump, Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Essen
pRRL.PPT.SF.IRES. dTomato.wPRE.FRT	CDS des Fluoreszenzproteins dTomato (diente als Kontrollvektor)		

2.1.10 Computergestützte Datenverarbeitungsprogramme

Auswertung durchflusszytometrischer Messdaten

Diva Software 6.1.2	BD Biosciences
CellQuest™ Pro 5.2.1	BD Biosciences
Kaluza Software 1.2	Beckman Coulter

Auswertung mikroskopischer Aufnahmen

AxioVision Rel. 4.8	Zeiss
---------------------	-------

Auswertung von qRT-PCR Daten

CFX Manager™ 3.1 BioRad

Aufarbeitung generierter Daten

Microsoft Excel 2007 Microsoft Corporation

GraphPad Prism 5.01 GraphPad Software

2.1.11 Bakterien

Für molekularbiologische Arbeiten wurde der *Escherichia coli*-Stamm „XL10-Gold“ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verwendet.

Genotyp: Tet^rΔ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^qZAM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r]

2.1.12 Zelllinien, Primärzellen und embryonale Stammzellen

Die verwendeten Zelllinien und Primärzellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, unter normoxischen Bedingungen (21% O₂, 5% CO₂) und bei 37°C in gesättigter H₂O Atmosphäre kultiviert. Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Zellkulturmedien werden in Kapitel 2.1.4 beschrieben.

2.1.12.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien stammen aus der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

HEK293T/17

HEK293T Zellen sind humane embryonale Nierenepithelzellen, die durch die stabile Transfektion mit DNA des Adenovirus Typ 5 immortalisiert wurden (Graham *et al.*, 1977). HEK293T/17 ist ein Derivat dieser adhärent wachsenden hypotriploiden Zelllinie und kann besonders effizient transfiziert werden. Deshalb wurde sie zur Produktion von retroviralen Vektorpartikel verwendet (vgl. Kapitel 2.2.6). Bei der ATCC ist diese Zelllinie unter der Nummer CRL-11268™ 293T/17 gelistet.

HT1080

HT1080 Zellen sind humane adulte Zellen, die aus einem Fibrosarkom eines 35-jährigen kaukasischen Mannes kultiviert wurden (Rasheed *et al.*, 1974). Die pseudo-diploide Krebszelllinie wächst adhärent und wurde zur Titration aller VSV-G pseudotypisierten retroviralen Vektorpartikel verwendet (vgl. Kapitel 2.2.8). Die ATCC führt die Zelllinie unter der Bezeichnung CCL-121™.

2.1.12.2 Primärzellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Primärzellen handelt es sich zum einen um dermale Fibroblasten des Weißbüschelaffen, die für die Generierung von induzierten pluripotenten Zellen verwendet wurde (vgl. Kapitel 2.2.9), und zum anderen um embryonale Mausfibroblasten des Mausstamms CF-1, die für die Ko-Kultivierung pluripotenter Zellen genutzt wurden (vgl. Kapitel 2.2.4). Die aus Gewebe gewonnenen und nach Präparation in Kultur genommenen Primärzellen sind im Gegensatz zu Zelllinien nicht unbegrenzt teilungsfähig und wurden nur bis Passage 5 verwendet.

***Callithrix jacchus* Fibroblasten**

Sämtliche Reprogrammierungen wurden mit dermalen *Callithrix jacchus* Fibroblasten durchgeführt. Diese entstammen aus Hautbiopsien, die von Rüdiger Behr (Deutsches Primatenzentrum, Göttingen) zur Verfügung gestellt und im Rahmen dieser Arbeit kultiviert wurden (vgl. Kapitel 2.2.3). Für den Großteil aller Versuche wurden Hautfibroblasten des weiblichen Tiers #13836 (4,3 Jahre) verwendet. Für die Versuche in Kapitel 3.7 (Vergleich zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen), 3.8 und 3.9 wurden die Zellen eines männlichen Tiers #15997 (5 Tage) genutzt.

CF-1 embryonale Mausfibroblasten (MEFs)

Um die Selbsterneuerungsteilungen der *Callithrix jacchus* ES Zellen zu unterstützen und eine unkontrollierte Differenzierung zu vermeiden, wurden diese mit embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) ko-kultiviert. Als Stromazellen dienten die MEFs (13,5 d.p.c.) des Mausstamms CF-1, die von der Firma CellSystems (Troisdorf) in Passage 2 geliefert wurden und im Rahmen dieser Arbeit bis Passage 5 expandiert wurden. Nach der Expansion wurde die Teilungsaktivität der MEFs durch Gammabestrahlung arretiert (vgl. dazu Kapitel 2.2.4). Schließlich wurden die Zellen aliquotiert und bis zur Verwendung in Flüssigstickstoff bei -196°C gelagert.

2.1.12.3 Embryonale Stammzellen des *Callithrix jacchus*

Die embryonale Stammzellen der Linie cjes001 wurden unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂, 5% CO₂), 37°C, in H₂O gesättigter Atmosphäre und auf γ MEFs kultiviert. Sie wurde von Erika Sasaki (Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Japan) zur Verfügung gestellt.

Bei cjes001 handelt es sich um eine Stammzelllinie, die erfolgreich aus der Blastozyste eines *Callithrix jacchus* generiert wurde (Muller *et al.*, 2009). Der pluripotente Charakter dieser Linie zeigt sich u.a. anhand der Expression der pluripotenzassoziierten Oberflächenmoleküle SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81, sowie anhand der erhöhten Expression von *POU5F1*, *SOX2* oder *NANOG* (Muller *et al.*, 2009). Zudem kann

cjes001 in sämtliche Zellen der drei Keimblätter differenzieren – sowohl *in vitro* als auch in Form von Teratomen in immundefizienten Mäusen, *in vivo*.

2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten, bis auf die in Kapitel 2.2.10 aufgeführten Methoden zur Charakterisierung der reprogrammierten Zellen, wurden an sterilen Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Die verwendeten Medien und Lösungen waren dabei stets autoklaviert oder steril filtriert und alle verwendeten Geräte oder Materialien wurden vor der Benutzung an der Sicherheitswerkbank gereinigt bzw. mit 80% Ethanol desinfiziert.

2.2.1 Passagieren der HEK293T/17 und HT1080 Zellen

Die HEK293T/17- bzw. HT1080 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen oder 75 cm² bzw. 175 cm² T-Flaschen kultiviert (zur Zusammensetzung der Medien vgl. Kapitel 2.1.4). Sobald sie dabei eine Konfluenz von 80-90% erreicht hatten, wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und 1 x Trypsin-EDTA hinzugegeben. Nach 5 min Einwirkzeit bei 37°C im Brutschrank wurde das Trypsin durch Zugabe des FBS-haltigen Kulturmediums inaktiviert. Die Zellen wurden von der Oberfläche durch Auf- und Abpipettieren gelöst und die so entstandene Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden sie für 5 min bei 300 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in frischem, warmem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen ausgesät.

2.2.2 Kryokonservieren und Auftauen der Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese, wie oben beschrieben, pelletiert und in einem Einfriermedium bestehend aus 10% (v/v) DMSO in FBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 1,5 ml Einfrierröhrchen aliquotiert und mit der Nalgene-Einfrierhilfe bei -80°C eingefroren. Die Einfrierhilfe ermöglichte dabei eine konstante Temperatur-Absenkrate von 1°C/min. Die Zellen wurden so zunächst bis -80°C gekühlt. Für eine längerfristige Lagerung wurden die Einfrierröhrchen in einen Stickstofftank mit einer Temperatur von -196°C überführt und in der Gasphase gelagert.

Um die Zellen aufzutauen, wurden die Einfrierröhrchen im Wasserbad bei 37°C so lange erwärmt, bis die gefrorene Zellsuspension angetaut war. Die teilgefrorenen Zellen wurde dann in 5 ml vorgewärmtes Medium in einem 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Um DMSO aus dem Medium zu entfernen wurden die Zellen 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert, in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und ausgesät. 24 h später erfolgte ein Mediumswechsel, bei dem tote Zellen aus der Kultur entfernt wurden.

2.2.3 Isolierung von Fibroblasten aus Hautbiopsien und anschließende Kultivierung

Für die Herstellung der *Callithrix jacchus* Fibroblastenkultur (vgl. Kapitel 2.1.12.2) wurden die in einer DMSO/cj Mediumslösung (10%/90%; vgl. Kapitel 2.1.4) gelieferten Hautbiopsien mehrfach in 1 x PBS mit 5% (v/v) Antibiotikum-Antimykotikum (Anti-Anti) gewaschen. Eventuell vorhandene Haare wurden mit Hilfe eines Skalpells entfernt. Anschließend wurden die Biopsien mit dem Skalpell in 1 mm x 1 mm große Stücke geschnitten und erneut mit 1 x PBS mit 5% (v/v) Anti-Anti gewaschen. In der Zwischenzeit wurden 6 Well Platten mit jeweils 1 ml 0,1% (w/v) Gelatinelösung pro Well beschichtet, indem die Lösung für 15 min bei RT in der Platte verblieb. Nach Entfernung der Gelatinelösung wurden die Hautstücke in den Wells platziert und zunächst für 15 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um so die Anheftung des Gewebes mit der Oberfläche zu erleichtern. Anschließend wurde das warme Kulturmedium in die Wells gegeben. Dabei war zu beachten, nicht zu viel Medium zu den Gewebestücken zu geben, da diese sonst im Medium treiben und durch den fehlenden Kontakt zum Boden, keine Fibroblasten aus dem Gewebe wachsen würden. Täglich erfolgte ein Mediumswechsel. Nach 2 bis 3 Tagen wuchsen die ersten Fibroblasten aus dem Gewebestück. Je nach Kultur konnten diese nach 6 bis 14 Tagen passagiert werden. Dafür wurden zunächst die Hautstücke in eine neue, gelatierte 6 Well Platten überführt, damit erneut Fibroblasten aus ihnen auswachsen können. Dieser Vorgang wurde bis zu fünfmal wiederholt. Die in der Platte verbliebenen, vom Gewebestück separierten Fibroblasten wurden daraufhin nach Behandlung mit Trypsin-EDTA in eine neue 6 Well Platte passagiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Die Zellen in Passage 1 wurden daraufhin so lange kultiviert, bis eine 80-90%ige Konfluenz erreicht wurde. Je nach Kultur dauerte dies 2-4 Tage. Nachdem die Zellen mittels Trypsin-EDTA gelöst wurden, wurden 5×10^5 Fibroblasten (Passage 2) kryokonserviert und bis zur Verwendung bei -196°C gelagert.

2.2.4 Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten und anschließende Arretierung ihrer Teilungsaktivität

Um ES Zellen stabil im undifferenzierten Status expandieren zu können, werden sie in der Regel auf MEFs ko-kultiviert. In der vorliegenden Arbeit wurden MEFs des CF1 Mausstamms (*Carworth Farms* Mausstamm Nr. 1) verwendet, deren Teilungsaktivität durch Gammastrahlen arretiert wurde (γ MEFs).

Für die Expansion der Zellen wurden zunächst 2 Einfrierröhrchen mit insgesamt 2×10^6 CF1-MEFs (Passage 2) aufgetaut und in eine 175 cm² T-Flaschen überführt.

Mit Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% (nach rund 2 Tagen) wurden die MEFs in eine 300 cm² Zellkulturflasche überführt (Passage 3). Bei einer Konfluenz von ca. 90% (nach rund 3 Tagen) wurden die Zellen auf drei 300 cm² Zellkulturflasche verteilt (Passage 4). Nach Erreichen der Konfluenz, wurde ihre Teilungsaktivität durch Gammastrahlen arretiert. Dies erfolgte am Institut für Medizinische Strahlenbiologie des Universitätsklinikums Essen. Dabei wurden die Zellen mit 40 Gy bestrahlt (Röntgenanlage ISOVOLT 320 HS, Pantak/General Electric). Anschließend wurden je 2,2 x 10⁶ γMEFs (Passage 5) kryokonserviert.

2.2.5 Kultivierung von embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen

Während die hier verwendeten *Callithrix jacchus* ES Zellen unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂, 5% CO₂) kultiviert wurden, wurden die generierten (partiellen) (p)iPS Zellen sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen (21% O₂, 5% CO₂) kultiviert. In beiden Fällen erfolgte die Kultivierung bei 37°C in gesättigter H₂O Atmosphäre und mit γMEFs.

2.2.5.1 Gewinnung konditionierten Mediums von γMEFs

Zur Gewinnung des verwendeten konditionierten Mediums (CM) wurden zunächst 12 Wells zweier 6 Well Platten mit 0,1% (w/v) Gelatine 15 min bei RT beschichtet. Daraufhin wurden kryokonservierte γMEFs im Wasserbad aufgetaut und in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit vorgelegtem warmen Medium überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 min bei 270 x g und RT zentrifugiert. Je 2,2x10⁶ Zellen wurden mit 24 ml ESML-Medium kultiviert. Der Überstand wurde nach 24 h abgenommen und durch frisches ESML-Medium ersetzt. Dieser Vorgang wurde 4-mal wiederholt. Die Überstände wurden gemischt, steril filtriert (0,22 µm, Zelluloseazetat) und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.5.2 Kultivieren und Passagieren von ES und iPS Zellen

Die reprogrammierten Zellen wurden auf Stromazellen in 6 Well Platten kultiviert. Täglich erfolgte ein Mediumswechsel mit Kulturmedium. Nach rund 5 bis 7 Tagen wurden die Zellen auf neue γCF1-MEFs passagiert.

Einen Tag vor dem Passagieren der Kolonien wurden die γCF1-MEFs ausgesät. Dafür wurden 6 Well Platten mit 0,1% (w/v) Gelatine für 15 min bei RT beschichtet. Die kryokonservierte γCF1-MEFs wurden im Wasserbad aufgetaut und in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit vorgelegtem warmen MEF Medium überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min, bei 270 x g und RT pelletiert. Anschließend wurden je 1,83x10⁵ Zellen pro 6 Well

ausgesät. Nach ca. 24 h erfolgte ein Mediumswechsel mit ES Zellkulturmedium, woraufhin 1 h später die Kolonien auf die Stromazellen ausgesät werden konnten.

Für die Kultivierung der pluripotenten Zellen wurden diese durch das Einwirken von 1 ml StemPro®Accutase für 3 min bei 37°C abgelöst. Durch vorsichtiges Waschen mit 1 ml Kulturmedium wurden daraufhin die pluripotenten Zellen von den Stromazellen separiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 200 x g und RT pelletiert. In einem weiteren Schritt wurde das Zellpellet in 1 ml frischem, vorgewärmtem Kulturmedium vorsichtig resuspendiert, so dass keine Einzelzellsuspension entstehen konnte. Die Zellen wurden dann auf Stromazellen überführt. Die passagierten Zellen wurden schließlich bei 37°C unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert. Nach 48 h wurde das erste Mal das Medium gewechselt.

2.2.5.3 Kryokonservieren und Auftauen pluripotenter Kolonien

Für das Kryokonservieren der Zellkolonien wurden die Zellen, wie beim Passagieren, mit StemPro®Accutase gelöst und 5 min bei 200 x g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin im Einfriermedium für pluripotente Zellen resuspendiert (Zusammensetzung des Mediums vgl. Kapitel 2.1.4.1). Je 1 ml Zellsuspension mit ca. 200 Kolonien wurde dann in ein 1,5 ml Einfrierröhrchen überführt und wie in Kapitel 2.2.2. beschrieben eingefroren.

Für das Auftauen pluripotenter Kolonien wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C erwärmt und in ein 15 ml Reaktionsgefäß, in dem bereits 5 ml warmes Kulturmedium vorgelegt wurde, überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 200 x g und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium mit 10 µM ROCK-Inhibitor resuspendiert. Die Suspension wurde in zwei 6 Wells mit γCF1-MEFs in ES Zellkulturmedium bei 37°C unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert. Nach 48 h erfolgte ein Mediumswechsel mit Kulturmedium ohne ROCK-Inhibitor.

2.2.6 Separation der Stromazellen

Damit ES- oder iPS Zellen nicht ungewollt differenzieren, werden sie häufig auf MEFs kultiviert. Um die MEFs von den pluripotenten Kolonien abtrennen zu können, wurde eine magnetische Zellseparation durchgeführt (*MACS: Magnetic Activated Cell Separation*). Hierfür werden MEF-spezifischer Antikörper, die mit ferromagnetischen Partikeln gekoppelt sind (Feeder Removal MicroBeads/Miltenyi Biotec), verwendet. Die Zellsuspension wird über eine LS Säule (Miltenyi Biotec) aufgetrennt. Mittels eines starken Magnetfelds (MidiMACS™ *Separation Unit*, Miltenyi Biotec) werden die Antikörper ge-

bundenen γ CF1-MEFs in der Säule festgehalten, während die pluripotenten Zellen durchfließen.

Für die Zellseparation wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit StemPro®Accutase abgelöst. Danach wurde die Accutase vorsichtig entfernt, durch 1 ml Cell-Dissoziation-Buffer ersetzt und für 10 min bei 37°C stehen gelassen. Zur Vereinzelnung der Zellen, wurde in jedes 6 Well 1 ml Kulturmedium gegeben und durch kräftiges Pipettieren eine homogene Einzelzellsuspension aus Stromazellen und pluripotenten Zellen erzeugt. Diese wurde dann durch ein 40 μ m Zellsieb gegeben, so dass eventuelle Zellaggregate aus der Suspension entfernt werden konnten. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.7 Kalzium Phosphat Transfektion zur Herstellung retroviraler Vektoren

Zur Herstellung von Viruspartikeln, mit Hilfe derer Gene stabil in Zellen eingebracht werden können (vgl. dazu Kapitel 2.2.9), wurde die transiente Transfektion mittels Kalzium Phosphat angewendet. Bei dieser Methode wird ein DNA-Kalzium-Phosphat-Präzipitat erzeugt, das von den Zellen vermutlich über Endozytose aufgenommen wird (Graham und van der Eb, 1973).

Die Viruspartikelherstellung erfolgte dabei in HEK293T/17 Zellen. Die Zellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine 80%ige Konfluenz erreichten. Eine Stunde vor Zugabe des DNA-Kalzium-Phosphat-Präzipitats wurde das Medium gegen 293T-Medium mit 25 μ M Chloroquin ersetzt, um eine Ansäuerung der Lysosomen zu verhindern, so dass die eingebrachte DNA nicht direkt wieder abgebaut wird.

Zur Herstellung retroviraler Vektoren sind folgende Komponenten nötig:

- 15 μ g Plasmid, das die lentiviralen Proteine *gag* und *pol* kodiert,
- 15 μ g Plasmid, das die Sequenz des lentiviralen *rev* kodiert,
- 6 μ g Plasmid, das die kodierende Sequenz für das *vsv-g* Hüllprotein exprimiert, und
- 15 μ g Plasmid, das den lentiviralen Vektor exprimiert

Die Plasmide wurden alle in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 150 μ l 2,5 M CaCl₂ zugegeben und mit H₂O auf 1500 μ l aufgefüllt. In ein weiteres Reaktionsgefäß wurden 1500 μ l 2 x HeBS vorgelegt. Das Plasmid-DNA-Kalzium-Gemisch wurde unter Luftblasenbildung tröpfchenweise in das 2 x HeBS überführt. Damit die Suspension weiter präzipitieren konnte, wurde sie schließlich für 20 min bei RT stehen gelassen.

Das Präzipitat wurde vorsichtig auf die HEK293T/17 Zellen gegeben (s.o.) und für 7-9 h im Brutschrank bei 37°C belassen. Anschließend wurde das Medium durch 20 ml

293T-Medium mit 10% ($\%_v$) hitzeinaktivierten FBS und 20 mM HEPES ersetzt. Nach 24 h wurde das viruspartikelhaltige Medium geerntet und gekühlt. Um einen weiteren Überstand ernten zu können, wurde frisches Medium zu den HEK293T/17 Zellen gegeben. Nach Abnahme des zweiten Überstands wurden die Zellen mit 4%iger PFA-Lösung inaktiviert und entsorgt. Die beiden Überstände wurden miteinander vermischt und durch einen 0,45 μm Polyethersulfonfilter filtriert.

Um eine höhere Virenkonzentration zu erzielen, wurden die VSV-G pseudotypisierten Virusüberstände für den weiteren Gebrauch konzentriert. Dazu wurden die Virenüberstände mit 90000 x g in der Optima L-80 XP Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) mit dem SW 32 Ti Rotor für 90 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 400 μl 293T-Medium mit h.i. FBS und 20 mM HEPES überschichtet und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. 24 h später wurde das Pellet vorsichtig resuspendiert. 6 μl der Suspension wurden für die Virustiterbestimmung abgenommen; der Rest wurde bei -80°C gelagert.

2.2.8 Bestimmung von Virentitern

Für die Titration wurden 10^5 HT1080 Zellen pro Vertiefung einer 24 Well Platte ausgesät. Nach 4-6 h wurde ein Mediumswechsel mit DMEM/high Glucose mit 10% ($\%_v$) h.i. FBS und 4 $\mu\text{g/ml}$ Protaminsulfat durchgeführt. Nach dem Mediumswechsel wurde eine Verdünnungsreihe mit verschiedenen Virenmengen hinzugegeben. Zur Herstellung dieser wurde mit 6 μl des Virusüberstandes (vgl. Kapitel 2.2.6) eine serielle Verdünnungsreihe durchgeführt, so dass schließlich 4 Volumina, 1 μl , 0,3 μl , 0,1 μl und 0,03 μl in einer Doppelbestimmung getestet werden konnten. Nach Zugabe der Viren wurden die Platten mit Parafilm umwickelt und für 90 min bei 720 x g und 32°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten bei 37°C im Brutschrank gelagert. 24 h später wurde ein Mediumswechsel mit HT1080 Medium durchgeführt. Nach weiteren 24 h konnte die Transduktionseffizienz bestimmt werden. Die Viruspartikel enthalten eine Sequenz, die für ein fluoreszierendes Reportergen kodiert. Dadurch konnte durchflusszytometrisch anhand des prozentualen Anteils positiv transduzierten Zellen die Transduktionseffizienz bestimmt werden.

Zur abschließenden Bestimmung des Virustiters (Übertragende Einheit [ÜE]/ ml) wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{prozentualer Anteil positiver Zellen}}{100} \times 10^5 (\text{ausgesäte Zellen}) \times 1000 = \frac{\text{ÜE}}{\text{ml}}$$

2.2.9 Generierung von iPS Zellen

Ziel dieser Arbeit war die Generierung induzierter pluripotenter (iPS) Zellen aus somatischen Zellen des *Callithrix jacchus*. Dafür wurden verschiedene Strategien verfolgt, die in den nachfolgenden Kapiteln erläutert werden. Für die verschiedenen Herangehensweisen wurden entweder gelagerte *Callithrix jacchus* Fibroblasten (Passage 2) aufgetaut und für eine weitere Passage in Kultur gehalten oder Zellen aus der laufenden Kultur (Passage 3) verwendet.

10^5 Fibroblasten wurden pro Vertiefung einer 6 Well Platte ausgesät. Nach 4-6 h wurde das Medium mit DMEM/high Glucose mit 10% (v/v) h.i. FBS und 4 µg/ml Protaminsulfat gewechselt. Der Virushaltige Überstand wurde mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5 eingesetzt und in 1 ml DMEM/high Glucose mit 10% (v/v) h.i. FBS pipettiert. Anschließend wurde die 6 Well Platte in Parafilm eingewickelt und 90 min bei 720 x g und 32°C zentrifugiert. Daraufhin wurde die Platte bei 37°C unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen gelagert. Nach 24 h erfolgte ein kompletter Mediumswechsel mit *cj* Medium. Nach weiteren 24 h wurde das Medium erneut gewechselt und zusätzlich mit 2 mM Valproinsäure (VPA), einem Histon-Deacetylase-Inhibitor, versetzt. Nach weiteren 24 – 72 h wurden aus einigen Wells Zellen gelöst und durchflusszytometrisch analysiert, um die Transduktionseffizienz zu bestimmen. Bei den verbleibenden Zellen wurde jeweils nach 48 h ein kompletter Mediumswechsel mit *cj* Medium mit 2 mM VPA durchgeführt.

Je nach Reprogrammierungsstrategie wurden entweder am 6. oder am 23. Tag γ MEFs ausgesät, so dass die transduzierten *Callithrix jacchus* Fibroblasten 24 h später darauf kultiviert werden konnten. Dafür wurden die Zellen von einem 6 Well auf 6 bis 8 neue 6 Wells verteilt und in ESML-Medium mit 2 mM VPA oder Variationen dieses Mediums (vgl. dazu Kapitel 3.2.1) kultiviert. Alle 48 h wurde das Medium unter Zugabe von 2 mM VPA gewechselt. Ab dem 4. Mediumswechsel erfolgte dieser ohne Zugabe von VPA. Nach 5 bis 10 Tagen konnten, je nach Reprogrammierungsstrategie, erste Kolonien auf den Stromazellen detektiert werden. Diese wurden enzymatisch mit Hilfe von Accutase zerkleinert und umgesetzt.

2.2.9.1 Transduktion der Fibroblasten mit einem polycistronischen lentiviralen Vektor

Die *Callithrix jacchus* Fibroblasten wurden u.a. mit selbstinaktivierenden lentiviralen Vektoren transduziert, die eine polycistronische Reprogrammierungskassette exprimieren (Voelkel *et al.*, 2010). Diese Kassette beinhaltet die codonoptimierten kodierenden Sequenzen der humanen Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* und *MYC* (vgl. Abb. 8). Die Sequenzen der Transkriptionsfaktoren sind jeweils durch ver-

schiedene 2A-Peptid Sequenzen voneinander getrennt, was eine intrinsische ko-translationale Spaltung der einzelnen Transkriptionsfaktoren zur Folge hat. Dabei wird zunächst die komplette Sequenz in mRNA transkribiert. Während der Translation am ribosomalen Komplex kommt es bei den 2A Esterase Sequenzen jeweils an den beiden letzten Aminosäuren am C'-Ende zu einem Abbruch, so dass das bis dahin synthetisierte Protein freigesetzt wird und die Translation an der letzten Aminosäure der 2A Sequenz weiter geführt werden kann. Somit können mittels eines Vektors alle vier Transkriptionsfaktoren gleichzeitig in der Zielzelle überexprimiert werden. Allerdings ist durch die vorgegebene Lage der einzelnen Sequenzen auf dem Vektor eine bestimmte Stöchiometrie der einzelnen Genprodukte zueinander vorgegeben. Zusätzlich exprimiert der Vektor das dTomato Reportergen, so dass transduzierte Zellen mikroskopisch oder durchflusszytometrisch detektiert werden können.

Die Transduktion erfolgte wie oben beschrieben und mit einer MOI von 5 und führte nach etwa 35 Tagen zu ersten Kolonien.

2.2.9.2 Transduktion der Fibroblasten mit mehreren bicistronischen lentiviralen Vektoren

Ein weitere in dieser Arbeit verwendete Strategie zur Generierung von iPS Zellen aus *Callithrix jacchus* Fibroblasten stellt die Transduktion mittels separater lentiviraler Vektoren dar. Dazu wurden die Zellen gleichzeitig mit bicistronischen retroviralen Vektoren transduziert, die jeweils die kodierende Sequenz für die humanen Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC* (Tiemann *et al.*, 2011) oder das *Callithrix jacchus* Genprodukt *LIN28* und ein Reporterfluoreszenzgen ko-exprimieren (vgl. Abb. 27). Durch die separaten Transduktionen konnte sichergestellt werden, dass sich genau diejenigen pluripotenten Kolonien durch Selektion durchsetzten, bei denen die Transkriptionsfaktoren in einem adäquaten äquimolaren Verhältnis exprimiert wurden.

Die Transduktion erfolgte wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben. Dabei wurde jeder Vektor mit einer MOI von 5 für die Transduktion der Fibroblasten eingesetzt. Nach etwa 10 Tagen konnten erste Kolonien detektiert werden.

2.2.9.3 Einfluss auf Signaltransduktionswege und Chromatinmodifikationen durch Reagenzienzugabe

Wie bereits beschrieben beeinflussen unterschiedliche Signaltransduktionswege nicht nur die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status einer ES Zelle, sondern sind auch für die Reprogrammierung somatischer Zellen von großer Bedeutung (vgl. Kapitel 1.1.2.3.). Aus diesem Grund wurden den *Callithrix jacchus* Fibroblasten während der Reprogrammierung zusätzlich unterschiedliche Inhibitoren und Agonisten (vgl. Tab. 12)

hinzugefügt. Diese aktivierten oder inhibierten bestimmte Signaltransduktionswege oder sorgten für eine Modifikation des Chromatins.

VPA wurde standartmäßig ab Tag 2 nach Transduktion bei jedem Mediumswechsel alle 48 h zu den Zellen gegeben. 5-AZA wurde zum einen 10 Tage nach Transduktion und zum anderen zu stabil partiell reprogrammierten Zellen bis zu sechs Mal zugesetzt. Dabei wurde folgendes Schema eingehalten: 1. Zugabe von 5-AZA; nach 48 h 2. Zugabe von 5-AZA; danach Mediumswechsel mit Kulturmedium ohne Zusatz. Nach 3 bis 4 Tagen passagieren der Kolonien. Ab dem 2. Tag nach dem Passagieren erneute Zugabe von 5-AZA. Nach 48 h erfolgte erneut eine Zugabe und so weiter. Anschließend wurden die Zellen noch vier weitere Male passagiert, bevor sie analysiert wurden. Außerdem wurden Strategien verfolgt, bei denen RepSox, CHIR, PD, und SB ebenfalls für 14 Tage zu stabil reprogrammierten Zellen zugesetzt wurde. Dabei wurden die unterschiedlichen Reagenzien bei dem täglichen Mediumswechsel immer wieder erneut zu den Zellen gegeben.

Tab. 12: Für die Reprogrammierung verwendete Reagenzien

Reagenz	Einfluss	Konzentration	Quelle
5-Azacytidin	DNA-Methyltransferase-Inhibitor	0,5 mM und 5 mM	(Huangfu <i>et al.</i> , 2008a; Mikkelsen <i>et al.</i> , 2008)
ALK5-Inhibitor II (E-616452, RepSox)	inhibiert TGF β -Signaltransduktionsweg	25 μ M	(Ichida <i>et al.</i> , 2009)
CHIR99021	aktiviert Wnt-Signaltransduktionsweg	3 μ M	(Silva <i>et al.</i> , 2008)
PD325901	inhibiert den MAP/ERK-Signaltransduktionsweg	0,5 μ M	(Silva <i>et al.</i> , 2008; Lin <i>et al.</i> , 2009; Zhang <i>et al.</i> , 2011)
SB431542	inhibiert TGF β -Signaltransduktionsweg	2 μ M	(Lin <i>et al.</i> , 2009; Zhang <i>et al.</i> , 2011)
Valproinsäure	Histon-Deacetylase-Inhibitor	2 mM	(Huangfu <i>et al.</i> , 2008a)

2.2.10 Charakterisierung der iPS Zellen

Für die Charakterisierung der putativen pluripotenten Zellen wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die Expression pluripotenzassoziierter Proteine (z.B. NANOG) und Oberflächenmoleküle (z.B. SSEA4) sowie die endogene Expression spezifischer Gene (z.B. *ZFP42*) analysiert (vgl. dafür Kapitel: 2.3.2.3). Die ES Zelllinie cjes001 des Weißbüschelaffen wurde als Referenz verwendet.

2.2.10.1 Alkalische Phosphatase Färbung

Undifferenzierte ES Zellen zeigen im Gegensatz zu differenzierten Zellen eine erhöhte Expression der Alkalischen Phosphatase (Pease *et al.*, 1990), weshalb in dieser Arbeit u. a. die Aktivität der Alkalischer Phosphatase zur Pluripotenzbestimmung herangezogen wurde.

Dabei wurden das im *Alkaline Phosphatase Detection Kit* der Firma Millipore enthaltene Substrat Naphthol AS-BI Phosphat sowie der Farbstoff Fast Red Violet zu den fixierten und permeabilisierten Zellen hinzugefügt. Die Alkalische Phosphatase hydrolysiert das Naphthol AS-BI Phosphat zu Naphthol AS, das mit Fast Red Violet eine farbig-violette Verbindung eingeht. Anhand der Färbung konnte geschlussfolgert werden, dass die untersuchten Zellen eine hohe Alkalische Phosphatase Aktivität aufweisen.

Für die Alkalische Phosphatase Färbung wurden die Zellen 3 bis 5 Tage in Kultur gehalten; die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben. Der benötigte *Rinse-Buffer* (Waschpuffer) wurde wie folgt zusammengesetzt: 20 mM TRIS-HCl (pH 7.4), 0,15 M NaCl und 0,05% (v/v) Tween-20.

2.2.10.2 Immunhistochemische Detektion von pluripotenzassoziierten Proteine

Pluripotente Zellen des Menschen und Weißbüschelaffen exprimieren auf ihrer Oberfläche pluripotenzspezifische Moleküle wie z. B. die Glykoproteine SSEA3, SSEA4 oder Podocalyxine TRA-1-60 und TRA-1-81 (Henderson *et al.*, 2002; Schopperle und DeWolf, 2007; Fleischmann *et al.*, 2009).

Reprogrammierte Zellen wurden mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen auf die Expression pluripotenzassoziiertes Oberflächenmoleküle und weiterer intrazellulärer Proteine wie z. B. NANOG hin untersucht. Dabei wurden intrazellulär vorhandene Proteine und Zelloberflächenantigene mit Antikörpern markiert. Die Expression wurde anschließend sowohl durchflusszytometrisch bestimmt, als auch mikroskopisch analysiert. Die jeweilige Vorgehensweise wird in den folgenden vier Abschnitten erläutert.

Sowohl bei den durchflusszytometrischen Messungen als auch bei den mikroskopischen Analysen wurden unbehandelte und mit Isotyp-Antikörper behandelte Zellen als Kontrollen mitgeführt.

Antikörpermarkierung von Oberflächenantigenen für die durchflusszytometrische Detektion

Für die durchflusszytometrischen Analysen der putativen pluripotenten Kolonien wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, 1 ml StemPro® Accutase® je 6 Well hinzugegeben und für 3 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde

die Accutase gegen 1 ml Cell-Dissociation-Buffer ausgetauscht, der für 10 min bei 37°C in den Wells belassen wurde. Anschließend wurde 1 ml Kulturmedium in jedes Well gegeben und eine Einzelzellsuspension durch heftiges Auf- und Abpipettieren erzeugt. Die Suspension wurden durch ein 40 µm Zellsieb filtriert, um eventuell vorhandene Aggregate zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen gezählt und gemäß der Anzahl der zu färbenden Proben auf eine entsprechende Anzahl an Reaktionsgefäßen aufgeteilt.

Vorwiegend wurden die in der Kultur befindlichen Stromazellen entfernt (vgl. Kapitel 2.2.6). Wurde dies nicht gemacht, mussten sie markiert werden, um sie bei der Auswertung der Analyseergebnisse ausschließen zu können. Hierfür wurden die Stromazellen mit α -Integrin beta-1 Antikörpern (α -CD29-PeCy7; 0,5 µg/10⁶ Zellen) behandelt. Dazu wurden α -CD29 Antikörper zu den Zellen gegeben und auf 4°C für 20 min stehen gelassen. Bei dem anschließenden Waschschrift wurden die Reaktionsgefäße stets mit 1 ml FACS-Proben-Puffer aufgefüllt und 5 min bei 400 x g und RT zentrifugiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden die Stromazellen mit unkonjugierten α -Maus FAB-Fragmenten geblockt. Diese wurden in einem Verhältnis von 1:20 im FACS-Proben-Puffer eingesetzt (f.c. 0,062 mg/ml) und 1 h bei 4°C auf den Zellen belassen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Primärantikörper (eingesetzt nach Herstellerangaben) für 1 h bei 4°C zugesetzt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die sekundären Antikörper (Esel gegen Maus-DyLight 649: 1:800; Esel gegen Ratte-Alexa Fluor® 645: 1:600) für 45 min bei 4°C zu den Zellen gegeben. Schließlich wurden die Zellen erneut gewaschen, in 200 µl FACS-Proben-Puffer aufgenommen und für die durchflusszytometrischen Analysen in Polypropylenröhrchen pipettiert.

Antikörpermarkierung von Oberflächenantigenen für die mikroskopische Detektion

Für die mikroskopischen Analysen wurden 24er Lumox™ Wells der Firma Greiner verwendet, da diese Platten eine sehr geringe Eigenfluoreszenz aufweisen und sich somit für hochauflösende Fluoreszenz-Mikroskopie eignen. Zunächst wurden 3,66 x 10⁴ γ CF1-MEFs pro Well ausgesät. 24 h später wurden die pluripotenten Zellen darauf kultiviert.

Nach 5 bis 7 Tagen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und für 15 min mit 0,5% (w/v) PFA bei RT fixiert. Daraufhin wurde eine Blocklösung für 2 h auf die Zellen gegeben, die unkonjugierte FAB-Fragmente aus Esel gegen Maus (f.c. 0,062 mg/ml) und 5% (v/v) Ziegenserum in 1 x PBS enthielt. Die FAB-Fragmente dienten dazu, die endogenen Immunglobuline der Maus zu blocken, wäh-

rend das Ziegenserum zur Absättigung unspezifischer Bindestellen eingesetzt wurde. Anschließend wurde die Blocklösung abgenommen und die Zellen mit Antigen-spezifischen Antikörpern markiert. Unkonjugierte Primärantikörper wurden 1:200 in 1 x PBS mit 1% (w/v) BSA zu den Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C auf diesen belassen. Direkt konjugierte Antikörper wurden erst am darauffolgenden Tag zu den Zellen gegeben. Damit die Kolonien, die mit den direkt konjugierten Antikörpern gefärbt wurden nicht über Nacht austrockneten, wurden sie mit 1 x PBS überschichtet. Am nächsten Tag wurden die Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS entfernt. Daraufhin wurden die Sekundärantikörper aus der Ziege (gegen Maus-Alexa Fluor®488 (1:1000) oder gegen Ratte-DyLight™ 488 (1:500)) zu den Zellen gegeben und die direkt konjugierten Antikörper nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Zellen wurden für 2 h bei RT und im Dunkeln stehen gelassen und anschließend mit 1 x PBS gewaschen. Zum Abschluss wurden die Zellen mit Mounting Medium + DAPI (1,5 µg/ml) eingedeckt. DAPI (4'6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA anlagert, wodurch der Zellkern im UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Für das Eindecken der Zellen wurde je 24er Vertiefung der Lumox™ Platte ein Tropfen VECTASHILD® auf die Zellen gegeben, gewartet bis der Tropfen eingetrocknet war und ein rundes Deckgläschen aufgelegt. Die Platten wurden bei 4°C getrocknet.

Intrazelluläre Antikörpermarkierung für die durchflusszytometrische Detektion

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen für 20 min bei 4°C mit 4% (w/v) PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit 1 x PBS gewaschen und dann für 20 min bei RT in 0,1% (v/v) Triton X-100 in 1 x PBS permeabilisiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut gewaschen und mit Esel-Serum in 1 x PBS (1:10) für 30 min bei 4°C geblockt. Der Primärantikörper (α -E-Cadherin, 1:50) wurde zu den Zellen für 1 h bei 4°C gegeben. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (Esel gegen Kaninchen-AlexaFluor®645; 1:400) für 45 min bei 4°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen abermals gewaschen, in 200 µl FACS-Proben-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Intrazelluläre Antikörpermarkierung für die mikroskopische Detektion

Zur mikroskopischen Analyse wurden die Zellen mit 0,5% (w/v) PFA fixiert, drei Mal mit 1 x PBS gewaschen und für 10 min mit 100% (v/v) Methanol auf -20°C permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen. Die weiteren Arbeitsschritte wurden analog zu den Ausführungen im Abschnitt „Antikörpermarkierung von Oberflächenantigenen für die mikroskopische Detektion“ ausgeführt (vgl. Seite 47).

