



Zur Pluripotenz Spermatogonialer Stammzelllinien

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

vorgelegt von

Jessica Nolte

aus

Northeim

Göttingen, 2008

D7

Referent:

Prof. Dr. W. Engel

Korreferentin:

Prof. Dr. S. Hoyer-Fender

Tag der mündlichen Prüfung:

30.10.2008

*„Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen.
Ein Plus an Wissen bedeutet ein Plus an Fragestellungen, und jede von ihnen
wird immer wieder von neuen Fragestellungen abgelöst.“*

(Hermann Hesse)

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	S. I
Abbildungsverzeichnis	S. VIII
Tabellenverzeichnis	S. XIII
Abkürzungsverzeichnis	S. XIV
1 EINLEITUNG.....	S. 1
1.1 Stammzellen allgemein.....	S. 1
1.2 Embryonale Stammzellen.....	S. 2
1.2.1 Differenzierung von ES- Zellen.....	S. 3
1.2.2 Problematik von ES- Zellen.....	S. 5
1.2.3 Therapeutisches Klonen.....	S. 6
1.3 Spermatogoniale Stammzellen.....	S. 7
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	S. 9
2 MATERIAL UND METHODEN.....	S. 11
2.1 Chemikalien.....	S. 11
2.2 Gebrauchswaren.....	S. 13
2.2.1 Gebrauchswaren für die Zellkultur.....	S. 13
2.3 Geräte.....	S. 14
2.4 Sterilisation.....	S. 14
2.5 Puffer und Lösungen.....	S. 14
2.6 Gebrauchsfertige Kits.....	S. 19
2.7 Vektoren.....	S. 20
2.8 Bakterien.....	S. 20
2.8.1 Medien für die Bakterienkultur.....	S. 20
2.9 Mausstämme.....	S. 21
2.10 Eukaryotische Zelllinien.....	S. 21
2.10.1 Medien für die Zellkultur.....	S. 21
2.11 Antikörper.....	S. 23
2.12 Sonden.....	S. 24
2.13 Oligonukleotide.....	S. 24

2.14	Molekulargewichtstandard.....	S. 26
2.15	Datenbanken.....	S. 26
2.16	Zellbiologische Methoden.....	S. 26
2.16.1	Testikuläre Zellsuspension.....	S. 26
2.16.2	Kultivierung von murinen Embryonalen Stammzellen (ES- Zellen).....	S. 27
2.16.3	Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten....	S. 27
2.16.3.1	Isolation von murinen embryonalen Fibroblasten.....	S. 27
2.16.4	Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen.....	S. 28
2.16.5	Passagieren von eukaryotischen Zelllinien.....	S. 28
2.16.6	Mitomycin C- Behandlung von embryonalen Fibroblasten (MEFs).....	S. 29
2.16.6.1	Gelatine- Behandlung von Kulturgefäßen.....	S. 29
2.16.7	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	S. 29
2.16.7.1	Elektroporation.....	S. 29
2.16.7.2	Lipofektamin™2000.....	S. 30
2.16.8	Selektion von positiven Klonen.....	S. 30
2.16.9	Gewinnung von Einzelklonen.....	S. 30
2.16.9.1	Picken von Einzelklonen.....	S. 30
2.16.9.2	Kultivierung von Einzelklonen.....	S. 31
2.16.9.3	Replikaplattierung.....	S. 31
2.16.10	Induktion von Zellen mit Retinsäure.....	S. 31
2.16.11	Analyse der Haploidisierung.....	S. 31
2.16.11.1	Färbung von Zellen mit Propidiumiodid.....	S. 32
2.16.11.2	FACS- Analyse.....	S. 32
2.16.12	FACS- Sortierung.....	S. 32
2.16.13	Chromosomenanalyse.....	S. 33
2.16.14	Transplantation von Zellen in Testes von Busulfan- behandelten Mäusen (Transplantations- Assay).....	S. 33
2.16.15	Teratombildung.....	S. 34
2.17	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	S. 34
2.17.1	Linearisierung und Aufreinigung von Konstrukten vor der Transfektion.....	S. 34
2.17.2	Isolierung von genomischer DNA aus Geweben.....	S. 35
2.17.3	Isolierung von genomischer DNA aus Zellen.....	S. 35

2.17.4	Isolierung von genomischer DNA aus Embryonen.....	S. 35
2.17.5	Isolierung von Gesamt- RNA aus Zellen.....	S. 35
2.17.6	Minipräparation von Plasmid- DNA aus Bakterien.....	S. 36
2.17.7	Endotoxin- freie Maxipräparation von Plasmid- DNA aus Bakterien.....	S. 36
2.17.8	Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen.....	S. 36
2.17.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	S. 37
2.17.10	Enzymatische Modifikation von DNA.....	S. 37
2.17.10.1	Restriktionsspaltung von Plasmid- DNA.....	S. 37
2.17.10.2	Restriktionsspaltung von genomischer DNA.....	S. 37
2.17.11	Polymerase- Kettenreaktion.....	S. 38
2.17.11.1	PCR an Plasmid- DNA.....	S. 38
2.17.11.2	PCR an genomischer DNA.....	S. 39
2.17.11.3	RT- PCR.....	S. 39
2.17.12	Klonierung von DNA- Fragmenten.....	S. 40
2.17.12.1	Ligation von PCR- amplifizierten DNA- Fragmenten.....	S. 40
2.17.12.2	Transformation.....	S. 40
2.17.13	Gelelektrophoretische Methoden.....	S. 40
2.17.13.1	Horizontale Gelelektrophorese.....	S. 40
2.17.13.2	Vertikale Gelelektrophorese.....	S. 41
2.17.14	Transfertechniken und Hybridisierung.....	S. 41
2.17.14.1	Southern Blot- Transfer von DNA auf Membrane.....	S. 41
2.17.14.2	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA- Sonden.....	S. 42
2.17.15	Sequenzanalyse.....	S. 42
2.18	Proteinchemische Techniken.....	S. 43
2.18.1	Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen.....	S. 43
2.18.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	S. 43
2.18.3	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE).....	S. 44
2.18.4	Western Blot- Analysen von Proteinen auf PVDF- Membranen.....	S. 44
2.18.5	Färbung von Polyacrylamidgelen.....	S. 45
2.18.6	Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern.....	S. 45
2.19	Proteomics.....	S. 45

2.20	Histologische Methoden.....	S. 46
2.20.1	Fixierung von Zellen auf Objektträgern.....	S. 46
2.20.2	Fixierung von Organen und Geweben.....	S. 46
2.20.2.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	S. 46
2.20.3	Hämatoxylin- Eosin- Färbung von eukaryotischen Zellen.....	S. 46
2.20.4	Hämatoxylin- Eosin- Färbung von Gewebeschnitten.....	S. 47
2.20.5	Antikörperfärbung.....	S. 47
2.20.6	Elektronenmikroskopie.....	S. 47
2.20.6.1	Fixierung der Zellen für die EM.....	S. 48
2.20.7	Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung (FISH).....	S. 48
2.21	Embryologische Methoden.....	S. 49
2.21.1	Blastozysteninjektion.....	S. 49
2.21.2	Intracytoplasmatische Gameten- Injektion.....	S. 49
2.21.2.1	Behandlung von Oocyten- Donor- Mäusen.....	S. 50
2.21.2.2	Isolierung von Oocyten.....	S. 50
2.21.2.3	Vorbereitung der Zellen.....	S. 50
2.21.2.4	Mikroinjektion.....	S. 51
2.21.3	Retransfer von Zweizellern in scheinchwangere Mäuse	S. 51
2.22	Methylierungs- und Imprinting- Untersuchungen.....	S. 52
2.22.1	Bisulfit- Modifikation der DNA.....	S. 52
2.22.2	Pyrosequenzierung.....	S. 53
2.22.2.1	Prinzip der Pyrosequenzierung.....	S. 53
2.22.2.2	Auswertung der Pyrosequenzierung.....	S. 55
3	ERGEBNISSE	
3.1	Generierung von SSC- und ES- Zelllinien.....	S. 56
3.1.1	Isolierung und Kultivierung von murinen Spermatogonialen Stammzellen.....	S. 56
3.1.2	Isolierung und Kultivierung von murinen Embryonalen Stammzellen.....	S. 60
3.1.3	Isolierung und Kultivierung humaner Spermatogonialer Stammzellen.....	S. 65
3.1.3.1	Isolationsmethoden.....	S. 67