2.3 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit angewendeten molekularbiologischen Methoden entsprechen, wenn nicht anders erwähnt, dem Standardwerk *Current protocols in molecular biology* (Ausubel, 1987).

2.3.1 Plasmidgewinnung mittels *Escherichia coli*

Die Plasmide, die für die Herstellung retroviraler Vektoren verwendet wurden (vgl. Kapitel 2.2.7 und 8), wurden in der vorliegenden Arbeit im Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) XL-10-Gold vermehrt.

2.3.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli* XL-10 Gold

Für die Anzucht, Vermehrung und Selektion von *E. coli*-Bakterien wurden LB-Medium und LB-Agar-Platten (Zusammensetzung vgl. Kapitel 2.1.5) verwendet. Die Bakterienkulturen wurden bei 37°C im Brutschrank MaxiQ6000 (Thermo Scientific) inkubiert. Bei Bedarf wurde das Selektionsmedium mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt.

2.3.1.2 Herstellung von transformationskompetenten *Escherichia coli*

Für die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* wurde, basierend auf der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983), aus einem Bakterienstock eine 10 ml Übernachtskultur initiiert. Diese wurde im Bakterien-schrank unter ständigem Schütteln (270 rpm) und 37°C kultiviert. Nach 24 h wurden 100 ml LB-Medium mit 1,5 ml Übernachtskultur versetzt und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4-0,5 kultiviert. Die Bakterienkultur wurde daraufhin für 10 min auf Eis gekühlt und schließlich in einer vorgekühlten Zentrifuge für 10 min bei 5000 x g und 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 40 ml kaltem TFB1 Puffer (Zusammensetzung vgl. Kapitel 2.1.5) resuspendiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Daraufhin wurde die Bakteriensuspension erneut für 10 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert und in 4 ml kaltem TFB2 Puffer (Zusammensetzung vgl. Kapitel 2.1.5) resuspendiert. In einem abschließenden Schritt wurden die Bakterien in 100 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.3.1.3 Transformation von *Escherichia coli*

Für die Plasmidtransformation in Bakterien wurden zunächst 100 µl kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid versetzt. Die Bakterien wurden daraufhin für 15-20 min auf Eis gestellt und danach für 90 sec einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde die Kultur für 1 h bei 37°C stehen gelassen. Danach wurde die Bakterienlösung für 2 min bei 3000 x g pelletiert, in

200 µl LB-Medium resuspendiert, auf eine 37°C vorgewärmte LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.1.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im großem Maßstab wurde zunächst eine Bakterienkolonie gepickt und in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem sich 5 ml LB-Medium mit einem Antibiotikum befanden. Diese Vorkultur wurde im Bakterienbrutschrank für ca. 8 Stunden bei 37°C geschüttelt (270 rpm). 1 ml der Vorkultur wurde dann in 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt und über Nacht (ca. 18 h) bei 37°C geschüttelt (270 rpm). Am darauffolgenden Tag wurden die Bakterien für 15 min bei 600 x g und 4°C pelletiert und mit dem QIAGEN® Plasmid Plus Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers weiter aufgearbeitet. Bevor die isolierten Plasmide bei -20°C gelagert wurden, wurden Konzentration und Reinheit dieser mit dem Spektralphotometer NanoDrop2000 (PeQlab) bestimmt.

2.3.2 Genexpressionsanalysen

In ES Zellen werden u. a. *POU5F1*, *NANOG*, *DNMT3B* oder *SOX2* stark exprimiert, da sie für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status essentiell sind (Adewumi *et al.*, 2007). In induzierten putativ pluripotenten Zellen zeigen sie daher eine ähnlich hohe Expression. Daher wurden die Genexpressionen pluripotenzassoziierter Proteine in der vorliegenden Arbeit mittels Quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) und RNA-Sequenzierung analysiert.

Zur Analyse wurde in einem ersten Schritt die zelluläre RNA isoliert. Diese wurde in cDNA transkribiert, um mittels qRT-PCR die Genexpression einzelner Transkripte zu analysieren. Außerdem wurden zusätzlich einige RNA-Proben im Transkriptomanalyselabor (TAL) der Universitätsmedizin Göttingen aufgearbeitet, um mit Hilfe von direkter RNA-Sequenzierungen (RNA-Seq) das gesamte Transkriptom zu analysieren. Als Referenz wurde jeweils die *Callithrix jacchus* ES Zelllinie cjes001 herangezogen.

2.3.2.1 Präparation zellulärer RNA

Die Präparation der RNA erfolgte mit Hilfe des TRIzol®-Reagenz (Life Technologies) gemäß der Einschritt-Methode nach Chomczynski (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen.

Das TRIzol®-Reagenz besteht aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, das alle Proteine denaturiert. Die hydrophilen Anionenaustauschersäulen des RNeasy® Mini Kits bestehen aus einer Siliziumoxid-Membran, an die RNA selektiv bindet, wohingegen unspezifisch gebundene DNA und Zellfragmente durch Waschstschritte entfernt werden.

In 1 ml TRIzol®-Reagenz wurden bis zu 10^7 Zellen lysiert. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform wurde die Lösung 15 sec kräftig gemischt und 3 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung für 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert, um die Phasentrennung zu beschleunigen. Die obere klare und wässrige Phase enthielt die RNA, die milchig-weiße Interphase enthielt den Großteil der DNA und die organische phenolische Phase beinhaltete die Proteine und die restliche DNA. Die obere Phase mit der enthaltenen RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen 70% (v/v) Ethanol versetzt. Die weitere Aufarbeitung der RNA mit dem RNeasy® Mini Kit erfolgte nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 30 μ l RNase freiem Wasser eluiert und ihre Konzentration und Reinheit mit dem Spektralphotometer NanoDrop 2000 (PecQlab) bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.3.2.2 Reverse Transkription zur Synthese komplementärer DNA

Die isolierte einzelsträngige RNA wurde mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kits der Firma Qiagen in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Im ersten Schritt wurden durch Zugabe des *Wipeout Buffers* Reste an genomischer DNA eliminiert, während im zweiten Schritt die Umschreibung der RNA erfolgte. Hierfür wurde die reversen Transkriptasen (RT) *Omniscript Reverse Transcriptase* und *Sensiscript Reverse Transcriptase* verwendet, die in *E. coli* rekombinant hergestellt werden. Als Primer für die reverse Transkription diente ein Gemisch aus Hexameroligonukleotiden unterschiedlicher Sequenzen. Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert. Um für nachfolgende qRT-PCR-Versuche Verunreinigungen mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurde zudem eine Negativkontrolle („no-RT“ Kontrolle) mitgeführt, bei der die reversen Transkriptasen nicht zur umzuschreibenden RNA zugesetzt wurden.

2.3.2.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe Quantitativer Real-Time-PCR konnte die Transkription ausgesuchter Gene der reprogrammierten Zellen relativ zur Expression derselben Gene in *Callithrix jacchus* ES Zellen bestimmt werden. Dazu wurde die Expression der 8 betrachteten endogenen Zielgene und die der beiden Referenzgene: *GAPDH* und *RPL13A* gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Als Referenzgene wurden die eben genannten „Haushaltsgene“ verwendet, da diese sowohl in den induzierten Zellen als auch in den Referenzzellen ähnlich stark exprimiert waren.

Die qRT-PCR-Analysen, wurden mit dem Thermocycler CFX96 der Firma BioRad durchgeführt und mit Hilfe des mitgelieferten Computerprogramms CFX Manager™ 3.1 ausgewertet. Die Genexpression in jedem Zelltyp wurde in Triplikaten analysiert. Zu-

sätzlich wurde neben der „no-RT“ Kontrolle eine „no-template“ Kontrolle mitgeführt. Diese Kontrolle enthielt dieselben Bestandteile wie der PCR-Ansatz, allerdings ohne die zu amplifizierende DNA. Mit dieser Kontrolle wurde die Reinheit der verwendeten Reaktionskomponenten überprüft. Zur Messung der Amplifikation während der PCR wurde der fluoreszierende Cyaninfarbstoff SYBR®-Green I hinzugegeben, der im QuantiTect® SYBR®Green PCR Kit der Firma Qiagen enthalten ist. Anhand der in jedem Zyklus gemessenen Fluoreszenzintensität wird bei dieser Methode die Zunahme der DNA-Amplifikate gemessen.

Ein 20 µl PCR-Ansatz beinhaltet:

- 5 µl cDNA (10 ng)
- 0,5 µl 10 µM fw Primer
- 0,5 µl 10 µM rv Primer
- 10 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Mix
- 4 µl RNase freies H₂O

Im optimierten Puffer des SYBR Green Mix waren neben dem Farbstoff SYBR Green I, die DNA Polymerase HotStarTaq®, ein dNTP Mix, 5 mM MgCl₂ und das X-Rhodamin ROX™ (als interne Referenz zur Berechnung der Fluoreszenz) enthalten. Die 20 µl Ansätze wurden in die Vertiefungen einer für den Thermocycler geeigneten 96er Spitzbodenplatte pipettiert und die Platte mittels Spezialfolie versiegelt.

Im ersten Schritt wurden die Ansätze zur Aktivierung der HotStarTaq® DNA Polymerase 5 min bei 95°C erhitzt. Danach folgten 40 Zyklen, in denen die Denaturierung für 15 sec bei 95°C und die Primerhybridisierung und Elongation für 30 sec bei 60°C durchgeführt wurden. Nach Beendigung der Amplifikationsreaktion wurden für einen Temperaturbereich zwischen 55 und 95°C Schmelzkurven ermittelt (Intervallgröße: 0,5°C), um festzustellen, ob spezifische und einheitliche DNA-Produkte gebildet wurden.

Für die Berechnung der relativen Genexpression gibt es mehrere Möglichkeiten. Wenn davon ausgegangen wird, dass die PCR mit einer 100%igen Effizienz ($E = 2$) durchgeführt wurde, kann zur Berechnung die Formel nach Livak (Livak und Schmittgen, 2001) verwendet werden. Dabei wurde zunächst ein Schwellenwert (Ct) im frühen exponentiellen Bereich der Amplifikationskurve gesetzt. Daraufhin wird der Δ Ct-Wert als Differenz zwischen den Ct-Werten des Zielgens und eines endogenen Referenzgens berechnet (Abb. 4).

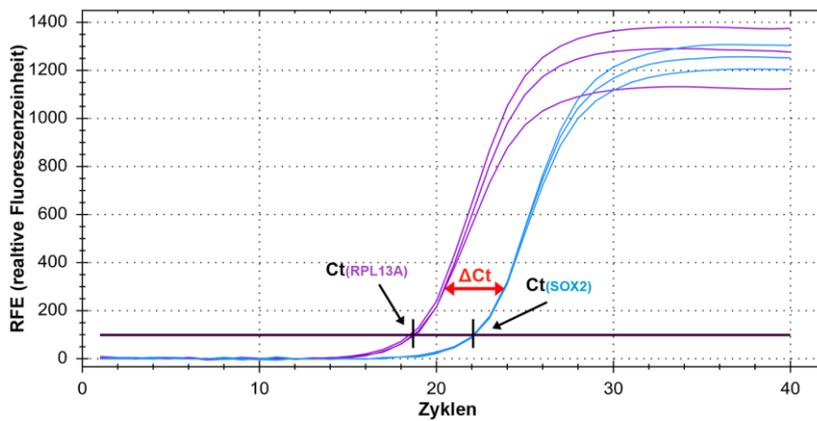


Abb. 4: Grafische Darstellung des ΔC_t -Wertes

Dargestellt wird der ΔC_t -Wert des Pluripotenzgens SOX2 und des Haushaltsgens RPL13A in den Zellen der ES Zelllinie cjes001.

Daraufhin konnte ein $\Delta\Delta C_t$ -Wert als Differenz des ΔC_t -Wertes der Referenzzellen und des ΔC_t -Wertes der putativen iPS Zellen bestimmt werden. Das relative Expressionsverhältnis ($R = \text{Ratio}$) wird schließlich wie folgt berechnet:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Da in der vorliegenden Arbeit allerdings für jedes Primerpaar die spezifischen Amplifikationseffizienzen (E) ermittelt wurden (vgl. Tab. 10), konnte die Formel nach Livak nicht verwendet werden. Deshalb wurde zunächst eine 5-stufige Verdünnungsreihe von cDNA-Proben erstellt und ein PCR-Lauf unter den oben aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden die C_t -Werte des dem Primerpaar zugeordneten Gens bestimmt. Diese wurden daraufhin gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge aufgetragen. Dadurch konnte eine lineare Regressionsgerade erstellt werden (Abb. 5).

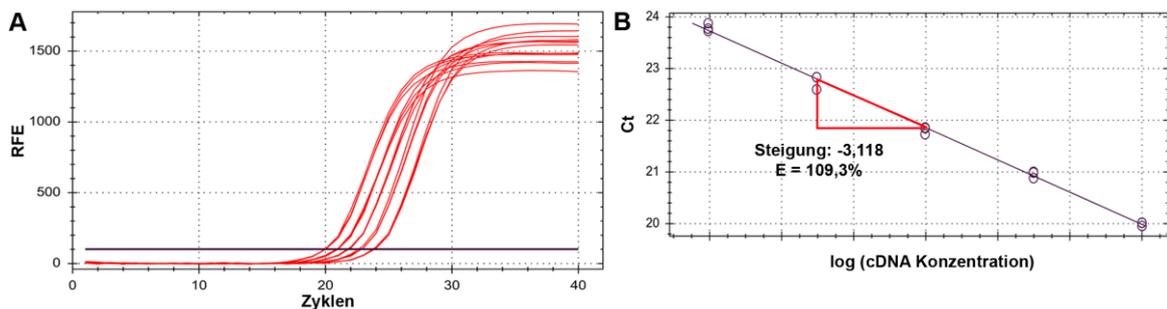


Abb. 5: Ermittlung der Regressionsgeraden zur Berechnung der Amplifikationseffizienzen

Berechnung der Effizienz am Beispiel für das Gen GAPDH. (A) Amplifikationskurven mit den unterschiedlichen cDNA Konzentrationen, (B) Ermittelte C_t -Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA

Anhand der Steigung der Geraden konnte schließlich die Amplifikationseffizienz des Primerpaars errechnet werden:

$$E = 10^{1/Steigung \times (-1)}$$

Somit konnte anstelle des Wertes 2 mit der jeweiligen Effizienz gerechnet werden. So wurde bei einer Effizienz von 93% mit 1,93 gerechnet und bei einer Effizienz von 102% mit 2,02.

Mit der ermittelten Amplifikationseffizienz (E), konnte die Formel nach Pfaffl (Pfaffl, 2001) benutzt werden. Dabei bedurfte es neben den spezifischen Amplifikationseffizienzen der Primerpaare zusätzlicher ΔCt -Werte.

Diese ΔCt -Werte wurden jedoch anders als bei Livak ermittelt. Der ΔCt -Wert gibt bei Pfaffl nicht die Differenz zwischen dem Zielgen und dem Referenzgen innerhalb eines Zelltyps an, sondern steht für die Differenz desselben Gens in den unterschiedlichen Zelltypen. Im vorliegenden Fall wurden die cjes001 Zellen als Referenzzellen genutzt, wobei die putativen iPS Zellen die Zielzellen darstellten:

$$\Delta Ct = Ct_{cjes001} - Ct_{piPSC}$$

Mittels der spezifischen Amplifikationseffizienzen (E) und der ΔCt -Werte konnte die genspezifische relative Expression nach Pfaffl wie folgt berechnet werden:

$$Ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta Ct_{Zielgen}(Ct_{cjes001} - Ct_{piPSC})}}{(E_{Refgen})^{\Delta Ct_{Refgen}(Ct_{cjes001} - Ct_{piPSC})}}$$

Da in dieser Arbeit die Analysen allerdings mit zwei Referenzgenen durchgeführt wurden, erfolgte die Berechnung der relativen Expression anhand einer modifizierten Formel:

$$Ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta Ct_{Zielgen}}}{((E_{Refgen1})^{\Delta Ct_{Refgen1}} \times (E_{Refgen2})^{\Delta Ct_{Refgen2}})^{1/2}}$$

Lag die errechnete relative Expression eines Gens um den Wert 1, konnte daraus geschlossen werden, dass das jeweilige Gen in den putativ pluripotenten Zellen ähnlich stark exprimiert worden ist wie in den cjes001 Zellen.

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die unterschiedlichen Strategien zur Reprogrammierung somatischer Zellen des *Callithrix jacchus* in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS Zellen) erläutert. Zur Charakterisierung der iPS Zellen wurden als Pluripotenzkriterien primär die Morphologie der Kolonien, die enzymatische Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die Expression pluripotenzassoziierter Oberflächenmoleküle und die endogene Expression charakteristischer Transkriptionsfaktoren herangezogen (Abb. 6, links).

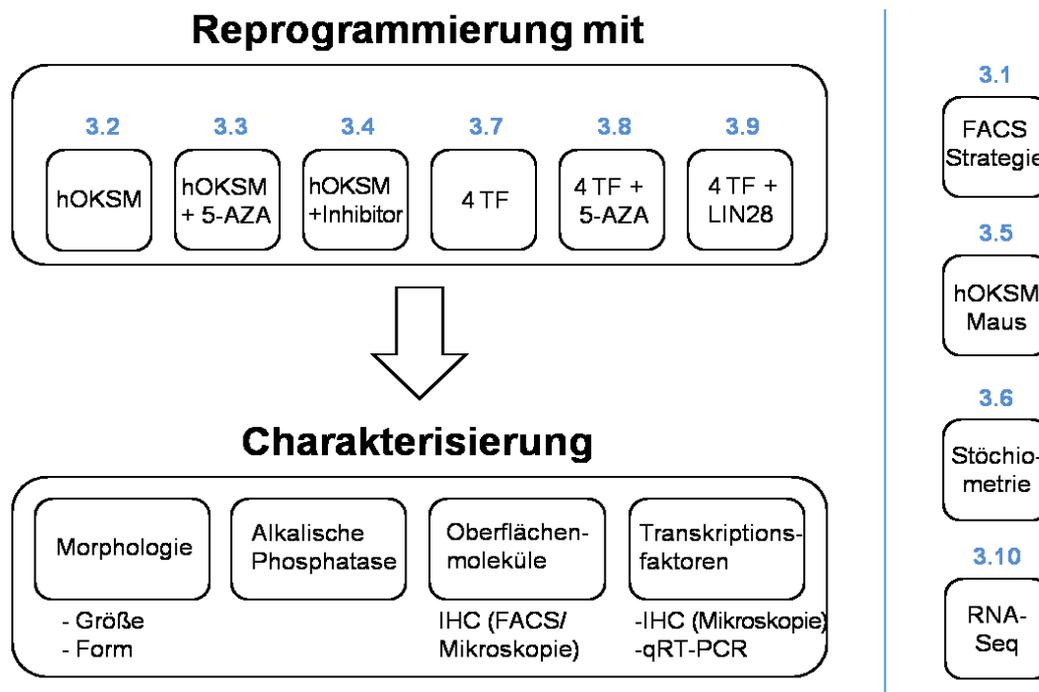


Abb. 6: Aufbau des Ergebnisteils (Schematische Darstellung)

Links: In den einzelnen Unterkapiteln werden die Reprogrammierungsstrategien und die jeweiligen Ergebnisse der Charakterisierung präsentiert.

Rechts: Weitere Unterkapitel des Ergebnisteils, in dem die Analysestrategie für die durchflusszytometrischen Messungen (3.1), die Reprogrammierung von Fibroblasten der Maus (3.5), das stöchiometrische Verhältnis der Reprogrammierungsfaktoren zueinander (3.6) und die Ergebnisse der Transkriptomanalyse (3.10) erläutert werden.

In Kapitel 3.1 wird die für die Auswertung der durchflusszytometrischen Expressionsmessung zentrale Analysestrategie erläutert. Die Ergebnisse der Reprogrammierung mit dem polycistronischen lentiviralen Expressionsvektor hOKSM werden in Kapitel 3.2 dargestellt. Kapitel 3.3 erläutert den Einfluss von DNA-Methylierung auf die Expression pluripotenzassoziierter Genloci. Der Effekt unterschiedlicher Inhibitoren und Agonisten der Signaltransduktion auf die Effizienz des Reprogrammierungsprozesses wird in Kapitel 3.4 dargelegt.

Die primaten Zellen konnten mit hOKSM nur partiell reprogrammiert werden. Deshalb wurde in einer zusätzlichen Versuchsreihe mit Mausfibroblasten gezeigt, dass eine Reprogrammierung mit hOKSM grundsätzlich möglich ist (vgl. Kapitel 3.5). Demnach könnte die durch den polycistronischen Vektor festgelegte Stöchiometrie nicht geeignet sein, um *Callithrix jacchus* iPS Zellen zu generieren (vgl. Kap. 3.6). Deshalb wurde in weiteren Experimenten ein Vektorsystem aus separaten bicistronischen lentiviralen Vektoren (4TF) eingesetzt, damit sich die stöchiometrische Verteilung der Transkriptionsfaktoren innerhalb der primaten Zellen selbst einstellt und bestenfalls zu einem für die Reprogrammierung optimalen Verhältnis führt (vgl. Kapitel 3.7). In Kapitel 3.8 wird der Einfluss der DNA-Methylierung auf die 4TF-Reprogrammierungseffizienz beschrieben. Kapitel 3.9 zeigt die Ergebnisse der 4TF-Reprogrammierung mit zusätzlicher Überexpression von LIN28. Abschließend werden die Ergebnisse der Transkriptomanalyse präsentiert, bei der sowohl partiell reprogrammierte Zellen als auch ES Zellen und Fibroblasten des Weißbüschelaffen untersucht wurden (vgl. Kapitel 3.10).

3.1 Analysestrategie zur Auswertung durchflusszytometrischer Daten

Zur Charakterisierung putativ pluripotenter Zellen wurde u. a. die Expression pluripotenzassoziierter Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch gemessen. Da die pluripotenten Zellen mit CF1- γ MEFs ko-kultiviert wurden, wurden die γ MEFs über eine α -CD29 Markierung aus den Analysen ausgeschlossen.

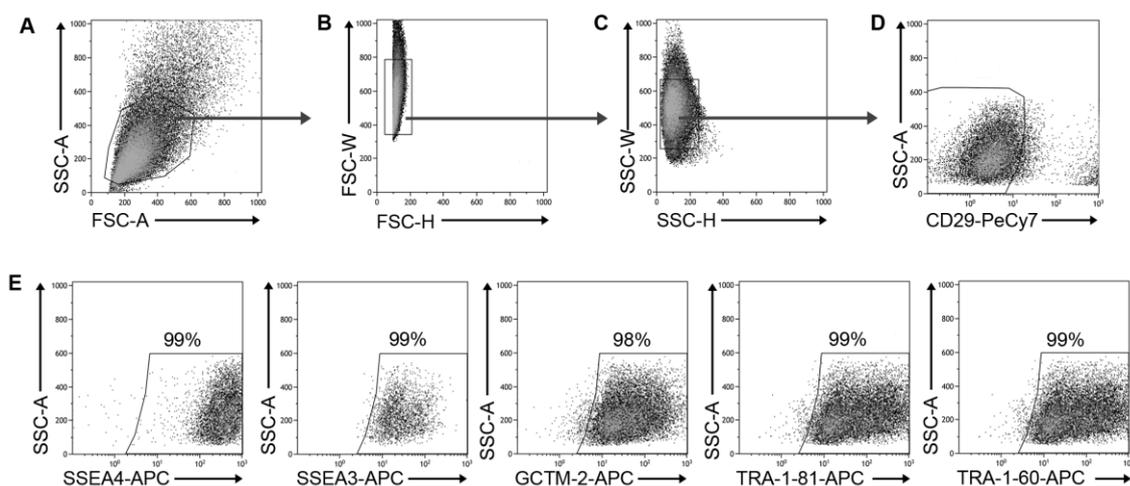


Abb. 7: Analysestrategie zur Detektion von *Callithrix jacchus* Zellen

Exemplarische Darstellung anhand der *Callithrix jacchus* ES Zelllinie cjes001 (P75).

(A-C) Ausschluss von Zelldebris und -aggregaten mit FSC-A vs. SSC-A (forward scatter area vs. side scatter area), sowie FSC-H vs. FSC-W und SSC-H vs. SSC-W (height – width). (D) Ausschluss der γ MEFs mit CD29-PeCy7 vs. SSC-A. (E) dotplot-Darstellung der primaten Zellen.

Mit Hilfe dieser Strategie konnten die pluripotenzassoziierten Oberflächenmoleküle SSEA4, SSEA3, GCTM-2, TRA-1-81 und TRA-1-60 untersucht werden. Bei der hier beispielhaft angeführten ES Zelllinie cjes001 exprimierten nahezu alle Zellen die entsprechenden Proteine (Abb. 7 E). Dies ließ den Schluss zu, dass diese Methode zur Pluripotenzbestimmung genutzt werden konnte.

3.2 Reprogrammierung von Fibroblasten des *Callithrix jacchus* mit dem polycistronischen lentiviralen Expressionsvektor hOKSM

Für die Reprogrammierung der Hautfibroblasten des Weißbüschelaffen wurde der lentivirale polycistronische Vektor hOKSM verwendet, da mit diesem Expressionsvektor erfolgreich Mausfibroblasten reprogrammiert werden konnten (Voelkel *et al.*, 2010).

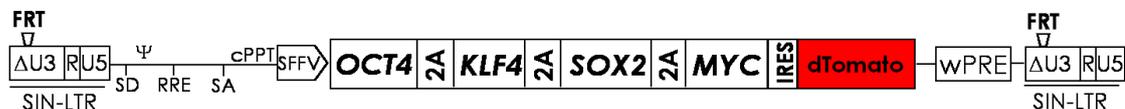


Abb. 8: Schematischer Aufbau des Reprogrammierungsvektors hOKSM

Lentiviraler polycistronischer Reprogrammierungsvektor, flankiert von LTR-Sequenzen mit FRT-Sites zur Entfernung des Vektors aus dem Genom. Abkürzungen: LTR: long terminal repeat; ΔU3: deletierte U3 Promotorregion, U3: einzigartiges 3'-Ende; U5: einzigartiges 5'-Ende; FRT: FLP-Rekombinase Zielstelle; 2A: Esterasesequenz; IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle; PBS: Primerbindungsstelle; SA: Spleißedonor; SA: Spleißakzeptor; cPPT: zentraler Polypurintrakt; SFFV: „spleen focus forming virus“ Promotor; WPRE: „woodchuck“-postregulatives Element; ψ: Verpackungssignal

Der Ko-Expressionsvektor hOKSM exprimiert eine Reprogrammierungskassette, die aus den codonoptimierten kodierenden Sequenzen der humanen Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* und *MYC* besteht (Abb. 8). Die Sequenzen der Transkriptionsfaktoren sind jeweils durch verschiedene 2A-Peptid-Sequenzen voneinander getrennt. Während der Translation am ribosomalen Komplex kommt es bei den 2A-Esterase-Sequenzen jeweils am C'-Ende zu einem Abbruch, so dass das bis dahin synthetisierte Protein freigesetzt wird und die Translation an der letzten Aminosäure der 2A-Sequenz weiter geführt werden kann. Somit können mittels eines Vektors alle vier Transkriptionsfaktoren gleichzeitig in der Zielzelle überexprimiert werden. Zusätzlich kodiert der Vektor die CDS des Reportergens dTomato.

3.2.1 Reprogrammierungsstrategie

Die zeitlichen Abläufe innerhalb eines Reprogrammierungsprozesses hängen u. a. davon ab, welches Vektorsystem eingesetzt und welche Zellen welcher Spezies verwendet werden. In Abbildung 9 werden die Zeitabläufe bei der Reprogrammierung von

adulten *Callithrix jacchus* Zellen (#13836) mit dem polycistronischen Vektor hOKSM schematisch dargestellt.

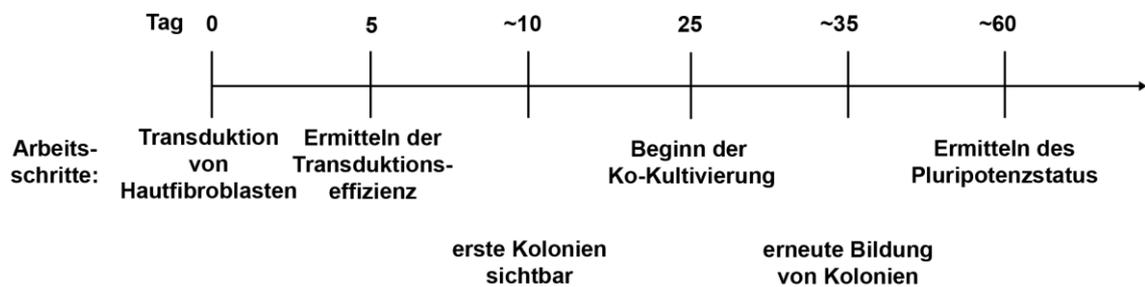


Abb. 9: Zeitstrahl der Reprogrammierung mit dem lentiviralen Reprogrammierungsvektor hOKSM

An Tag 5 wurde die Transduktionseffizienz ermittelt (Abb. 10). Nach circa 10 Tagen wurden erste Kolonien sichtbar (Abb. 11).

Da der Expressionsvektor hOKSM das Fluoreszenzreportergen dTomato ko-exprimiert, konnte die Transduktionseffizienz an Tag 5 sowohl mikroskopisch geschätzt als auch durchflusszytometrisch quantifiziert werden (Abb. 10).

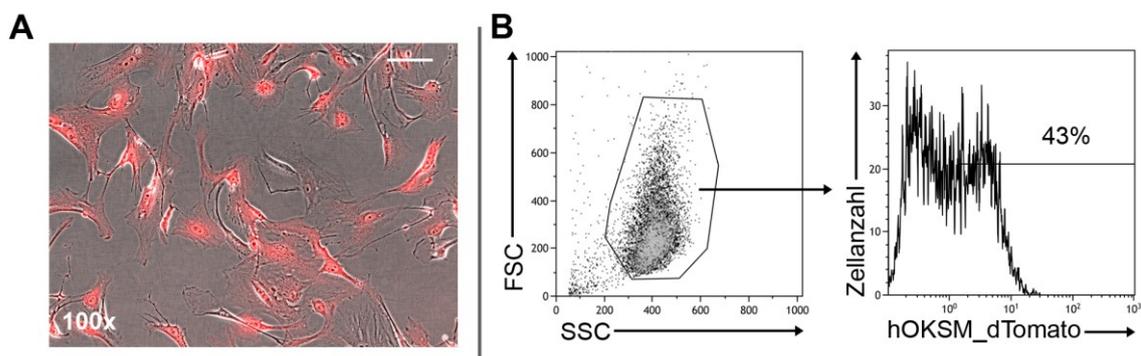


Abb. 10: Transduktionseffizienz des polycistronischen Vektors

(A) Phasenkontrast und überlagerte Fluoreszenz der transduzierten Fibroblasten, Maßstabsbalken = 100 µm, 100x Vergrößerung, (B) Durchflusszytometrische Bestimmung der Transduktionseffizienz. Die positiven Zellen sind im Histogramm mittels Region eingegrenzt.

Ab Tag 10 nach Transduktion konnte mikroskopisch beobachtet werden, dass sich die Fibroblasten transformieren (Abb. 11 C). Um auszuschließen, dass sich die Fibroblasten allein durch die Integration des Vektors in ihr Genom transformierten, wurde eine Kontrolle mitgeführt, bei der der Expressionsvektor lediglich das Fluoreszenzgen dTomato kodierte.

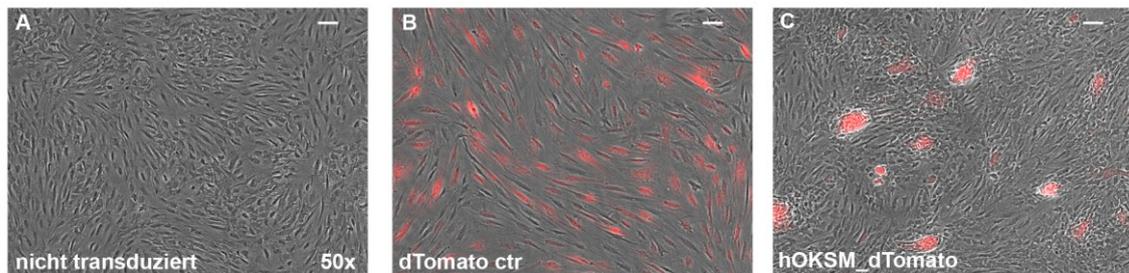


Abb. 11: Koloniebildung nach Transduktion mit hOKSM_dTomato

(A) nicht transduzierte Zellen; (B) mit Kontrollvektor und (C) mit Reprogrammierungsvektor transduzierte Zellen (Tag 10). Maßstabsbalken = 100 µm, 50x Vergrößerung

Während die mit hOKSM-transduzierten Fibroblasten transformierten und sich Kolonien bildeten (Abb. 11 C), behielten die mit dem Kontrollvektor transduzierten Zellen (Abb. 11 B) weiterhin ihre fibroblastoide Morphologie bei (Abb. 11 A).

Einfluss verschiedener Kulturmedien und Stromazellen auf die Reprogrammierung

Die für eine erfolgreiche Reprogrammierung von Weißbüschelaffenzellen notwendigen Kulturbedingungen waren zu Beginn des Projekts nicht hinreichend bekannt. Deshalb wurde der Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien und Stromazellen auf die Reprogrammierungseffizienz untersucht.

Als Kulturmedium wurde *cj* oder ESML-Medium mit unterschiedlichen Zusätzen verwendet. So wurde konditioniertes Medium von den Zellen der ES Zelllinie *cjes001* gesammelt (CM(*cjes001*)). Das Medium wurde nach jeweils 24 h, 48 h, 72 h und 96 h abgenommen und durch frisches ESML-Medium ersetzt. Die Überstände wurden gemischt, steril filtriert (0,22 µm, Zelluloseazetat) und für die Kultivierung der reprogrammierten Kolonien verwendet ($\frac{1}{4}$ ($\frac{1}{v}$) CM(*cjes001*) + $\frac{3}{4}$ ($\frac{1}{v}$) ESML-Medium). Desweiteren wurden die Zytokine rhLIF (10 ng/ml) und bFGF (1 ng/ml) zugesetzt. Von beiden Zytokinen ist bekannt, dass sie die Aufrechterhaltung des Pluripotenzstatus unterstützen. rhLIF wurde sowohl für die *Callithrix jacchus* ES als auch für die iPS Zellkultur verwendet (Sasaki *et al.*, 2005; Tomioka *et al.*, 2010). bFGF wurde hingegen für humane als auch für *Callithrix jacchus* ES Zellkulturen genutzt (Amit *et al.*, 2000; Fleischmann *et al.*, 2009).

Die reprogrammierten Zellen des Weißbüschelaffen wurden nicht nur auf γ MEFs sondern auch auf Hautfibroblasten des Affen (γ Callifibs) kultiviert. Dazu wurden die Fibroblasten bei 35 Gy bestrahlt und so mitotisch arretiert. Dieser Vorgehensweise liegt die Annahme zugrunde, dass nicht transduzierte primate Fibroblasten ebenso als Stromazellen geeignet sind, da beobachtet werden konnte, dass sich bei der gemeinsamen Kultivierung von transduzierten und nicht transduzierten Fibroblasten in einem frühen Stadium des Reprogrammierungsprozesses Kolonien bildeten. Bei humanen ES

Zellkulturen werden neben MEFs auch humane mesenchymale Stammzellen (MSCs) (Cheng *et al.*, 2003) oder humane embryonale Fibroblasten (Amit *et al.*, 2003) für die erfolgreiche Kultivierung pluripotenter Zellen verwendet. Deshalb wurde hier versucht, einen ähnlich positiven Effekt durch die Verwendung von γ Callifibs zu erzielen.

3.2.2 Charakterisierung der hOKSM-transduzierten primaten Zellen

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Pluripotenzanalysen der mit dem hOKSM-Expressionsvektor transduzierten *Callithrix jacchus* Fibroblasten dargestellt.

Morphologie der Kolonien

Die transduzierten Zellen bildeten Kolonien, die hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht und mit den Kolonien der pluripotenten Stammzellen des Weißbüschelaffen verglichen wurden (vgl. Abb. 3 A), die in großen, flachen und kompakten Kolonien wachsen.

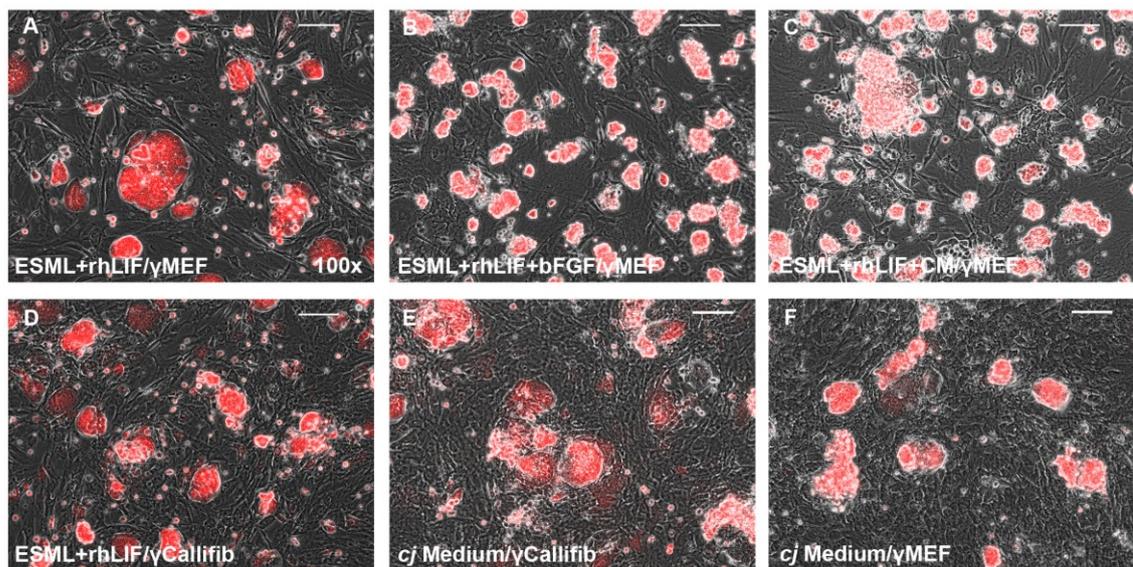


Abb. 12: Reprogrammierte Zellen in verschiedenen Kulturbedingungen

Kolonien an Tag 50 nach Transduktion mit dem polycistronischen Vektor in (A) ESML+rhLIF auf γ MEF, (B) ESML+rhLIF+bFGF auf γ MEF, (C) ESML+rhLIF+CM(cjes001) auf γ MEF, (D) ESML+rhLIF auf γ Callifib, (E) cj Medium auf γ Callifib, (F) cj Medium auf γ MEF, Maßstabsbalken = 100 μ m, 100x Vergrößerung

Unabhängig von den Kulturbedingungen konnten alle Kolonien über mehrere Passagen hinweg (10) erhalten und für weitere Analysen genutzt werden. Die Morphologie der im ESML-Medium mit rhLIF gehaltenen Kolonien (Abb. 12 A) stimmte mit denen der *Callithrix jacchus* ES Zelllinie cjes001 am ehesten überein. Bei beiden waren die Kolonien groß und flach und grenzten sich deutlich von der Umgebung ab. Die in ESML-Medium mit bFGF oder CM(cjes001) kultivierten Kolonien waren hingegen klein und wiesen viele Auswölbungen auf (Abb. 12 B und C). Diejenigen Kolonien, die auf

γ Callifibs oder auf γ MEFs im *cj* Medium kultiviert wurden, waren groß und zeigten weniger Wölbungen (Abb. 12 D-F). Dabei zeigten die unstrukturierten Kolonien erste differenzierte Zellen.

Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Eines der ersten Anzeichen für die Pluripotenz einer Zelle ist die erhöhte enzymatische Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP). Dieses Merkmal haben pluripotente ES Zellen der Maus (Pease *et al.*, 1990), des Weißbüschelaffen (Thomson *et al.*, 1996) und des Menschen (Thomson *et al.*, 1998) gemeinsam.

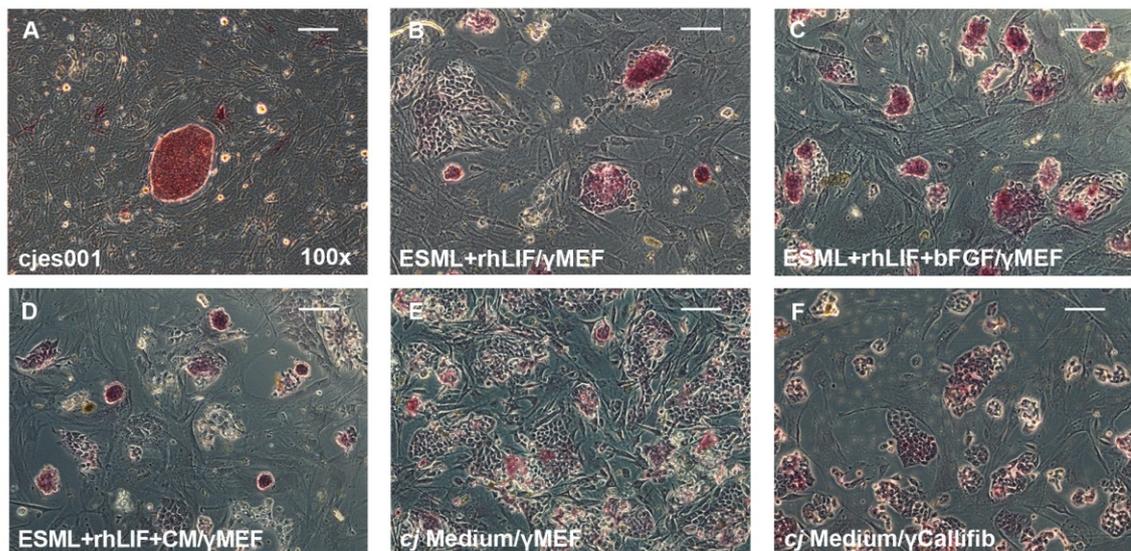
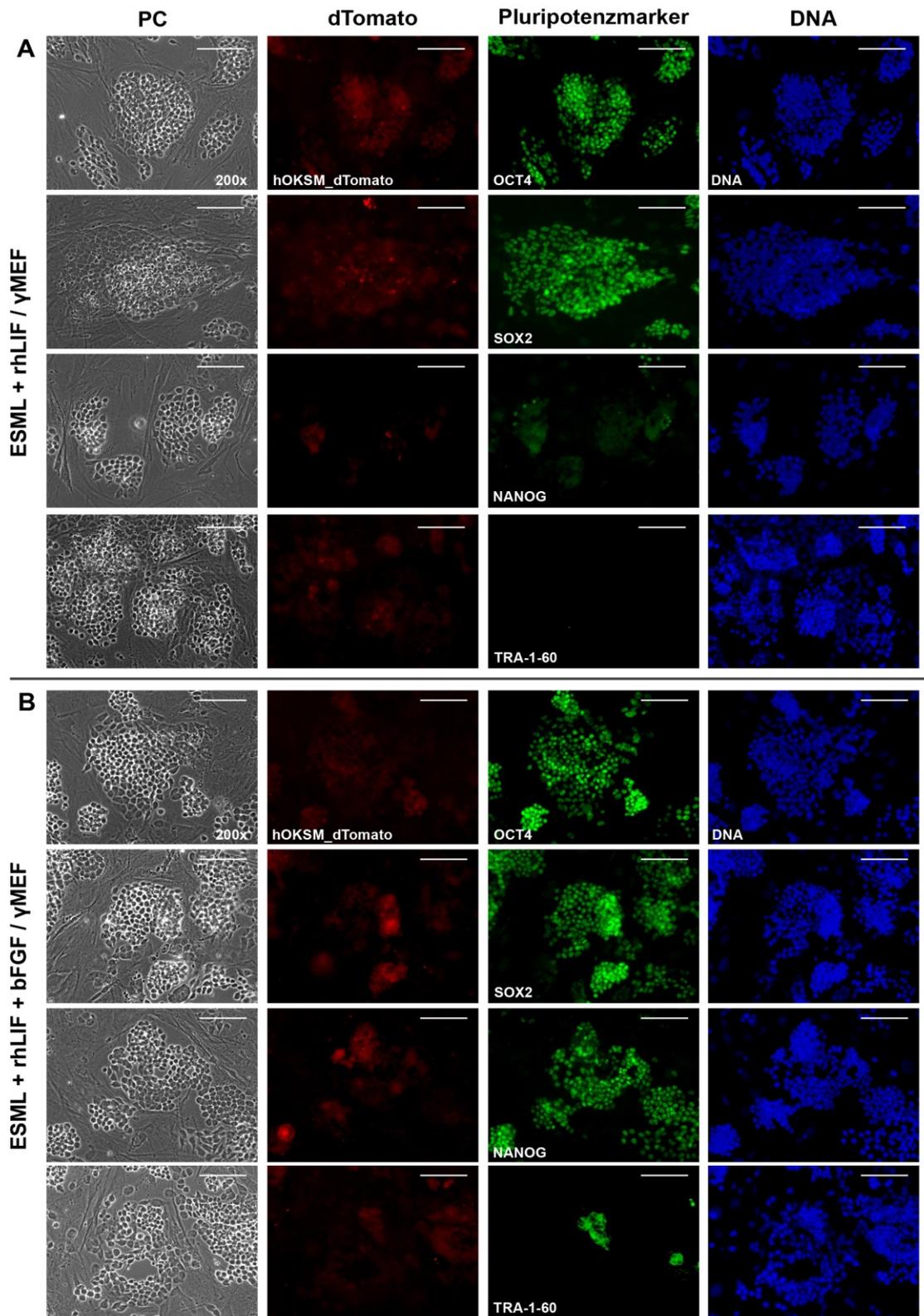


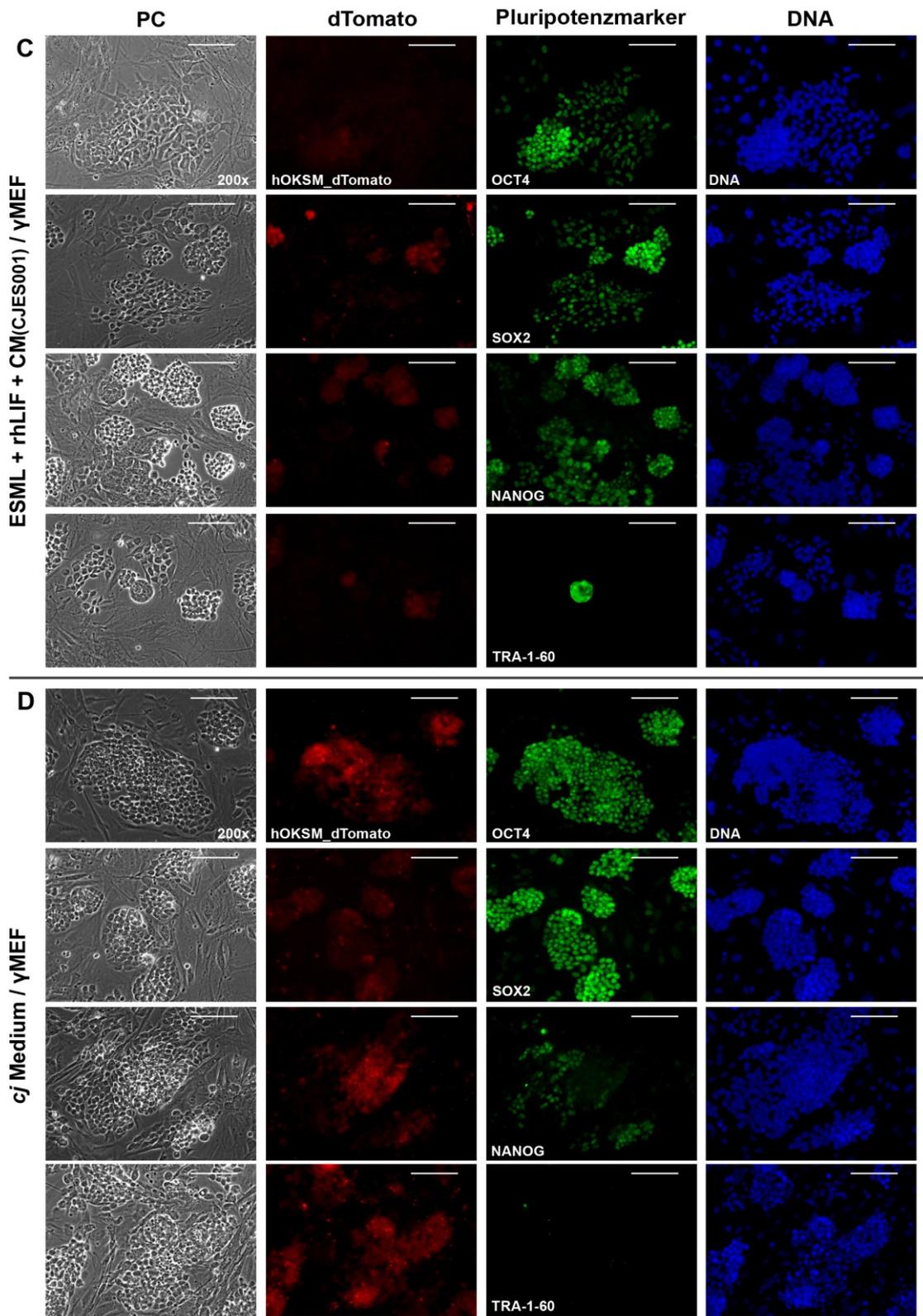
Abb. 13: Alkalische Phosphatase Färbung von hOKSM-transformierten Zellen
 (A) *cjes001* Zelllinie als Positivkontrolle; Kolonien in (B) ESML+rhLIF auf γ MEF, (C) ESML+rhLIF+bFGF auf γ MEF, (D) ESML+rhLIF+CM(*cjes001*) auf γ MEF, (E) *cj* Medium auf γ Callifib, (F) *cj* Medium auf γ MEF; (B-F) Tag 64 nach Transduktion, Maßstabsbalken = 100 μ m, 100x Vergrößerung

Trotz unterschiedlicher Koloniemorphologie exprimierten alle Zellen unter den unterschiedlichen Kulturbedingungen AP (vgl. violette Färbung in Abb. 13). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass Zellen aus abgegrenzten kompakten Kolonien verstärkt AP exprimierten. Da die Fibroblasten *des Callithrix jacchus* keine AP exprimierten (Daten nicht gezeigt), konnte davon ausgegangen werden, dass die hOKSM-transduzierten Zellen bereits ihren fibroblastoiden Zustand verlassen hatten.

Nachweis pluripotenzassoziierter Proteine mittels Immunfluoreszenz

Mittels immunhistochemischer Antikörpermarkierung wurden pluripotenzassoziierte Transkriptionsfaktoren (OCT4, SOX2 und NANOG) und das Oberflächenmolekül TRA-1-60 mikroskopisch nachgewiesen (Abb. 14).





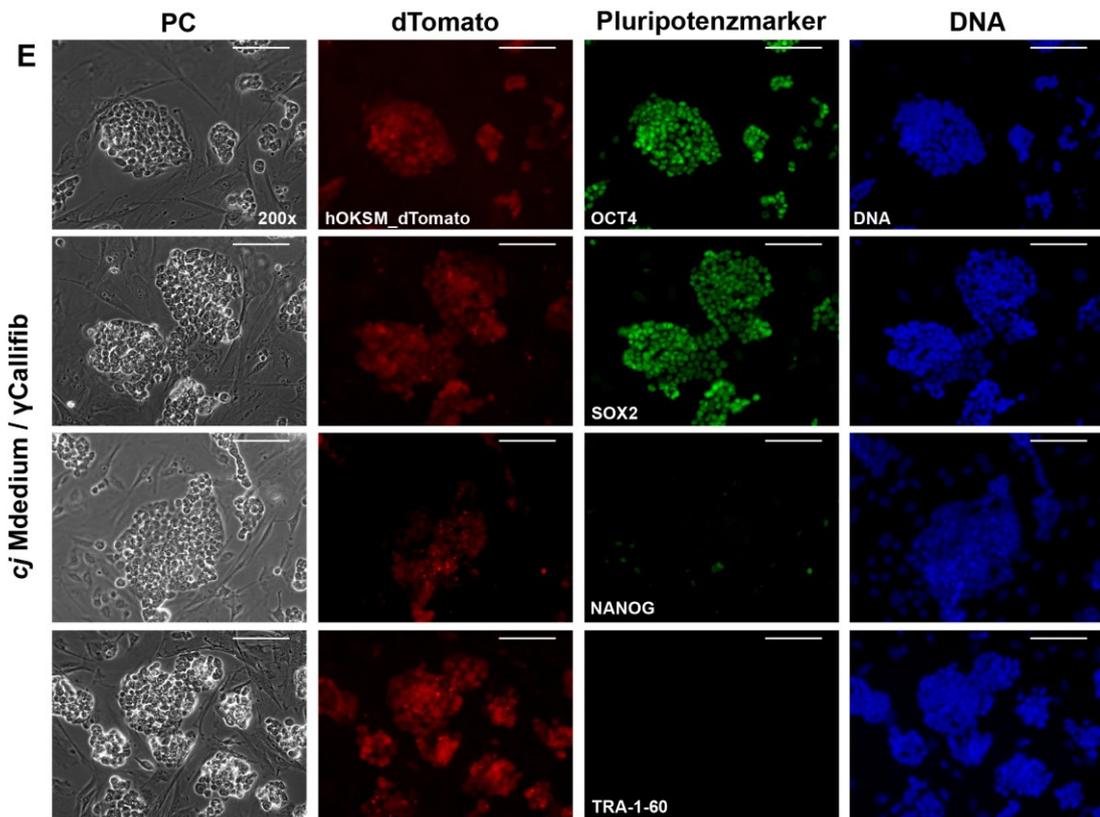


Abb. 14: Immunhistochemische Detektion pluripotenzassoziierter Proteine

Tag 64 nach Transduktion mit hOKSM_dTomato; Kolonien in (A) ESML+rhLIF auf γ MEF, (B) ESML+rhLIF+bFGF auf γ MEF, (C) ESML+rhLIF +CM(cjes001) auf γ MEF, (D) cj Medium auf γ MEF, (E) cj Medium auf γ Callifib
 Die Kolonien wurden mit Primärantikörpern gegen OCT4, SOX2, NANOG und TRA-1-60 gefärbt. Die gebundenen Antikörper wurden mit Sekundärantikörpern, die mit Alexa Fluor®488 bzw. DyLight™ 488 konjugiert waren, detektiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. PC = Phasenkontrast, Maßstabsbalken = 100 μ m, 200x Vergrößerung

Unabhängig von den Kulturbedingungen wurde die Reprogrammierungskassette von allen transduzierten Zellen noch 64 Tage nach Transduktion exprimiert (Abb. 14). Demnach wurde der lentivirale Vektor bis zu diesem Zeitpunkt nicht abgeschaltet. Daher wurden vermutlich sämtliche Proteine der Reprogrammierungskassette exprimiert, so dass mittels Antikörperfärbung nicht unterschieden werden konnte, ob die Proteine OCT4 und SOX2 aus endogener oder ektopter Genexpression gebildet wurden. Beim Transkriptionsfaktor NANOG hingegen konnte davon ausgegangen werden, dass dieser durch endogene Expression von NANOG entstanden war. Das Protein konnte lediglich in Kolonien, die in cj Medium und auf γ Callifibs gehalten wurden, nicht nachgewiesen werden. TRA-1-60 konnte auf den Zellen detektiert werden, die in ESML+rhLIF+bFGF und in ESML+rhLIF+CM(cjes001) jeweils auf γ MEFs kultiviert wurden (Abb. 14 B und C). In diesen beiden Kulturmedien war zusätzlich bFGF enthalten, welches ebenfalls für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status in *Callithrix jacchus* ES Zellkulturen verwendet wird (Fleischmann *et al.*, 2009). In den dermalen Fibroblasten des Weißbüschelaffen konnte keine der untersuchten Proteine nachge-

wiesen werden. Die Zellen der ES Zelllinie cjes001 bildeten alle untersuchten Proteine (Daten nicht gezeigt). Demnach haben diejenigen untersuchten Zellen, die sowohl die Proteine NANOG als auch TRA-1-60 produzierten (Abb. 14 B und C), ihren fibroblastoiden Zustand hin zu einem pluripotenten Status verändert.

Expression pluripotenzassoziierter Oberflächenmoleküle

Für die weitere Charakterisierung der transduzierten Zellen wurde die Expression der vier Oberflächenmoleküle SSEA4, SSEA3, TRA-1-81 und TRA-1-60 durchflusszytometrisch gemessen. Für diese Messung wurden die γ MEFs vor der Antikörperfärbung mit Hilfe von *Feeder Removal MicroBeads* (vgl. Kapitel 2.2.6) entfernt.

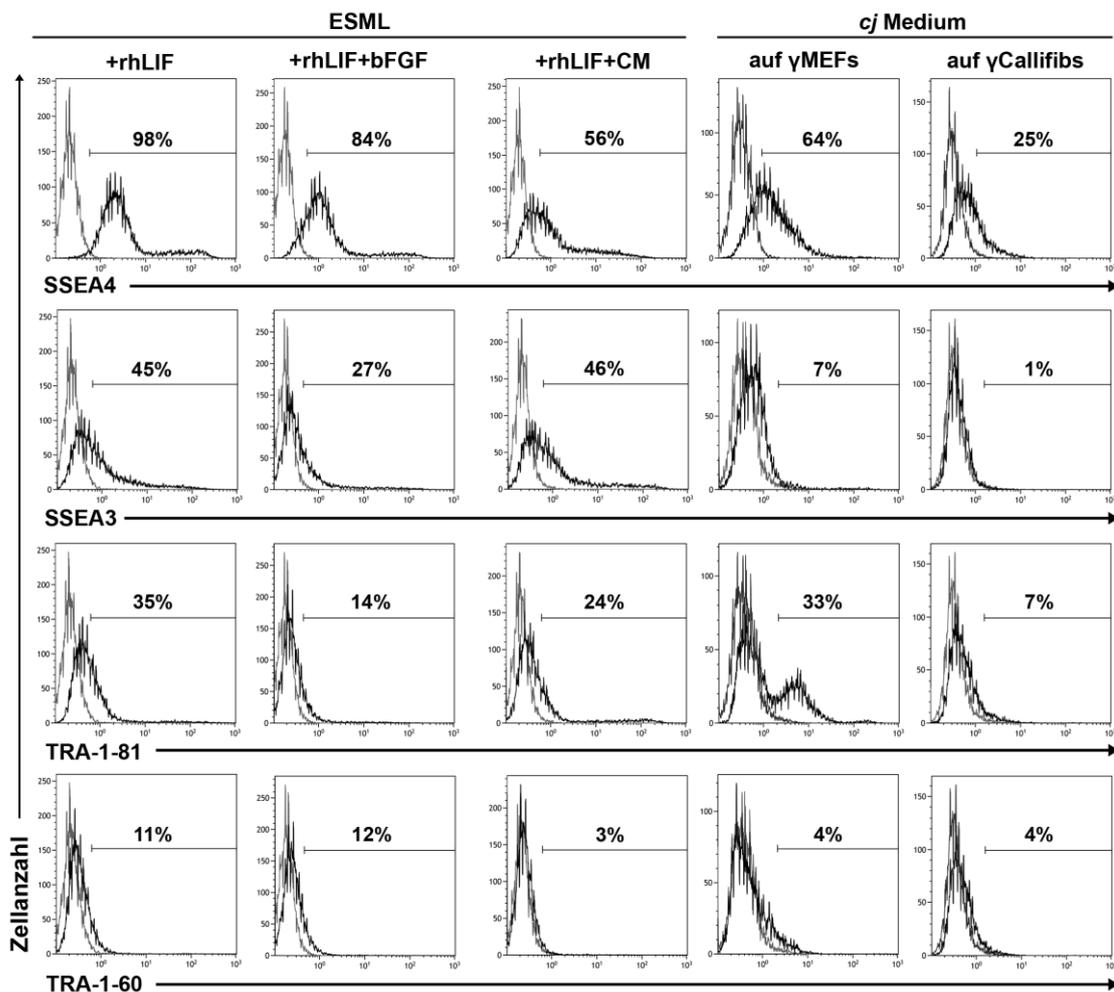


Abb. 15: Expression pluripotenzassoziierter Oberflächenmoleküle in unterschiedlichen Medien

Tag 70 nach Transduktion mit hOKSM_dTomato. Die Kolonien wurden in ESML-Medium mit unterschiedlichen Zusätzen (rhLIF, rhLIF+bFGF oder rhLIF+CM(cjes001)) und mit cj Medium auf unterschiedliche Stromazellen kultiviert. Die Expression der pluripotenzassozierten Oberflächenmoleküle wurde durchflusszytometrisch gemessen und ausgewertet. Die Isotypenkontrollen sind grau, die spezifische Färbung schwarz dargestellt.

Bei allen Kulturbedingungen war der Anteil an SSEA4 exprimierenden Zellen hoch (Abb. 15). Der Anteil an positiven Zellen war dabei im ESML+rhLIF-Medium mit 98% am höchsten und mit der SSEA4-Expression der cjes001 Zellen vergleichbar (vgl. Abb. 7). Bei Kolonien, die in *cj* Medium kultiviert wurden, war der Anteil der SSEA4 exprimierenden Zellen nur dann erhöht, wenn die Zellen mit γ MEFs ko-kultiviert wurden. Die Ko-Kultivierung auf γ Callifibs führte zur geringsten Zunahme an SSEA4⁺ Zellen. Allerdings wurden unter dieser Kulturbedingung auch die anderen Oberflächenmarker ähnlich schwach exprimiert.

Im ESML-Medium – unabhängig von den diversen Zusätzen - war der Anteil der exprimierenden Zellen am höchsten: So exprimierten im rhLIF+CM(cjes001)-Medium 46% der Zellen SSEA3, im rhLIF-Medium 35% TRA-1-81 und im rhLIF+bFGF-Medium 12% TRA-1-60. Allerdings konnte unter keiner Kulturbedingung ein mit den ES Zellen vergleichbar hoher Anteil an TRA-1-60 exprimierenden Zellen erzielt werden (vgl. Abb. 7). Da die Expression der dTomato-Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt), konnte davon ausgegangen werden, dass der Expressionsvektor nicht abgeschaltet wurde. Dies und das Fehlen einer ausreichend hohen TRA-1-60-Expression ließen den Schluss zu, dass die Zellen nicht vollständig zu iPS Zellen reprogrammiert waren.

Transkription ausgesuchter pluripotenzassoziierter Gene

Mittels qRT-PCR wurde die Transkription ausgesuchter Gene in den transduzierten Zellen mit der in ES Zellen verglichen. Dabei wurden Primer verwendet (vgl. Tab. 10), die nur endogen an die nicht translatierte Sequenz und nicht an die CDS der ektop eingebrachten vier Faktoren *POU5F1* (kodiert OCT4), *KLF4*, *SOX2* und *MYC* banden. Zusätzlich zur Expression der Yamanaka-Faktoren wurden auch die Transkripte von *LIN28A*, *NANOG*, *DNMT3B* und *ZFP42* (kodiert REX1) untersucht.

Es wurden Ausgangszellen (dermale Fibroblasten in Passage 3), Zellen der ES Zelllinie cjes001 (Passage 91) und reprogrammierte Zellen (Tag 64 nach Transduktion), die in unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (*cj* Medium und ESML+rhLIF+bFGF), analysiert (vgl. Abb. 16). Da sowohl die ES Zellen als auch die reprogrammierten Zellen zuvor mit γ MEFs ko-kultiviert wurden, wurden diese für die qRT-PCR vor der RNA-Isolierung durch *Feeder Removal MicroBeads* aus der Kultur entfernt (vgl. Kapitel 2.2.6).

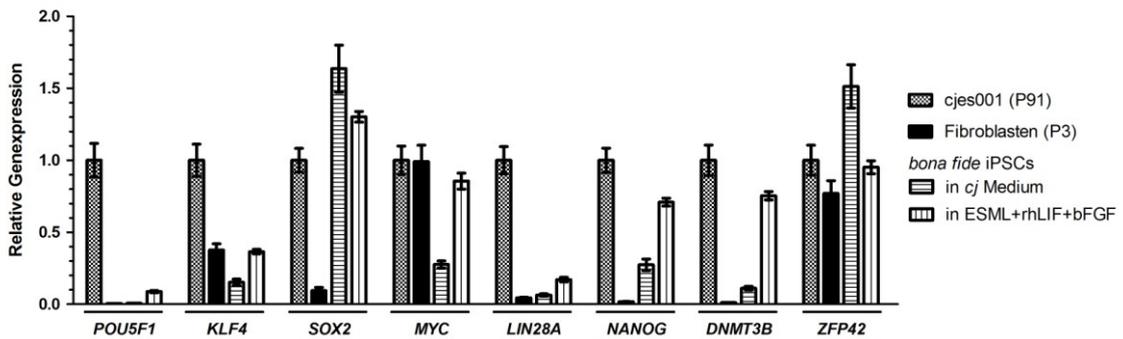


Abb. 16: Endogene Transkription von pluripotenzassoziierten Genen in den reprogrammierten Zellen

Die relativen Transkript-Mengen von *POU5F1*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *LIN28A*, *NANOG*, *DNMT3B* und *ZFP42* wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Expression der untersuchten Gene wurde über die Haushaltsgene *GAPDH* und *RPL13A* normalisiert. Die Expressionshöhen sind relativ zu der Expression in ES Zellen gezeigt, die auf 1 gesetzt wurden. Die dargestellten Werte sind die aus Triplikaten gebildeten arithmetischen Mittelwerte (+/- SD).

Die Expression von *MYC* und *ZFP42* war in den ES Zellen und den Fibroblasten ähnlich hoch. Die anderen Gene wurden in den Fibroblasten geringer exprimiert als in den Zellen der ES Zelllinie. Die *bona fide* iPS Zellen beider Kulturmedien exprimierten *SOX2*, *MYC* und *ZFP42* ähnlich stark wie die ES Zellen. Vergleicht man die reprogrammierten Zellen im ESML+rhLIF+bFGF-Medium mit den Fibroblasten, zeigt sich, dass die Expression von *DNMT3B* und *NANOG* induziert wurde. Allerdings wurden die untersuchten Gene nicht so stark exprimiert wie in den ES Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass die hOKSM-transduzierten Zellen nur partiell reprogrammiert waren.

3.3 Einfluss von DNA-Methylierung auf die Reprogrammierungseffizienz

Bei der Reprogrammierung von somatischen Zellen werden mehrere metastabile Stadien durchlaufen (Brambrink *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*, 2008a; Hansson *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2012). Dabei wird nur ein geringer Teil der Zellen vollständig reprogrammiert. Häufig wird die Weiterentwicklung über einen intermediären Status hinaus blockiert (Hanna *et al.*, 2009). Durch Zugabe des Methyltransferase-Inhibitors 5-Azacytidin (5-AZA) können teilreprogrammierte Zellen der Maus aber vollständig zu iPS Zellen überführt werden (Mikkelsen *et al.*, 2008).

3.3.1 Einfluss von 5-Azacytidin auf die mit hOKSM teilreprogrammierten *Callithrix jacchus* Zellen

Um zu überprüfen, ob 5-AZA auch teilreprogrammierte Zellen des Weißbüschelaffen in vollständig reprogrammierte iPS Zellen überführen kann, wurde der Inhibitor zu partiell reprogrammierten Zellen (vgl. Kapitel 3.2.2, Tag 94 nach Transduktion) hinzugegeben.

Dabei wurde 5-AZA zweimal hintereinander für je 48 h in das Kulturmedium der piPS Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen weitere vier Wochen kultiviert. Das Cytidin-Analogon, das im Gegensatz zum Cytosin aufgrund seines Stickstoffatoms nicht methyliert werden kann, wurde bei jeder Zellteilung in die genomische DNA eingebaut. Nach mehreren Reifezyklen wurde die statistische Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die pluripotenzassoziierten Promotoren durch die Entfernung der Cytosin-Methylierung wieder aktiviert wurden.

3.3.2 Charakterisierung teilreprogrammierter Zellen nach Demethylierung

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Pluripotenzanalyse nach der Verwendung von 5-AZA dargestellt.

Morphologie der Kolonien

114 Tage nach Beginn der Reprogrammierung und 20 Tage nach zweimaliger Zugabe von 5-AZA wurden die Kolonien hinsichtlich ihrer Morphologie begutachtet (Abb. 17).

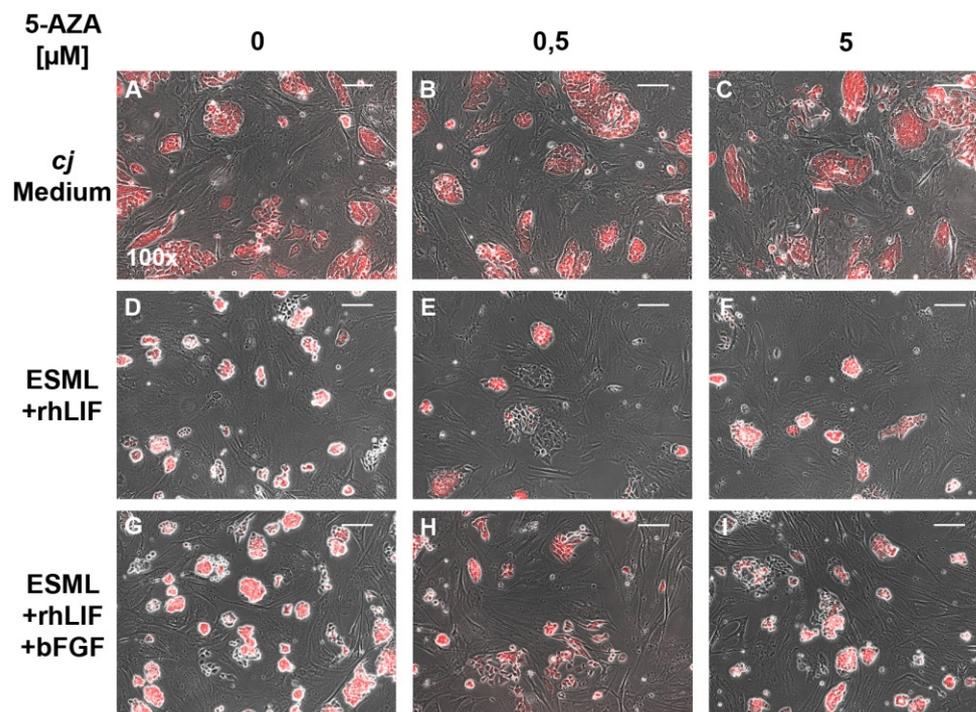


Abb. 17: Morphologie der Kolonien nach Zugabe von 5-AZA

Kolonien in (A-C): *cj* Medium; (D-F): ESML+rhLIF; (G-I): ESML+rhLIF+bFGF, mit 0 μ M, 0,5 μ M und 5 μ M 5-AZA, Maßstabsbalken = 100 μ m, 100x Vergrößerung

Eine Zugabe von 5-AZA im *cj* Medium zeigte keinen Einfluss auf die Morphologie der Kolonien. Die Kolonien waren groß, rund und flach und die einzelnen Zellen waren zu erkennen. (Abb. 17 A-C). In den ESML-Medien waren die Kolonien ohne 5-AZA klein, kompakt und rund. Die einzelnen Zellen waren nicht zu erkennen (Abb. 17 D und G). Durch Zugabe von 5-AZA wurden die Kolonien zwar größer, verloren aber an Kompak-

theit (Abb. 17 E,F und H,I). Alle Zellen exprimierten weiterhin das dTomato Reporter-gen.

Die beobachteten morphologischen Veränderungen nach der Zugabe von 5-Azacytidin lassen keinen konkreten Schluss über die Wirksamkeit des verwendeten Inhibitors zu.

Expression von pluripotenzassoziierten Oberflächenmolekülen

121 Tage nach Transduktion und 27 Tage nach der zweifachen Zugabe von 5-AZA wurde die Expression von pluripotenzassoziierten Oberflächenmolekülen gemessen.

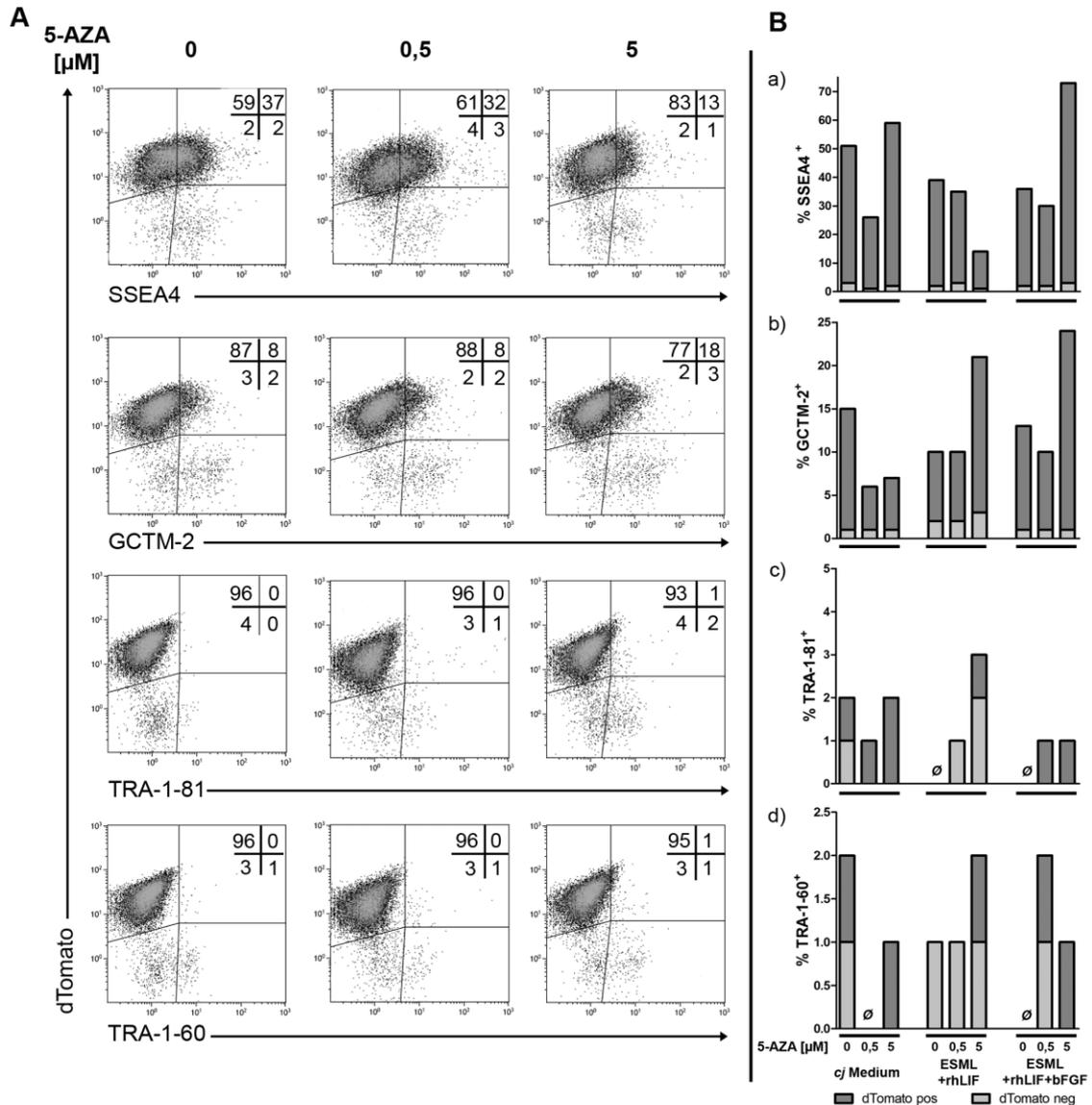


Abb. 18: Expression der Oberflächenmoleküle nach Zugabe von 5-AZA

(A) Expression der Oberflächenmoleküle am Beispiel von in ESML+rhLIF kultivierten Zellen ohne und mit 5-AZA. Gezeigt ist jeweils die Expression des untersuchten Oberflächenmoleküls gegen die Expression von dTomato. (B) Zusammenfassung aller durchflusszytometrisch ermittelten Daten. Gezeigt ist der Anteil der positiven Zellen für die untersuchten Oberflächenmoleküle. dunkelgrau: Anteil der dTomato positiven Zellen, hellgrau: Anteil der dTomato negativen Zellen

Da ein Großteil der Zellen unabhängig von der Zugabe des Inhibitors das dTomato Reporterprotein exprimiert (Abb. 18 A), war kein *Silencing* des lentiviralen Reprogrammierungsvektor erfolgt. Weiterhin war zu beobachten, dass die Zugabe von 5-AZA nicht dazu führte, dass der Anteil an Zellen, die die untersuchten Oberflächenmoleküle exprimierten, anstieg. Zwar stieg durch die Zugabe von 5 μ M 5-AZA im *cj* und ESML+rhLIF-Medium der Anteil an SSEA4 exprimierenden Zellen insgesamt an (Abb. 18 B, a)), jedoch blieb die Anzahl der Zellen gleich, die kein dTomato exprimierten. Ebenso verhielt es sich bei den GCTM-2 exprimierenden Zellen in den ESML Medien (Abb. 18 B, b)). Dass die Zugabe von 5-AZA wahrscheinlich nicht dazu beiträgt, teilreprogrammierte *Callithrix jacchus* Zellen in iPS Zellen zu überführen, wurde vor allem hinsichtlich der TRA-Oberflächenmoleküle deutlich: Diese wurden in allen Medienbedingungen nur bei unter 3% der gemessenen Zellen exprimiert. Zumeist konnte jedoch gar keine Expression ermittelt werden.

3.4 Aktivierung oder Inhibierung von Signaltransduktionswegen

Eine andere Strategie, partiell reprogrammierte Zellen in den pluripotenten Status zu überführen, ist die Manipulation von Signaltransduktionswegen, die für die Aufrechterhaltung des Pluripotenzstatus wichtig sind (Kapitel 1.2.3). Daher wurden der Agonist des Wnt-Signaltransduktionswegs CHIR99021 (Silva *et al.*, 2008), der MEK-Inhibitor PD325901 (Silva *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011) und die beiden ALK5-Inhibitoren RepSox (Ichida *et al.*, 2009) und SB431542 (Lin *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011) verwendet. Letzterer inhibiert darüber hinaus auch ALK4 und ALK7 (Inman *et al.*, 2002).

3.4.1 Einfluss manipulierter Signaltransduktionswege auf mit hOKSM teilreprogrammierte *Callithrix jacchus* Zellen

Die piPS Zellen des Weißbüschelaffen (vgl. Kapitel 3.2.2) wurden mit CHIR99021, PD325901, SB431542 und RepSox behandelt. Die Zugabe erfolgte ab Tag 88 nach Transduktion bei jedem Medienwechsel für insgesamt 28 Tage (Konzentrationen vgl. Tab. 12).

3.4.2 Charakterisierung teilreprogrammierter Zellen nach Manipulation von Signaltransduktionswegen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Pluripotenzzanalyse (Morphologie und Expression der Oberflächenmoleküle) dargestellt.

Morphologie der Kolonien

102 Tage nach Beginn der Reprogrammierung und 14 Tage nach täglicher Zugabe der Reagenzien wurden die Kolonien in den unterschiedlichen Kulturmedien hinsichtlich ihrer Morphologie begutachtet.