3.1.3.2	Differentielles Plattieren.....	S. 68
3.1.3.3	Magnetische Zellsortierung (MACS).....	S. 69
3.1.3.4	Kulturmedien.....	S. 69
3.1.3.5	Histologie und Morphologie der Zellen ohne Anreicherung.....	S. 73
3.1.3.6	Histologie und Morphologie der Zellen nach Anreicherung.....	S. 75
3.1.3.7	Isolierung der Zellen mittels Selektionskonstrukten.....	S. 76
3.2	Pluripotenz von SSCs: Vergleich mit ES- Zellen.....	S. 79
3.2.1	Expression von Pluripotenzmarkern auf Proteinebene...	S. 79
3.2.2	Chimärenbildung nach Blastozysteninjektion.....	S. 84
3.2.3	Testikuläre Transplantation von SSCs.....	S. 86
3.2.4	Methylierungsanalysen.....	S. 89
3.2.5	Teratombildung.....	S. 91
3.2.6	Proteomics: Vergleich von ES- und SSC- Zelllinien auf Proteinebene.....	S. 94
3.2.7	Chromosomenanalyse.....	S. 100
3.3	Expressionanalysen von <i>Stra8</i>.....	S. 102
3.3.1	Expression in Präimplantations- Embryonen: Expressionsanalyse für <i>Stra8</i> mittels RT- PCR.....	S. 102
3.3.2	Expressionsanalyse für <i>Stra8</i> mittels Immunohistochemie.....	S. 104
3.3.3	Strategie zur Überexpression von <i>Stra8</i> in ES- und SSC- Zellen.....	S. 114
3.4	<i>In vitro</i> Differenzierung muriner Spermatogonialer Stammzellen (mSSCs) zu haploiden Keimzellen.....	S. 116
3.4.1	Strategie für die Differenzierung.....	S. 116
3.4.2	Stabile Transfektion der WT- SSC- Zelllinien mit dem Stra8- EGFP- Promotorkonstrukt.....	S. 119
3.4.3	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	S. 119
3.4.4	Histologie und Morphologie der SSC- Zelllinien vor und nach FACSsortierung.....	S. 122
3.4.5	Stabile Transfektion aller SSC- Zelllinien mit dem Prm1- DsRed- Promotorkonstrukt.....	S. 125

3.4.6	Untersuchung molekularer Marker für die <i>in vitro</i> Spermatogenese.....S.	127
3.4.7	Analyse der Haploidisierung: Bestimmung der DNA-Menge mittels Durchflußcytometrie..... S.	132
3.4.8	Analyse des Meiose- spezifischen synaptonemalen Komplexes.....S.	134
3.4.9	Detektion der Eigenfluoreszenz in den „Embryoid-Body-like“- Strukturen.....S.	136
3.4.10	Immunhistochemie.....S.	138
3.4.11	Analyse der genomischen Prägung..... S.	141
3.4.12	Intrazytoplasmatische Spermien- Injektion (ICSI).....S.	146
4 DISKUSSION		
4.1	Generierung und Vergleich von murinen ES- und SSC- Zelllinien.....S.	151
4.1.1	Generierung von ES- Zelllinien.....S.	151
4.1.2	Generierung von SSC- Zelllinien.....S.	151
4.1.3	Vergleich von ES- und SSC- Zelllinien.....S.	156
4.1.3.1	Transkriptom- Analysen..... S.	156
4.1.3.2	Proteom- Analysen.....S.	158
4.1.3.3	Chimären und Teratombildung.....S.	159
4.1.3.4	Methylierungsanalysen..... S.	159
4.1.3.5	Expressionsanalyse von ES- Zell- spezifischen miRNAs.... S.	161
4.2	<i>In vitro</i> Spermatogenese..... S.	162
4.2.1	Genomische Prägung (genomic imprinting).....S.	166
4.2.2	<i>In vivo</i> Spermatogenese und ausgewählte Marker- Gene.....S.	168
4.2.2.1	Marker- Gene für die Proliferationsphase (I).....S.	169
4.2.2.2	Marker- Gene für die meiotische Phase (II)..... S.	170
4.2.2.3	Marker- Gene für die postmeiotische Phase (III)..... S.	170
4.2.3	Bedeutung und Perspektiven.....S.	170
4.3	Expressionsanalysen von <i>Stra8</i>S.	171
4.4	Isolierung und Kultivierung humaner SSCs.....S.	174
4.5	iPS- Zellen.....S.	177

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	S. 180
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	S. 182
7	ANHANG.....	S. 204
8	DANKSAGUNG.....	S. 206

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Einleitung:

- Abb.1:** Herkunft von Stammzellen unterschiedlichster Potenz..... S. 1
Abb.2: Schematische Darstellung des therapeutischen Klonens..... S. 6

Material und Methoden:

- Abb.3:** Ablauf der Desaminierung..... S. 53
Abb.4: Das Prinzip der Pyrosequenzierung..... S. 54

Ergebnisse:

- Abb.5:** FACS Sortierung EGFP positiver Zellen aus der Testessuspension
einer 6 Wochen alten transgenen Stra8-EGFP- Maus..... S. 57
Abb.6: Strategie für die Gewinnung und Differenzierung von
ES- Zell- ähnlichen SSC- Zelllinien..... S. 58
Abb.7: Schematische Abbildung der Isolationsstrategie von SSCs
aus adulten Testes von Wildtyp- Mäusen..... S. 59
Abb.8: Isolierung und Generierung von Embryonalen Stammzellen..... S. 61
Abb.9: Genotypisierung der neuen ES- Zelllinien..... S. 62
Abb.10: Expression der Pluripotenz- Gene und – Marker in den
neuen ES- Zelllinien..... S. 64
Abb.11: HE- Färbung eines Schnittes einer Testis- Biopsie aus Hamburg..... S. 66
Abb.12: Histologie von Semidünnschnitt- Präparaten zweier
Gewebeproben von Testis transsexueller Männer..... S. 67
Abb.13: Hellfeld- Aufnahmen von Zellclustern, die innerhalb von zwei
bis zehn Tagen nach der Isolation auftraten..... S. 73
Abb.14: RT- PCR für das humane Oct4..... S. 74
Abb.15: AP- Färbung an Zellclustern innerhalb der ersten 5 Tage
nach Isolation..... S. 75
Abb.16: Hellfeld- Aufnahmen von humanen Zellen nach Aufreinigung..... S. 76
Abb.17: Schematische Darstellung der verwendeten Promotorkonstrukte..... S. 77
Abb.18: Transiente Transfektion frisch isolierter humaner Testeszellen
mit dem Stra8- Promotorkonstrukt..... S. 77

Abb.19: Transiente Transfektion frisch isolierter humaner Testeszellen mit dem Oct4- Promotorkonstrukt.....	S. 78
Abb.20: Western Blot- Analysen der vier SSC- Zelllinien für die Pluripotenzmarker Oct4, Sox2, Nanog, Zfp206 und Sall4.....	S. 79
Abb.21: Graphische Darstellung der Expressionsprofile im Western Blot.....	S. 80
Abb.22: Western Blot- Analysen von SSC FVB P20 bis P45 für die Pluripotenzmarker Oct4, Sox2, Nanog, Sall4 und Zfp206.....	S. 81
Abb.23: Western Blot- Analysen von SSC FVB P45 bis P70 für die Pluripotenzmarker Oct4, Sox2, Nanog, Sall4 und Zfp206.....	S. 83
Abb.24: Western Blot- Analysen von ES-RI und SSC 129SV – undifferenziert und differenziert – für Oct4 und Sox2.....	S. 84
Abb.25: Graphische Zusammenfassung der erhaltenen Chimären nach Blastozysteninjektion.....	S. 85
Abb.26: Transplantations- Assay.....	S. 86
Abb.27: HE- Färbung von Testisschnitten Busulfan- behandelte Mäuse.....	S. 87
Abb.28: Tumorbildung nach Testis-Transplantation von SSC15 Nr.12 FACSII.....	S. 88
Abb.29: HE- Färbung an Schnitten eines Tumors nach SSC- Transplantation.....	S. 88
Abb.30: Methylierung geprägter Gene in den Zelllinien SSC15 Nr.12, ES- Stra8, SSC 129SV und ES-RI jeweils vor und nach Differenzierung.	S. 89
Abb.31: Methylierung der Promotorregionen von Oct4 und Nanog in den Zelllinien SSC15 Nr.12, ES- Stra8, SSC 129SV und ES-RI jeweils vor und nach Differenzierung.....	S. 90
Abb.32: Verlauf der Teratombildung nach Injektion verschiedener Zelllinien unter die Haut immundefizienter Mäuse.....	S. 94
Abb.33: Übereinanderlagerung der 2D- Gele von Proteinen aus Zellen je einer ES- und einer SSC- Zelllinie des gleichen genetischen Hintergrundes.....	S. 95
Abb.34: Metaphase- Chromosomen nach Giemsa- Färbung.....	S. 100
Abb.35: FISH- Analyse an Zellen der Zelllinie SSC FVB P34.....	S. 101
Abb.36: RT-PCR- Analyse an frühen Embryonen.....	S. 103
Abb.37: RT- PCR- Analyse an Embryonen.....	S. 104
Abb.38: Stra8- Antikörperfärbung auf Schnitten von adultem WT- Testis.....	S. 105
Abb.39: Stra8- Antikörperfärbung auf unbefruchteten Oocyten.....	S. 106

Abb.40: Stra8- Antikörperfärbung auf 2- Zellern.....	S. 106
Abb.41: Stra8- Antikörperfärbung auf 4- Zellern.....	S. 107
Abb.42: Stra8- Antikörperfärbung auf 8- Zellern.....	S. 107
Abb.43: Stra8- Antikörperfärbung auf Morulae.....	S. 108
Abb.44: Stra8- Antikörperfärbung auf Blastozysten.....	S. 108
Abb.45: Stra8- Antikörperfärbung auf Ovarien aus adulten und 15 Tage alten Mäusen.....	S. 109
Abb.46: Stra8- RT- PCR mit RNA aus den vier SSC- Zelllinien und aus der Zelllinie ES-RI.....	S. 110
Abb.47: Stra8- Antikörperfärbung auf ES- und SSC- Zelllinien.....	S. 111
Abb.48: RT- PCR- Analyse mit RNA aus differenzierten Zellen.....	S. 112
Abb.49: 90%ige Chimäre mit den auf EGFP- Expression sortierten Zellen.....	S. 113
Abb.50: pCMV- Myc- Vektor.....	S. 114
Abb.51: pTK- Hyg- Vektor.....	S. 114
Abb.52: Amplifikation der ORFs von Zfp206 und Stra8.....	S. 115
Abb.53: Schematische Darstellung der Promotorkonstrukte.....	S. 116
Abb.54: Generelle Strategie für die <i>in vitro</i> Spermatogenese ausgehend von pluripotenten Stammzelle.....	S. 117
Abb.55: Genotypisierungs-PCR auf das Stra8-EGFP-Konstrukt.....	S. 119
Abb.56: FACSorting der Zelllinie SSC15 Nr.1.....	S. 120
Abb.57: FACSorting I der Zelllinie SSC15 Nr.12.....	S. 120
Abb.58: FACSorting II der Zelllinie SSC15 Nr.12.....	S. 121
Abb.59: FACSortierungen der WT-SSC-Klone.....	S. 122
Abb.60: HE-Färbung eines „Embryoid- Body- like“- Zellclusters der Zelllinie SSC15 Nr.1.....	S. 123
Abb.61: Morphologie von SSC15 Nr.12 vor FACS I.....	S. 123
Abb.62: Morphologie von SSC15 Nr.1 nach FACS I.....	S. 124
Abb.63: Genotypisierung der SSC15 Nr.1- Klone nach Transfektion mit dem Prm1-DsRed- Konstrukt.....	S. 125
Abb.64: Genotypisierungs- PCRs der SSC15 Nr.12- Klone nach der Prm1-DsRed- Transfektion.....	S. 125
Abb.65: Genotypisierung auf ROSA26-LacZ.....	S. 126
Abb.66: Genotypisierung der WT-SSC- Klone nach der Prm1-DsRed- Transfektion.....	S. 127

Abb.67: Expressionsmuster von Genen, die in verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermatogenese exprimiert werden und hier als Marker verwendet wurden.....	S. 128
Abb.68: RT-PCR-Analyse von SSC15 Nr.1 und Nr.4 sowie den Prm1-DsRed- Klonen 1Q und 1J.....	S. 129
Abb.69: RT-PCR-Analyse der Ausgangszelllinien SSC15 Nr.1 und Nr.4.....	S. 130
Abb.70: RT-PCR Analyse von SSC15 Nr.12 während der Differenzierung.....	S. 132
Abb.71: Analyse der Haploidisierung mittels Durchflußcytometrie.....	S. 133
Abb.72: Analyse/ Darstellung des synaptonemalen Komplexes in SSC15 Nr.12/72- Zellen nach 48h Induktion mit Retinsäure.....	S. 135
Abb.73: Konfokale Aufnahmen von „Embryoid-Body-like“- Strukturen in der SSC15 Nr.12/72- Linie.....	S. 136
Abb.74: Konfokales Ebenen-Scanning einer „Embryoid-Body-like“Struktur.....	S. 137
Abb.75: Einige sich im Medium befindliche Zellen zeigen DsRed- Expression....	S. 138
Abb.76: Immunhistologie von SSC15 Nr.12/72, 72h RA.....	S. 139
Abb.77: Antikörperfärbung gegen DAZL (konfokale Aufnahme).....	S. 139
Abb.78: PHGPx-Antikörperfärbung (konfokale Aufnahme).....	S. 140
Abb.79: Schematische Darstellung der Methylierung in den ausgewählten Regionen der drei untersuchten Gene H19, Igf2r und Snrpn.....	S. 141
Abb.80: Rohdaten der Bisulfit- Sequenzierung für die Zellen der Zelllinie SSC15 Nr.12.....	S. 142
Abb.81: Graphische Darstellung des Methylierungs- Status in den untersuchten Regionen.....	S. 143
Abb.82: Ergebnisse der Pyrosequenzierung der DMR von Meg3.....	S. 146
Abb.83: FACSorting auf DsRed- positive Zellen.....	S. 147
Abb.84: Prm1-DsRed- Genotypisierung der 2-Zeller.....	S. 149
Abb.85: Intracytoplasmatische Injektion von haploiden Keimzellen.....	S. 149
Abb.86: Genotypisierung der ICSI- NKO auf das Stra8-EGFP- Konstrukt.....	S. 150
 <u>Diskussion:</u>	
Abb.87: Ergebnis der Transkriptomuntersuchung von ES- und SSC- Zelllinien bei einem CutOff von 2.....	S. 157
Abb.88: Expressionprofile für die ES- Zell- spezifischen miRNA- Familien miR-290 und miR- 302 in SSC- Zelllinien.....	S. 161