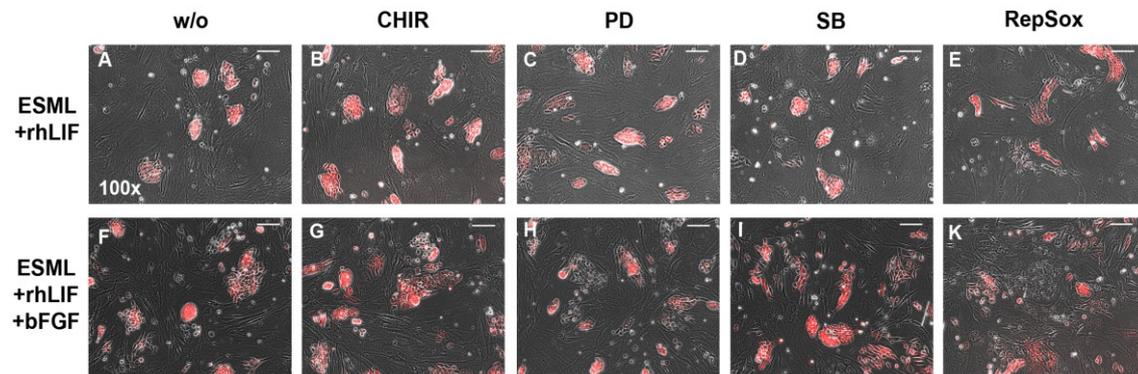


Abb. 19: Morphologie der Kolonien nach manipulierter Signaltransduktion

Kolonien in (A-E): ESML+rhLIF-Medium, (F-K): ESML+rhLIF+bFGF-Medium, (A und F): ohne Zusatz, (B und G): mit Wnt-Signaltransduktionsweg-Agonist, (C und H): mit MEK-Inhibitor, (D und I): mit TGF β -Inhibitor (ALK4, ALK5 und ALK7) und (E und K): mit ALK5-Inhibitor. Maßstabsbalken = 100 μ m, 100x Vergrößerung

Durch Zugabe der Inhibitoren wurden die kompakten und kleinen Kolonien unspezifisch größer (Abb. 19 E und K). Durch die Zugabe von RepSox wurden sie fast gänzlich zerstört. Da entweder keine morphologischen Veränderungen oder nur negative Modifikationen (bei RepSox) zu beobachten waren, lässt sich keine konkrete Aussage zur Wirksamkeit der verwendeten Inhibitoren und Agonisten treffen.

Expression pluripotenzassoziierter Oberflächenmoleküle

An Tag 115 nach Transduktion wurde die Expression der Oberflächenmoleküle SSEA4, SSEA3, TRA-1-81 und TRA-1-60 durchflusszytometrisch gemessen. Die Stromazellen (γ MEFs) wurden mit Hilfe der *Feeder Removal MicroBeads* aus der Kultur entfernt. Anschließend wurden die Ergebnisse mit denen von unbehandelten piPS Zellen verglichen (Abb. 20).

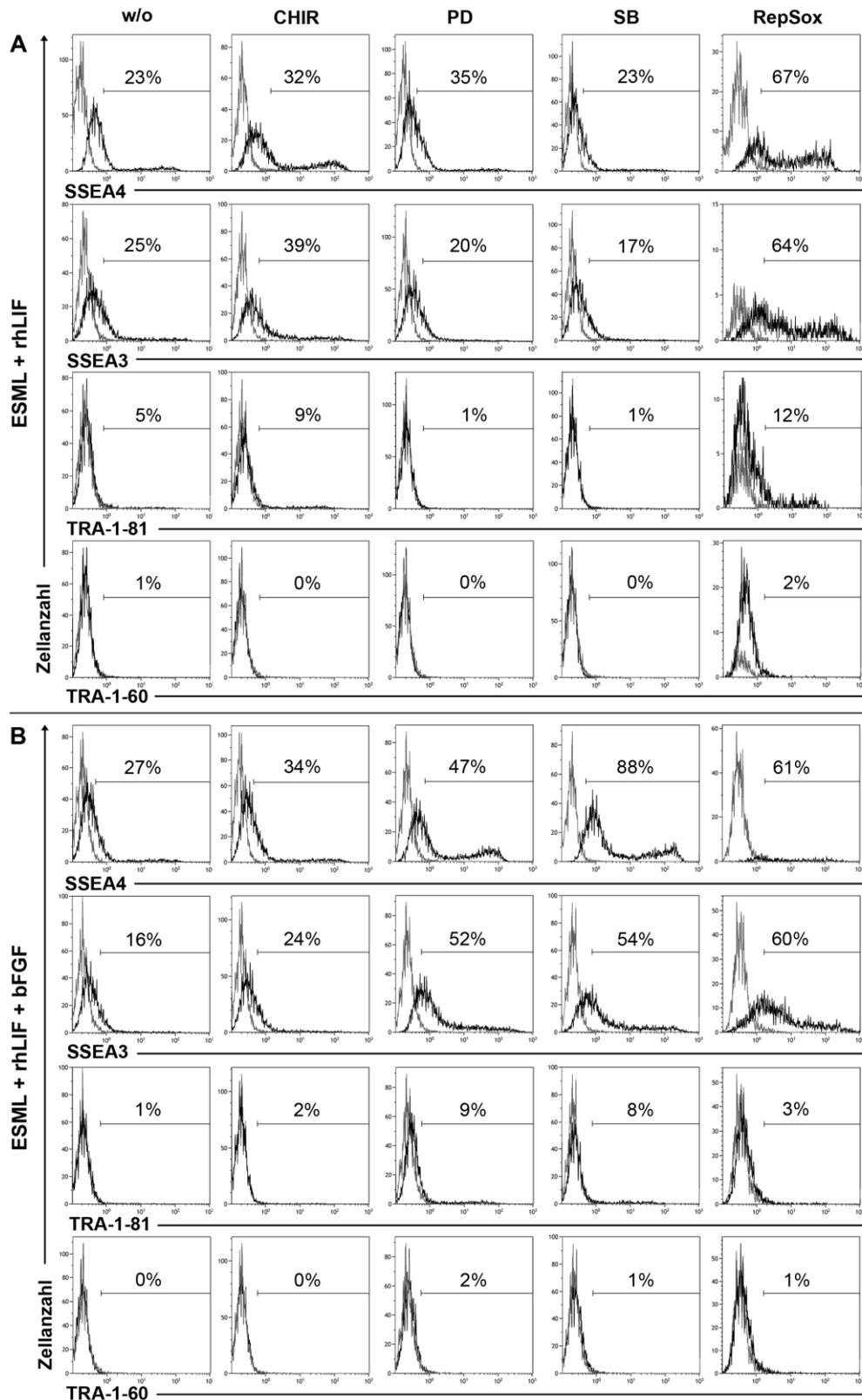


Abb. 20: Expression der Oberflächenmoleküle nach manipulierter Signaltransduktion

Tag 115 nach Transduktion, 28 Tage unter Einfluss unterschiedlicher Inhibitoren und Agonisten. Ermittelt wurde die Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle SSEA4, SSEA3, TRA-1-81 und TRA-1-60 in ESML+rhLIF (A) und ESML+rhLIF +bFGF (B) und unter Zugabe unterschiedlicher Reagenzien; hellgrau: Isotypenkontrollen; schwarz: spezifische Färbungen

Durch Zugabe der Inhibitoren wurde zwar der Anteil an SSEA4 und SSEA3 exprimierenden Zellen aber nicht der Anteil an TRA⁺ Zellen erhöht. Unter Einfluss von RepSox war der Anteil an SSEA4⁺-, SSEA3⁺- und TRA-1-81⁺ Zellen im ESML+rhLIF-Medium deutlich erhöht. Allerdings wurde die Koloniestruktur durch den Einsatz von RepSox zerstört (vgl. Abb. 19).

3.5 Reprogrammierung von Mausfibroblasten mit dem polycistronischen Vektor hOKSM

Da die primaten Zellen mit hOKSM nur partiell reprogrammiert wurden, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Fibroblasten aus den Schwanzspitzen von Mäusen (*tail tip fibroblasts*; TTFs) und embryonale Mausfibroblasten (MEFs) transduziert, um zu zeigen, dass eine Reprogrammierung mit hOKSM grundsätzlich möglich ist.

3.5.1 Reprogrammierungsprozess

Die Reprogrammierung der Mauszellen erfolgte analog zur Reprogrammierung der *Callithrix jacchus* Zellen (vgl. Abb. 9 und Abb. 28).

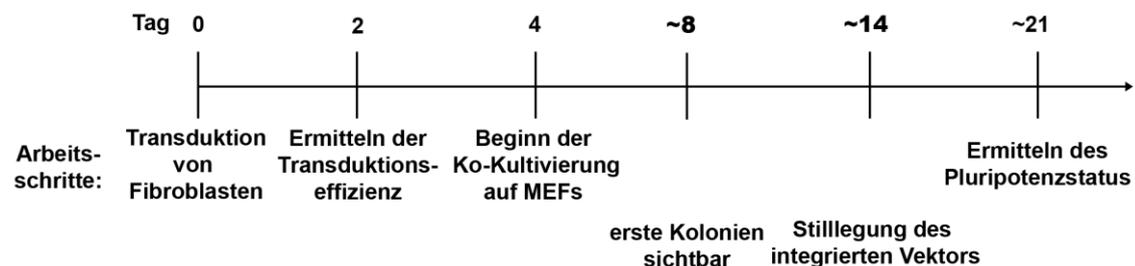


Abb. 21: Zeitstrahl der Reprogrammierung mit hOKSM (Maus)

Nachdem die Zellen transduziert wurden, wurden sie ab Tag 4 mit γ MEFs ko-kultiviert und expandiert, so dass nach etwa 21 Tagen ausreichend Kolonien für die Pluripotenzenanalysen vorhanden waren.

Nach Transduktion von 10^5 Fibroblasten mit einer MOI von 5 wurde die Transduktionseffizienz ermittelt. Ab Tag 2 wurden 2 mM VPA ins Medium gegeben. Nach 4 Tagen wurde mit der Ko-Kultivierung der Mauszellen auf γ MEFs begonnen (ES Zell Medium: 15% (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 x Pen/Strep, $1,5 \times 10^{-4}$ mM Monothioglycerole, LIF, in Knockout™ DMEM). Nach etwa 14 Tagen wurde in den ersten Zellen der Reprogrammierungsvektor stillgelegt. Aufgrund der schnellen Zellteilung konnten die Zellen alle 3-4 Tage in hohen Raten (1:15-1:20) passagiert werden, so dass drei Wochen nach Beginn der Reprogrammierung mit den ersten Pluripotenzenanalysen begonnen werden konnte.

3.5.2 Charakterisierung hOKSM-transduzierter Zellen aus der Maus

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Pluripotenzanalysen der mit hOKSM transduzierten Mausfibroblasten dargestellt.

Morphologie der Kolonien

Die ersten iPS Zellkolonien der Maus bildeten sich bereits 8 Tage nach Transduktion.

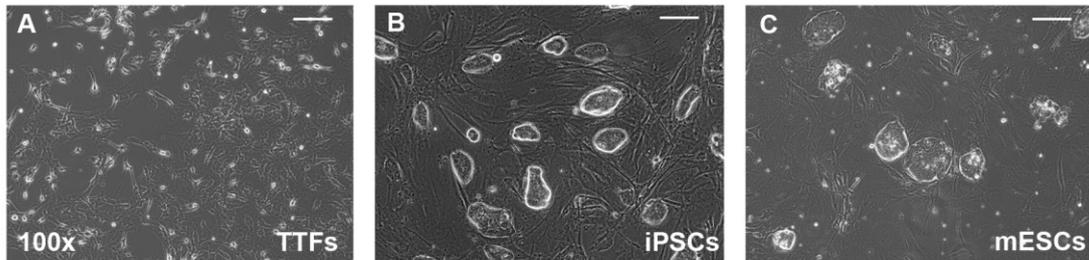


Abb. 22: Morphologie der Mauszellen und Kolonien

(A) isolierte TTFs (Tail Tip Fibroblasten – Schwanzspitzen Fibroblasten) Tag 9, (B) aus den TTFs generierte IPS Zellen (Tag 40) und zum Vergleich (C) ES Zellen vom Black6 Mausstamm. Maßstabsbalken = 100 µm, 100x Vergrößerung

Unter morphologischen Gesichtspunkten ähnelten die isolierten Mausfibroblasten den primaten Fibroblasten (vgl. Abb. 10). Die Maus iPS Zellen (Abb. 22 B) waren den mES Zellen (Abb. 22 C) morphologisch ähnlich. Im Gegensatz zu den ES Zellen des Weißbüschelaffen waren diese weder flach noch groß (vgl. Abb. 3 A) sondern kompakt und dreidimensional. Die für mES Zellen typische *shiny border* war sehr gut zu erkennen.

Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Für die Charakterisierung der reprogrammierten Zellen wurde die Expression der Alkalischen Phosphatase Aktivität nachgewiesen.

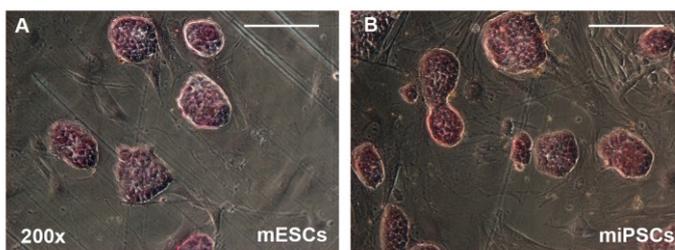


Abb. 23: Alkalische Phosphatase Färbung von Zellkolonien der Maus

Positive AP Färbung der (A) Maus ES Zellen und (B) iPS Zellen auf γ MEFs. Maßstabsbalken = 100 µm, 200x Vergrößerung

Sowohl die ES Zellen aus dem Mausstamm Black 6 als auch die generierten iPS Zellen aus den isolierten TTFs waren violett gefärbt. Dies ließ auf eine hohe enzymatische Aktivität der AP schließen.

Nachweis pluripotenzassoziierter Proteine mittels Immunfluoreszenz

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Proteine Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 und Ssea1 immunhistochemisch nachgewiesen. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt.

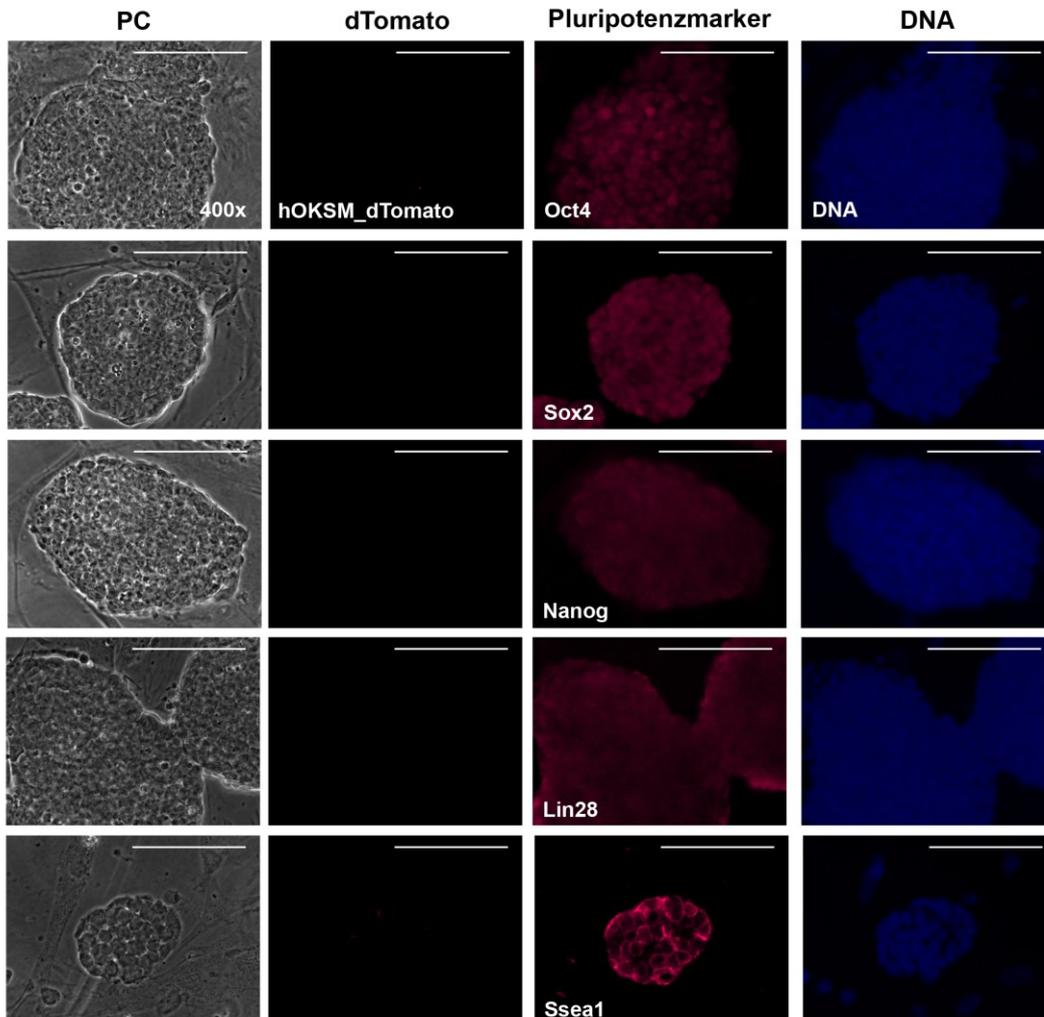


Abb. 24: Immunhistochemische Detektion pluripotenzassoziierter Proteine

Tag 38 nach Transduktion mit hOKSM_dTomato. Die Kolonien wurden mit Primärantikörpern gegen Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 und Ssea1 gefärbt. Anschließend wurden die gebundenen Antikörper mit Sekundärantikörpern detektiert, die mit DyLight™ 657 konjugiert waren. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. PC = Phasenkontrast.

Maßstabsbalken = 100 µm, 400x Vergrößerung

In den iPS Zellen der Maus konnte das dTomato Protein nicht mehr detektiert werden (Abb. 24, zweite Spalte von links). Demnach war die Reprogrammierungskassette stillgelegt. Die endogene Genexpression der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog sowie das RNA-bindende Protein Lin28 und das Oberflächenantigen Ssea1 konnten in allen Zellen nachgewiesen werden, was auf eine erfolgreiche Reprogrammierung hindeutete.

Gerichtete hämatopoetische Differenzierung

Für die gerichtete hämatopoetische Differenzierung wurden die iPS Zellen von den γ MEFs getrennt und zunächst in einem Methylcellulose-Medium (beschrieben in Carotta *et al.* 2004) über EBs (*Embryoid Bodies* – embryonale Hohlkörper) für 6 Tage differenziert. Daraufhin wurden die EBs (Abb. 25 B) mit Hilfe von 5 x Trypsin-EDTA dissoziiert und zusammen mit OP9 Zellen in hämatopoetischem Differenzierungsmedium gerichtet differenziert (verwendete Zytokine und Chemikalien: mSCF (100 ng/ml), mIL-3 (2 ng/ml), mIL-6 (5 ng/ml) Flt3-L (10 ng/ml), IGF-1 (40 ng/ml), Dexamethason (1 μ M) (Lesinski *et al.*, 2012)). Die Zellen der dissoziierten EBs bildeten Suspensionszellen (Abb. 25 C). Nach 5 Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD41 (Marker der frühen Hämatopoese) und den pan-hämatopoetischen Marker CD45 analysiert. Rund 10% der Zellen waren positiv für CD41 und etwa 3% positiv für CD45 (Daten nicht gezeigt).

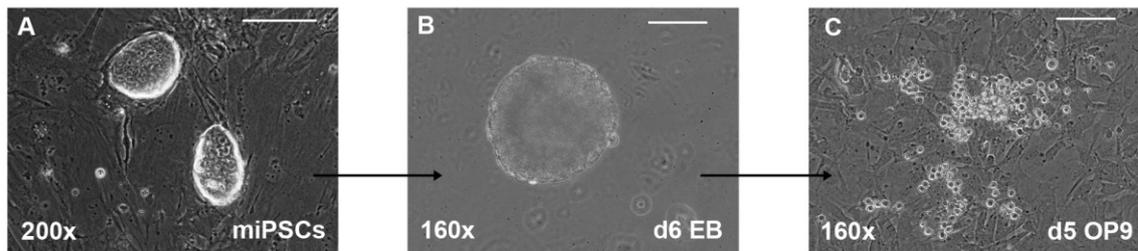


Abb. 25: Gerichtete hämatopoetische Differenzierung der iPS Zellen

Hämatopoetische Differenzierung über EB Formierung (A) Ko-kultivierte iPS Zellen aus der Maus, 100x Vergrößerung, (B) Tag 6 EB in Methylzellulose, 160x Vergrößerung, (C) Suspensionszellen ko-kultiviert mit OP9 Zellen, 160x Vergrößerung, Maßstabsbalcken = 100 μ m

Somit konnte gezeigt werden, dass Mausfibroblasten im Gegensatz zu den Weißbüschelaffenzellen mit hOKSM vollständig reprogrammiert werden konnten.

3.6 Einfluss der stöchiometrischen Verteilung der Reprogrammierungsfaktoren

Aus anderen Forschungsarbeiten ist bekannt, dass innerhalb eines polycistronischen Vektors die Anordnung der Gensequenzen der Transkriptionsfaktoren entscheidend für die Qualität der generierten iPS Zellen ist. Carey *et al.* vertauschten die Position von Sox2 und Klf4 auf einem polycistronischen Vektor (Reihenfolge: 5'-OSKM-3' anstatt 5'-OKSM-3') und generierten so iPS Zellen unterschiedlicher Qualitäten (Carey *et al.*, 2011). Demnach könnte die stöchiometrische Verteilung der Transkriptionsfaktoren auch die Reprogrammierung von *Callithrix jacchus* Zellen beeinflussen.

Deshalb wurden die endogenen Transkriptmengen von *POU5F1* (kodiert OCT4), *KLF4*, *SOX2* und *MYC* innerhalb der *Callithrix jacchus* ES Zelllinie cjes001 und der hES Zelllinie H1 gemessen und miteinander verglichen (Abb. 26).

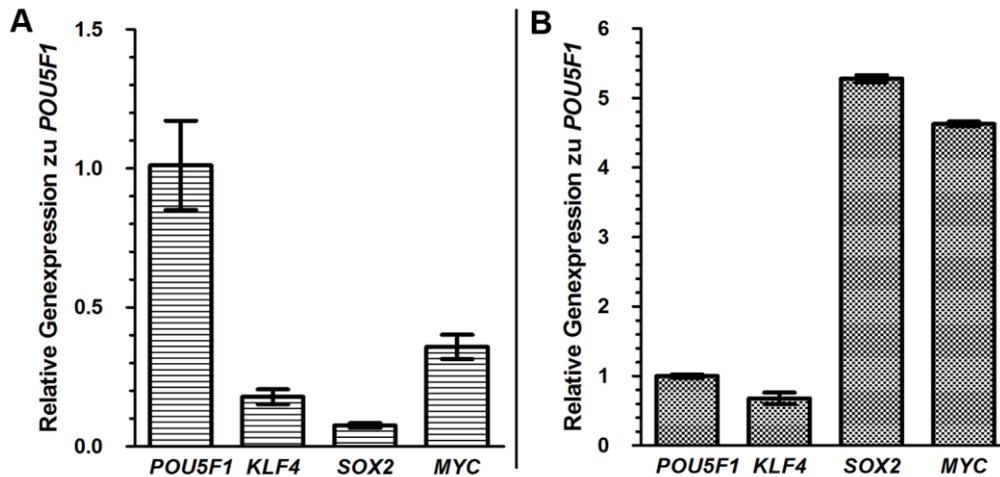


Abb. 26: Relative Transkriptmengen in den ES Zellen im Bezug zu *POU5F1*

Die Expression der Transkripte *POU5F1*, *KLF4*, *SOX2* und *MYC* wurden in ES Zellen des Weißbüschelaffen cjes001 (A) und in Zellen der humanen ES Zelllinie H1 (B) mittels qRT-PCR ermittelt. Die Expression wurde relativ zu *POU5F1* dargestellt. Die gezeigten Werte sind die aus Triplikaten gebildeten arithmetischen Mittelwerte \pm SD.

Bei den primaten ES Zellen wurde *POU5F1* im Vergleich zu *KLF4*, *SOX2* und *MYC* hoch exprimiert. In den hES Zellen hingegen war die Expression von *SOX2* und *MYC* am höchsten. Zur Aufrechterhaltung des pluripotenten Status wird in den beiden Systemen also eine andere stöchiometrische Verteilung der Transkriptionsfaktoren benötigt. Möglicherweise bedarf es demnach für eine vollständige Reprogrammierung der primaten Zellen einer anderen Verteilung der Yamanaka-Faktoren. Damit sich das stöchiometrische Verhältnis der Faktoren zueinander von selbst einstellen kann (Papapetrou *et al.*, 2009; Tiemann *et al.*, 2011), wurden die Transkriptionsfaktoren im weiteren Versuchsverlauf auf separaten Vektoren in die Zelle eingebracht.

3.7 Entkoppelte Transduktion von *Callithrix jacchus* Zellen mittels separater Reprogrammierungsvektoren

Für die Reprogrammierung mit separaten Vektoren wurden vier bicistronische lentivirale Vektoren verwendet, die jeweils die humane CDS eines Transkriptionsfaktors und die CDS eines Reportergens kodierten (vgl. Abb. 27). Mit Hilfe dieser Vektoren wurden bereits erfolgreich Mausfibroblasten reprogrammiert (Tiemann *et al.*, 2011).

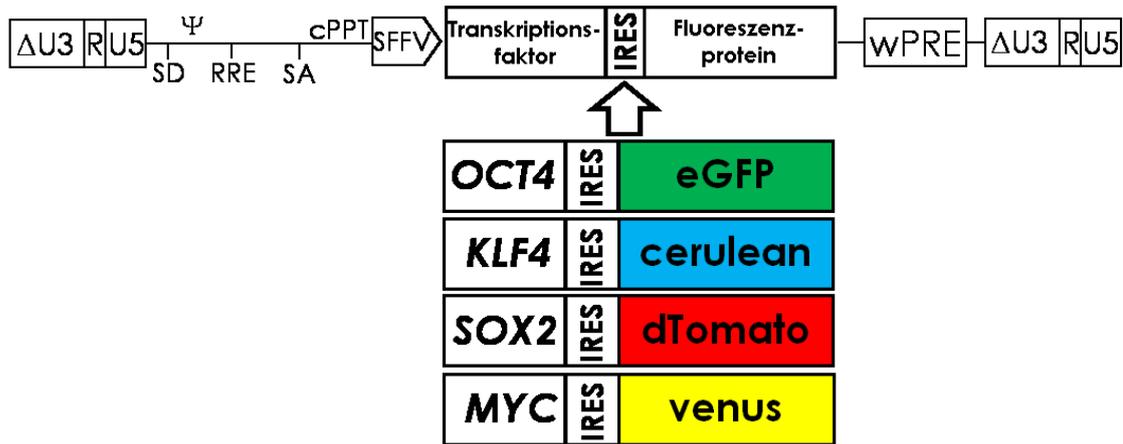


Abb. 27: Schematischer Aufbau der bicistronischen lentiviralen Reprogrammierungsvektoren

Jeder lentivirale Reprogrammierungsvektor kodiert die humane CDS eines Transkriptionsfaktors (OCT4, KLF4, SOX2, MYC) und eines Reportergens (eGFP, cerulean, dTomato, venus), die durch eine IRES-Sequenz getrennt sind.

3.7.1 Reprogrammierung mit 4 separaten lentiviralen Vektoren

Die Reprogrammierung der primaten Fibroblasten mit den 4 separaten Vektoren (4TF) erfolgte analog zur Reprogrammierung mit hOKSM (vgl. Abb. 9 und Abb. 21).

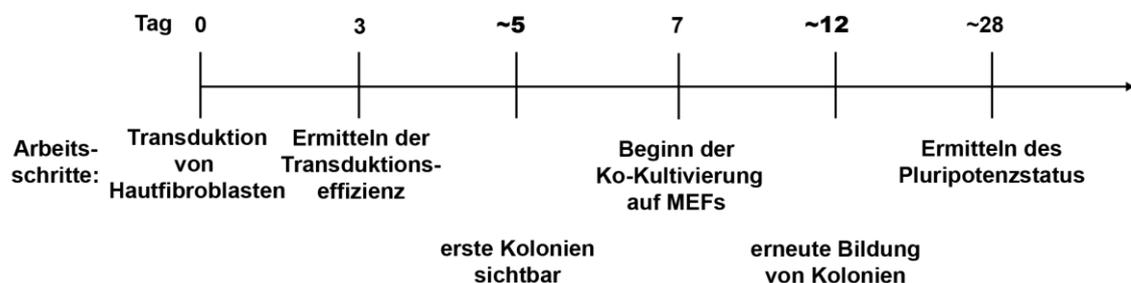


Abb. 28: Zeitstrahl der Reprogrammierung mit 4 separaten Vektoren

Nachdem die Zellen transduziert wurden, wurden sie ab Tag 7 mit γ MEFs ko-kultiviert und expandiert, so dass nach etwa 28 Tagen ausreichend Kolonien für die Pluripotenzenanalysen vorhanden waren.

An Tag 3 nach Transduktion wurde die Transduktionseffizienz ermittelt (vgl. Abb. 29). Die ersten Kolonien bildeten sich nach ungefähr fünf Tagen (vgl. Abb. 31). Ab dem siebten Tag wurde mit der Ko-Kultivierung auf γ MEFs und im Medium ESML+rhLIF begonnen. Anhand Reporterproteine konnte sowohl durchflusszytometrisch als auch mikroskopisch ermittelt werden, welche lentiviralen Vektoren in der Zielzelle exprimiert wurden (Weber *et al.*, 2011).

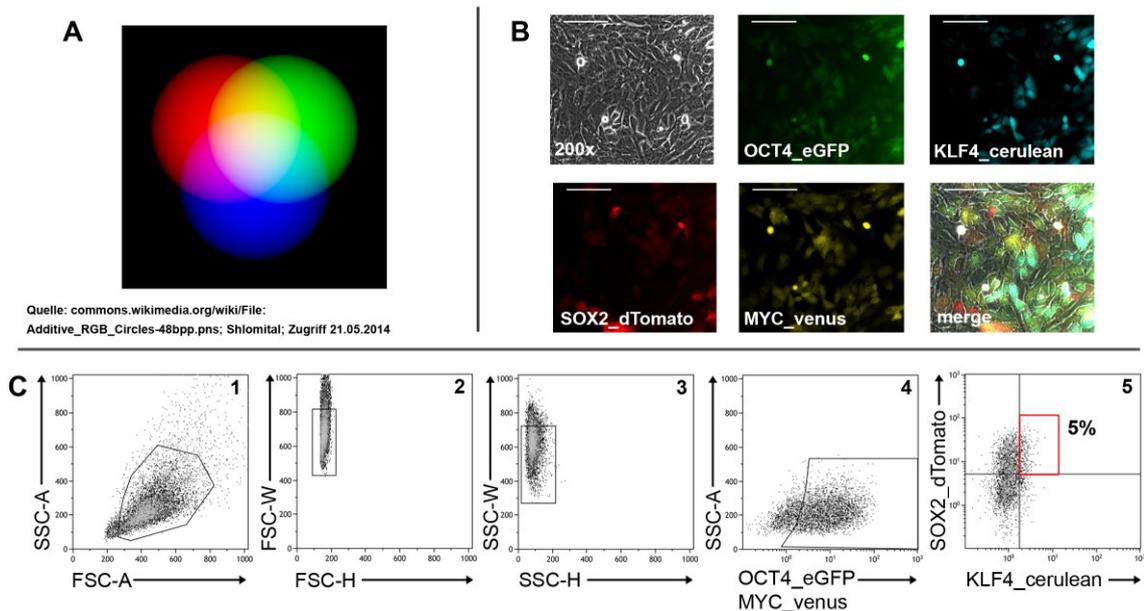


Abb. 29: Transduktionsnachweis mit Hilfe additiver Farbmischung

(A) Darstellung der additiven Farbmischung anhand eines Farbkreises. (B) Vierfach transduzierte Fibroblasten an Tag 3, Maßstabsbalken = 100 μ m, 200x Vergrößerung, (C) Durchflusszytometrische Ermittlung der vierfach transduzierten Zellen an Tag 3. 1-3: Ausschluss von Zelldebris und -aggregaten durch stufenweise Definition von Regionen, 4: Darstellung der OCT4_eGFP/MYC_venus exprimierenden Zellen, 5: Darstellung der OCT4_eGFP⁺ und/oder MYC_venus⁺ Zellen, die ebenfalls SOX2_dTomato und KLF4_cerulean exprimierten. (In diesem Beispiel 5% der Zellen.)

Durch die Überlagerung der Fluoreszenzen erschienen die vierfach transduzierten Zellen weiß (Abb. 29 B). Da bei den bicistronischen Vektoren die Sequenzen des Faktors und des Fluoreszenzproteins durch eine IRES-Sequenz getrennt waren, exprimierten beispielsweise grün fluoreszierende Zellen zusätzlich das Protein OCT4.

Mikroskopisch konnte zwischen den einzelnen Fluoreszenzproteinen eindeutig unterschieden werden, da für die Detektion des eGFP Signals der Filtersatz 38 (Anregung: BP470/40, Emission: BP525/50), für das cerulean Signal der Filtersatz 47HE (Anregung: BP436/25; Emission: BP480/40), für das dTomato Signal der Filtersatz 43 (Anregung: BP545/25, Emission: BP605/70) und für das venus Signal der Filtersatz 46 (Anregung: BP500/20, Emission: 535/30) verwendet wurden.

Zur Ermittlung der Transduktionseffizienz wurde die Expression der Fluoreszenzproteine durchflusszytometrisch gemessen: 5% der Zellen exprimierten drei der vier Transkriptionsfaktoren (Abb. 29 C). Allerdings konnte aufgrund des verwendeten Filtersatzes (LP502 und BP 530/30) nicht zwischen der Fluoreszenz von eGFP (Emission 507 nm) und venus (Emission 528 nm) unterschieden werden.

3.7.2 Charakterisierung der vierfach transduzierten primaten Zellen

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Pluripotenzanalysen der mit den separaten lentiviralen Vektoren transduzierten Weißbüschelaffenzellen dargestellt.

Morphologie der Kolonien

Bereits 5 Tage nach Transduktion bildeten sich erste Kolonien. Die nachfolgende Abbildung zeigt die typische Koloniemorphologie der vierfach transduzierten Zellen.

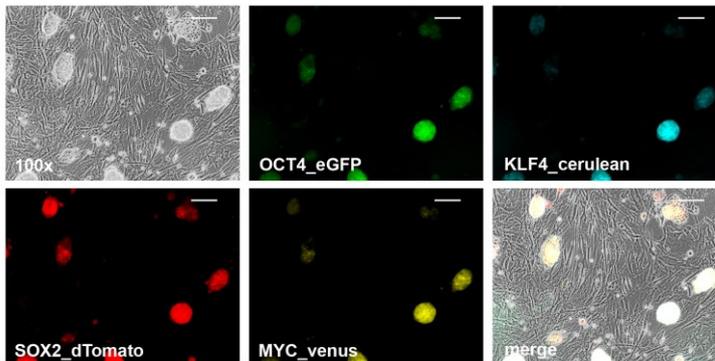


Abb. 30: Morphologie der vierfach transduzierten Zellen

Kolonien nach vierfacher Transduktion an Tag 31. Maßstabsbalken = 100 μ m, 100x Vergrößerung

Ein großer Teil der Zellen formierte kompakte und runde Kolonien, die sich deutlich von den Stromazellen abgrenzten. Dabei zeigten sie eine große Ähnlichkeit mit den ES Zellen des Weißbüschelaffen (vgl. Abb. 3 A)

Expression der lentiviralen Reportergene

Abbildung 31 wird zeigt die erfolgreiche Expression der verschiedenen Reportergene.

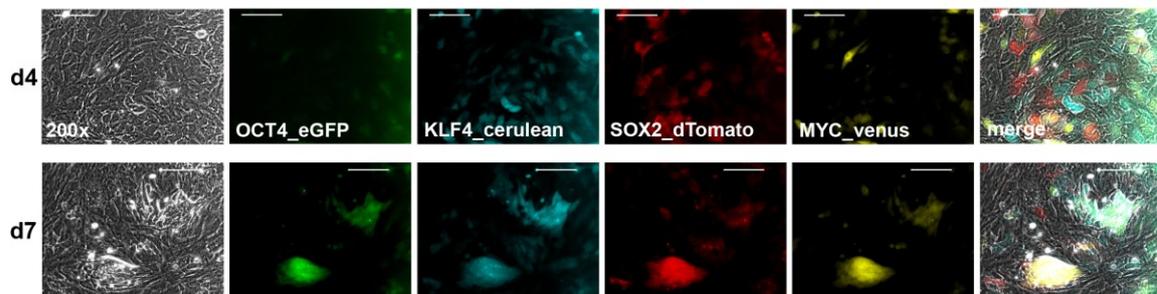


Abb. 31: Koloniebildung nach Vierfach-Transduktion

Tag 4 nach Transduktion: einfach und mehrfach transduzierte Zellen; Tag 7: erste Kolonien. Maßstabsbalken = 100 μ m, 200x Vergrößerung

An Tag 4 konnten einfach- und mehrfachtransduzierte Fibroblasten detektiert werden. An Tag 7 bildeten sich Kolonien (Abb. 31). Dabei wies die obere bläuliche Kolonie eine weniger starke Expression von *dTomato* und *venus* auf. Bei der nahezu weißen Kolonie (unten im Bild) wurden hingegen alle vier Expressionsvektoren in das Genom integriert.

Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Die transduzierten Zellen wurden auf die enzymatische Aktivität der Alkalischen Phosphatase untersucht.

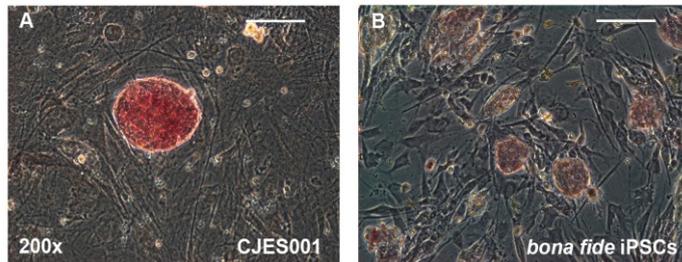


Abb. 32: Alkalische Phosphatase Färbung der vierfach transduzierten Kolonien
Tag 32 nach Transduktion. Positive AP Färbung der (A) cjes001 Kolonie und (B) der bona fide iPS Zellkolonien. Maßstabsbalken = 100 μ m, 200x Vergrößerung

Die mit den separaten Vektoren transduzierten Zellen und die primaten ES Zellen zeigten eine erhöhte Expression der Alkalischen Phosphatase (Abb. 32). Demnach hatten die vierfach transduzierten Zellen ihren fibroblastoiden Zustand verlassen.

Transkription ausgesuchter pluripotenzassoziierter Gene

Zur Analyse der endogenen Expression ausgewählter pluripotenzassoziierter Gene wurden Zellen der ES Zelllinie cjes001 (Passage 91), Hautfibroblasten (Passage 3) und vierfach transduzierte Zellen (28 Tage nach Transduktion) via qRT-PCR analysiert.

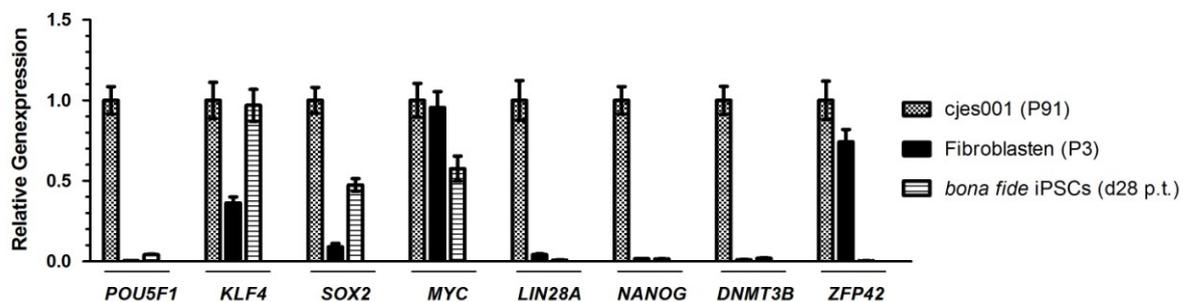


Abb. 33: Vergleichbare endogene Expression von KLF4

Tag 28 nach Transduktion: Die relativen Transkript-Mengen von *POU5F1*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *LIN28A*, *NANOG*, *DNMT3B* und *ZFP42* wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Expression der untersuchten Gene wurde über die Haushaltsgene *GAPDH* und *RPL13A* normalisiert. Die Expressionshöhen sind relativ zu der Expression in den cjes001 Zellen gezeigt, die auf 1 gesetzt wurde. Die dargestellten Werte sind die aus Triplikaten gebildeten arithmetischen Mittelwerte \pm SD.

Die Expression von *KLF4* in den reprogrammierten Zellen war mit der in den ES Zellen vergleichbar. Die Expression von *SOX2* war in den putativen iPS Zellen fünfmal höher als in den Fibroblasten, aber nur halb so hoch wie in den ES Zellen. Die Expression von *POU5F1* war in den reprogrammierten Zellen ebenfalls höher als in den Fibroblasten und geringer als in den cjes001 Zellen (rund ein Zehntel).

Da *POU5F1* gering und *LIN28A*, *NANOG*, *DNMT3B* und *ZFP42* nicht exprimiert wurden, waren die Zellen nicht vollständig reprogrammiert.

Expression pluripotenzassoziierter Oberflächenmoleküle

Die Expression der Oberflächenmoleküle SSEA4, SSEA3, GCTM-2, TRA-1-81 und TRA-1-60 wurde zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (d55, d60, d68 und d76) durchflusszytometrisch untersucht. Zusätzlich wurde die Expression der ektop eingebrachten Fluoreszenzproteine analysiert (Abb. 34 B).

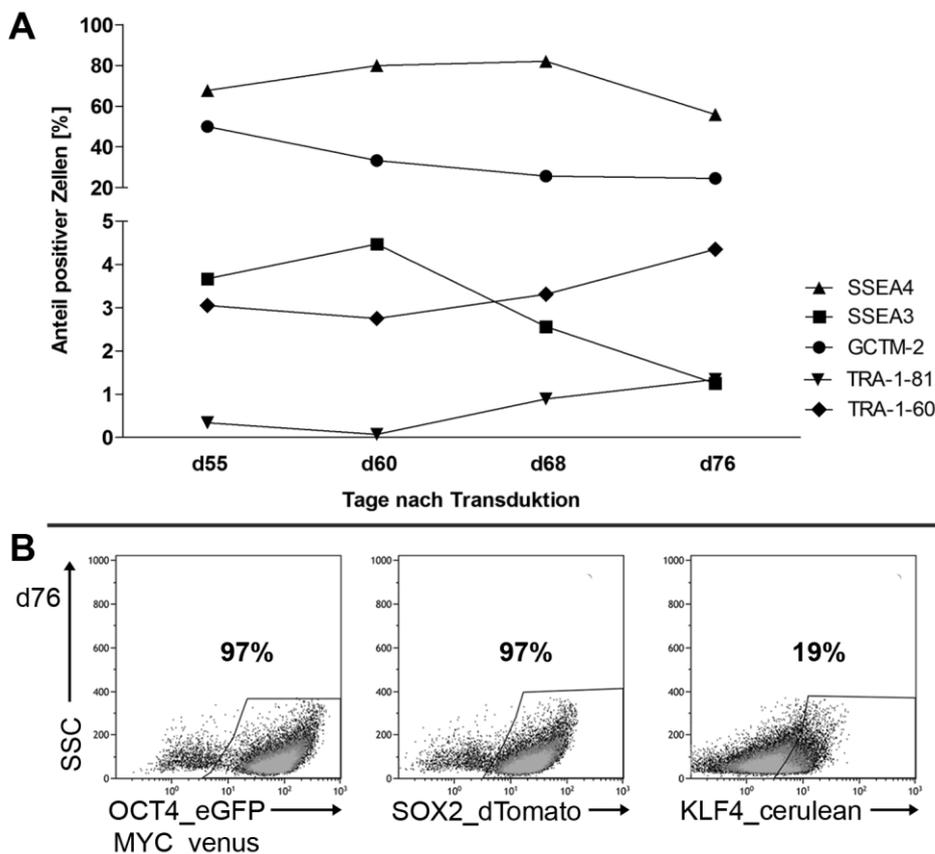


Abb. 34: Expression der Oberflächenmoleküle und Fluoreszenzproteine

(A) Durchflusszytometrisch gemessene Expression von SSEA4, SSEA3, GCTM-2, TRA-1-81 und TRA-1-60 in reprogrammierten Zellen über die Zeit; (B) Expression der Fluoreszenzproteine 76 Tage nach Transduktion

Über den dreiwöchigen Untersuchungszeitraum wurde eine nahezu gleichbleibende Expression der unterschiedlichen Oberflächenmoleküle ermittelt (Abb. 34). Während der Anteil an SSEA4 und SSEA3 exprimierenden Zellen abnahm, erhöhte sich der Anteil an TRA-1-60⁺ und TRA-1-81⁺ Zellen. Allerdings wurden die TRA-Marker lediglich von einem geringen Teil der Zellen exprimiert. Auch noch 76 Tage nach Transduktion konnte die Expression der Fluoreszenzproteine detektiert werden. Somit wurden die lentiviralen Vektoren nicht abgeschaltet.

Einfluss von Hypoxie auf die Reprogrammierung mit 4 separaten lentiviralen Expressionsvektoren

Um eine spontane ungerichtete Differenzierung von hES Zellen zu verhindern, können diese unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂, 5% CO₂) kultiviert werden (Ezashi *et al.*, 2005). Zudem können MEFs unter Hypoxie effizienter reprogrammiert werden (Yoshida *et al.*, 2009). Deshalb wurden die reprogrammierten Weißbüschelaffenzellen unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂, 5% CO₂) und bei 37°C in gesättigter H₂O Atmosphäre kultiviert. Dabei wurden Zellen des Weißbüschelaffen #15997 (5 Tage) verwendet.

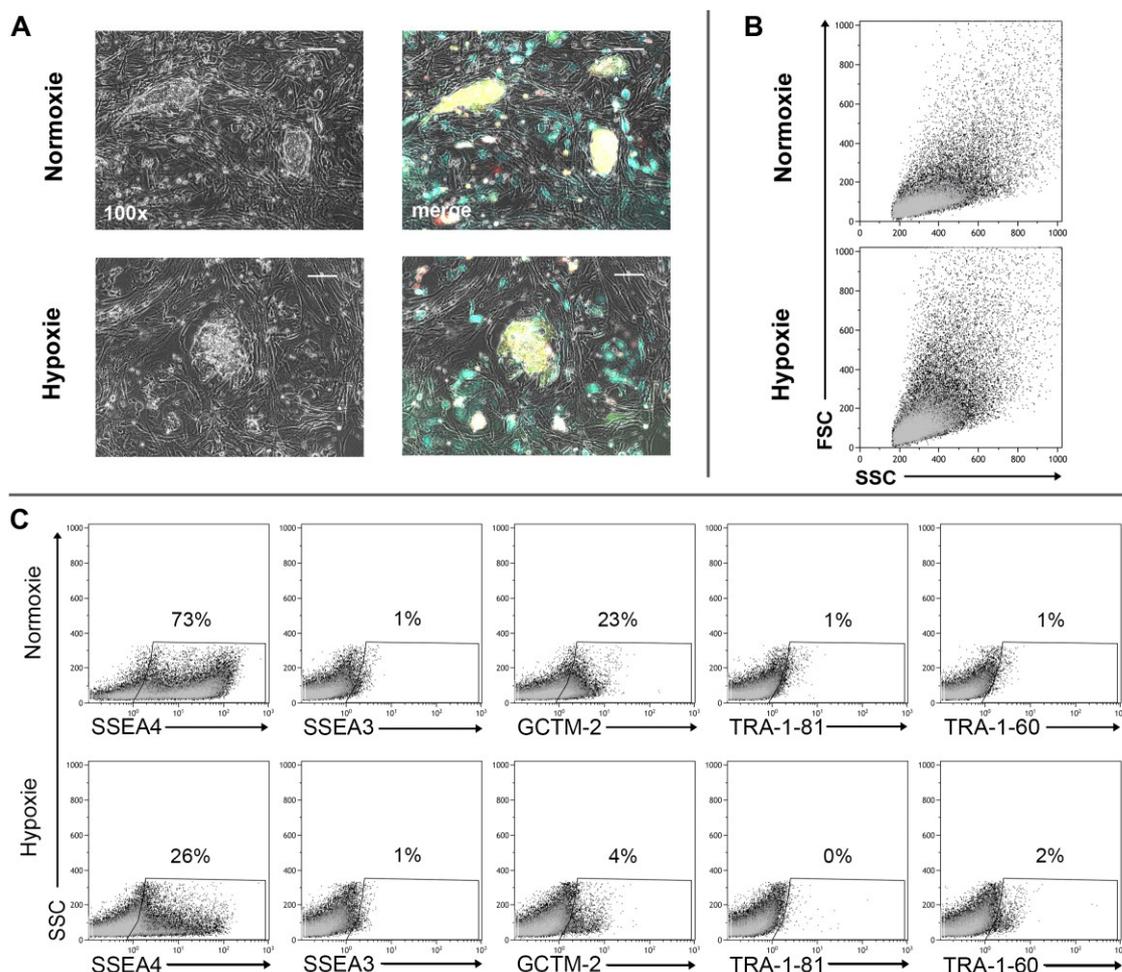


Abb. 35: Einfluss hypoxischer Kulturbedingungen auf die Reprogrammierung
 (A) Tag 15 nach Transduktion. Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie Bildung von morphologisch ähnlichen Kolonien; Maßstabsbalken = 100 µm; 100x Vergrößerung; (B) Tag 49 nach Transduktion: Zellpopulation in FSC vs. SSC unter Normoxie und Hypoxie. (C) Tag 49: Anteil an positiven Zellen für die getesteten Oberflächenmoleküle unter Normoxie und Hypoxie

Nach etwa 10 Tagen bildeten sich erste Kolonien (Abb. 35 A). Bei der durchflusszytometrischen Messung zeigte sich, dass die unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Zellen größer waren als die normoxisch kultivierten Zellen (Abb. 35 B).

Die Messung der Expression der unterschiedlichen Oberflächenmoleküle ergab, dass ein höherer Anteil der unter normoxischen Bedingungen kultivierten Zellen SSEA4 exprimierte als hypoxisch kultivierte Zellen (Abb. 35 C). Dies gilt, wenn auch in geringem Maße, ebenso für GCTM-2 exprimierende Zellen. Allerdings konnte bei den hypoxisch kultivierten Zellen ein höherer Anteil an TRA-1-60⁺ Zellen gemessen werden. Demnach hatte eine Verminderung des Sauerstoffdrucks keine positiven Auswirkungen auf den 4TF-Reprogrammierungsprozess.

3.8 Einfluss von Stöchiometrie und Epigenetik

Scheinbar ist die Überexpression der vier verwendeten Transkriptionsfaktoren nicht ausreichend, um somatische Zellen des Weißbüschelaffen vollständig zu reprogrammieren. Deshalb wurde der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Azacytidin zur Manipulation des Chromatinstatus zu den Zellen gegeben (vgl. Kapitel 3.3).

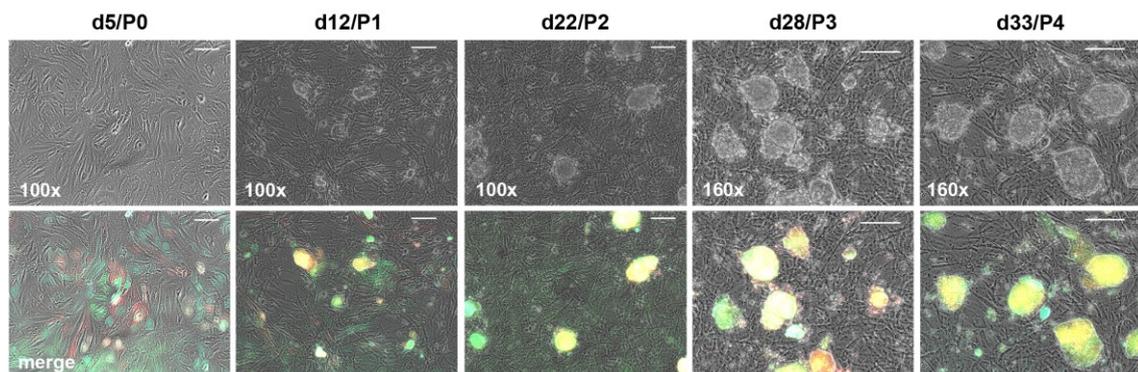


Abb. 36: 4TF transduzierte Zellen ohne Zusatz von 5-AZA

In der Überlagerung aller Fluoreszenzen (merge) ist zu erkennen, dass sich die Spannbreite der unterschiedlichen Farbnuancen im Laufe der Zeit verringerte und sich die Fluoreszenz der Kolonien in einem schmalen Farbbereich einpendelte; Maßstabsbalken = 100 μ m, Tag 5, 12 und 22: 100x Vergrößerung, Tag 28 und 33: 160x Vergrößerung

Ohne Zugabe von 5-AZA spielte sich die additive Farbmischung der Fluoreszenzen in einem schmalen Farbbereich ab (Abb. 36). Demnach wurden die ektop eingebrachten Faktoren in allen Zellen in einem ähnlichen Verhältnis zueinander exprimiert. Um die Variation der Expressionsverhältnisse und somit die Wahrscheinlichkeit eines für die Reprogrammierung optimalen stöchiometrischen Verhältnisses der Transkriptionsfaktoren zu erhöhen, wurde 5-AZA zu den Zellen gegeben.

3.8.1 Einfluss von DNA-Methylierung auf die Reprogrammierungseffizienz mit vier separaten Expressionsvektoren

Um zu testen, ob die Weißbüschelaffenzellen (#15997) durch eine Kombination von unabhängigen Reprogrammierungsvektoren und einem DNA-Methyltransferase-Inhibitor vollständig reprogrammiert werden können, wurden 10 Tage nach Transduktion zwei Mal 5-AZA für 48 Stunden ins Medium hinzugefügt. Dabei wurden zwei verschiedenen Konzentrationen (0,5 μM und 5 μM) verwendet. Zudem wurden die Zellen sowohl unter normoxischen (20% O_2 , 5% CO_2) als auch hypoxischen (3% O_2 , 5% CO_2) Bedingungen kultiviert.

3.8.2 Charakterisierung der vierfach transduzierten Zellen nach Demethylierung

Im nachfolgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Pluripotenzanalyse nach der Verwendung von 5-AZA unter Normoxie und Hypoxie dargestellt.

Morphologie der Kolonien

49 Tage nach Beginn der Reprogrammierung und 37 Tage nach zweimaliger Zugabe von 5-AZA wurden die Kolonien hinsichtlich ihrer Morphologie begutachtet.

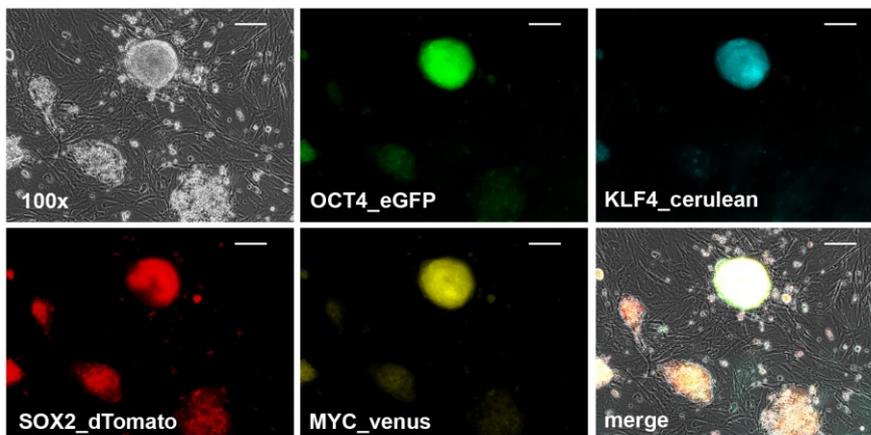


Abb. 37: Morphologie der vierfach transduzierten Kolonien nach Zugabe von 5-AZA
Beispielhafte Darstellung von mit 5-AZA behandelten Kolonien. Tag 49 nach Transduktion und zweifacher Zugabe von 5 μM 5-AZA. Maßstabsbalken = 100 μm , 100x Vergrößerung

Dabei bildeten sich sowohl kompakte als auch weniger kompakte Kolonien, die sich zum Teil in der Zusammensetzung der sichtbaren Fluoreszenzproteine unterschieden.

Expression der lentiviralen Reportergene

Nach Zugabe von 5-AZA zeigten die mikroskopischen Aufnahmen der Kolonien veränderte Farbspektren.

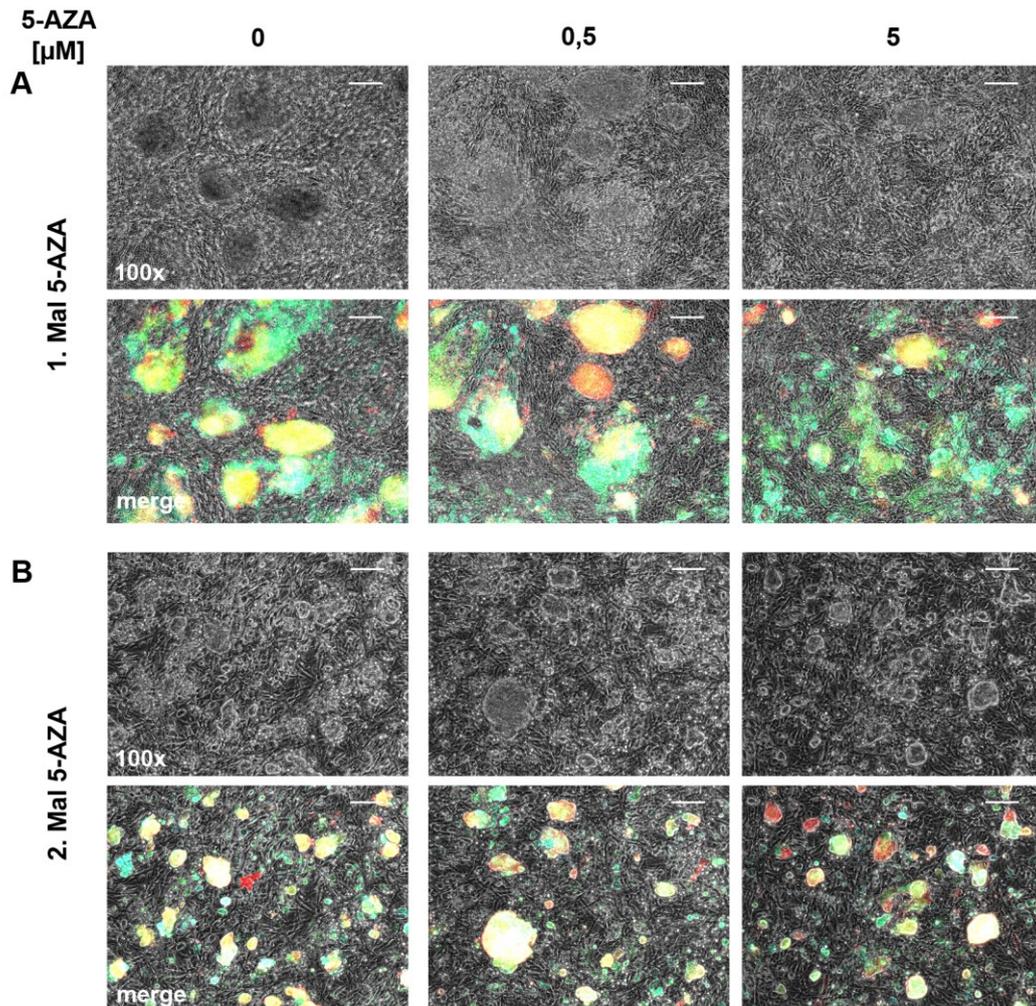


Abb. 38: Zugabe von 5-AZA erweitert das Farbspektrum der Kolonien

(A) Tag 17 nach Transduktion und erster Zugabe von 5-AZA. (B) Tag 21 nach Transduktion und zweite Zugabe von 5-AZA für 48 h. Maßstabsbalken = 100 μm , 100x Vergrößerung

Nach der ersten Zugabe von 0,5 μM 5-AZA erschien ein Teil der Kolonien nicht mehr gelbgrün, sondern orange oder blau. Die zweite Zugabe des Inhibitors führte zu einer weiteren Vergrößerung des Farbspektrums: Neben weißlichgelben Kolonien bildeten sich auch orange, blau und rot fluoreszierende Kolonien. Demnach trägt die Zugabe von 5-AZA dazu bei, die stöchiometrische Verteilung der Transkriptionsfaktoren in den Zellen zu variieren.

Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurden normoxisch und hypoxisch kultivierte und mit 5-AZA behandelte Zellen gefärbt.

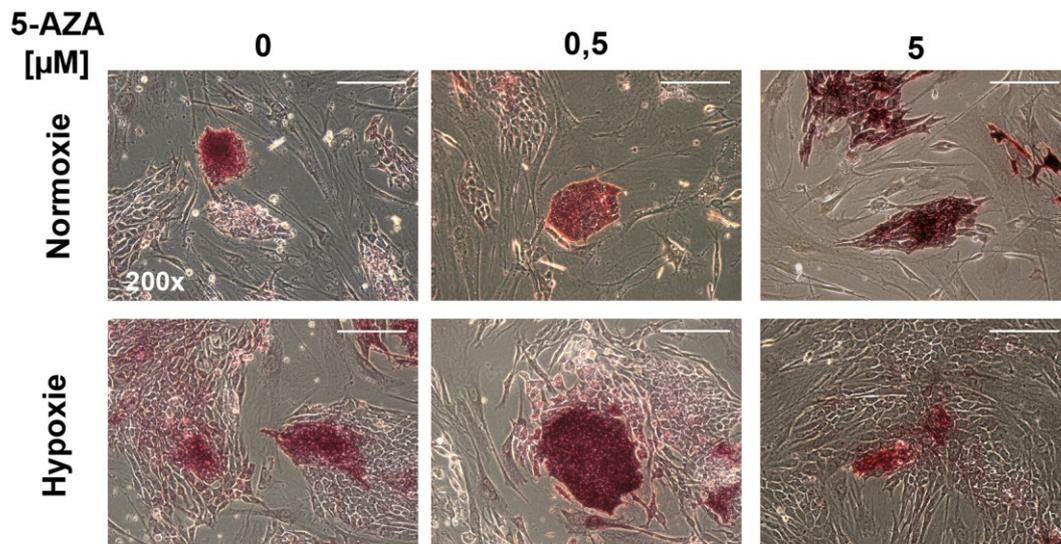


Abb. 39: Erhöhte Alkalische Phosphatase Aktivität nach Zugabe von 5-AZA
 Tag 90 nach Transduktion mit 0 μM , 0,5 μM und 5 μM 5-AZA unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Maßstabsbalken = 100 μm , 200x Vergrößerung

Sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen bildeten sich kompakte Kolonien. Allerdings begannen die Kolonien unter Hypoxie an den Rändern ungerichtet zu differenzieren. Die kompakten Kolonien waren unabhängig von den Kulturbedingungen lila-violett gefärbt, was auf eine erhöhte Aktivität der AP hindeutete. Die Zugabe von 5-AZA (in verschiedenen Konzentrationen) schien keinen Einfluss auf die AP-Aktivität zu haben.

Expression pluripotenzassoziierter Oberflächenmoleküle

10 Tage nach Transduktion der *Callithrix jacchus* Zellen wurde der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-AZA in verschiedenen Konzentrationen und Intervallen zu den Zellen gegeben (0,5 μM und 5 μM ; vier bzw. sechs Mal für 48 h). Anschließend wurde die Expression der Oberflächenmoleküle SSEA4, SSEA3, GCTM-2, TRA-1-81 und TRA-1-60 durchflusszytometrisch gemessen.

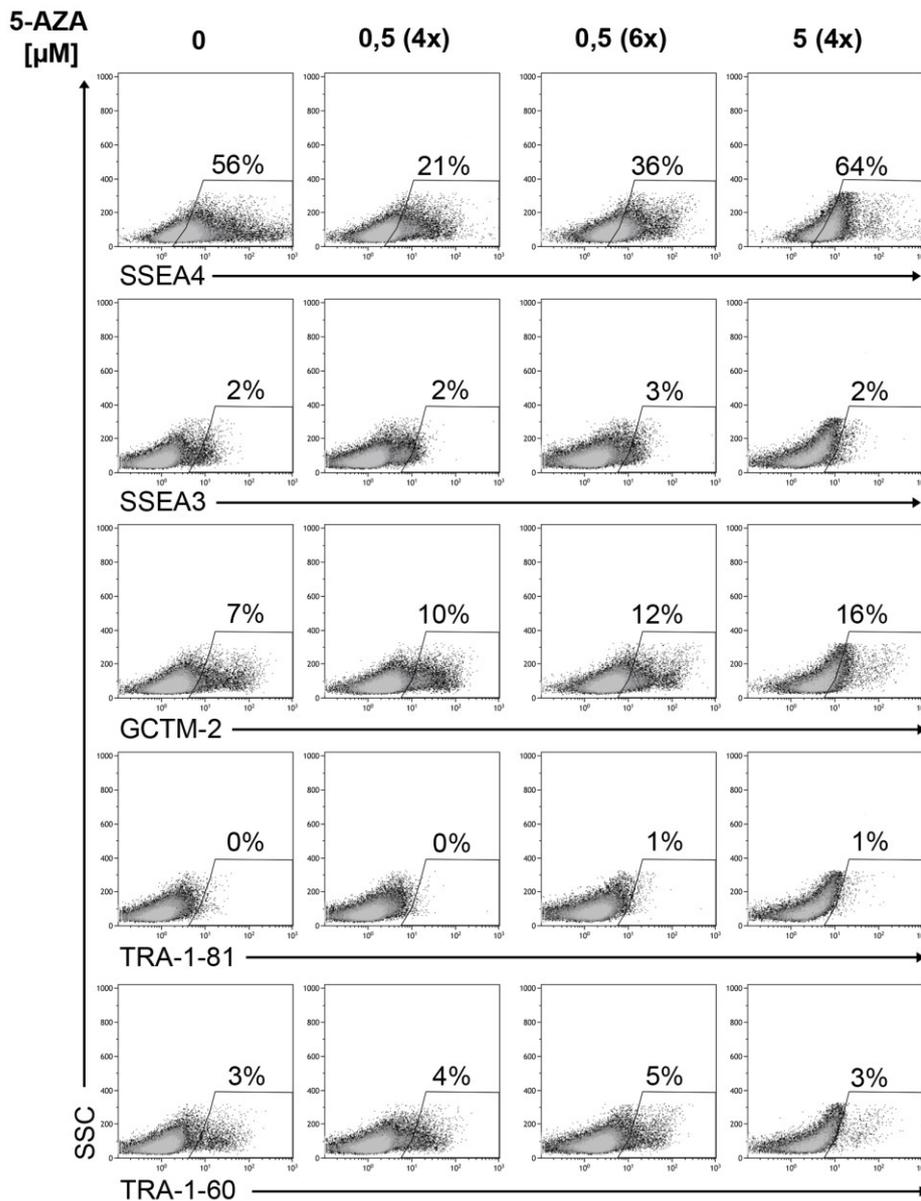


Abb. 40: Einfluss von 5-AZA auf die Expression von Oberflächenmolekülen (normoxisch)

Tag 61 nach Transduktion. Durchflusszytometrische Analyse mit und ohne Einfluss von 5-AZA in unterschiedlichen Konzentrationen: 4- bzw. 6-mal 0,5 μM sowie 4-mal 5 μM für je 48 h.

Die Zugabe des Inhibitors zu den normoxisch kultivierten *bona fide* iPS Zellen führte zu keinem größeren Anteil an Zellen, die die untersuchten Oberflächenmoleküle exprimierten (vgl. Abb. 40). Bei der Zugabe von 5 μM 5-AZA stieg der Anteil an SSEA4⁺ Zellen lediglich von 56% auf 64%. Wurde eine geringere Konzentration des Inhibitors verwendet, war der Anteil an SSEA4 exprimierenden Zellen sogar geringer. Die anderen Oberflächenmoleküle, vor allem die TRA-Marker, wurden nur von einem kleinen Teil der mit 5-AZA behandelten Zellen exprimiert.

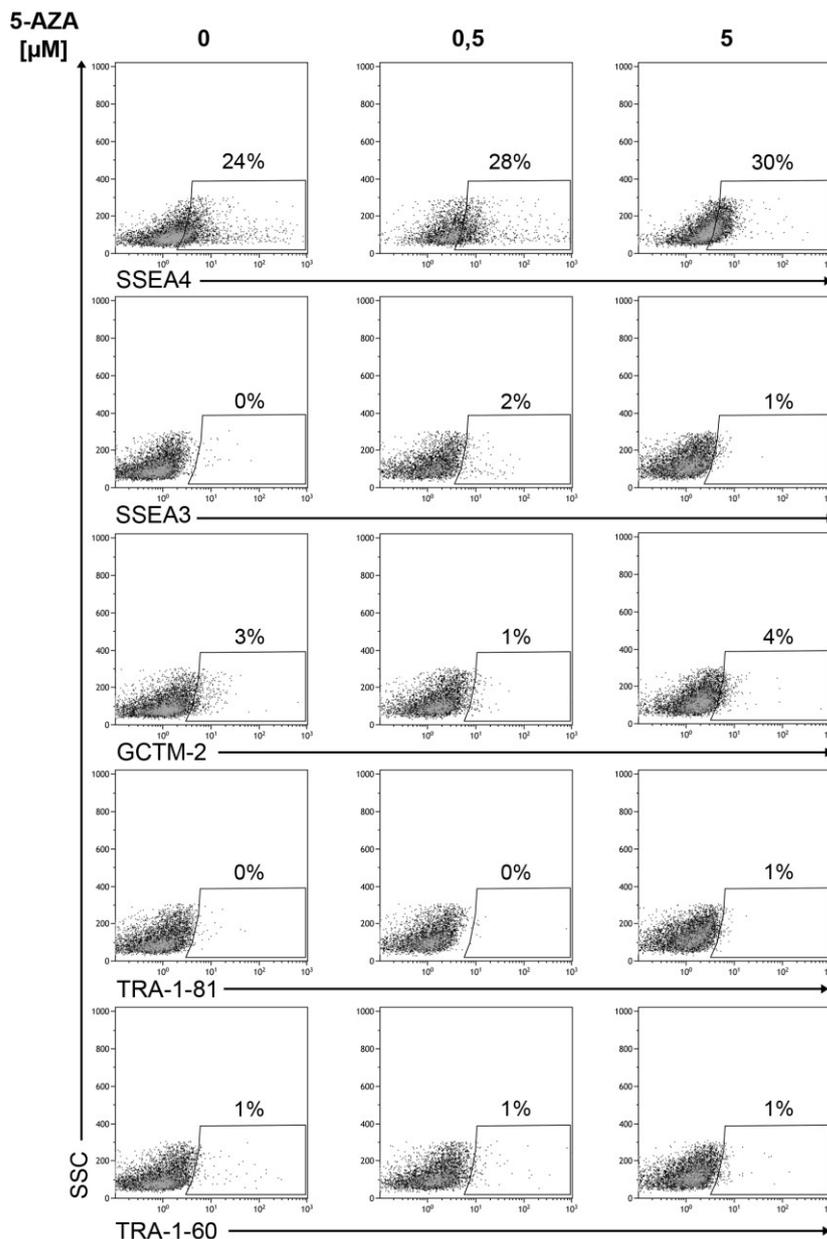


Abb. 41: Einfluss von 5-AZA auf die Expression von Oberflächenmolekülen (hypoxisch)

Tag 83 nach Transduktion. Durchflusszytometrische Analyse mit und ohne Einfluss von 5-AZA in unterschiedlichen Konzentrationen: 4-mal 0,5 µM und 4-mal 5 µM für je 48 h.

Ähnlich wie bei den normoxisch kultivierten *bona fide* iPS Zellen zeigte der Inhibitor auch bei den hypoxisch kultivierten Zellen keinen Effekt auf die Oberflächenexpression (vgl. Abb. 41). Zwar konnte der Anteil an SSEA4⁺ Zellen von 24% auf 30% gesteigert werden, dieser Effekt konnte bei der Expression der anderen Oberflächenmoleküle jedoch nicht beobachtet werden.

Transkription ausgesuchter pluripotenzassoziierter Gene

Zur weiteren Charakterisierung der mit 5-AZA behandelten Zellen wurden diese via qRT-PCR auf die Transkription unterschiedlicher Gene untersucht.

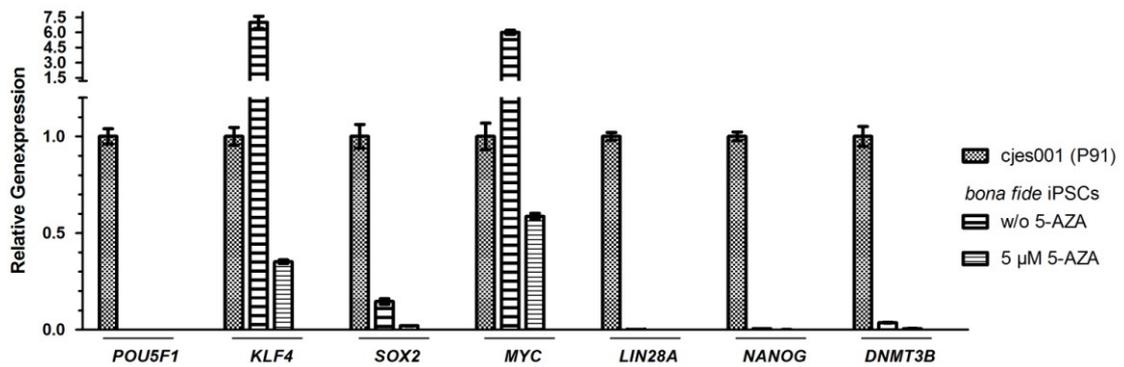


Abb. 42: Keine erhöhte Expression der pluripotenzassoziierten Faktoren nach Zugabe von 5-AZA (normoxisch)

Tag 47 nach Transduktion. Die relativen Transkript-Mengen von *POU5F1*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *LIN28A*, *NANOG* und *DNMT3B* wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Die Expression der untersuchten Gene wurde über die Haushaltsgene *GAPDH* und *RPL13A* normalisiert. Die Expressionshöhen sind relativ zur Expression in *cjes001* Zellen gezeigt, die auf 1 gesetzt wurde. Die dargestellten Werte sind die aus Triplikaten gebildeten arithmetischen Mittelwerte +/- SD.

Die normoxisch kultivierten und nicht mit 5-AZA behandelten Zellen zeigten eine vergleichsweise hohe Expression von *KLF4* und *MYC* (Abb. 42). Die mit 5-AZA kultivierten Zellen zeigten hingegen eine reduzierte Expression von *KLF4* und *MYC*. Die Expression von *SOX2* und *DNMT3B* wurden nur in geringem Maße detektiert. Die weiteren analysierten Gene wurden weder in den unbehandelten noch in den mit 5-AZA kultivierten Zellen induziert. Demnach wurde die unter Normoxie durchgeführte Reprogrammierung durch die Zugabe des Inhibitors nicht befördert.

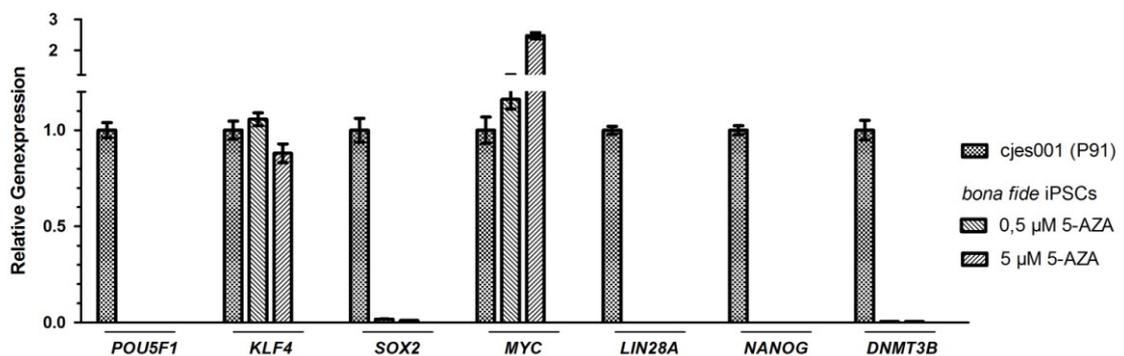


Abb. 43: Ähnlich hohe Expression von *KLF4* nach Zugabe von 5-AZA (hypoxisch)

Tag 49 nach Transduktion. Die relativen Transkript-Mengen von *POU5F1*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *LIN28A*, *NANOG* und *DNMT3B* wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Die Expression der untersuchten Gene wurde über die Haushaltsgene *GAPDH* und *RPL13A* normalisiert. Die Expressionshöhen sind relativ zu der Expression in *Callithrix jacchus* ES Zellen gezeigt, die auf 1 gesetzt wurde. Die dargestellten Werte sind die aus Triplikaten gebildeten arithmetischen Mittelwerte +/- SD.

Unter hypoxischen Bedingungen induzierte die Zugabe von 5-AZA die Expression von *KLF4* und *MYC*. Diese lagen nach Zugabe von 0,5 µM 5-AZA näher am Vergleichswert

1 als bei der Zugabe von 5 μ M. Alle anderen Gene wurden, unabhängig von der Konzentration des Inhibitors, jedoch nicht induziert. Demzufolge zeitigte die Zugabe von 5-AZA auch unter Hypoxie keine positive Wirkung auf den Reprogrammierungsprozess.

3.9 Transduktion der *Callithrix jacchus* Zellen mit LIN28A

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Verwendung der vier Yamanaka-Faktoren nicht ausreichte, um *Callithrix jacchus* Fibroblasten vollständig zu reprogrammieren. Allerdings können zur Reprogrammierung auch andere Faktoren verwendet werden. So wurden humane Fibroblasten mit den Faktoren OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 in iPS Zellen transformiert (Yu *et al.*, 2007). Besonders LIN28 ist für die Reprogrammierung fetaler Leberzellen des Weißbüschelaffen unverzichtbar (Tomioka *et al.*, 2010). Deshalb wurde LIN28A sowohl nach erfolgter 4TF-Transduktion nachträglich in die teilreprogrammierten Zellen transduziert (Kapitel 3.9.1) als auch gemeinsam mit den Yamanaka-Faktoren zur Transduktion der primaten Zellen verwendet (Kapitel 3.9.2).

3.9.1 Einfluss von LIN28A auf partiell reprogrammierte Zellen

Nach der zusätzlichen Transduktion der 4TF-transduzierten, teilreprogrammierten Zellen mit dem LIN28A-Expressionsvektor wurde diese charakterisiert.

Morphologie der Kolonien/Expression der lentiviralen Reportergene

Abbildung 44 zeigt sowohl die Kolonien der 4TF-transduzierten als auch die der zusätzlich mit LIN28A transduzierten Zellen.