Abb.89: Überblick über die Differenzierungsstrategien von ES- Zellen zu haploiden männlichen Keimzellen.....	S. 163
Abb.90: <i>In vivo</i> Spermatogenese mit Angaben über die Expression der ausgewählten Marker.....	S. 168
Abb.91: Struktur des Stra8- Proteins.....	S. 171
Abb.92: iPS- Zellen, die ohne die Transduktion von c-myc entstanden sind, rufen in den Chimären keine Tumorbildung hervor.....	S. 176
Abb.93: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Reprogrammierung von Fibroblasten zu iPS- Zellen.....	S. 177
Abb.94: Ansatz zur Therapie mit iPS- Zellen.....	S. 178

TABELLENVERZEICHNIS

Einleitung:

Tab.1: <i>In vitro</i> Differenzierungen von ES-Zellen der Maus in definierte Zelltypen.....	S. 3
--	------

Ergebnisse:

Tab.2: Genotypen der im Folgenden verwendeten Zelllinien.....	S. 63
Tab.3: Übersicht über die verwendeten Kulturmedien.....	S. 70
Tab.4: Teratombildung nach Injektion der einzelnen Zelllinien.....	S. 92
Tab.5: Übersicht über die detektierbaren und analysierbaren Proteine, die aus den 2D-Gelen aufgereinigt werden konnten.....	S. 96
Tab.6: Auszählung der Metaphase-Chromosomen.....	S. 101
Tab.7: Ergebnisse der Blastozysteninjektion.....	S. 113
Tab.8: Prozentualer Anteil der Zellen mit verschiedenen DNA- Gehalten während der <i>in vitro</i> Differenzierung.....	S. 134
Tab.9: Zusammenstellung der Proben, in denen Meg3-Methylierung untersucht wurde.....	S. 145
Tab.10: Zusammenfassung aller bis dato durchgeführten Injektionen.....	S. 148

Diskussion:

Tab.11: Übersicht über die wichtigsten Fakten der verschiedenen Arbeiten...	S. 155
---	--------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Anhaftend (Adhärent)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	„basic fibroblast growth factor“
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bq	Bequerel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
cDNA	komplementäre DNA
CE	zentrales (central) Element
cpm	„counts per minute“ (Zählrate)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium

DMR	differentiell methylierte Region
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
dpc	“days post coitum”
dpp	“days post partum”
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
EB	“Embryoid Body”
EC	“Embryonic Carcinoma”
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
E-Cup	Eppendorf- Cup
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	“Embryonic Germ”
EGC	“Embryonic Germ Cell”
EGF	“Epidermal Growth Factor”
EGFP	“Enhanced Green Fluorescent Protein”
EM	Elektronenmikroskopie
ES- Zelle	embryonale Stammzelle
ESC	„Embryonic Stem Cell“
EschG	Embryonen- Schutzgesetz
et al.	et alteres
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	“Fluorescence Activated Cell Sorting”
FISH	“Fluorescence In Situ Hybridisation”
FKS	Fötale Kälberserum
FSH	Follikel- stimulierendes Hormon
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

GDNF	“Glial Cell Derived Neurotrophic Factor”
GTP	Guanidin-5`-triphosphat
h	Stunde
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
hCG	human chorionic Gonadotropin
HD	“hanging drop”
HE	Hämatoxylin- Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin- Phosphoribosyl- Transferase
HRP	“Horse Raddish Peroxidase”
Hrsg	Herausgeber
HSC	„Hematopoietic Stem Cell“
ICM	„Inner Cell Mass“
ICR	„Imprinting Control Region“
ICSI	„Intracytoplasmic Sperm Injection“
i.p.	intraperitoneale (Injektion)
iPS	„induced Pluripotent Stem“
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
IU	international unit
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LE	laterales Element
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
Lsg.	Lösung
LW	Leerwert
M	Molar (mol/ l)
m-	mili- (1×10^{-3})
MACS	“Magnetic Activated Cell Sorting”
maGSC	“Multipotent Adult Germline Stem Cell”
MCS	“Multiple Cloning Site”
MEF	“Mouse Embryonic Fibroblast”

min	Minute
MPI	Max Planck Institut
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSC	„mesenchymal stem cell“
μ-	mikro- (1×10^{-6})
n-	nano- (1×10^{-9})
NaAc	Natriumacetat
Neo	Neomycin
Nm	nano-Meter
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
ORF	„Open Reading Frame“
OT	Objektträger
P...	Passage
p-	pico- (1×10^{-12})
p.A.	pro Analysis
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGC	„primordial germ cell“
pH	pH- Wert (negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMSG	Pregnant Mare's Serum Gonadotropin
PPi	Pyrophosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Retinsäure
RE	Restriktionsenzyme
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	Reverse Transkriptase PCR
S.	Seite
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
sek.	sekundär
SSC	“Spermatogonial Stem Cell”
SSC (-Puffer)	„Standard Saline Citrat“ (-Puffer)
SSEA-1	“Stage Specific Embryonic Antigen-1”
s.o.	siehe oben
Std.	Stunde
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA (-Puffer)
TC	Teratokarzinom
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
TESE	testikuläre Spermienextraktion
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
Ü	Überstand
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

w/w	Gewicht pro Gewicht
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Code der Nukleinsäuren

A	Adenin
T	Thymin
G	Guanin
C	Cytosin
U	Uracil

1 EINLEITUNG

1.1 Stammzellen allgemein

Als Stammzellen werden alle noch nicht ausdifferenzierten Zellen eines Organismus bezeichnet, die Teilungs- und Entwicklungspotential besitzen. Die damit verbundene Fähigkeit zur Differenzierung nimmt auf dem Weg der Spezialisierung während der Entwicklung der Zellen immer weiter ab. Der Begriff „Stammzellen“ umfasst eine Vielzahl von Zellen unterschiedlichster Herkunft. Allen diesen Zellen gemeinsam sind jedoch zwei grundsätzliche Eigenschaften: Stammzellen befinden sich im Gegensatz zu den hoch spezialisierten Zellen im erwachsenen Organismus in einem undifferenzierten (unspezialisierten) Zustand und können sich unter bestimmten Bedingungen im Körper (*in vivo*) und teilweise in der Zellkultur (*in vitro*) unbegrenzt teilen und vermehren (Selbsterneuerung, self renewal), ohne diese Eigenschaft zu verlieren. Zudem besitzen sie das Potenzial, zu Zellen unterschiedlichster Funktion zu differenzieren. Entsprechend ihrer Herkunft unterscheidet man im Wesentlichen embryonale Stammzellen (ES-Zellen), gewebsspezifische (adulte) Stammzellen, Keimbahnstammzellen (EG-Zellen, embryonic germ cells) und embryonale Karzinomzellen (EC- Zellen, embryonic carcinoma cells) (Abb. 1). Dabei werden die einzelnen Stammzelltypen auch hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials klassifiziert.