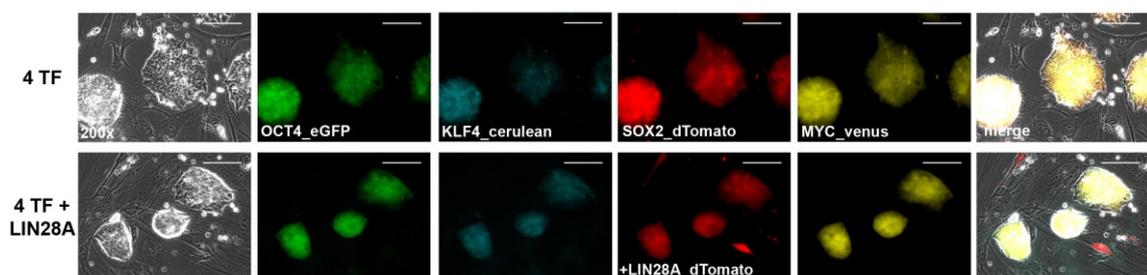


Abb. 44: Transduktion teilreprogrammierter Zellen mit LIN28_dTomato

Tag 151 nach Transduktion und 14 Tage nach der zusätzlichen Transduktion mit LIN28_dTomato. Maßstabsbalken = 100 μ m, 200x Vergrößerung

Unabhängig von der Art und Weise der Transduktion bildeten sich runde, kompakte Kolonien, die sich deutlich von ihrer Umgebung abgrenzten. Eine erfolgreiche Transduktion mit dem LIN28A-Expressionsvektor konnte allerdings mikroskopisch nicht ermittelt werden, da die Expressionsvektoren, die LIN28A und SOX2 exprimierten, beide dTomato kodierten.

Expression pluripotenzassoziierter Oberflächenmoleküle

Die vierfach transduzierten Zellen sowie die nachträglich mit LIN28A transduzierten teilreprogrammierten Zellen wurden an drei Tagen auf die Expression von SSEA4, SSEA3, GCTM-2, TRA-1-81, TRA-1-60 und E-Cadherin hin untersucht (Abb. 45).

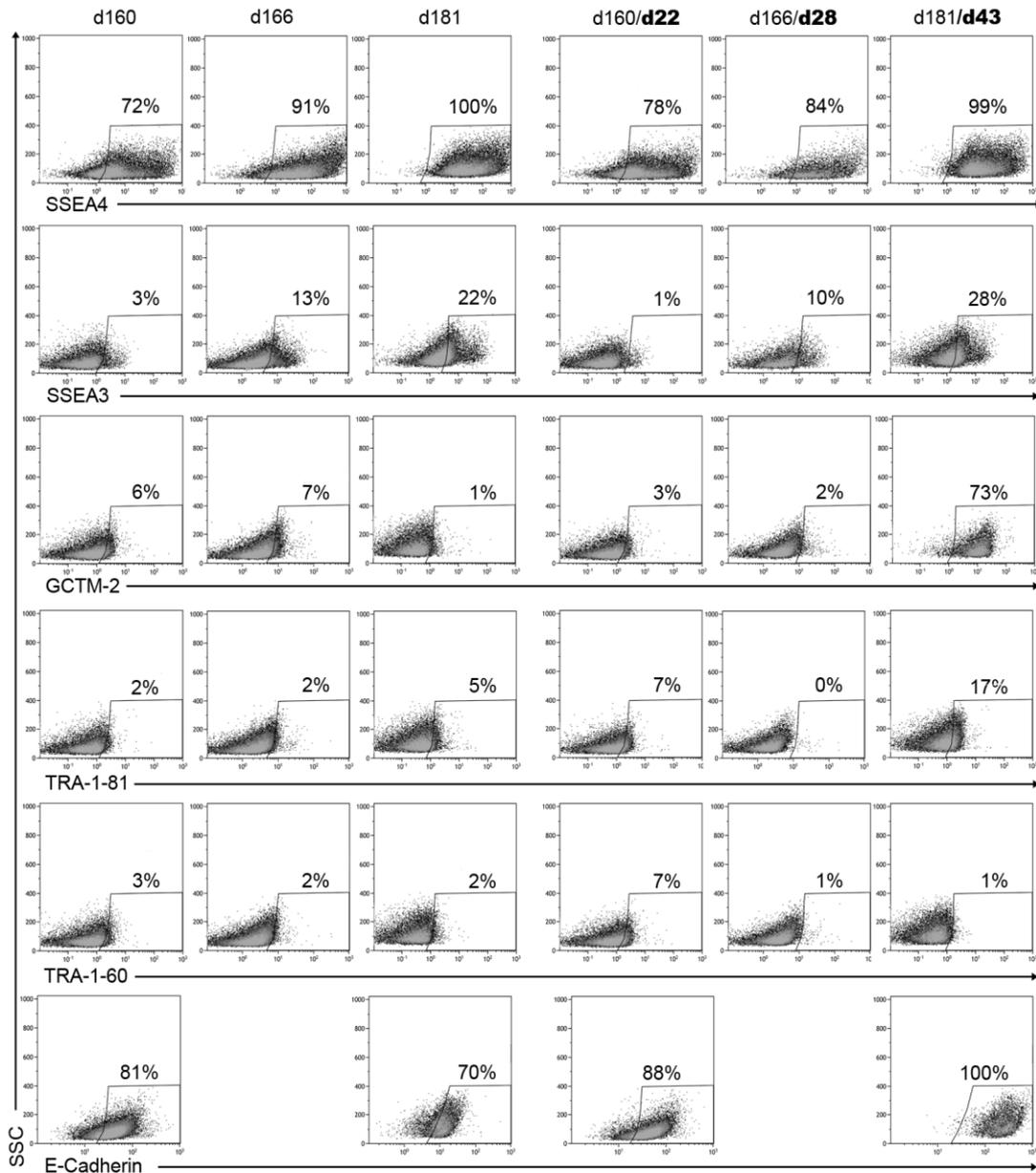


Abb. 45: Nachträgliche Transduktion mit LIN28A erhöht Anteil an Oberflächenmarker exprimierenden Zellen

Tag 137 nach Transduktion. Durchflusszytometrische Messung von vierfach und zusätzlich mit LIN28 transduzierte Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Nach viermonatiger Kultivierung exprimierten alle vierfach transduzierten sowie alle nachträglich mit dem *LIN28A*-Expressionsvektor transduzierten Zellen SSEA4. Allerdings exprimierte ein höherer Anteil an *LIN28A*-transduzierten Zellen GCTM-2 (73%),

TRA-1-81 (17%) und E-Cadherin (100%). Demnach wirkt sich die zusätzliche Transduktion mit LIN28A positiv auf den Reprogrammierungsprozess aus.

3.9.2 Reprogrammierung mit 5 separaten lentiviralen Vektoren

Die somatischen Fibroblasten des Weißbüschelaffen wurden zudem mit allen fünf bicistronischen lentiviralen Expressionsvektoren direkt transduziert (5TF) und sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen kultiviert.

Morphologie der Kolonien/Expression der lentiviralen Reportergene

Sowohl die vierfach als auch die fünffach transduzierten Zellen formten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen Kolonien, die sich deutlich von den Stromazellen abgrenzten. (Abb. 46).

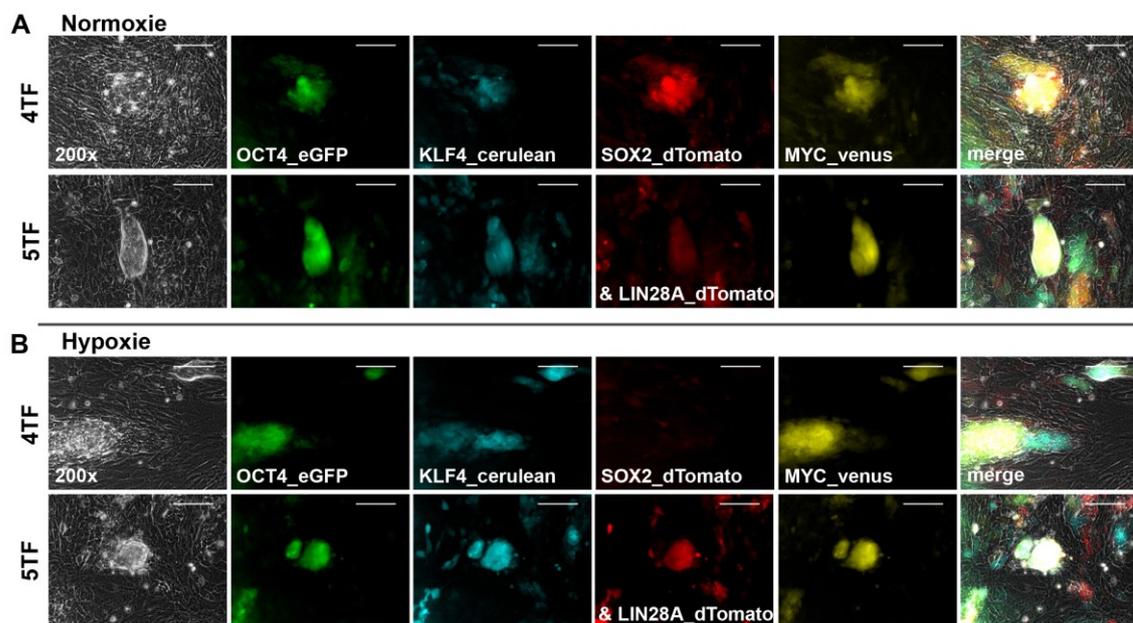


Abb. 46: 4TF- und 5TF-transduzierte Zellen unter Normoxie und Hypoxie

Tag 7 nach Transduktion. 4TF: OCT4, SOX2, KLF4 und MYC, 5TF: OCT4, SOX2, KLF4, MYC und LIN28. Maßstabsbalken = 100 μ m, 200x Vergrößerung

Die fünffach transduzierten Zellen bildeten kompaktere Kolonien als die 4-TF-transduzierten Zellen aus. Die mikroskopische Analyse zeigte, dass alle Zellen die unterschiedlichen Reporterfluoreszenzgene exprimierten. Eine erfolgreiche Transduktion mit LIN28A konnte wie in den Versuchen zuvor mikroskopisch nicht nachgewiesen werden, da die Expressionsvektoren, die LIN28A und SOX2 exprimierten, beide *dTomato* kodierten (s. untere Bildreihe).

Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Zur weiteren Charakterisierung der putativen iPS Zellen wurde die Expression der Alkalischen Phosphatase bestimmt.

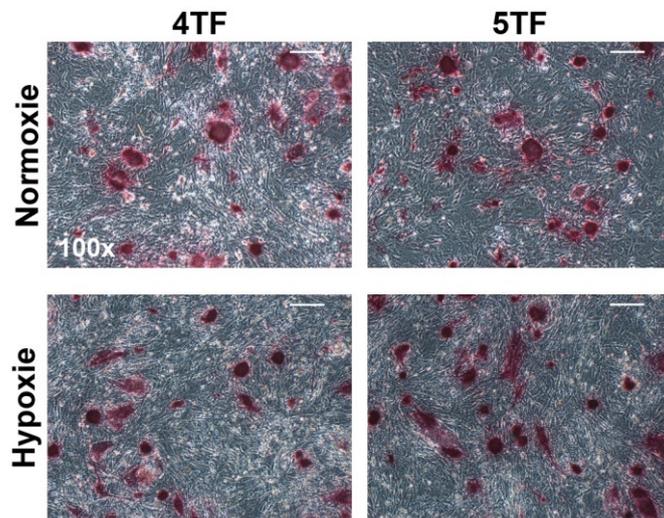


Abb. 47: Expression Alkalischer Phosphatase bei 4TF- und 5TF-transduzierten Zellen

Tag 18 nach Transduktion. Kulturbedingungen: hypoxisch/normoxisch, 4TF: OCT4, SOX2, KLF4 und MYC, 5TF: OCT4, SOX2, KLF4, MYC und LIN28. Maßstabsbalken = 100 μ m, 100x Vergrößerung

Sowohl die 4TF- als auch die 5TF-transduzierten Zellen zeigten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Expression der Alkalischen Phosphatase.

Expression pluripotenzassoziierter Oberflächenmoleküle

Die putativen iPS Zellen, die mit Hilfe einer Überexpression von 4 bzw. 5 Faktoren generiert wurden, wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von SSEA4, SSEA3, GCTM-2, TRA-1-81, TRA-1-60 und E-Cadherin untersucht. Dabei wurden die sowohl normoxisch als auch hypoxisch kultivierten Zellen an drei unterschiedlichen Tagen gemessen.

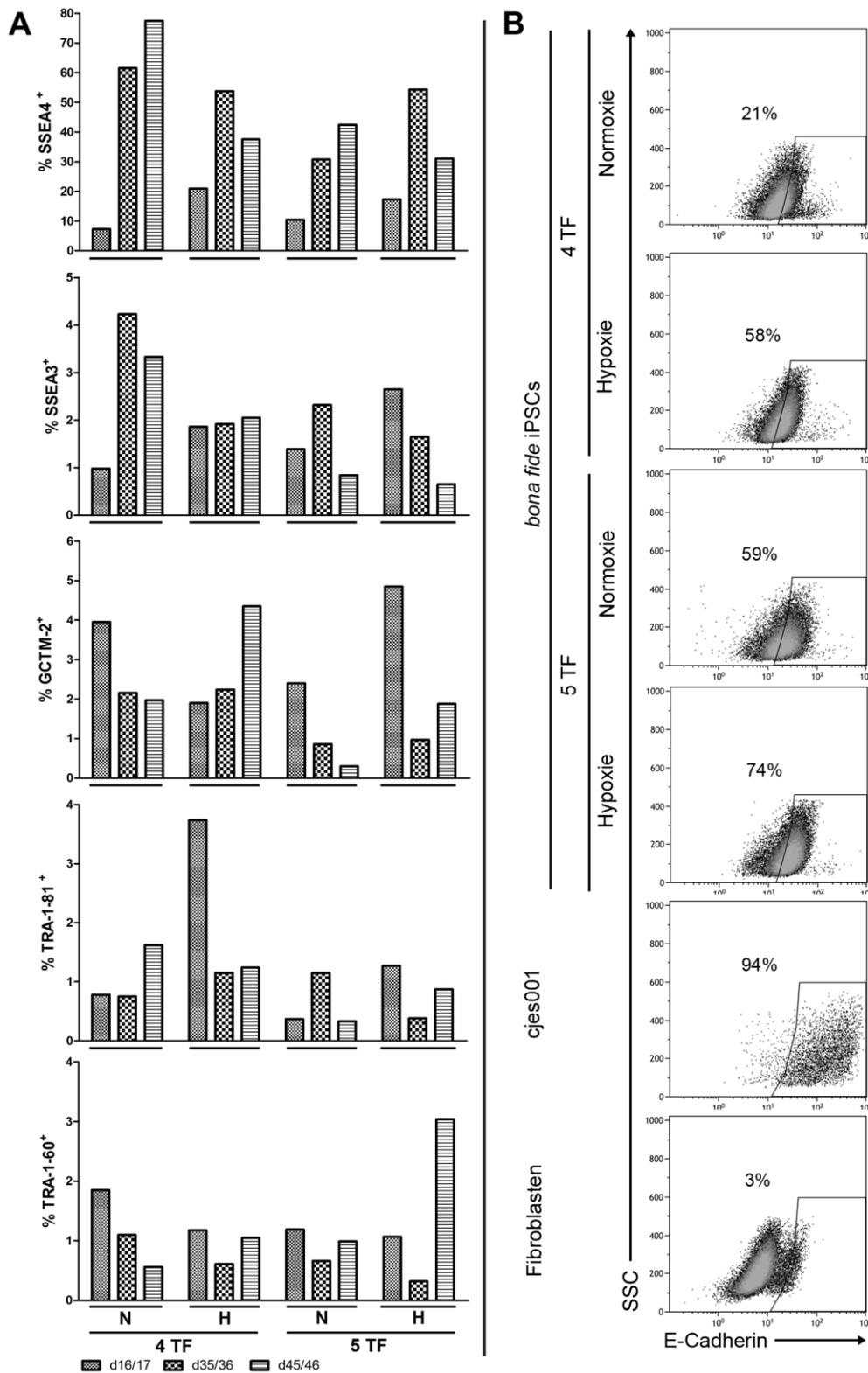


Abb. 48: Durchflusszytometrische Messung der Expression von Pluripotenzmolekülen bei 4TF- und 5TF-transduzierten Zellen

16, 35 oder 45 Tage nach Transduktion. Kulturbedingungen: normoxisch/hypoxisch. (A) Messung an drei unterschiedlichen Zeitpunkten; (B) Expression von E-Cadherin in den reprogrammierten Zellen (d45/46), den Fibroblasten und den Zellen der ES Zelllinie cjes001.

Die durchflusszytometrischen Messungen zeigten, dass ein großer Anteil der putativen iPS Zellen SSEA4 exprimierten (vgl. Abb. 48 A, erstes Diagramm). Der höchste Anteil

an SSEA4 exprimierenden Zellen wurde allerdings bei den vierfach transduzierten Zellen, die unter Normoxie kultiviert wurden, gemessen (rund 80%).

Der Anteil an E-Cadherin exprimierenden Zellen war in den 5TF-transduzierten Zellen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie höher als in den 4TF-transduzierten Zellen. Der höchste Anteil an E-Cadherin exprimierenden Zellen (rund 75%) wurde in den 5TF-transduzierten Zellen unter Hypoxie gemessen. Zum Vergleich: Über 90% der ES Zellen aber nur 3% der unbehandelten Fibroblasten exprimierten E-Cadherin (vgl. Abb. 48 B). Die anderen Oberflächenmoleküle wurden nur von einem sehr geringen Teil der 4TF- bzw. 5TF-Zellen exprimiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die 5TF-Transduktion mit LIN28A keinen positiven Einfluss auf den Pluripotenzstatus der transduzierten *Callithrix jacchus* Zellen hatte.

3.10 Transkriptomanalyse der teilreprogrammierten primaten Zellen

Um die Transkriptome der unterschiedlich kultivierten *Callithrix jacchus* piPS Zellen mit denen der Hautfibroblasten und der ES Zellen zu vergleichen, wurde im Transkriptomanalyselabor (TAL) in Göttingen eine RNA-Seq durchgeführt. Dabei wurden die aus der RNA transkribierten cDNA-Sequenzen gegen das teilsequenzierte und noch nicht vollständig zugeordnete Genom des Weißbüschelaffen abgeglichen. Die einzelnen identifizierten Transkripte wurden daraufhin gezählt und über interne Standards normalisiert (DESeq). Anhand derjenigen Gene, die die stärkste Varianz aufwiesen (oberes Terzil), wurde eine Hauptkomponentenanalyse erstellt (Abb. 49).

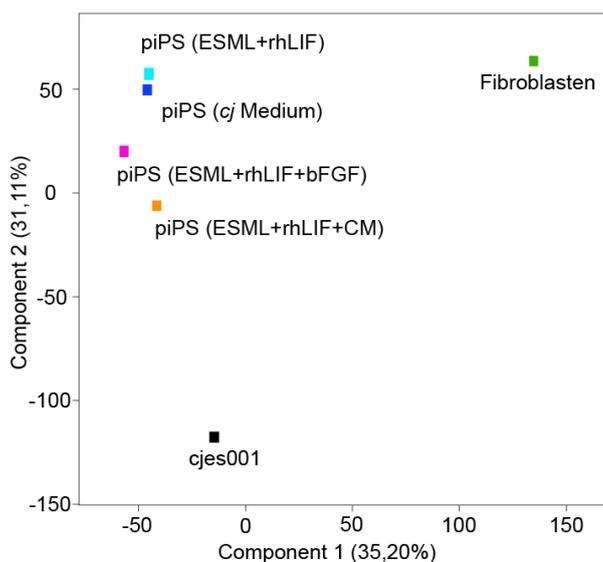


Abb. 49: Hauptkomponentenanalyse im Rahmen einer Transkriptomanalyse Tag 64 nach Transduktion mit *hOKSM_dTomato*. Gemeinsame Analyse der *cjes001* Zellen (P91), der Fibroblasten (P3) und der teilreprogrammierten Zellen in unterschiedlichen Kulturmedien.

Der Vergleich der Transkriptome zeigte eine höhere Ähnlichkeit zwischen den piPS Zellen und den Zellen der ES Zelllinie als zwischen den Fibroblasten und den ES Zellen (vgl. Abb. 49, *Component 1*). Dass sich die piPS Zellen auf kleinem Raum gruppieren, zeigte ihre Ähnlichkeit zueinander. Allerdings waren die im ESML+rhLIF+CM(cjes001)-Medium kultivierten piPS Zellen den ES Zellen am ähnlichsten (vgl. Abb. 49, *Component 2*).

Mit Hilfe der gezählten Transkripte konnte zudem eine HeatMap erstellt werden, in der die 50 Gene, die zwischen den Zellen der ES Zelllinie und den Fibroblasten am unterschiedlichsten exprimiert wurden, aufgeführt wurden (vgl. Abb. 50).

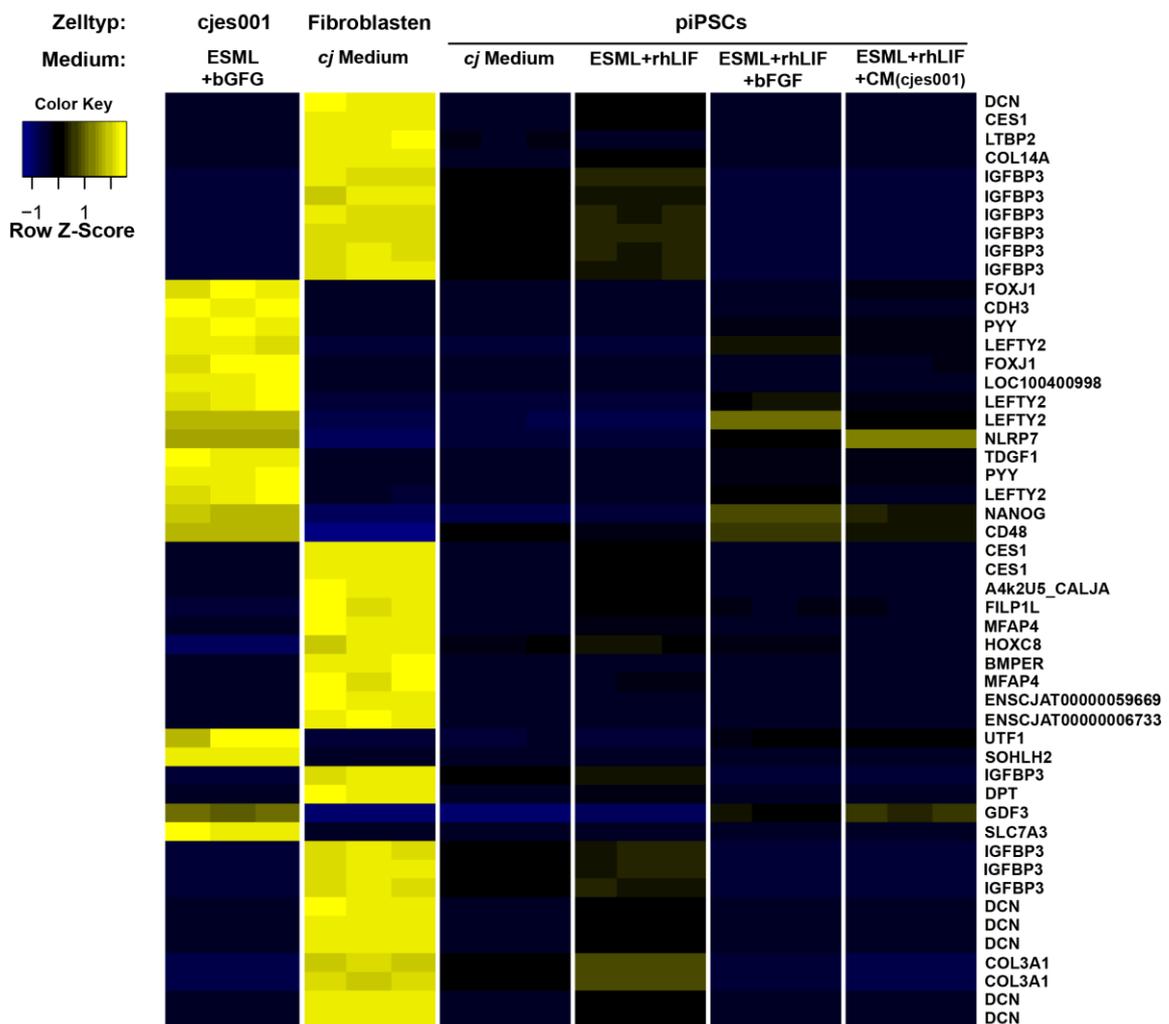


Abb. 50: Unterschiede in der Genexpression zwischen ES Zellen und Fibroblasten: Die 50 Top-Gene

Tag 64 nach Transduktion. Im Zuge der Transkriptomanalyse wurden 50 differentiell exprimierte Gene ermittelt. Diese wurden mit den hOKSM-transduzierten Zellen in unterschiedlichen Kulturmedien verglichen. Häufig gezählte Transkripte erscheinen gelb, selten gezählte erscheinen blau.

Die HeatMap zeigte, dass die pluripotenzassoziierten Gene *NANOG*, *LEFTY2* sowie *NLRP7* in den in ESML+rhLIF+bFGF und ESML+rhLIF+CM(cjes001) kultivierten piPS

Zellen ähnlich hoch exprimiert waren wie in den ES Zellen. Die Expression der weiteren mit Pluripotenz assoziierten Gene *UTF1*, *TDGF* und *CDH3* war in den piPS Zellen niedriger als in den ES Zellen.

Während die Expression von *UTF1* einen ersten Hinweis auf potenziell pluripotente Zellen gibt (Galonska *et al.*, 2014), ist *NLRP7* an der differentiellen, maternalen DNA-Methylierung beteiligt (Mahadevan *et al.*, 2014). *P-Cadherin* wiederum wurde als ein weiterer Zelloberflächenmarker zur Identifizierung pluripotenter Zellen definiert (Kolle *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnten Hough *et al.* zeigen, dass vollständig pluripotente Zellen TDGF exprimieren (Hough *et al.*, 2009). Das Zusammenspiel von *Lefty-1* und *Lefty-2* steuert zudem das Verhältnis von Selbsterneuerung und Differenzierung in ES Zellen der Maus (Kim *et al.*, 2014).

Mit Hilfe der RNA-Seq konnten also einige pluripotenzassoziierte Gene in den partiell reprogrammierten Zellen des Weißbüschelaffen ermittelt werden. Allerdings konnte durch die RNA-Seq kein Schlüsselfaktor ausgemacht werden, mit dessen Hilfe eine vollständige Reprogrammierung der *Callithrix jacchus* Zellen möglich wäre. Auch eine Hoch- oder Runterregulation von Gengruppen, die beispielsweise über bestimmte Signaltransduktionswege zusammenhängen und in die man gezielt eingreifen könnte, konnte nicht ermittelt werden.

Für die Analyse wurden die Transkripte nur gegen das teilsequenzierte Genom des *Callithrix jacchus* abgeglichen. Zwar wurde das Genom eines weiblichen Weißbüschelaffen inzwischen vollständig entschlüsselt (Worley *et al.*, 2014), allerdings sind noch nicht alle Gene hinsichtlich ihrer Funktionen analysiert. Wenn diese Analysen abgeschlossen sein sollten, könnten aus einem Abgleich der vollständigen Genomdaten mit den aus der RNA-Seq erhaltenen Daten weitere Erkenntnisse gewonnen werden.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, iPS Zellen aus somatischen Zellen des *Callithrix jacchus* zu generieren. Dafür wurden unterschiedliche Reprogrammierungsstrategien verfolgt, die allesamt zu stabil partiell reprogrammierten (piPS) Zellen führten.

Diese piPS Zellen wiesen unterschiedliche Merkmale von Pluripotenz auf – je nachdem welches Vektorsystem für die Expression der Reprogrammierungsfaktoren verwendet wurde, in welchen Medien die Zellen kultiviert wurden, unter welchem Sauerstoffpartialdruck die Kultivierung erfolgte oder welche *Small Molecules* ins Medium zugegeben wurden, um die DNA Methylierung oder Signaltransduktion zu verändern.

Einfluss der diversen lentiviralen Vektorsysteme auf die Reprogrammierung

Die Verwendung eines lentiviralen Vektors, von dem die kodierenden Regionen der humanen Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* und *MYC* polycistronisch transkribiert und anschließend mittels 2A-Esterasen ko-translational separiert wurden, gewährleistet eine Expression der Transkriptionsfaktoren in einem stabilen stöchiometrischen Verhältnis. Zudem konnte mit der Verwendung eines polycistronischen Vektors eine höhere Transduktionseffizienz erreicht werden als bei der Verwendung der separaten Vektoren (vgl. Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.7.1), da bei diesen nur wenige Zielzellen von allen Vektoren transduziert werden konnten. Zudem musste bei der Verwendung separater Vektoren eine wesentlich höhere MOI (*multiplicity of infection*) eingesetzt werden, um alle Reprogrammierungsfaktoren in die gleiche Zelle einzubringen, wodurch das Insertionsmutageneserisiko deutlich erhöht wird. Ein weiterer Vorteil des in dieser Arbeit eingesetzten polycistronischen Vektors ist, dass er flankierende FRT-Sites aufweist, die eine fast vollständige Exzision mittels der Flp-Rekombinase ermöglichte (Voelkel *et al.*, 2010). Zudem wurde hOKSM innerhalb unserer Arbeitsgruppe zur Reprogrammierung von primären Zellen des Menschen (Nabelschnur-Venenendothelzellen und Hautfibroblasten) und der Maus (MEFs und Hautfibroblasten) (vgl. Kapitel 3.5) bereits erfolgreich eingesetzt. Doch obwohl die Hautfibroblasten des *Callithrix jacchus* nach gleichem Protokoll wie die Zellen des Menschen und der Maus behandelt wurden und auch die ersten Phasen der Reprogrammierung zu durchzulaufen schienen (vgl. Kapitel 3.2.2), konnten sie trotzdem nicht zu vollständig induzierten pluripotenten Stammzellen reprogrammiert werden.

In der bis *dato* einzigen Veröffentlichung zur Reprogrammierung von Weißbüschelafenzellen mit dem hier ebenso verwendeten polycistronischen lentiviralen Vektor wurde gezeigt, dass mit Hilfe dieses Vektors und eines ganzen Panels an *Small Molecules* in einem chemisch definierten Medium (mTeSR™, Stemcell Technologies) Knochen-

marks-MSCs des Weißbüschelaffen vollständig reprogrammiert werden konnten (Wiedemann *et al.*, 2012). Allerdings wurde dabei eine im Vergleich zu den mitgeführten ES Zellen deutlich geringere Transkriptmenge von OCT4, SOX2 oder LIN28 gemessen. Zudem dauerte der Reprogrammierungsprozess sehr lange. Erst nachdem die Zellen über 20 Passagen in Kultur gehalten wurden, war ihre Morphologie mit der der Weißbüschelaffen ES Zellen vergleichbar. Da die Zellen alle 7-10 Tage passagiert wurden, bedeutete dies, dass der Beginn der Reprogrammierung bereits über 6 Monate zurück lag, bevor die Zellen charakterisiert wurden. Darüber hinaus wurde die Expressionskassette erst nach 64 Passagen (ca. 1 ½ Jahre) stillgelegt. Im Vergleich dazu wurde der Vektor in Zellen aus der Maus nach etwa 12 Tagen (Theunissen und Jaenisch, 2014) und in humanen Zellen nach zirka 21 Tagen (Maherali und Hochedlinger, 2008) still gelegt. Die Transduktion mit hOKSM hatte also auch bei Wiedemann *et al.* keine ausreichend effiziente Reprogrammierung zur Folge.

Deshalb stellte sich die Frage, ob der verwendete polycistronische Vektor geeignet ist, Weißbüschelaffenzellen effizient zu reprogrammieren. Möglicherweise wird zur Reprogrammierung von *Callithrix jacchus* Zellen ein anderes stöchiometrisches Verhältnis der Transkriptionsfaktoren benötigt als zur Generierung humaner iPS Zellen, da die Stöchiometrie der Transkriptionsfaktoren in humanen ES Zellen und ES Zellen des Weißbüschelaffen unterschiedlich ist (vgl. Abb. 26). Demnach wäre es von Vorteil, die Transkriptionsfaktoren voneinander entkoppelt in die Zielzellen einzubringen, so dass sich das stöchiometrische Verhältnis der Faktoren zueinander von selbst einstellen kann (Papapetrou *et al.*, 2009; Tiemann *et al.*, 2011). Dass die Reihenfolge der Transkriptionsfaktoren auf dem Vektor von besonderer Bedeutung für die Reprogrammierung ist, konnten Carey *et al.* zeigen. Nachdem sie bei der Reprogrammierung von Mausfibroblasten die Position von *Sox2* und *Klf4* auf einem polycistronischen Vektor (Reihenfolge: 5'-OSKM-3' anstatt 5'-OKSM-3') vertauschten, wiesen die mit OSKM transduzierten Zellen eine höhere Chimärbildungsrate auf (Carey *et al.*, 2011). Dass Carey *et al.* nur mit dem Expressionsvektor OSKM sogenannte „all-iPSC Mice“ erzeugen konnten, war vor allem darauf zurückzuführen, dass bei der Verwendung dieses Vektors die Expression von *Pou5f1* und *Klf4* höher als die Expression von *Sox2* und *Myc* war. Der Vektor OKSM führte dahingegen zu einer höheren Expression von *Sox2* und *Myc*. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für die endogenen Transkriptionsfaktoren SOX2 und MYC ein ähnlicher Befund (vgl. Abb. 16). Demnach sind OCT4 und KLF4 für die Aktivierung und Aufrechterhaltung der autoregulatorischen Schleife in iPS Zellen ausschlaggebend.

Da das stöchiometrische Verhältnis der Transkriptionsfaktoren auf polycistronischen Vektoren aber festgelegt ist, wurden die somatischen Zellen des Weißbüschelaffen in

weiteren Versuchen mit separaten Vektoren transduziert, die OCT4, KLF4, SOX2 und MYC kodierten.

Dabei waren bereits nach 28 Tagen ausreichend Zellen für eine Charakterisierung vorhanden. Die beschleunigte Koloniebildung kann dabei durch eine vermehrte Integration des Onkogens *Myc* in das Genom erklärt werden, da bei einer Reprogrammierung mit *Myc* stets mehr Kolonien gebildet werden (Nakagawa *et al.*, 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen allerdings nicht, dass eine sich selbst einstellende stöchiometrische Verteilung der Transkriptionsfaktoren zu besseren Reprogrammierungsergebnissen führt, da lediglich partiell reprogrammierte Zellen generiert werden konnten (vgl. Kapitel 3.7.2). Zwar wurde eine Reprogrammierung von Fibroblasten neugeborener Weißbüschelaffen mit vier separaten lentiviralen Vektoren beschrieben (Wu *et al.*, 2010), allerdings müssen die Ergebnisse in Frage gestellt werden, da die generierten iPS Zellen nur mit den Zellen einer humanen ES Zelllinie (I6 oder auch TE06) (Amit und Itskovitz-Eldor, 2002) und nicht mit Zellen einer *Callithrix jacchus* ES Zelllinie verglichen wurden. Zudem wurde das Differenzierungspotential der Zellen nur *in vivo* durch einen Teratom Assay nachgewiesen. Allerdings wurden die putativen iPS Zellen nicht *in vitro*, z. B. über eine EB-Formierung, differenziert. Zudem wurden die Fibroblasten drei Mal hintereinander mit allen vier Vektoren transduziert. So konnte möglicherweise eine ausreichend hohe Expression der Transkriptionsfaktoren gewährleistet werden, allerdings wurde so auch das Insertionsmutageneserisiko erhöht.

Es konnten also weder mit dem polycistronischen lentiviralen Vektor noch mit den separaten bicistronischen Vektoren vollständig reprogrammierte iPS Zellen erzeugt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Weißbüschelaffenzellen aufgrund der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen nur mit primaten Transkriptionsfaktoren reprogrammiert werden können. Allerdings stimmen die Aminosäuresequenzen der *Callithrix jacchus* Proteine mit denen der humanen Proteine, *POU5F1*, *SOX2* und *KLF4*, überwiegend überein (98,3%, 99,7% bzw. 99,4%). Bei den kritischen Domänen, die die Aktivitäten der drei Transkriptionsfaktoren stellen, wird die Übereinstimmung besonders deutlich: Hier stimmen die Domänen der humanen als auch der primaten Faktoren zu 100% überein (Wu *et al.*, 2010). Gemäß der NCBI-Datenbank liegt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen den humanen Transkriptionsfaktoren und denjenigen der Maus hingegen bei lediglich 86% (*POU5F1*), 96% (*SOX2*) bzw. 90% (*KLF4*). Trotzdem konnten die Mauszellen mit hOKSM erfolgreich reprogrammiert werden (vgl. Kapitel 3.5). Demnach müssen die Proteine bezüglich ihrer Funktion so stark konserviert sein, dass die Mausfibroblasten mit humanen Faktoren reprogrammiert werden konnten. Für die Reprogrammierung von *Callithrix jacchus* Zellen folgt daraus entgegen der anfangs getroffenen Annahme, dass die Übereinstimmung der

Aminosäuresequenzen zwischen den beiden Systemen keinen ausschlaggebenden Punkt für eine erfolgreiche Reprogrammierung mit humanen Transkriptionsfaktoren darstellt.

Eine Transduktion mit den Yamanaka-Faktoren, unabhängig vom Vektorsystem, führte also lediglich zu teilreprogrammierten Weißbüschelaffenzellen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde deshalb versucht, eine vollständige Reprogrammierung der stabilen piPS Zellen durch eine nachträgliche Transduktion mit dem *LIN28A*-Expressionsvektor zu erzielen (vgl. Kapitel 3.9), da humane Fibroblasten mit einer Kombination aus OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 reprogrammiert wurden (Yu *et al.*, 2007) und die *LIN28*-Expression die Reifephase im Reprogrammierungsprozess unterstützt (Tanabe *et al.*, 2013). Zudem konnten fetale Hepatozyten des Weißbüschelaffen mit den Yamanaka-Faktoren und dem RNA-bindenden Protein LIN28 erfolgreich reprogrammiert werden (Tomioka *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten die 4TF-reprogrammierten piPS Zellen aber nicht in vollständig reprogrammierte Zellen überführt werden, obwohl die zusätzliche Transduktion mit LIN28A zunächst einen positiven Effekt auf die Expression der pluripotenzassoziierten Oberflächenmoleküle zeigte (vgl. Abb. 45). Z. B. exprimierten alle Zellen spätestens an Tag 43 nach Transduktion das Oberflächenprotein E-Cadherin, welches den Zell-Zell-Kontakt bei der iPS Zell-Bildung unterstützt (Chen *et al.*, 2010) und bei der Reprogrammierung von Mauszellen Oct4 ersetzen kann (Redmer *et al.*, 2011). Außerdem fungiert E-Cadherin im Maussystem als Pluripotenzmarker (Chen *et al.*, 2011). In dieser Arbeit zeigte sich, dass die E-Cadherin exprimierenden Zellen aber nicht die späten Pluripotenzmarker TRA-1-60 oder TRA-1-81 im hohen Maße exprimierten (vgl. Abb. 45). Demnach war die Überführung der stabil partiell reprogrammierten Zellen in den pluripotenten Status durch eine nachträgliche Transduktion mit LIN28A letztendlich nicht erfolgreich. Da die piPS Zellen zum Zeitpunkt der nachträglichen Transduktion bereits über 4 Monate in Kultur waren, wurde der Reprogrammierungsprozess möglicherweise nicht mehr von LIN28A unterstützt. Deshalb wurden die Fibroblasten des Weißbüschelaffen in einer weiteren Versuchsreihe mit den Yamanaka-Faktoren und LIN28A direkt fünffach transduziert. Im Anschluss daran bildeten sich zunächst AP positive Kolonien (vgl. Abb. 47). Die durchflusszytometrischen Messungen zeigten jedoch – auch über die Zeit – nur eine Zunahme E-Cadherin exprimierender Zellen. Bei den TRA-Oberflächenmarkern konnte hingegen keine erhöhte Expression festgestellt werden (vgl. Abb. 48). Demnach führte die 5TF-Reprogrammierung der *Callithrix jacchus* Fibroblasten lediglich zu stabil reprogrammierten piPS Zellen.

Unabhängig von den verwendeten Vektorsystemen konnte in jeder Versuchsreihe beobachtet werden, dass der/die Expressionsvektor/en nicht stillgelegt wurde/n. Dem-

nach wurden die retroviralen Vektoren während des Reprogrammierungsprozesses nicht *de novo* methyliert (Wernig *et al.*, 2007). Eine solche Stilllegung ist jedoch eine Grundvoraussetzung für die spätere erfolgreiche Differenzierung (Okita *et al.*, 2007). Zellen, deren Reprogrammierungsvektoren weiterhin ekto exprimiert werden, weisen in Teratom Assays grundsätzlich ein sehr schlechtes Tumorbildungspotenzial auf (Brambrink *et al.*, 2008). Warum der/die Reprogrammierungsvektor/en in den *Callithrix jacchus* Zellen nicht stillgelegt wurden, konnte nicht geklärt werden.

Es konnte ebenfalls nicht geklärt werden, ob die verwendete Expressionshöhe des Vektors für eine vollständige Reprogrammierung ausreichend war. So könnte es sein, dass die ektope Expression der transduzierten Transkriptionsfaktoren unabhängig vom verwendeten Vektorsystem stets zu gering war, um das Pluripotenznetzwerk zu aktivieren. Versuche im Maussystem hatten gezeigt, dass bei Zellen, deren Reprogrammierungsprozess geblockt wurde, eine Steigerung der Expression von *Pou5f1*, *Klf4*, *Sox2* und *Myc* die Aufhebung von Blockaden bewirkt (Polo *et al.*, 2012). Zudem könnte eine unbalancierte oder unvollständige Induktion der endogenen Pluripotenzgene dazu geführt haben, dass lediglich piPS Zellen generiert werden konnten.

Des Weiteren ist noch offen, inwieweit sich ein längerer Kultivierungszeitraum positiv auf den Reprogrammierungsprozess auswirkt. Nishino *et al.* zeigten zwar, dass reprogrammierte Zellen ES Zellen immer ähnlicher werden, je länger sie in Kultur gehalten werden, da sich das Methyloem der iPS Zellen dem der ES Zellen angleicht (Nishino *et al.*, 2011). Die 4TF-reprogrammierten Zellen wurden deshalb mehr als ein halbes Jahr kultiviert. Jedoch wurde dabei weder die Expression der Vektoren herunterreguliert noch konnte ein höherer Anteil an Zellen beobachtet werden, die pluripotenzassoziierte Oberflächenmoleküle exprimierten (vgl. Abb. 45, dritte Spalte von links).

Diesen Teil der Diskussion abschließend kann festgehalten werden, dass unabhängig vom verwendeten Vektorsystem und der in die Zellen eingebrachten Faktoren stabile piPS Zellen des Weißbüschelaffen generiert werden konnten. Demnach könnten in weiteren Versuchsreihen mehr als fünf oder andere Faktoren als die hier verwendeten eingesetzt werden oder die Expression bestimmter Gene gezielt herunterreguliert werden, um *Callithrix jacchus* Fibroblasten vollständig zu reprogrammieren.

Beispielweise konnten fetale Hepatozyten des Weißbüschelaffen nur mit Hilfe von sechs Faktoren (OCT4, KLF4, SOX2, MYC sowie zusätzlich LIN28 und NANOG) reprogrammiert werden (Tomioka *et al.*, 2010). Hinsichtlich der Reprogrammierung mit den Yamanaka-Faktoren beschrieben Tomioka *et al.*, dass es ihnen hingegen nicht möglich war, vollständig reprogrammierte iPS Zellen aus adulten oder neugeborenen Fibroblasten, fetalen Hepatozyten, sowie Knochenmarks-MSCs herzustellen. Zwar konnten sie wie in dieser Arbeit Kolonien erzeugen, jedoch wurden die Vektoren in den

Zellen ebenfalls nicht stillgelegt. Zudem konnte Liao *et al.* im humanen System zeigen, dass durch die Verwendung von sechs anstelle von vier Faktoren die transduzierten Zellen nicht nur schneller erste Kolonien (12 Tage bei 4TF, 7 Tage bei 6TF) sondern auch deutlich mehr AP positive Kolonien bildeten (Liao *et al.*, 2008).

Da inzwischen weitere Faktoren identifiziert werden konnten, mit denen Zellen reprogrammiert werden können, könnte zur Reprogrammierung von Weißbüschelaffenzellen auch eine andere Transkriptionsfaktor-Kombination verwendet werden. Z. B. konnten durch die zusätzliche Expression von hTERT und SV40 mit den vier Yamanaka-Faktoren humane Zellen vollständig reprogrammiert werden. Allerdings konnte die Integration von hTERT und SV40 in den iPS Zellen nicht nachgewiesen werden. Park *et al.* zeigten aber, dass die mit hTERT und SV40 transduzierten Zellen die mit den Yamanaka-Faktoren transduzierten Zellen hin zu einer vollständigen Reprogrammierung unterstützen (Park *et al.*, 2008). Zudem konnte bei der Reprogrammierung von Mausfibroblasten nachgewiesen werden, dass der Faktor Nr5a2 mit Sox2 und Klf4 interagiert und Nanog aktivieren kann (Heng *et al.*, 2010). Bei Tests mit dem Kernrezeptor Essrb (*estrogen-related receptor beta*) zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor Klf4 durch diesen ersetzt werden kann und so Mausfibroblasten mit Oct4, Sox2 und Essrb reprogrammiert werden konnten (Feng *et al.*, 2009). Auch eine Verwendung des Transkriptionsfaktors Glis1 (*Gli-like transcription factor*) wäre möglicherweise vorteilhaft, da dieser die Generierung von iPS Zellen im Mensch- und Maussystem fördert, indem Glis1 sowohl die Faktoren Myc, Nanog, Lin28, Wnt, Essrb als auch die MET unterstützt (Maekawa *et al.*, 2011). Darüber hinaus kann die autoregulatorische Pluripotenzschleife auch mit unterschiedlichen Variationen der Faktoren Oct4, Esrrb, Nanog, Klf4, Myc, Sall4, Lin28 und Dppa2 (*developmental pluripotency associated 2*) aktiviert werden – wenn auch mit unterschiedlich hohen Effizienzgraden (Buganim *et al.*, 2012).

Allerdings unterstützt nicht nur eine zusätzliche ektope Expression unterschiedlicher Gene den Reprogrammierungsprozess. Auch eine gezielte Herunterregulierung störender Faktoren könnte zur vollständigen Reprogrammierung von *Callithrix jacchus* Zellen beitragen, da z. B. humane Zellen durch die gezielte Abschaltung von p53 mit Hilfe von siRNA und der gleichzeitigen Expression von *UTF1* und den vier Yamanaka-Faktoren noch effizienter reprogrammiert werden können (Zhao *et al.*, 2008). Auch in Zellen der Maus konnte gezeigt werden, dass durch den *knock down* von p53 oder seines Zielgens p21 (*Cdkn1a*) mittels shRNA und der ektope Expression der vier Yamanaka-Faktoren erfolgreich iPS Zellen generiert werden konnten (Kawamura *et al.*, 2009).

Einfluss der verwendeten Medien auf die Reprogrammierung

Bei der Reprogrammierung mit dem polycistronischen lentiviralen Vektor zeigte sich, dass die verwendeten ESML-Medien, unabhängig von den jeweiligen Zusätzen, den Reprogrammierungsprozess eher unterstützten als das *cj* Medium. Die im *cj* Medium kultivierten Kolonien waren weniger kompakt (vgl. Abb. 13). Bei den durchflusszytometrischen Messungen wurde sowohl bei der Verwendung des *cj* Mediums mit γ MEFs als auch mit γ Callifibs ein geringer Anteil an Oberflächenmolekül exprimierenden Zellen festgestellt (vgl. Abb. 15). Die Auswertung der qRT-PCR Daten ergab für die im ESML- und im *cj* Medium kultivierten Zellen eine im Vergleich zur mitgeführten ES Zelllinie geringere Genexpression. Allerdings war die Expression der pluripotenzassoziierten Gene bei den im *cj* Medium kultivierten Zellen geringer als bei denen, die im ESML-Medium kultiviert wurden (vgl. Kapitel 3.2.2). Ein solches Ergebnis wurde auch erwartet, da es sich beim *cj* Medium um ein Grundmedium handelt, welches zur Kultivierung von Fibroblasten verwendet wird und neben FBS keinerlei zusätzlichen Zytokine enthält, die zum Erhalt des pluripotenten Status beitragen könnten.

Bei der immunhistochemischen Analyse zeigte sich, dass nur die im ESML+rhLIF+bFGF- oder ESML+rhLIF+CM(cjes001)-Medium kultivierten Zellen den Pluripotenzmarker TRA-1-60 exprimierten (vgl. Abb. 16). Demnach könnte das Zytokin bFGF, das in beiden Medien enthalten war, nicht nur für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status von Vorteil sein, sondern auch den Reprogrammierungsprozess unterstützt haben. Für hES Zellen konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass bFGF in höheren Dosen den PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg aktiviert (Singh *et al.*, 2012), was wiederum die GSK-3 β inhibiert. Ebenso konnte vor kurzem gezeigt werden, dass bFGF auch in den ES Zellen des Weißbüschelaffen denselben Signaltransduktionsweg aktiviert (Nii *et al.*, 2014). Allerdings zeigten die durchflusszytometrischen Analysen für die im ESML+rhLIF-Medium kultivierten Zellen den höchsten Anteil an Oberflächenmarker exprimierenden Zellen (vgl. Abb. 15 und 20 jeweils die erste Spalte). Zudem wurde dieses Medium von der Gruppe um Sasaki bei der Kultivierung von *Callithrix jacchus* ES Zellen erfolgreich eingesetzt (Sasaki *et al.*, 2005). Deshalb wurde das ESML+rhLIF-Medium im Rahmen der 4TF- und 5TF-Reprogrammierung verwendet.

Die spätere Analyse der Transkriptomdaten ergab hingegen, dass die im ESML-Medium+rhLIF kultivierten Zellen die wenigsten Übereinstimmungen mit den mitgeführten ES Zellen aufwiesen (vgl. Abb. 49). Warum dieses Ergebnis derart von den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Messungen abweicht, konnte nicht abschließend geklärt werden. Möglicherweise ist diese Divergenz darauf zurückzuführen, dass bei den durchflusszytometrischen Messungen vier einzelne Merkmale untersucht wurden, während bei der RNA-Seq das gesamte Transkriptom analysiert wurde. Es wäre aller-

dings auch möglich, dass das Zytokin LIF nicht die ihm zugesprochene positive Wirkung auf den Reprogrammierungsprozess zeigte. Denn die in den mit rhLIF und bFGF versetzten Medien kultivierten piPS Zellen zeigten eine insgesamt höhere Ähnlichkeit mit den ES Zellen als die in dem „reinen“ rhLIF-Medium kultivierten. Dass die piPS Zellen, die in dem konditionierten ESML+rhLIF+CM(cjes001)-Medium kultiviert wurden, ein dem der cjes001 Zellen ähnliches Transkriptom aufwiesen, wurde ebenso nicht zwingend erwartet. Möglicherweise sezernierten die zur Konditionierung des ESM+bFGF-Mediums verwendeten ES Zellen lösliche Stoffe in das CM(cjes001)-Medium, die nicht durch die Filtrierung (0,22 µm, Zelluloseazetat) aus dem konditionierten Medium entfernt werden konnten und die deshalb den Reprogrammierungsprozess unterstützten. Diese Vermutung wird von Untersuchungen von Rajasingh *et al.* gestützt. Sie konnten zeigen, dass Fibroblasten der Maus-Zelllinie 3T3 mit Hilfe von ES Zellextrakten (oder Karzinom-Zellextrakten) zu multipotenten Zellen umprogrammiert werden konnten (Rajasingh *et al.*, 2008). Zudem können 3T3 und die humane Zelllinie 293T mittels solcher Zellextrakte derart umprogrammiert werden, dass sie *POU5F1* oder *NANOG* stark exprimieren (Taranger *et al.*, 2005). Zudem konnten Zellen der Ratte zu piPS Zellen reprogrammiert werden, indem diese ausschließlich in mit Zellextrakten versetztem Medium kultiviert wurden (Chang *et al.*, 2010).

Einfluss von Hypoxie auf die Reprogrammierung

Bei Maus- und Menschenzellen wurde gezeigt, dass eine Reprogrammierung unter hypoxischen Bedingungen zu einer erhöhten Reprogrammierungseffizienz führen kann (Yoshida *et al.*, 2009; Panopoulos *et al.*, 2011). Zudem konnten ES Zellen, die bereits begonnen hatten ungerichtet zu differenzieren, alleine durch den Einfluss von Hypoxie zurück in ihren pluripotenten Status geführt werden (Mathieu *et al.*, 2013). Deshalb wurden die *Callithrix jacchus* Fibroblasten in dieser Arbeit unter hypoxischen Bedingungen reprogrammiert. Allerdings führte dies nicht zu vollständigen iPS Zellen. Die durchflusszytometrischen Messungen ergaben hingegen, dass ein höherer Anteil derjenigen Zellen, welche unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden, pluripotenzassoziierte Oberflächenmoleküle exprimierten (vgl. Abb. 35). Demnach wird die Reprogrammierung von Weißbüschelaffenfibroblasten möglicherweise nicht durch die Absenkung des Sauerstoffpartialdrucks befördert. Die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen könnte sogar gegenteilige Effekte zeitigen.

Einfluss von *Small Molecules* auf die Reprogrammierung

Grundsätzlich wird der für die Reprogrammierung notwendige Chromatinstatus und das für eine effiziente Reprogrammierung optimale Verhältnis der Signaltransduktionswege durch die Überexpression der Transkriptionsfaktoren erreicht. Durch die Zugabe

von *Small Molecules* können diese Prozesse unterstützt werden. Z. B. kann die Reprogrammierungseffizienz bei humanen Zellen durch den Einsatz von PD0325901 (MEK-Inhibitor) und SB431542 (TGF β -Inhibitor) um den Faktor 200 erhöht werden (Lin *et al.*, 2009). Im Maussystem wird durch die Verwendung von CHIR99021 (GSK-3 β -Inhibitor) und PD0325901 (2i-Bedingungen) eine stabile Expression von *Pou5f1* und *Nanog* gewährleistet (Silva *et al.*, 2008). Der Einsatz des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Azacytidin erhöht ebenso die Effizienz bei der Reprogrammierung von Zellen der Maus und des Menschen (Huangfu *et al.*, 2008a). Mit der Zugabe von *Small Molecules* wird der Reprogrammierungsprozess aber nicht nur unterstützt, durch ihre Verwendung kann auch auf den Einsatz von Transkriptionsfaktoren verzichtet werden. So kann z. B. durch den Einsatz des TGF β -Inhibitors E-616452 (RepSox) bei der Reprogrammierung von MEFs auf Sox2 verzichtet werden (Ichida *et al.*, 2009). Mit BIX-01294 (Histon-Methyltransferase-Inhibitor) und BayK8644 (Aktivator von Calciumkanälen) konnten zudem iPS Zellen ohne Sox2 und Myc generiert werden (Shi *et al.*, 2008a; Shi *et al.*, 2008b). Durch die Zugabe von AMI-5 (Arginin-Methyltransferase-Inhibitor) konnte auf drei Transkriptionsfaktoren verzichtet und lediglich mit Oct4 reprogrammiert werden (Yuan *et al.*, 2011). Hou *et al.* konnten sogar zeigen, dass sowohl embryonale als auch adulte Mausfibroblasten nur mit Hilfe von *Small Molecules* reprogrammiert werden können. Die so chemisch induzierten iPS Zellen wurden dabei mit Hilfe von CHIR, RepSox, VPA, FSK (cAMP Agonist), DZNep (Histon-Methylase-Inhibitor), TTNPB (synthetischer Retinsäure-Rezeptor Ligand) und Tranylcypromin (Inhibitor der Lysin-spezifischen Demethylase 1) erzeugt (Hou *et al.*, 2013). Darüber hinaus ist es ebenso möglich, stabile piPS Zellen mit Hilfe von *Small Molecules* vollständig zu reprogrammieren. So konnten piPS Zellen der Maus mit Hilfe der 2i-Bedingungen (GSK-3 β -Inhibitor und MEK-Inhibitor) zu vollständigen iPS Zellen gewandelt werden (Fussner *et al.*, 2011). Zudem konnte die DNA-Methylierung pluripotenzassoziierter Promotoren durch den Einbau des Cytidin-Analogons 5-AZA in die DNA verhindert werden, um so eine vollständige Reprogrammierung zu erzielen (Mikkelsen *et al.*, 2008).

Die in der vorliegenden Arbeit mit dem polycistronischen lentiviralen Vektor hOKSM partiell reprogrammierten Zellen wurden aufgrund dieser Vorüberlegungen mit 5-AZA behandelt (vgl. Kapitel 3.3). Allerdings exprimierten diese auch nach der Zugabe von 5-AZA weiterhin kein TRA-1-81 oder TRA-1-60; zudem wurde der Reprogrammierungsvektor weiterhin exprimiert (vgl. Abb. 18). Somit zeitigte die Demethylierung der Cytosine durch die Zugabe von 5-AZA keinerlei positive Folgen, obwohl das Cytidin-Analogon grundsätzlich eine Methylierung verhindern müsste. Eventuell wurde 5-AZA zu spät zu den piPS Zellen hinzugefügt, so dass die regulatorische

Schleife der Selbsterneuerung nicht mehr angestoßen werden konnte. Deshalb wurde 5-AZA in den nachfolgenden Versuchen zu einem früheren Zeitpunkt (10 Tage nach Transduktion) verwendet (vgl. Kapitel 3.8). Die Zugabe von 5-AZA zu den 4TF-reprogrammierten Zellen führte ebenfalls nicht zu vollständig reprogrammierten Zellen. Allerdings veränderte sich nach Zugabe des DNA-Methyltransferase-Inhibitors die Verteilung der Transkriptionsfaktoren, was anhand der Farbzusammensetzung der Zellen mikroskopisch beobachtet werden konnte. Ohne die Verwendung von 5-AZA bildete sich nach der Transduktion relativ schnell ein sehr enges Farbspektrum aus (vgl. Abb. 30), was darauf hindeutete, dass die Verteilung der Transkriptionsfaktoren in den Zellen ähnlich war. Durch die Zugabe von 5-AZA stellten sich in den einzelnen Zellen verschiedene Verhältnisse der Faktoren ein, was anhand des erweiterten Farbspektrums deutlich wurde (vgl. Abb. 38). Im Gegensatz zu der im Vorfeld getroffenen Annahme, dass sich bei einer solchen differentiellen Verteilung genau diejenige Verteilung einstellt, die für eine vollständige Reprogrammierung vonnöten ist, konnten keine vollständig reprogrammierten Zellen generiert werden (vgl. Abb. 42). Demnach wirkt sich die Zugabe von 5-AZA in einem frühen Stadium des Reprogrammierungsprozesses nicht positiv aus.

Um die mit dem polycistronischen Vektor erzeugten piPS Zellen in den pluripotenten Status zu überführen, wurden in weiteren Versuchen *Small Molecules* zu den Zellen gegeben, um so für die Reprogrammierung bedeutsame Signaltransduktionswege zu manipulieren.

Da die Inhibition des TGF β -Signaltransduktionswegs die MET unterstützt (Chen *et al.*, 2012), wird der Reprogrammierungsprozess durch die Zugabe eines TGF β -Inhibitors wie RepSox befördert. Dies konnte durch die Ergebnisse in dieser Arbeit belegt werden (vgl. Abb. 20). Allerdings ist es überraschend, dass die Zugabe des anderen hier verwendeten TGF β -Inhibitors SB im ESML+rhLIF-Medium ohne zugesetztes bFGF zu einer geringen Rate an Oberflächenmarker exprimierenden Zellen führte. Denn schließlich inhibieren sowohl RepSox als auch SB gezielt die ALK5, wobei SB darüber hinaus noch ALK4 und ALK7 inhibiert (Inman *et al.*, 2002; Gellibert *et al.*, 2004). Die Zugabe des MEK-Inhibitors PD in das ESML-Medium ohne bFGF führte zu keinerlei Veränderungen. Nach der Kultivierung im mit bFGF versetzten Medium konnte hingegen ein erhöhter Anteil an Oberflächenmarker exprimierenden Zellen gemessen werden. Während in humanen ES Zellen bFGF sowohl die MEK/ERK-Signalkaskade als auch den PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg aktiviert (Levenstein *et al.*, 2006), wird bei ES Zellen des Weißbüschelaffen nur der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg über bFGF angestoßen. Allerdings wird der MEK/ERK-Signaltransduktionsweg auch in Abwesenheit von bFGF aktiviert (Nii *et al.*, 2014). Also muss diese Kaskade über ein anderes

Mitogen, welches z. B. im Serum vorhanden ist, aktiviert werden. Nie *et al.* konnten zudem zeigen, dass PD in Kombination mit bFGF vor allem die Expression von endodermalen und mesodermalen Genen verminderte. Demnach könnte PD die Expression von bestimmten linienspezifischen Genen verringern und so einen Beitrag zur Aufrechthaltung des pluripotenten Status leisten. Die Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionswegs über den Inhibitor CHIR bewirkte im Medium ohne bFGF einen höheren Anteil an Oberflächenmoleküle exprimierenden Zellen. Dahingegen zeigte sich im mit bFGF versetzten Medium nur eine geringere Verbesserung (vgl. Abb. 20). Sowohl über CHIR als auch über bFGF wird die Expression von *Stat3* reguliert. Das Protein *Stat3* trägt dazu bei, dass pluripotenzassoziierte Gene exprimiert werden (Hao *et al.*, 2006). Da *Stat3* bereits durch die Aktivierung von *Lif* über den *Stat/Jak*-Signaltransduktionsweg aktiviert wird, hätte eine zusätzliche Aktivierung über bFGF erwartungsgemäß den Anteil an Oberflächenmoleküle exprimierenden Zellen erhöhen sollen. Inwieweit die zusätzliche Inhibition von GSK-3 β den Reprogrammierungsprozess von Weißbüschelaffenzellen tatsächlich unterstützen kann, ist nicht weiter bekannt. Möglicherweise ist der Einfluss von GSK-3 β sehr gering bzw. nicht nachweisbar, da weder mit Hilfe der 2i- (GSK-3 β - & MEK-Inhibitor) (Silva *et al.*, 2008) noch der 3i-Bedingungen (GSK-3 β & MEK & TGF β -Inhibitor) (Li *et al.*, 2009) Zellen reprogrammiert werden konnten (Wiedemann *et al.*, 2012).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die piPS Zellen durch die Manipulation von Signaltransduktionswegen mithilfe von *Small Molecules* nicht in den pluripotenten Status überführt werden konnten. So zeigte die Inaktivierung des TGF β -Signaltransduktionswegs über RepSox erhöhte Messwerte. Der Anteil der Oberflächenmoleküle exprimierenden Zellen erreichte hier zwar über 60% für die SSEA-Marker, die TRA-Marker wurden lediglich von rund 10% der Zellen exprimiert (vgl. Abb. 20). Darüber hinaus wurde die Koloniestruktur durch die Zugabe von RepSox fast vollständig zerstört (vgl. Abb. 19). Daher wurde der Ansatz, Inhibitoren im Reprogrammierungsprozess einzusetzen, im Folgenden nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Im Zuge dieser Forschungsarbeit konnten verschiedene piPS Zelllinien stabil reprogrammiert werden. Diese wiesen zwar einige typische Merkmale pluripotenter Stammzellen auf (vgl. dazu Kapitel 1.1.1), dennoch konnten wichtige Pluripotenzmarker wie die Expression von TRA-Oberflächenmolekülen nicht nachgewiesen werden. Zudem konnten hinsichtlich der Expression pluripotenzassoziiierter Transkripte zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den partiell reprogrammierten und den ES Zellen beobachtet werden. Allerdings war dies – wenn auch nicht in dieser Deutlichkeit – zu erwarten. Denn schließlich gleichen sich iPS Zellen und die entsprechenden ES Zellen weder auf

molekularer Ebene noch auf genetischer (Chin *et al.*, 2009; Chin *et al.*, 2010) oder epigenetischer Ebene (Doi *et al.*, 2009; Bock *et al.*, 2011) jemals vollständig. Darüber hinaus muss auch bedacht werden, dass selbst ES Zellen (Cahan und Daley, 2013) oder iPS Zellen (Chin *et al.*, 2010; Yamanaka, 2012) untereinander viele genetische und epigenetische Variationen zeigen. Die Variationen unter den iPS Zellen können dabei auf verschiedene Ursachen wie die verwendete Reprogrammierungsmethode oder das verwendete „Material“ (Zelltyp, Alter des Spenders, Differenzierungsgrad der Zelle, Erkrankung) zurückgeführt werden. Dies wiederum beeinflusst, wie gut sich iPS Zellen in die unterschiedlichen Zellen der drei Keimblätter differenzieren lassen (Polo *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Je nach Verwendungszweck der reprogrammierten Zellen müssten deshalb geeignete Ausgangszellen und Methoden für die iPS Zell-Generierung ausgewählt werden.

Nach neuesten Erkenntnissen spielt auch das alternative Spleißen eine nicht zu unterschätzende Rolle im Reprogrammierungsprozess. Die entsprechenden Ursache-Wirkungs-Zusammenhänge konnten bisher aber noch nicht hinreichend geklärt werden. Fest steht jedoch, dass durch das alternative Spleißen das Pluripotenznetzwerk reguliert werden kann. So können die verschiedenen Isoformen von FOXP1, die während des alternativen Spleißens gebildet werden, pluripotenzassoziierte Gene wie *POU5F1*, *NANOG*, *NR5A2* und *GDF3* regulieren. Darüber hinaus reprimieren sie gleichzeitig Gene, die für die Differenzierung von ES Zellen notwendig sind (Gabut *et al.*, 2011). Zudem wurden im Maussystem viele RNA-bindende Proteine ermittelt, die als Spleiß-Regulatoren dienen. So können z. B. U2af1 und Srsf3 den Reprogrammierungsprozess unterstützen (Ohta *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnten Han *et al.* zeigen, dass auch eine negative Regulation des alternativen Spleißens die Aufrechterhaltung des pluripotenten Status in ES Zellen unterstützt. Denn diese garantiert, dass die Gene *MBNL1* und *MBNL2* sowohl in mES als auch hES Zellen nur in geringem Maße exprimiert werden, so dass die entsprechenden regulatorischen Proteine keine Zelldifferenzierung befördern können (Han *et al.*, 2013).

Ähnlich aktuell sind die Beobachtungen, dass post-translationale Modifikationen von Proteinen möglicherweise den Reprogrammierungsprozess beeinflussen. Die auf verschiedene Weise, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Sumoylierung oder Ubiquitinierung, modifizierten Proteine regulieren die Expressionslevel und die Aktivität von Pluripotenzfaktoren und gewährleisten so eine Balance zwischen Pluripotenz und Differenzierung (Cai *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Beispielsweise gibt es Anzeichen dafür, dass das Ubiquitin-Proteasom-System regulatorisch in das Pluripotenznetzwerk von mES Zellen eingreifen kann. Die beiden Deubiquitinierungs-

Enzyme Psm14 und E3 Ligase Fbxw7 scheinen demnach essentiell für die Pluripotenz in mES und miPS Zellen zu sein (Buckley *et al.*, 2012).

Da Variationen unter iPS Zellen auch auf verschiedene Ursachen wie die verwendete Reprogrammierungsmethode oder das verwendete „Material“ zurückgeführt werden können, könnte das Alter des Spenders/tiers ein für eine erfolgreiche Reprogrammierung bedeutsamer Faktor sein. So konnte das Team um Sasaki lediglich fetale Weißbüschelaffenzellen reprogrammieren (Tomioka *et al.*, 2010). Weiter konnte gezeigt werden, dass auch humane fetale Zellen effizienter reprogrammiert werden können als neonatale Zellen, die wiederum bessere Ergebnisse zeigten als adulte Zellen (Park *et al.*, 2008). In anderen Versuchen konnte anhand der Reprogrammierung von 6 Wochen, 6 Monate oder 14 Monate alten Mauszellen gezeigt werden, dass die Zellen des 14 Monate alten Versuchstiers die geringste Proliferationsaktivität und Reprogrammierungseffizienz aufwiesen (Wang *et al.*, 2011).

Zudem können Zellen, die einen geringeren Differenzierungsgrad aufweisen, besser reprogrammiert werden als Zellen, die in hohem Maße ausdifferenziert sind (Eminli *et al.*, 2009). So war schon hinsichtlich des somatischen Zellkerntransfers bekannt, dass Differenzierungs- und Methylierungsstatus von besonderer Bedeutung sind (Blelloch *et al.*, 2006). Kim *et al.* konnten zeigen, dass bei der Reprogrammierung von Mauszellen neurale Stammzellen effizienter in iPS Zellen umgewandelt werden konnten, als dies bei Blutzellen oder dermalen Fibroblasten der Fall war (Kim *et al.*, 2010). Ähnliches zeigten auch die Untersuchungen der Gruppe von Jaenisch: Bei Zelltypen mit einem hohen Differenzierungsgrad, wie z. B. terminal differenzierten B-Zellen, müssen bestimmte Gene, hier *Pax5*, zunächst herunterreguliert werden, um den Grad der Differenzierung zu verringern, bevor sie schließlich reprogrammiert werden können (Hanna *et al.*, 2008).

Der Erfolg des Reprogrammierungsprozesses ist zudem vom gewählten Zelltyp abhängig. Z. B. konnten humane Keratinozyten (Aasen *et al.*, 2008), humane CD34⁺ Blutzellen (Loh *et al.*, 2009), neuronale Stammzellen des Menschen (Kim *et al.*, 2008) und der Maus (Kim *et al.*, 2009b), sowie humane Knochenmark-MSCs (Park *et al.*, 2008), humane Fettstammzellen (ASC; adipose tissue derived stem cells) (Sun *et al.*, 2009), HUVECs des Menschen (Panopoulos *et al.*, 2011) und Magenepithelzellen und Hepatozyten der Maus (Aoi *et al.*, 2008) erfolgreich reprogrammiert werden. Darüber hinaus wurden sekundäre iPS Zellen aus den unterschiedlichsten Geweben der Maus generiert: Nierenzellen, Nebennierenzellen, Muskelzellen, Keratinozyten und Neurosphären (Wernig *et al.*, 2008). Sekundäre iPS Zellen sind dabei iPS Zellen, die aus Zellen generiert wurden, die bereits die Reprogrammierungsvektoren induzierbar im Genom enthielten. Diese wurden durch die Zugabe von Aktivatoren wie z. B.

Doxycyclin aktiviert, um so den Reprogrammierungsprozess zu initiieren. Bei der Herstellung von sekundären iPS Zellen zeigte sich, dass Keratinozyten wesentlich effizienter reprogrammiert werden konnten als Fibroblasten. Während die reprogrammierten Fibroblasten noch Wochen nach Aktivierung der Reprogrammierungskassette eine transgene Expression der ektopt eingebrachten Transkriptionsfaktoren zeigten, wurden die Faktoren in den Keratinozyten bereits nach 10 Tagen stillgelegt (Maherali *et al.*, 2008). Grund dafür könnte sein, dass es sich bei den Keratinozyten um epitheliale Zellen handelt, die im Gegensatz zu Fibroblasten, welche mesenchymalen Ursprungs sind, nicht die MET durchlaufen (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010).

Auch wenn die *Callithrix jacchus* Fibroblasten in der vorliegenden Arbeit nicht zu vollständig induzierten Zellen reprogrammiert werden konnten, stellen die generierten stabilen piPS Zellen ein interessantes Modell zur weiteren Erforschung des Reprogrammierungsprozesses von Weißbüschelaffenzellen dar. Denn anhand dieser können transkriptionelle und epigenetische Veränderungen, die eine Zelle durchläuft, bevor sie den pluripotenten Status erreicht, optimal identifiziert werden.

Allerdings können die erzeugten piPS Zellen für den therapeutischen Einsatz nicht verwendet werden, auch wenn sich stabile piPS Zellen in Effektorzellen differenzieren lassen (Matsui *et al.*, 2012). Es besteht die Möglichkeit, dass die weiterhin transiente Expression der Reprogrammierungsfaktoren eine Tumorbildung begünstigt (Ohnishi *et al.*, 2014). Demnach ist es für die therapeutische Anwendung unabdingbar, *Callithrix jacchus* Zellen vollständig reprogrammieren zu können, da der Weißbüschelaffe bisher das einzige transgene Primatenmodell mit Keimbahntransmission darstellt. Daraus folgt, dass weitergehende Forschungsanstrengungen unternommen werden müssen, um mehr über die Expression von Transkriptionsfaktoren, die Wirkung von Signaltransduktionswegen und die Bedeutung von Histonmodifikationen in ES oder piPS Zellen des Weißbüschelaffen zu erfahren.

Mit der inzwischen vollständigen Entschlüsselung des *Callithrix jacchus* Genoms (Worley *et al.*, 2014) ist es zukünftig möglich, die bei der RNA-Seq generierten cDNA-Sequenzen besser gegen das Genom abgleichen zu können. Allerdings sind trotz vollständiger Sequenzierung noch nicht alle Genfunktionen bekannt. Somit wird es noch einige Zeit in Anspruch nehmen, mit Daten aus der RNA-Seq neue HeatMaps und Hauptkomponentenanalysen zu erstellen. Auf diesem Wege könnte vielleicht derjenige Schlüsselfaktor gefunden werden, mit dem Weißbüschelaffenzellen effizient und vollständig reprogrammiert werden können.

5 Zusammenfassung

Da iPS Zellen in jeden Zell- oder Gewebetyp differenziert werden können, der für eine autologe Transplantation benötigt wird, wären induzierte pluripotente Stammzellen in der regenerativen Medizin von großem Nutzen. Daher ist es sinnvoll, zur Erforschung der Generierung (und späteren Differenzierung) von iPS Zellen Tiermodelle einzusetzen, die näher mit dem Menschen verwandt sind als das üblicherweise verwendete Mausmodell. Deshalb war es Ziel der vorliegenden Arbeit, adulte Hautfibroblasten des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) in iPS Zellen zu überführen. Da zu Beginn der Forschungsarbeiten keine Veröffentlichungen zur Reprogrammierung von *Callithrix jacchus* Zellen vorlagen, wurden die verwendeten Methoden aus etablierten Praktiken in der Forschung an Menschen- und Mauszellen abgeleitet und dem Affenmodell angepasst. Dabei wurden unterschiedliche lentivirale Methoden und Reprogrammierungsbedingungen getestet. Die Zellen wurden einerseits mit einem polycistronischen Vektor, der die cDNA der humanen Yamanaka-Faktoren *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* und *MYC* ko-exprimierte, transduziert. Andererseits wurde der Reprogrammierungsprozess mit separaten Vektoren initiiert, mit Hilfe derer die genannten Faktoren einzeln in die Zelle eingebracht wurden. Weitere Ansätze wurden unter Hinzunahme eines *LIN28A*-Expressionsvektors durchgeführt. Zur Unterstützung des Reprogrammierungsprozesses wurden sogenannte *Small Molecules* zu den Zellen gegeben, die epigenetische Blockaden beseitigen oder Signaltransduktionswege aktivieren oder inhibieren.

Allerdings konnten nur partiell reprogrammierte Zellen (piPS) generiert werden, die auch durch die Verwendung von *Small Molecules* nicht in vollständige iPS Zellen überführt werden konnten. Die generierten Kolonien zeigten allerdings Charakteristika pluripotenter Zellen. So exprimierten sie die Alkalische Phosphatase und wurden positiv auf SSEA3- und SSEA4-exprimierende Zellen getestet. Dabei exprimierten aber nur wenige Zellen die Marker TRA-1-81 oder TRA-1-60. Die Analyse der endogenen pluripotenzassoziierten Transkripte in den piPS Zellen mittels qRT-PCR zeigte hingegen, dass diese Gene auf ein höheres Level als in den Fibroblasten induziert wurden. Allerdings wurde je nach Methode nur eine mit ES Zellen vergleichbare Expression von *SOX2*, *MYC* und *ZFP24* oder *KLF4* gemessen; die Hochregulation von *POU5F1* war dabei stets unzureichend. Zudem wurde der retrovirale Vektor in den piPS Zellen nicht stillgelegt. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA), die auf einer globalen Transkriptomanalyse aufbaut, zeigte, dass die piPS Zellen eine miteinander vergleichbare Genexpression aufwiesen. Im Vergleich zu ES Zellen zeigten sie zwar deutliche Unterschiede, ihre Transkriptome waren diesen aber ähnlicher als denen der Hautfibroblasten.

Auch wenn die somatischen Weißbüschelaffenzellen nicht vollständig reprogrammiert werden konnten, können die generierten piPS Zellen für die Identifizierung transkriptioneller und epigenetischer Veränderung sowie aktiver und inhibierter Signaltransduktionswege während der unterschiedlichen Stadien des Reprogrammierungsprozesses eingesetzt werden. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit könnte in weiteren Forschungen versucht werden, Keratinozyten mit sechs Faktoren auf separaten Vektoren zu transduzieren. Die epithelialen Zellen könnten möglicherweise effizienter reprogrammiert werden, da sie die MET nicht durchlaufen. Auch wenn der polycistronische Vektor zu besseren Reprogrammierungsergebnissen führte, können mit separaten Vektoren mehr als vier Faktoren in die Zellen transduziert werden.

6 Summary

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are attractive for regenerative medicine because they can be differentiated towards any somatic cell type and tissues needed for autologous transplantation. It would be desirable to test the medical applicability of this notion in a relevant animal model system which is more closely related to humans than the commonly used mouse model is. Thus the non-human primate common marmoset (*Callithrix jacchus*) is a suitable choice. The major aim of this thesis was to reprogram dermal fibroblasts of the marmoset monkey towards iPSCs. Because the conditions for reprogramming marmoset cells were ill-defined at the beginning of this research project, different lentiviral approaches and reprogramming conditions were used. Thus the somatic cells were transduced with a polycistronic vector, co-expressing the cDNAs for human *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* and *MYC* (Yamanaka factors). Furthermore the reprogramming process was initiated with separate vectors, each coding a Yamanaka factor together with a different fluorescence protein. In further approaches these were additionally combined with a *LIN28A*-expression vector. To overcome possible epigenetic roadblocks due to remaining DNA-methylation or to activate or inhibit signaling transduction pathways, which are supportive for pluripotency, *small molecules* were added to the cells.

However, the marmoset skin fibroblasts could not be fully reprogrammed with all the different approaches. Even the use of various *small molecules* did not yield to fully reprogrammed cells. Indeed the obtained colonies showed some hallmarks of pluripotency. They expressed alkaline phosphatase and stained positive for the pluripotency markers SSEA3 and SSEA4, but they were mostly negative for TRA-1-81 and TRA-1-60 expression. Analysis of endogenous pluripotency associated gene transcription by qRT-PCR showed that these genes were significantly induced above levels of unmanipulated fibroblasts. However, depending on the approach, only *SOX2*, *MYC* and *ZFP24* or *KLF4* expression was comparable between the partial iPSCs (piPSCs) and marmoset embryonic stem cells (ESC). Beyond that especially the up regulation of *POU5F1* expression was insufficient. Noteworthy, they also failed to silence retroviral vector expression, a phenomenon normally observed during successful pluripotency induction in human and mouse cells. Furthermore, global transcriptome measurements by RNA-seq and subsequent principle component analysis (PCA) revealed that the generated piPS cells showed comparable gene expression among each other but still different from marmoset ESCs. However, they were much more similar to the ESCs than to the skin fibroblasts indicating their partially reprogrammed state.