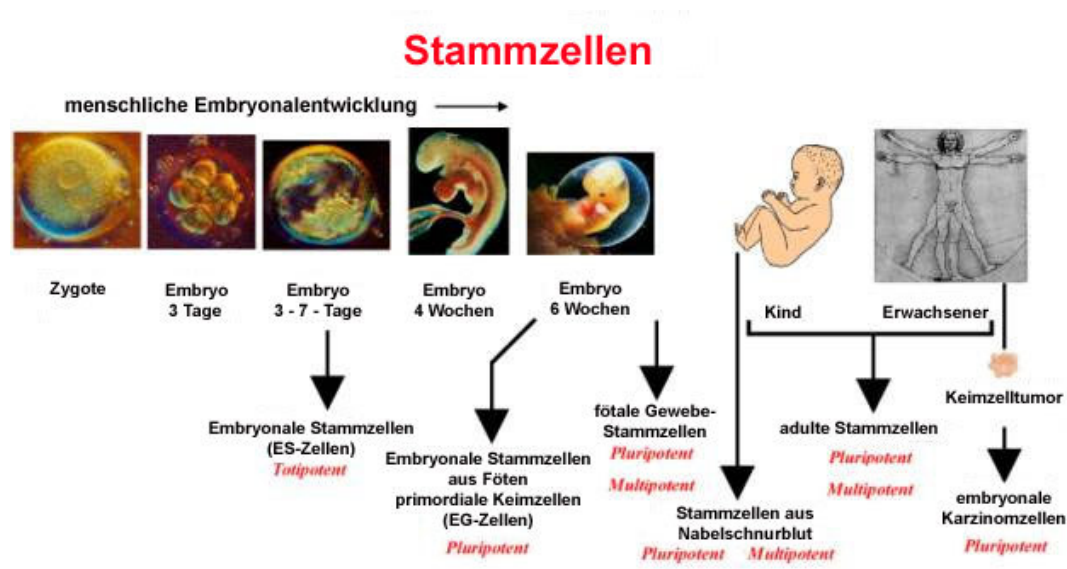


Abbildung 1: Herkunft von Stammzellen unterschiedlichster Potenz (Quelle: <http://www.biokurs.de/skripten/13/bs13-11e.htm>)

Als „totipotent“ bezeichnet man Stammzellen, die die Fähigkeit haben, sich zu Geweben aller drei Keimblätter einschließlich der Trophoblastzellen zu differenzieren und somit in der Lage sind, nach Übertragung in den Uterus, zu einem lebensfähigen Organismus heranzureifen. Diese Zellen sind nur in frühen Embryonalstadien und in sehr geringer Anzahl vorhanden. So sind bei der Maus nur die befruchteten Eizellen (Zygoten) und die Zellen des embryonalen Zwei- bis Acht-Zellstadiums (Blastomere) totipotent. Nach dem Morula- Stadium verlieren die embryonalen Zellen infolge der Differenzierung in innere (innere Zellmasse) und äußere Zellen (Trophoblastenzellen) ihre Totipotenz.

Als „pluripotent“ bezeichnet man Stammzellen, die zwar nicht mehr in der Lage sind, einen lebensfähigen Organismus hervorzubringen, aber sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm, Mesoderm) differenzieren können. Als pluripotente Stammzellen gelten ES- Zellen, EG- Zellen und einige adulte Stammzellen.

Als „multipotent“ werden Stammzellen bezeichnet, die sich nur noch in eine begrenzte Anzahl verschiedener Zelltypen eines Keimblatts differenzieren können. So sind die meisten adulten Stammzellen als multipotent anzusehen.

1.2 Embryonale Stammzellen

Die pluripotenten Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) sind die bisher am besten charakterisierten Stammzellen. Sie werden aus der inneren Zellmasse (inner cell mass, ICM) einer Blastozyste isoliert und können unter definierten Kulturbedingungen unbegrenzt in ihrem pluripotenten Status kultiviert werden. Die ersten ES- Zelllinien konnten Anfang der 80er Jahre aus der Maus isoliert werden (Martin, 1981; Evans and Kaufmann, 1981). Die Isolierung humaner ES- Zellen ließ noch weitere 17 Jahre auf sich warten (Thomson et al., 1998). Überhaupt ist es bis dato nur bei drei Säugern gelungen, embryonale Stammzellen in Kultur zu nehmen und zu vermehren, das heißt ES-Zelllinien zu erzeugen, nämlich bei Maus, Affe (Rhesusaffe) und Mensch (Evans und Kaufmann, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1995; Thomson et al., 1998).

Um die ES-Zellen in ihrem pluripotenten, undifferenzierten Zustand zu erhalten, bedarf es klar definierter Kulturbedingungen. So werden ES- Zellen in der Regel auf einem mitotisch inaktiviertem Feeder- Layer aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) kultiviert. Von diesen Zellen werden geringe Mengen des Wachstums- und Differenzierungsfaktors LIF (leukemia inhibitory factor) ins Medium abgegeben. Seit

1988 wird beschrieben, dass die Kultivierung embryonaler Stammzellen aus der Maus im undifferenzierten Zustand auch durch die Supplementierung des Kulturmediums mit LIF möglich ist (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Von vielen Autoren werden die ES- Zellen zur Hemmung der Differenzierung sowohl auf Feeder- Layer als auch in Anwesenheit von LIF im Kulturmedium kultiviert (z.B. Toumadje et al., 2003; Cui et al., 2004).

1.2.1 Differenzierung von ES- Zellen

Verzichtet man bei der Kultur von ES- Zellen auf die Differenzierungs- hemmenden Kulturbedingungen, d.h. kultiviert man die Zellen auf mit Gelatine beschichteten Kulturgefäßen ohne die Zugabe von LIF, so bilden die Zellen dreidimensionale Zellaggregate, die sog. „Embryoid Bodies“ (EBs), aus. Dieser Effekt kann noch verstärkt werden, indem man die Zellen in sog. „Hängende Tropfen“ (hanging drops; HD) setzt, in denen sie nur noch mit sich selbst aggregieren und nicht mehr auf der Oberfläche des Kulturgefäßes anwachsen können. Unter diesen Bedingungen differenzieren ES- Zellen in verschiedene Zelltypen aller drei Keimblätter aus (Doetschman et al., 1985). Im Laufe der letzten Jahre wurden Protokolle zur *in vitro* Differenzierung von ES- Zellen in die unterschiedlichsten Zelltypen entwickelt. Einen Überblick über die frühesten Arbeiten gibt Tabelle 1. Durch den gezielten Einsatz verschiedener Wachstumsfaktoren kann die Differenzierung der ES- Zellen in eine gewünschte Richtung dirigiert werden.

Tabelle 1: *In vitro* Differenzierungen von ES-Zellen der Maus in definierte Zelltypen (nach Smith, 2001; National Institute of Health, 2001; Stem cells: scientific progress and future research directions <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>)

Gefäßsystem/Herz	
Endothelzellen	Risau et al., 1988 Wartenberg et al., 1988 Yamashita et al., 2001
Vaskuläre Glatte Muskelzellen	Drab et al., 1997 Yamashita et al., 2001
Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen)	Doetschman et al., 1985 Maltsev et al., 1993; 1994 Wobus et al., 1991; 1997
Blutbildendes System/Lymphsystem	
Hämatopoetische Zellen	Wiles u.Keller, 1991 Schmitt et al., 1991 Nakano et al., 1996 Nishikama et al., 1998
Lymphoide Vorläuferzellen	Potocnik et al., 1994
Mastzellen	Tsai et al., 2000
Nervensystem	
Astrozyten (Makrogliazellen)	Fraichard et al., 1995
Dendritische Zellen	Fairchild et al., 2000
Neurone	Bain et al., 1995 Strübing et al., 1995 Dinsmore et al., 1996 Lee et al., 2000 Rolletschek et al., 2001
Oligodendrozyten (Makrogliazellen)	Brüstle et al., 1999 Liu et al., 2000
Knochen/Muskelsystem	
Chondrozyten (Knorpelzellen)	Kramer et al., 2000
Osteoblasten	Buttery et al., 2001
Skelettmuskelzellen	Rohwedel et al., 1994
Sonstige	
Adipozyten (Fettzellen)	Dani et al., 1997
Insulin-produzierende Zellen	Soria et al., 2000 Lumelsky et al., 2001
Keratinozyten	Bagutti et al., 1996 Yamashita et al., 2001

Während der letzten Jahre wurden auch mehrere Arbeiten über die Differenzierung von ES- Zellen zu weiblichen (Hübner et al., 2003) und männlichen Keimzellen (Toyooka et al., 2003; Geijsen et al., 2004; Nayernia, Nolte et al., 2006; Nolte et al., 2007) veröffentlicht. Als Kriterium für die Pluripotenz von Stammzellen ist also neben der *in vitro* Differenzierung zu Derivaten aller drei Keimblätter auch die Differenzierung zu Gameten zu nennen.

1.2.2 Problematik von ES- Zellen

Gegen den Einsatz von aus ES- Zellen generierten spezialisierten Zellen, wie z.B. von Neuronen oder Kardiomyozyten für therapeutische Zwecke, sprechen sowohl immunologische als auch und vor allem ethische Aspekte. Da die Blastozyste, also der Embryo, aus dem die Ausgangszellen gewonnen werden, immunologisch nicht mit dem Empfängerorganismus übereinstimmt, muss mit Abstoßungsreaktionen beim Einsatz von aus ES- Zellen differenzierten Zellen gerechnet werden. Zudem ist eine gerichtete, also induzierte Differenzierung nie vollständig, so dass, falls keine geeignete Selektion stattfinden kann, immer auch undifferenzierte Zellen mittransplantiert werden, was wiederum zu Teratombildung führen kann. Das immunologische Problem könnte vielleicht durch genetische Eingriffe oder durch therapeutisches Klonen (siehe Kapitel 1.2.3) gelöst werden. Für die Auswahl geeigneter Selektionsverfahren oder der Verbesserung der Differenzierungsprotokolle bedarf es aber noch weiterer Grundlagenforschung auf diesem Gebiet. Schwieriger zu handhaben sind jedoch die ethischen Bedenken, welche sowohl gegen die Entnahme von Stammzellen aus humanen Embryonen (Blastozysten werden dabei zerstört) als auch gegen Methoden wie das therapeutische Klonen bestehen. Gesetzliche Basis ist hier das Embryonenschutzgesetz (EschG) aus dem Jahre 1991, nach dem Embryonen nur zum Zwecke der Fortpflanzung erzeugt werden dürfen. Humane ES- Zellen dürfen in Deutschland nicht generiert werden. Zudem unterliegt die Verwendung von humanen ES- Zellen strengen gesetzlichen Regelungen. So ist die Forschung an humanen ES- Zellen in Deutschland nur nach vorausgehender Prüfung an solchen Zellen zulässig, die aus dem Ausland kommen und aus Embryonen stammen, welche vor dem 01.05.2007 durch extrakorporale Befruchtung zum Zwecke der Herbeiführung einer Schwangerschaft erzeugt wurden. Dennoch bleibt die sehr aufwendige und langwierige

Prozedur der Genehmigung für das Arbeiten mit humanen ES- Zellen generell ein großes Problem für die deutsche Stammzellforschung.

1.2.3 Therapeutisches Klonen

Bei dem Verfahren des therapeutischen Klonens wird eine Spendereizelle entkernt und mit dem Kern aus einer somatischen Zelle eines Patienten fusioniert. Die so erhaltene Eizelle besitzt nun also die genetische Information des Patienten bzw. Empfängerorganismus. Durch einen elektrischen Impuls kann die Eizelle zur parthenogenetischen Teilung angeregt werden, so dass aus der sich entwickelnden Blastozyste ES- Zellen gewonnen werden können. Diese besitzen nun die gleiche genetische Ausstattung wie der Empfänger, so dass bei einer Transplantation von differenzierten Zellen aus den ES- Zellen nicht mit einer Immunreaktion gerechnet werden muss (Abb. 2).

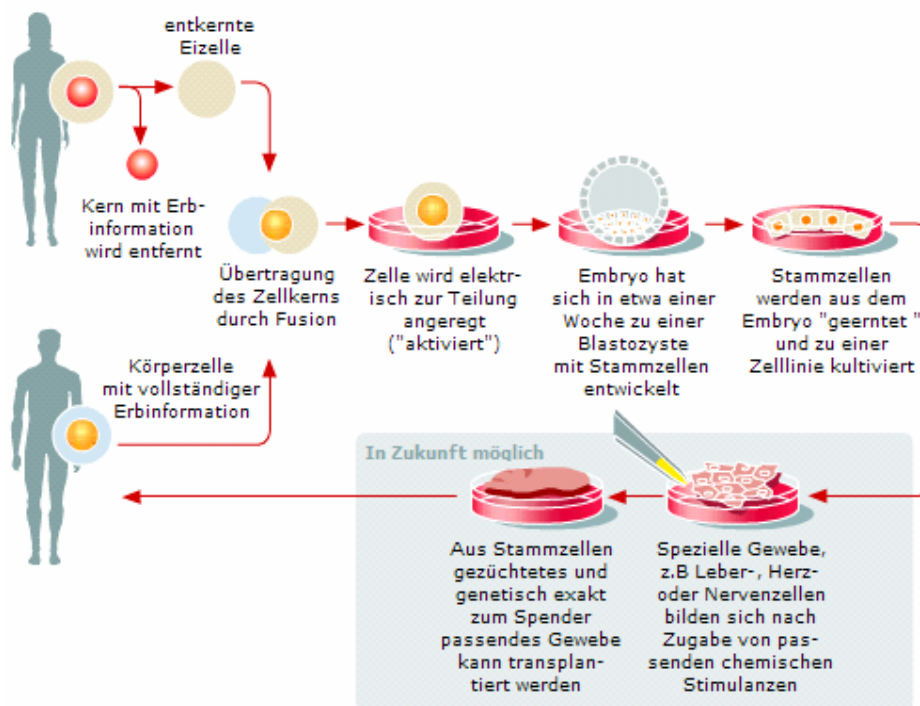


Abbildung 2: Schematische Darstellung des therapeutischen Klonens
(Quelle: www.stern.de; Infografik)

Allerdings unterliegen auch die Versuche zum therapeutischen Klonen in Deutschland dem EschG, da hier Embryonen erzeugt werden, die nicht zum Herbeiführen einer

Schwangerschaft gedacht sind. Dass es sich dabei um parthenogenetisch erzeugte Embryonen handelt, also um Embryonen die nicht aus einer Verschmelzung von Ei- und Samenzelle (Befruchtung) hervorgegangen sind, wird im EschG nicht berücksichtigt.

1.3 Spermatogoniale Stammzellen

Spermatogoniale Stammzellen (spermatogonial stem cells, SSCs) sind einzelne Zellen, die in den Tubuli seminiferi im Testis von Säugern an der Basalmembran lokalisiert sind und durch ihre Fähigkeit, sich sowohl selbst zu erneuern (self renewal) als auch zu differenzieren, dafür sorgen, dass es zu einer lebenslangen Spermatogenese beim männlichen Organismus kommt. SSCs gehen während der Embryonalentwicklung aus primordialen Keimzellen (primordial germ cells, PGCs) hervor. Bei der Maus gelang es erstmals Anfang der 90er Jahre, aus PGCs undifferenzierte embryonale Keimzelllinien, sog. EGCs (embryonic germ cells), zu etablieren (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992). Diese Zellen gelten als pluripotente Zellen da es möglich ist, sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Teratombildung) zu Derivaten aller drei Keimblätter zu differenzieren. Auch exprimieren sie die Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog.