Thus piPSCs are not fully reprogrammed they are very powerful to identify transcriptional and epigenetic changes as well as active and inhibited signal transduction pathways during the different stages of the reprogramming process. However, the findings of the piPSC analyses will certainly help to find better ways for an efficient and complete reprogramming of somatic marmoset cells. One could consider transducing keratinocytes with six factors on six separate vectors. The epithelial cells could possibly be reprogrammed more efficiently, because they do not have to pass the MET. Although the polycistronic vector led to better results, only separate vectors are suitable to transduce cells with more than four factors.

7 Literaturverzeichnis

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., *et al.* (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276-1284.
- Abbott, D.H., Barnett, D.K., Colman, R.J., Yamamoto, M.E., and Schultz-Darken, N.J. (2003). Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. *Comp Med* 53, 339-350.
- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., Bevan, S., *et al.* (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25, 803-816.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227, 271-278.
- Amit, M., and Itskovitz-Eldor, J. (2002). Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat* 200, 225-232.
- Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R., and Itskovitz-Eldor, J. (2003). Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 68, 2150-2156.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321, 699-702.
- Ausubel, F.M. (1987). *Current protocols in molecular biology* Brooklyn, N.Y. Media, Pa. Greene Pub. Associates, J. Wiley, order fulfillment.
- Bao, L., He, L., Chen, J., Wu, Z., Liao, J., Rao, L., Ren, J., Li, H., Zhu, H., Qian, L., *et al.* (2011). Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. *Cell Res* 21, 600-608.
- Bieberich, E., and Wang, G. (2013). Molecular Mechanisms Underlying Pluripotency. In *Pluripotent Stem Cells*, D. Bhartiya, and N. Lenka, eds. (InTech).
- Blelloch, R., Wang, Z., Meissner, A., Pollard, S., Smith, A., and Jaenisch, R. (2006). Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells* 24, 2007-2013.
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., *et al.* (2011). Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144, 439-452.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2, 151-159.
- Brok, H.P., Hornby, R.J., Griffiths, G.D., Scott, L.A., and Hart, B.A. (2001). An extensive monoclonal antibody panel for the phenotyping of leukocyte subsets in the common marmoset and the cotton-top tamarin. *Cytometry* 45, 294-303.
- Buckley, S.M., Aranda-Orgilles, B., Strikoudis, A., Apostolou, E., Loizou, E., Moran-Crusio, K., Farnsworth, C.L., Koller, A.A., Dasgupta, R., Silva, J.C., *et al.* (2012). Regulation of pluripotency and cellular reprogramming by the ubiquitin-proteasome system. *Cell Stem Cell* 11, 783-798.

- Buganim, Y., Faddah, D.A., Cheng, A.W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S.L., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2012). Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* 150, 1209-1222.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8033-8037.
- Byrne, J.A., Pedersen, D.A., Clepper, L.L., Nelson, M., Sanger, W.G., Gokhale, S., Wolf, D.P., and Mitalipov, S.M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450, 497-502.
- Cahan, P., and Daley, G.Q. (2013). Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 357-368.
- Cai, N., Li, M., Qu, J., Liu, G.H., and Izpisua Belmonte, J.C. (2012). Post-translational modulation of pluripotency. *J Mol Cell Biol* 4, 262-265.
- Carey, B.W., Markoulaki, S., Hanna, J.H., Faddah, D.A., Buganim, Y., Kim, J., Ganz, K., Steine, E.J., Cassady, J.P., Creighton, M.P., *et al.* (2011). Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 9, 588-598.
- Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10, 295-304.
- Chang, M.Y., Kim, D., Kim, C.H., Kang, H.C., Yang, E., Moon, J.I., Ko, S., Park, J., Park, K.S., Lee, K.A., *et al.* (2010). Direct reprogramming of rat neural precursor cells and fibroblasts into pluripotent stem cells. *PLoS One* 5, e9838.
- Chen, H.F., Chuang, C.Y., Lee, W.C., Huang, H.P., Wu, H.C., Ho, H.N., Chen, Y.J., and Kuo, H.C. (2011). Surface marker epithelial cell adhesion molecule and E-cadherin facilitate the identification and selection of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* 7, 722-735.
- Chen, J., Han, Q., and Pei, D. (2012). EMT and MET as paradigms for cell fate switching. *J Mol Cell Biol* 4, 66-69.
- Chen, J., Liu, H., Liu, J., Qi, J., Wei, B., Yang, J., Liang, H., Chen, Y., Wu, Y., Guo, L., *et al.* (2013). H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet* 45, 34-42.
- Chen, L., and Daley, G.Q. (2008). Molecular basis of pluripotency. *Hum Mol Genet* 17, R23-27.
- Chen, T., Yuan, D., Wei, B., Jiang, J., Kang, J., Ling, K., Gu, Y., Li, J., Xiao, L., and Pei, G. (2010). E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells* 28, 1315-1325.
- Cheng, L., Hammond, H., Ye, Z., Zhan, X., and Dravid, G. (2003). Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* 21, 131-142.
- Chesne, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., and Renard, J.P. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol* 20, 366-369.
- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., *et al.* (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111-123.
- Chin, M.H., Pellegrini, M., Plath, K., and Lowry, W.E. (2010). Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 263-269.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Collas, P. (2009). Epigenetic states in stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1790, 900-905.

- Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., and Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309, 1369-1373.
- Dalton, S. (2013). Signaling networks in human pluripotent stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 25, 241-246.
- Davis, R.P., Nemes, C., Varga, E., Freund, C., Kosmidis, G., Gkatzis, K., de Jong, D., Szuhai, K., Dinnyes, A., and Mummery, C.L. (2013). Generation of induced pluripotent stem cells from human foetal fibroblasts using the Sleeping Beauty transposon gene delivery system. *Differentiation* 86, 30-37.
- Deng, J., Shoemaker, R., Xie, B., Gore, A., LeProust, E.M., Antosiewicz-Bourget, J., Egli, D., Maherali, N., Park, I.H., Yu, J., *et al.* (2009). Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol* 27, 353-360.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87, 27-45.
- Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., *et al.* (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41, 1350-1353.
- Downing, T.L., Soto, J., Morez, C., Houssin, T., Fritz, A., Yuan, F., Chu, J., Patel, S., Schaffer, D.V., and Li, S. (2013). Biophysical regulation of epigenetic state and cell reprogramming. *Nat Mater* 12, 1154-1162.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
- Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., and Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41, 968-976.
- Engle, S.J., and Puppala, D. (2013). Integrating human pluripotent stem cells into drug development. *Cell Stem Cell* 12, 669-677.
- Esteban, M.A., Xu, J., Yang, J., Peng, M., Qin, D., Li, W., Jiang, Z., Chen, J., Deng, K., Zhong, M., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem* 284, 17634-17640.
- Ezashi, T., Das, P., and Roberts, R.M. (2005). Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4783-4788.
- Feng, B., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.H., Heng, J.C., Chan, Y.S., Yaw, L.P., Zhang, W., Loh, Y.H., Han, J., *et al.* (2009). Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 11, 197-203.
- Fisher, C.L., and Fisher, A.G. (2011). Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells. *Curr Opin Genet Dev* 21, 140-146.
- Fleischmann, G., Muller, T., Blasczyk, R., Sasaki, E., and Horn, P.A. (2009). Growth characteristics of the nonhuman primate embryonic stem cell line cjes001 depending on feeder cell treatment. *Cloning Stem Cells* 11, 225-233.
- Fussner, E., Djuric, U., Strauss, M., Hotta, A., Perez-Iratxeta, C., Lanner, F., Dilworth, F.J., Ellis, J., and Bazett-Jones, D.P. (2011). Constitutive heterochromatin reorganization during somatic cell reprogramming. *EMBO J* 30, 1778-1789.
- Gabut, M., Samavarchi-Tehrani, P., Wang, X., Slobodeniuc, V., O'Hanlon, D., Sung, H.K., Alvarez, M., Talukder, S., Pan, Q., Mazzoni, E.O., *et al.* (2011). An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell* 147, 132-146.
- Galonska, C., Smith, Z.D., and Meissner, A. (2014). In Vivo and in vitro dynamics of undifferentiated embryonic cell transcription factor 1. *Stem Cell Reports* 2, 245-252.

- Gellibert, F., Woolven, J., Fouchet, M.H., Mathews, N., Goodland, H., Lovegrove, V., Laroze, A., Nguyen, V.L., Sautet, S., Wang, R., *et al.* (2004). Identification of 1,5-naphthyridine derivatives as a novel series of potent and selective TGF-beta type I receptor inhibitors. *J Med Chem* 47, 4494-4506.
- Golipour, A., David, L., Liu, Y., Jayakumar, G., Hirsch, C.L., Trcka, D., and Wrana, J.L. (2012). A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network. *Cell Stem Cell* 11, 769-782.
- Gonzalez, F., Barragan Monasterio, M., Tiscornia, G., Montserrat Pulido, N., Vassena, R., Batlle Morera, L., Rodriguez Piza, I., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8918-8922.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 249-257.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.
- Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10, 622-640.
- Han, H., Irimia, M., Ross, P.J., Sung, H.K., Alipanahi, B., David, L., Golipour, A., Gabut, M., Michael, I.P., Nachman, E.N., *et al.* (2013). MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature* 498, 241-245.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., *et al.* (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133, 250-264.
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462, 595-601.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., *et al.* (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920-1923.
- Hansson, J., Rafiee, M.R., Reiland, S., Polo, J.M., Gehring, J., Okawa, S., Huber, W., Hochedlinger, K., and Krijgsveld, J. (2012). Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Rep* 2, 1579-1592.
- Hao, J., Li, T.G., Qi, X., Zhao, D.F., and Zhao, G.Q. (2006). WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 290, 81-91.
- Henderson, J.K., Draper, J.S., Baillie, H.S., Fishel, S., Thomson, J.A., Moore, H., and Andrews, P.W. (2002). Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 20, 329-337.
- Heng, J.C., Feng, B., Han, J., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.H., Orlov, Y.L., Huss, M., Yang, L., Lufkin, T., *et al.* (2010). The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 6, 167-174.
- Hibino, H., Tani, K., Ikebuchi, K., Wu, M.S., Sugiyama, H., Nakazaki, Y., Tanabe, T., Takahashi, S., Tojo, A., Suzuki, S., *et al.* (1999). The common marmoset as a target preclinical primate model for cytokine and gene therapy studies. *Blood* 93, 2839-2848.

- Hochedlinger, K., and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136, 509-523.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., *et al.* (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 341, 651-654.
- Hough, S.R., Laslett, A.L., Grimmond, S.B., Kolle, G., and Pera, M.F. (2009). A continuum of cell states spans pluripotency and lineage commitment in human embryonic stem cells. *PLoS One* 4, e7708.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 26, 795-797.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26, 1269-1275.
- Ichida, J.K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E.Y., Chung, J.E., Egli, D., Loh, K.M., Carter, A.C., Di Giorgio, F.P., Koszka, K., *et al.* (2009). A small-molecule inhibitor of *tgf-Beta* signaling replaces *sox2* in reprogramming by inducing *nanog*. *Cell Stem Cell* 5, 491-503.
- Inman, G.J., Nicolas, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J., and Hill, C.S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62, 65-74.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6, 88-95.
- Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567-582.
- Jia, F., Wilson, K.D., Sun, N., Gupta, D.M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N.J., Chen, Z.Y., Robbins, R.C., Kay, M.A., *et al.* (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7, 197-199.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771-775.
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y.V., Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., Wahl, G.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140-1144.
- Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., *et al.* (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472-476.
- Kim, D.K., Cha, Y., Ahn, H.J., Kim, G., and Park, K.S. (2014). *Lefty1* and *lefty2* control the balance between self-renewal and pluripotent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 23, 457-466.
- Kim, J.B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Scholer, H.R. (2009b). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649-643.
- Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., *et al.* (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454, 646-650.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I., *et al.* (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285-290.
- Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y.H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., *et al.* (2011). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 1117-1119.

- Kolle, G., Ho, M., Zhou, Q., Chy, H.S., Krishnan, K., Cloonan, N., Bertonecello, I., Laslett, A.L., and Grimmond, S.M. (2009). Identification of human embryonic stem cell surface markers by combined membrane-polysome translation state array analysis and immunotranscriptional profiling. *Stem Cells* 27, 2446-2456.
- Kues, W.A., Herrmann, D., Barg-Kues, B., Haridoss, S., Nowak-Imialek, M., Buchholz, T., Streeck, M., Grebe, A., Grabundzija, I., Merkert, S., *et al.* (2013). Derivation and characterization of sleeping beauty transposon-mediated porcine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 22, 124-135.
- Lesinski, D.A., Heinz, N., Pilat-Carotta, S., Rudolph, C., Jacobs, R., Schlegelberger, B., Klump, H., and Schiedlmeier, B. (2012). Serum- and stromal cell-free hypoxic generation of embryonic stem cell-derived hematopoietic cells in vitro, capable of multilineage repopulation of immunocompetent mice. *Stem Cells Transl Med* 1, 581-591.
- Levenstein, M.E., Ludwig, T.E., Xu, R.H., Llanas, R.A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., and Thomson, J.A. (2006). Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24, 568-574.
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., *et al.* (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7, 51-63.
- Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., and Ding, S. (2009). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4, 16-19.
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H.J., Yoder, M.C., and Chan, R.J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105, 635-637.
- Liao, J., Wu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Cui, C., Gao, Y., Chen, T., Rao, L., Chen, S., Jia, N., *et al.* (2008). Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res* 18, 600-603.
- Lin, T., Ambasudhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., Lin, X., Hahm, H.S., Hao, E., Hayek, A., *et al.* (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 6, 805-808.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., *et al.* (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322.
- Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., Jiang, W., Cai, J., Liu, M., Cui, K., *et al.* (2008). Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3, 587-590.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Loh, Y.H., Agarwal, S., Park, I.H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113, 5476-5479.
- Loh, Y.H., Ng, J.H., and Ng, H.H. (2008). Molecular framework underlying pluripotency. *Cell Cycle* 7, 885-891.
- Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., *et al.* (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38, 431-440.
- Maekawa, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Shibukawa, R., Kodanaka, I., Ichisaka, T., Kawamura, Y., Mochizuki, H., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2011). Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 474, 225-229.

- Mahadevan, S., Wen, S., Wan, Y.W., Peng, H.H., Otta, S., Liu, Z., Iacovino, M., Mahen, E.M., Kyba, M., Sadikovic, B., *et al.* (2014). NLRP7 affects trophoblast lineage differentiation, binds to overexpressed YY1 and alters CpG methylation. *Hum Mol Genet* 23, 706-716.
- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., and Hochedlinger, K. (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 340-345.
- Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2008). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 595-605.
- Mansfield, K. (2003). Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comp Med* 53, 383-392.
- Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R.A., and Jaenisch, R. (2008). Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 3, 132-135.
- Mathieu, J., Zhang, Z., Nelson, A., Lamba, D.A., Reh, T.A., Ware, C., and Ruohola-Baker, H. (2013). Hypoxia induces re-entry of committed cells into pluripotency. *Stem Cells* 31, 1737-1748.
- Matsui, T., Takano, M., Yoshida, K., Ono, S., Fujisaki, C., Matsuzaki, Y., Toyama, Y., Nakamura, M., Okano, H., and Akamatsu, W. (2012). Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. *Stem Cells* 30, 1109-1119.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49-55.
- Montserrat, N., Garreta, E., Gonzalez, F., Gutierrez, J., Eguizabal, C., Ramos, V., Borros, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Simple generation of human induced pluripotent stem cells using poly-beta-amino esters as the non-viral gene delivery system. *J Biol Chem* 286, 12417-12428.
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., Polgar, Z., Varga, E., Ivics, Z., Pirty, M.K., and Dinnyes, A. (2012). Generation of mouse induced pluripotent stem cells from different genetic backgrounds using Sleeping beauty transposon mediated gene transfer. *Exp Cell Res* 318, 2482-2489.
- Muller, T., Fleischmann, G., Eildermann, K., Matz-Rensing, K., Horn, P.A., Sasaki, E., and Behr, R. (2009). A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. *Hum Reprod* 24, 1359-1372.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101-106.
- Neubert, R., Foerster, M., Nogueira, A.C., and Helge, H. (1996). Cross-reactivity of antihuman monoclonal antibodies with cell surface receptors in the common marmoset. *Life Sci* 58, 317-324.
- Nii, T., Marumoto, T., Kawano, H., Yamaguchi, S., Liao, J., Okada, M., Sasaki, E., Miura, Y., and Tani, K. (2014). Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells. *FEBS Open Bio* 4, 213-219.
- Nishino, K., Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Fukawatase, Y., Chikazawa, E., Sakaguchi, H., Akutsu, H., and Umezawa, A. (2011). DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet* 7, e1002085.
- Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J.M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S.L., Manos, P.D., Rossi, D.J., *et al.* (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol* 13, 541-549.
- Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., *et al.* (2014). Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell* 156, 663-677.
- Ohta, S., Nishida, E., Yamanaka, S., and Yamamoto, T. (2013). Global splicing pattern reversion during somatic cell reprogramming. *Cell Rep* 5, 357-366.

- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317.
- Onder, T.T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A.U., Zhu, N., Bernt, K.M., Cahan, P., Marcarci, B.O., Unternaehrer, J., Gupta, P.B., *et al.* (2012). Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* **483**, 598-602.
- Panopoulos, A.D., Ruiz, S., Yi, F., Herrerias, A., Batchelder, E.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Rapid and highly efficient generation of induced pluripotent stem cells from human umbilical vein endothelial cells. *PLoS One* **6**, e19743.
- Papapetrou, E.P., Tomishima, M.J., Chambers, S.M., Mica, Y., Reed, E., Menon, J., Tabar, V., Mo, Q., Studer, L., and Sadelain, M. (2009). Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12759-12764.
- Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**, 141-146.
- Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D., and Williams, R.L. (1990). Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* **141**, 344-352.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., *et al.* (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**, 86-90.
- Polo, J.M., Anderssen, E., Walsh, R.M., Schwarz, B.A., Nefzger, C.M., Lim, S.M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., *et al.* (2012). A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* **151**, 1617-1632.
- Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., *et al.* (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **28**, 848-855.
- Rais, Y., Zviran, A., Geula, S., Gafni, O., Chomsky, E., Viukov, S., Mansour, A.A., Caspi, I., Krupalnik, V., Zerbib, M., *et al.* (2013). Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* **502**, 65-70.
- Rajasingh, J., Lambers, E., Hamada, H., Bord, E., Thorne, T., Goukassian, I., Krishnamurthy, P., Rosen, K.M., Ahluwalia, D., Zhu, Y., *et al.* (2008). Cell-free embryonic stem cell extract-mediated derivation of multipotent stem cells from NIH3T3 fibroblasts for functional and anatomical ischemic tissue repair. *Circ Res* **102**, e107-117.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P., and Gardner, M.B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33**, 1027-1033.
- Redmer, T., Diecke, S., Grigoryan, T., Quiroga-Negreira, A., Birchmeier, W., and Besser, D. (2011). E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep* **12**, 720-726.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* **18**, 399-404.
- Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.K., Beyer, T.A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A., and Wrana, J.L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* **7**, 64-77.
- Sasaki, E., Hanazawa, K., Kurita, R., Akatsuka, A., Yoshizaki, T., Ishii, H., Tanioka, Y., Ohnishi, Y., Suemizu, H., Sugawara, A., *et al.* (2005). Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cells* **23**, 1304-1313.

- Sasaki, E., Suemizu, H., Shimada, A., Hanazawa, K., Oiwa, R., Kamioka, M., Tomioka, I., Sotomaru, Y., Hirakawa, R., Eto, T., *et al.* (2009). Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* **459**, 523-527.
- Schatten, G., and Mitalipov, S. (2009). Developmental biology: Transgenic primate offspring. *Nature* **459**, 515-516.
- Schopperle, W.M., and DeWolf, W.C. (2007). The TRA-1-60 and TRA-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma. *Stem Cells* **25**, 723-730.
- Shi, Y., Despons, C., Do, J.T., Hahm, H.S., Scholer, H.R., and Ding, S. (2008a). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* **3**, 568-574.
- Shi, Y., Do, J.T., Despons, C., Hahm, H.S., Scholer, H.R., and Ding, S. (2008b). A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **2**, 525-528.
- Shimada, H., Nakada, A., Hashimoto, Y., Shigeno, K., Shionoya, Y., and Nakamura, T. (2010). Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol Reprod Dev* **77**, 2.
- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* **6**, e253.
- Singh, A.M., Reynolds, D., Cliff, T., Ohtsuka, S., Mattheyses, A.L., Sun, Y., Menendez, L., Kulik, M., and Dalton, S. (2012). Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* **10**, 312-326.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690.
- Solter, D., and Knowles, B.B. (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5565-5569.
- Sommer, C.A., Sommer, A.G., Longmire, T.A., Christodoulou, C., Thomas, D.D., Gostissa, M., Alt, F.W., Murphy, G.J., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. (2010). Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells* **28**, 64-74.
- Sotomaru, Y., Hirakawa, R., Shimada, A., Shiozawa, S., Sugawara, A., Oiwa, R., Nobukiyo, A., Okano, H., Tamaoki, N., Nomura, T., *et al.* (2009). Preimplantation development of somatic cell cloned embryos in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Cloning Stem Cells* **11**, 575-583.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008a). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* **2**, 230-240.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008b). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**, 945-949.
- Sun, N., Panetta, N.J., Gupta, D.M., Wilson, K.D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., Cherry, A.M., Robbins, R.C., Longaker, M.T., *et al.* (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15720-15725.
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* **11**, 1553-1558.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.

- Tanabe, K., Nakamura, M., Narita, M., Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2013). Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 12172-12179.
- Taranger, C.K., Noer, A., Sorensen, A.L., Hakelien, A.M., Boquest, A.C., and Collas, P. (2005). Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* *16*, 5719-5735.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., and Scott, E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* *416*, 542-545.
- Theunissen, T.W., and Jaenisch, R. (2014). Molecular control of induced pluripotency. *Cell Stem Cell* *14*, 720-734.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145-1147.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., and Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 7844-7848.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., and Hearn, J.P. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* *55*, 254-259.
- Tiemann, U., Sgodda, M., Warlich, E., Ballmaier, M., Scholer, H.R., Schambach, A., and Cantz, T. (2011). Optimal reprogramming factor stoichiometry increases colony numbers and affects molecular characteristics of murine induced pluripotent stem cells. *Cytometry A* *79*, 426-435.
- Tomioka, I., Maeda, T., Shimada, H., Kawai, K., Okada, Y., Igarashi, H., Oiwa, R., Iwasaki, T., Aoki, M., Kimura, T., *et al.* (2010). Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28. *Genes Cells* *15*, 959-969.
- Utikal, J., Polo, J.M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R.M., Khalil, A., Rheinwald, J.G., and Hochedlinger, K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* *460*, 1145-1148.
- Voelkel, C., Galla, M., Maetzig, T., Warlich, E., Kuehle, J., Zychlinski, D., Bode, J., Cantz, T., Schambach, A., and Baum, C. (2010). Protein transduction from retroviral Gag precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 7805-7810.
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* *394*, 369-374.
- Wang, B., Miyagoe-Suzuki, Y., Yada, E., Ito, N., Nishiyama, T., Nakamura, M., Ono, Y., Motohashi, N., Segawa, M., Masuda, S., *et al.* (2011). Reprogramming efficiency and quality of induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) generated from muscle-derived fibroblasts of mdx mice at different ages. *PLoS Curr* *3*, RRN1274.
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D.N., Theunissen, T.W., and Orkin, S.H. (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* *444*, 364-368.
- Wang, Y.C., Peterson, S.E., and Loring, J.F. (2014). Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res* *24*, 143-160.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., *et al.* (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* *7*, 618-630.
- Weber, K., Thomaschewski, M., Warlich, M., Volz, T., Cornils, K., Niebuhr, B., Tager, M., Lutgehetmann, M., Pollok, J.M., Stocking, C., *et al.* (2011). RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nat Med* *17*, 504-509.

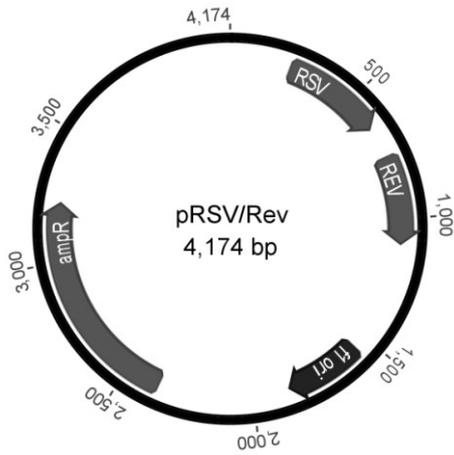
- Wernig, M., Lengner, C.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Steine, E., Foreman, R., Staerk, J., Markoulaki, S., and Jaenisch, R. (2008). A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol* 26, 916-924.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.
- Wiedemann, A., Hemmer, K., Bernemann, I., Gohring, G., Pogozykh, O., Figueiredo, C., Glage, S., Schambach, A., Schwamborn, J.C., Blasczyk, R., *et al.* (2012). Induced pluripotent stem cells generated from adult bone marrow-derived cells of the nonhuman primate (*Callithrix jacchus*) using a novel quad-cistronic and excisable lentiviral vector. *Cell Reprogram* 14, 485-496.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Wobus, A.M., Holzhausen, H., Jakel, P., and Schoneich, J. (1984). Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152, 212-219.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., *et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.
- Woods, N.B., Muessig, A., Schmidt, M., Flygare, J., Olsson, K., Salmon, P., Trono, D., von Kalle, C., and Karlsson, S. (2003). Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood* 101, 1284-1289.
- Worley, K., Warren, W., Rogers, J., Locke, D., Muzny, D., Mardis, E., Weinstock, G., Tardif, S., Aagaard, K., Archidiacono, N., *et al.* (2014). The common marmoset genome provides insight into primate biology and evolution. *Nat Genet* 46, 850-857.
- Wu, Y., Zhang, Y., Mishra, A., Tardif, S.D., and Hornsby, P.J. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from newborn marmoset skin fibroblasts. *Stem Cell Res* 4, 180-188.
- Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 971-974.
- Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* 10, 678-684.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., and Smith, A.G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548.
- Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 237-241.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., He, P., Slukvin, I., and Thomson, J.A. (2006). Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. *Stem Cells* 24, 168-176.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Yuan, X., Wan, H., Zhao, X., Zhu, S., Zhou, Q., and Ding, S. (2011). Brief report: combined chemical treatment enables Oct4-induced reprogramming from mouse embryonic fibroblasts. *Stem Cells* 29, 549-553.
- Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., and Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 6, 363-369.

- Zhang, Z., Gao, Y., Gordon, A., Wang, Z.Z., Qian, Z., and Wu, W.S. (2011). Efficient generation of fully reprogrammed human iPSC cells via polycistronic retroviral vector and a new cocktail of chemical compounds. *PLoS One* 6, e26592.
- Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., *et al.* (2008). Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* 3, 475-479.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381-384.
- Zhou, Q., Chipperfield, H., Melton, D.A., and Wong, W.H. (2007). A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16438-16443.
- Zhou, W., and Freed, C.R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2667-2674.
- Zuhlke, U., and Weinbauer, G. (2003). The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model in toxicology. *Toxicol Pathol* 31 *Suppl*, 123-127.

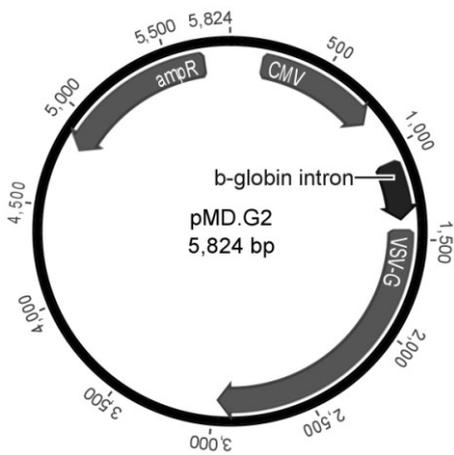
8 Anhang

Plasmidkarten

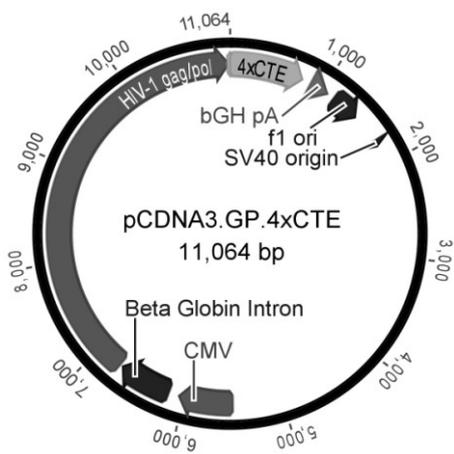
pRSV/Rev



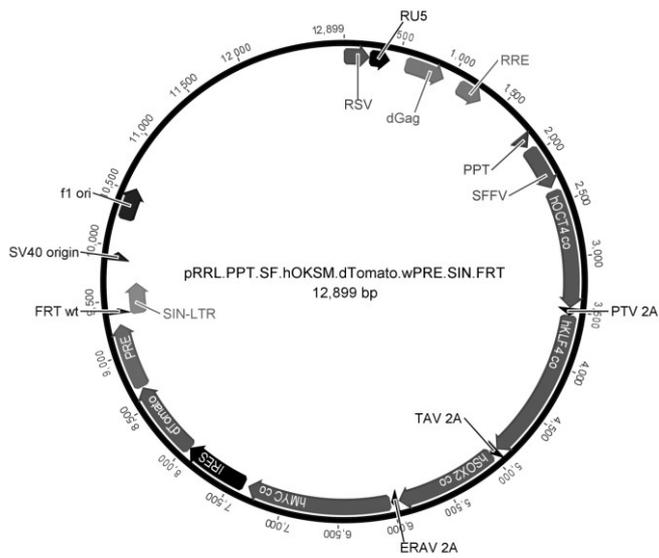
pMD.G2



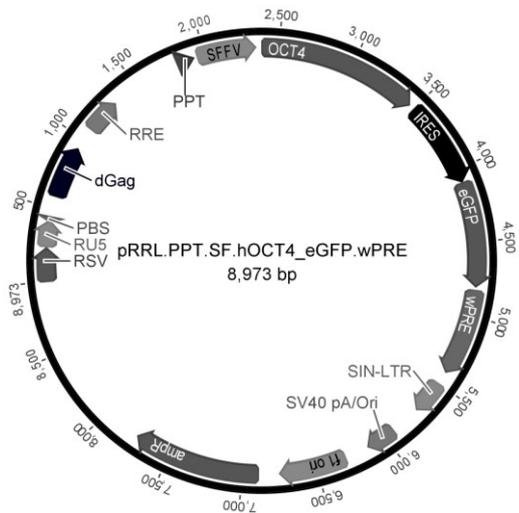
pCDNA3.GP.4xCTE



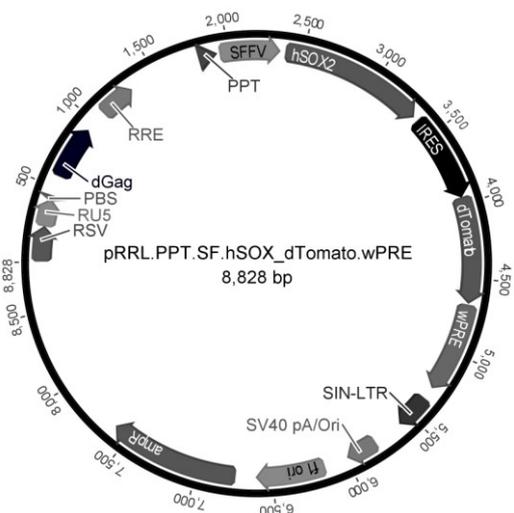
pRRL.PPT.SF.hOKSM.dTomato.wPRE.SIN.FRT



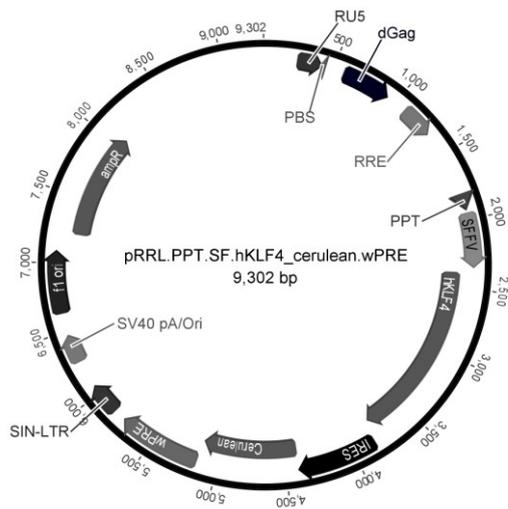
pRRL.PPT.SF.hOCT4_eGFP.wPRE



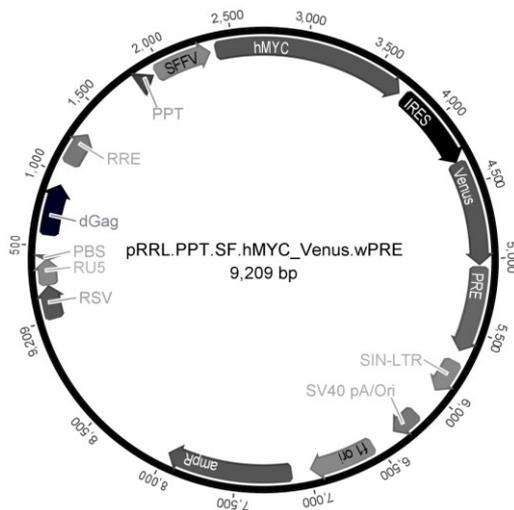
pRRL.PPT.SF.hSOX2_dTomato.wPRE



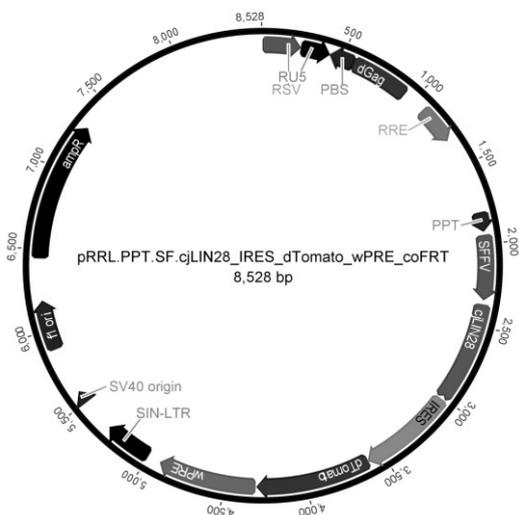
pRRL.PPT.SF.hKLF4_Cerulean.wPRE



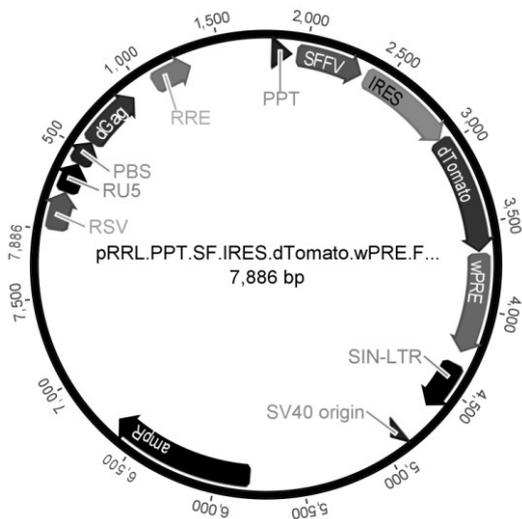
pRRL.PPT.SF.hMYC_Venus.wPRE



pRRL.PPT.SF.cjLIN28_IRES_dTomato_wPRE_FRT



pRRL.PPT.SF.IRES.dTomato.wPRE.FRT



ampR: Ampicillin Resistenz; **CMV**: Promotor des Cytomegalievirus; **dGag**: *deleted Group Specific Antigen* (deletiertes gruppenspezifisches Antigen); **ERAV 2A**: 2A Esterase des equinen Rhinovirus 1; **FRT**: *Flp recombinase recognition site* (Erkennungsstelle der Flp-Rekombinase); **IRES**: *internal ribosomal entry site* (interne ribosomale Eintrittsstelle); **ORI**: *origin of replication* (Replikationsursprung); **pA**: Polyadenylierungssignal; **PBS**: *primer binding site* (Primerbindestelle); **PPT**: *polypurin tract* (Polypurintrakt); **PTV A**: Esterase des porcinen Teschovirus; **rev**: *regulator of expression of virion proteins* (Virion Expressions Regulator); **RRE**: *rev responsive element* (Bindestelle für rev); **RSV**: Promoter des Rous-Sarkom-Virus; **RU5**: repetitive Sequenz am U5 (Nähe des 5' Ende); **SFFV**: Promoter des spleen focus forming virus; **SIN**: *self-inactivating* (selbstinaktivierend); **TAV 2A**: 2A Esterase des Thossea asigna virus

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Horn dafür bedanken, dass ich diese Arbeit am Institut für Transfusionsmedizin schreiben konnte. Ebenso bedanke ich mich bei Ihnen dafür, dass Sie mir den Forschungsaufenthalt in Japan ermöglicht und die Rolle des Erstprüfers dieser Arbeit gerne übernommen haben.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinem Betreuer Dr. Hannes Klump. Vielen lieben Dank, dass ich in zahlreichen und zeitintensiven Meetings von Deinem umfangreichen und fundierten Wissen profitieren konnte. Zudem habe ich von Dir (hoffentlich) vieles über das wissenschaftliche Schreiben und Argumentieren lernen können. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bei Dir bedanken.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Rüdiger Behr vom DPZ in Göttingen für die Hautbiopsien der Weißbüschelaffen sowie Dr. Erika Sasaki, CIAE Kawasaki, für die *Callithrix jacchus* ES Zelllinie. Außerdem danke ich Dr. Axel Schambach und Dr. Eva Warlich, Hochschule Hannover, für die Reprogrammierungsvektoren.

Vielen lieben Dank auch an alle Mitarbeiter des Instituts – vor allem für das angenehme Arbeitsklima. Besonders möchte ich mich bei Susanne und den Doktoranden der AG Giebel bedanken! Ohne die tatkräftige Hilfe von Anna, André und Stefan hätte ich das Mikroskopieren und FACSen nie so schnell erlernt.

Mein besonderer Dank gilt aber vor allem den „Gründungsmitgliedern“ der AG Klump, meinen Essener Mädels: Antje, Corinna, Kristin und Nadine. Euch möchte ich nicht nur für Eure Hilfsbereitschaft und den guten Zusammenhalt danken. Ihr habt mich genau dann aufgebaut, wenn dies dringend nötig war. Ich habe mich sehr gefreut, dass Ihr da wart und auch in Zukunft da sein werdet! Vielen lieben Dank auch den Mädels aus Herthen, Dortmund und Aachen. Ihr wisst einfach, wie man mir wieder ein Lächeln auf die Lippen zaubert. Ihr alle seid die besten Freundinnen, die ich mir vorstellen kann.

Mit absoluter Selbstverständlichkeit danke ich auch meinen Eltern. Durch Euch bin ich erst zu dem Menschen geworden, der ich heute bin und sein möchte. Ihr habt mir diesen Weg überhaupt erst ermöglicht! Vielen lieben Dank, dass ihr mich stets bestärkt habt und immer für mich da wart.

Mein größter Dank gilt allerdings meinem Partner Andre! Hier gibt es nicht viel zu sagen, weil jedes Wort ein Wort zu wenig wäre! Ich kenne einfach keinen lieberen und klügeren Menschen als Dich. Wer, wenn nicht Du, hätte sich als Fachfremder mir zu Liebe in die Tiefen der Weißbüschelaffenzellenreprogrammierung gefressen, obwohl er sich viel lieber mit Wahlprogrammdebatten oder Wählerwanderung beschäftigt?

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem Thema „**Reprogrammierung von somatischen Zellen des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) in den pluripotenten Status**“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Melanie Zuk befürworte.

Essen, den _____

(Prof. Dr. med. Peter A. Horn)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

(Melanie Zuk)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

(Melanie Zuk)