Der Anteil an Spermatogonialen Stammzellen im Testis von Säugetieren ist sehr gering. Tegelenbosch und de Rooij kalkulierten 1993, dass der Anteil an SSCs im Testis einer adulten Maus nur 0,03% beträgt. Das entspricht ca. 1,24% aller spermatogonialer Stadien. Damit ist klar, dass die SSCs (in irgendeiner Art und Weise) angereichert werden müssen, um sie erfolgreich kultivieren zu können. Bis heute wurde kein Marker identifiziert, der ausschließlich die SSCs markiert. In einer ersten Annäherung isolierten Kanatsu-Shinohara und Kollegen im Jahre 2004 SSCs aus Testis neugeborener Mäuse. In diesem Stadium der Entwicklung sind nur die frühesten Spermatogonien im Testis enthalten, die so auch die SSCs umfassen. Durch diese frühe Isolierung hatte man also schon eine beträchtliche Anreicherung erzielt und konnte auch zeigen, dass sich die Zellen kultivieren lassen und Eigenschaften pluripotenter Stammzellen haben.

Unser Ansatz zur Isolierung und Kultivierung von Spermatogonialen Stammzellen war ähnlich, zielte aber auf die Isolierung aus adulten Mäusen ab. Dies ist insofern von größerer Bedeutung, da bei einer späteren Übertragung auf das humane System der Einsatz von adultem Gewebe wahrscheinlicher ist.

Stra8 (Stimulated by retinoic acid gene 8) wurde erstmals 1995 von Bouillet et al. beschrieben. 1996 wurde *Stra8* von Oulad-Abdelghani et al. als Testis- spezifisch beschrieben, wobei die Expression auf prämeiotische Stadien der Spermatogenese beschränkt ist. Im Rahmen einer biologischen Doktorarbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe eine transgene Maus generiert, die EGFP unter der Kontrolle der 1,4 kb Promotorregion von *Stra8* exprimiert (Jaroszynski, 2005). Die EGFP- Expression in dieser Mauslinie stimmt überein mit der von Oulad- Abdelghani beschriebenen *Stra8*- Expression: Sie ist Testis- spezifisch und auf prämeiotische Stadien der Spermatogenese beschränkt. Diese transgene Maus war die Grundlage für unsere Arbeit (Guan,....., Nolte et al., 2006). Über die EGFP- Expression konnten die Keimzellen der prämeiotischen Stadien mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) isoliert bzw. angereichert werden. Die Kultur dieser Zellen unter den Standard- Bedingungen für ES- Zellen (MEFs + LIF) brachte Zellkolonien hervor, die nach Vereinzeln und weiterer Kultur ES- Zell- ähnliche Zelllinien hervorbrachten. Diese SSC- Zelllinien, auch maGSCs (multipotent adult germline stem cells) genannt, unterscheiden sich morphologisch nicht von ES- Zellen und zeigen auch ein vergleichbares Differenzierungspotential. Die Isolierung dieser Zellen und erfolgreiche Etablierung von pluripotenten Zelllinien ist nicht auf die transgene *Stra8*- EGFP- Maus beschränkt. Nachdem man wusste, welche Kulturbedingungen geeignet waren und nach welchen Zellmorphologien man in Kultur suchen musste, gelang es, auch aus WT- Mausstämmen SSC- Zelllinien zu etablieren. Diese Zelllinien exprimieren alle relevanten Pluripotenzmarker, wie z.B. Oct4, Nanog und Sox2. Auch weitere Kriterien, die zur Beurteilung von Pluripotenz bei ES- Zellen gelten, werden von diesen SSC- Zelllinien erfüllt. So exprimieren sie SSEA-1(stage-specific embryonic antigen-1) (Smith, 1992; Solter and Knowles, 1978), besitzen eine hohe Alkalische Phosphatase (AP)- Aktivität (Hahnel et al., 1990; Pease et al., 1990) und ein hohes Kern-Plasma-Verhältnis (Wobus, 2001). Die Alkalische Phosphatase- Aktivität und die Expression von SSEA-1 werden häufig zur Beurteilung des Differenzierungsstatus von Stammzellen herangezogen. Dabei wird davon ausgegangen, dass undifferenzierte Stammzellen diese Marker exprimieren, differenzierte Zellen hingegen nicht.

Die von uns generierten SSC- Zelllinien konnten *in vitro* zu verschiedensten Zellen differenziert werden, darunter Muskelzellen, neuronale Zellen und Kardiomyozyten. Nach subkutaner Injektion der Zellen in immundefiziente Mäuse entwickelten sich Teratome, die Derivate aller drei Keimblätter enthielten. Nach Blastozysteninjektion der

Zellen konnten mehrere hochprozentige Chimären erhalten werden, die auch Keimbahntransmission zeigten.

Um zu beweisen, dass die generierten Zelllinien von den SSCs *in vivo* ausgehen, wurde mit den auf EGFP sortierten Zellen ein funktionaler Test durchgeführt. Dieser sog. Transplantations- Assay wurde 1994 erstmals eingeführt (Brinster und Avarbock, 1994; Brinster und Zimmermann, 1994) und gilt auch heute noch als Nachweis, dass eine Zellsuspension testikuläre Stammzellen enthält. Nach Transplantation der EGFP⁺ Zellen in Testis von Empfänger- Mäusen, bei denen im Vorfeld die endogene Spermatogenese durch Behandlung mit einem Cytostatika zerstört wurde, konnte nach fünf bis sechs Monaten erneut Spermatogenese detektiert werden. Damit war der Beweis erbracht, dass die EGFP⁺ Zellpopulation auch die SSCs umfasste.

Die Ergebnisse unserer Arbeit wurden in den letzten zwei Jahren durch mehrere Arbeitsgruppen bestätigt (Seandel et al., 2007; Kanatsu-Shinohara et al., 2008; Izadyar et al., 2008). Auf die Ergebnisse dieser Arbeiten sowie die Unterschiede und Gemeinsamkeiten mit unserer Arbeit wird in der Diskussion noch genauer eingegangen.

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die von uns bereits beschriebenen SSC-Zelllinien (Guan, ..., Nolte et al., 2006) genauer charakterisiert und mit ES- Zelllinien verglichen werden. Dazu war es nötig, aus den verschiedenen genetischen Hintergründen, aus denen SSC- Zelllinien vorhanden waren, auch ES- Zelllinien zu generieren. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass es abhängig vom genetischen Hintergrund auch zwischen pluripotenten ES- Zelllinien und EG- Zelllinien Unterschiede gibt (z.B. Sharova et al., 2007).

Die SSC- Zelllinien sollten auf Proteinebene hinsichtlich der Expression von bekannten Pluripotenzmarkern untersucht werden, da dies in der bereits publizierten Arbeit noch nicht ausreichend geschehen war. Ein weiterer Versuchsteil beschäftigte sich mit dem Vergleich von ES- und SSC- Zelllinien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, nach subkutaner Injektion in immundefiziente Mäuse Teratome hervorzubringen. Ebenso sollten die verschiedenen pluripotenten Zellen in Blastozysten injiziert werden, um auch die daraus resultierenden Chimären miteinander vergleichen zu können. Auch der Transplantations- Assay sollte mit kultivierten SSC- Zelllinien wiederholt werden, um zu zeigen, dass es sich bei den Zelllinien um eine umprogrammierte Zellpopulation

handelt, die nicht mehr oder nur sehr eingeschränkt in der Lage ist, Spermatogenese zu rekonstituieren. Als ein weiterer Vergleich von ES- und SSC- Zelllinien sollten Methylierungsanalysen von Promotoren von Pluripotenzgenen sowie von einigen Imprinting- Genen durchgeführt werden. Auch ein Vergleich der Zelllinien bezüglich ihres Proteoms (Proteomics) sollte durchgeführt werden.

Da, wie bereits erwähnt, *Stra8* als Marker für die ersten Isolationsversuche verwendet wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von *Stra8* näher untersucht werden. Dazu sollten vor allem Expressionsuntersuchungen an Präimplantations- Embryonen sowie an den verschiedenen ES- und SSC- Zelllinien durchgeführt werden.

Als weiterer Beweis für die Pluripotenz von SSC- Zelllinien und ihr vergleichbares Potential mit ES- Zelllinien, sollten SSC- Zelllinien mittels der bereits von uns bei ES- Zellen erfolgreich angewendeten Differenzierungsstrategie (Nayernia, Nolte et al., 2006) *in vitro* zu haploiden männlichen Keimzellen differenziert werden. Als funktioneller Test sollten die so generierten Gameten mittels ICSI (Intracytoplasmatische Spermien- Injektion) zur Befruchtung von Oocyten verwendet werden. Es sollte geprüft werden, ob sich die befruchteten Eizellen weiterentwickeln und nach Retransfer in scheinchwangere Weibchen Nachkommen geboren werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

1 kb- DNA- Leiter	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
BSA	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Cacodylsäure	Serva, Heidelberg
Chloroform	T.J. Baker, Deventer, Niederlande
Collagenase	Sigma, Deisenhofen
Complete™ (Proteaseinhibitoren)	Roche, Mannheim
DH5 α - kompetente Zellen	Invitrogen, Groningen, Niederlande
DMEM	PAN, Aidenbach
DMSO	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Dithiotreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	T.J. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Eurobio, Frankreich
Eukitt	Fluka, Neu-Ulm
FKS	PAA, Cölbe
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Geneticin G418	Gibco/ BRL, Eggenstein
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt
HBSS- Medium	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
IPTG	Applichem, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Ketavat® (Narkose)	Pharmacia GmbH, Erlangen
L- Glutamin	Gibco/ BRL, Eggenstein

LIF	Chemicon, Temecula, USA
M2- Medium	Sigma, Deisenhofen
M16- Medium	Sigma, Deisenhofen
Mitomycin C	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Roth, Karlsruhe
nicht- essentielle Aminosäuren	Gibco/ BRL, Eggenstein
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PBS	PAN, Aidenbach
Penicillin/ Streptomycin	Gibco/ BRL, Eggenstein
Phenol	Biomol, Hamburg
Platinum- Taq Polymerase	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Propidiumiodid	Fluka, Neu-Ulm
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Retinolsäure	Sigma, Deisenhofen
Reverse Transkriptase	Invitrogen, Groningen, Niederlande
RNaseA	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
SDS	Roth, Karlsruhe
Sigma FastRed	Sigma, Deisenhofen
SOC- Medium	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Sodium- Pyruvat	Gibco/ BRL, Eggenstein
β- Mercaptoethanol	Gibco/ BRL, Eggenstein
TriReagent	MRC, Cincinnati
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
TritonX 100	Roth, Karlsruhe
TrypleExpress®	Gibco/ BRL, Eggenstein
Trypsin/ EDTA	PAN, Aidenbach
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe
Vector Shield with DAPI	Vector Laboratories, USA
X- Gal	Applchem, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.2 Gebrauchswaren

Nicht gesondert aufgeführte Gebrauchswaren wurden von den Firmen Schütt bzw. Omnilab-Krannich, Göttingen, bezogen.

Blottingpapier GB 003	Schleicher & Schüll, Dassel
Elektroporationsküvette Gene Pulser Cuvette, 0.4 cm, gap 50	BioRad, München
Filterpapier 0850	Schleicher & Schüll, Dassel
Kühlzentrifugenbecher	Nalge, Rochester, USA
Nitrocellulose-Membran Hybond TM -C	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Objektträger/ Deckgläschen	Schütt, Göttingen
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen ohne Filter	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Hyperfilm TM MP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen

2.2.1 Gebrauchswaren für die Zellkultur

Auslaufpipetten	Sarstedt, Sarstedt
Kryocups	Greiner, Nürtingen
Kulturflaschen	Sarstedt oder Nunc
Kulturschalen (10 + 5 cm)	Nunc, Wiesbaden
6- Loch- Platte	Nunc, Wiesbaden
12- Loch- Platte	Nunc, Wiesbaden
24- Loch- Platte	Nunc, Wiesbaden
96- Loch- Platte	Nunc, Wiesbaden
12 ml- Zentrifugenröhrchen	Greiner, Nürtingen
14 ml- Zentrifugenröhrchen	Corning, USA, NY
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Zellschaber	Greiner, Nürtingen

2.3 Geräte

Accu- Jet	Brand, Wertheim
Automated DNA- Sequencer ABI 377	Applied Biosystems, Foster City, USA
Brutschrank IR Autoflow CO ₂ Water- Jacketed- Incubator	Sanyo, Tokyo, Japan
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus, Planegg
Inversmikroskop IX81	Olympus, Planegg
Konvokalmikroskop	Olympus, Planegg
FACScan™ Durchfluscytometer	Becton- Dickinson, Heidelberg
GenePulser	BioRad, Waltham
Mikrotom	Leica, St. Gallen, Schweiz
Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Primus Cyclor	MWG- Biotech, Ebersberg
PTC-100™ Peltier Thermal Cyclor	MJ Research, BioRad
Sterilbank HERA <i>safe</i>	Heraeus, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Turboblotter™	Schleicher & Schüll, Dassel
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Hettich Universal	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus, Osterode
Zentrifuge J2-21	Beckmann, München
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg

2.4 Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte für 20 min bei 121°C und 10⁵ Pa im Dampfdruckautoklaven (Webco, Bad Schwartau) oder bei hitzeempfindlichen Lösungen durch Sterilfiltration (Sterilfilter, 0.2–0.45 µm Porengröße). Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder für 8–12 h bei 180 °C hitzesterilisiert.

2.5 Puffer und Lösungen

Die Lösungen für den routinemäßigen Laborbetrieb wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Die Chemikalien wurden den Erfordernissen entsprechend in deionisiertem Wasser (dH₂O), in vollentsalztem Wasser (Millipore), in bidestilliertem Wasser (ddH₂O)

oder in Ampuwa gelöst. Je nach Bedarf wurden die Lösungen dampfdrucksterilisiert, sterilfiltriert, frisch angesetzt, aliquotiert und bei -20°C oder bei 4°C aufbewahrt.

Die Puffer für Enzyme und für gebrauchsfertige Kits wurden, wie vom Hersteller geliefert, benutzt. Ihre Zusammensetzung ist aus den entsprechenden Beipackzetteln ersichtlich und hier nicht weiter aufgeführt.

AP-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl pH 9.5
Äquilibriumspuffer (Proteomics)	6 M Harnstoff 30 % Glycerin 2 % SDS 0,05 M Tris/ HCL pH 8,8 15 mM DTT
Blockpuffer I (Western Blot)	1x PBS 2-5% Magermilchpulver
Blockpuffer II (Western Blot)	1x TBS/0,1 % Tween 20 5% Magermilchpulver
Blocking- Lösung (Immunhisto)	0,2% BSA 0,1% Tween20 in PBS
Coomassie-Lösung	30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,05% (w/v) Coomassie-Brilliant Blau R250
Denaturierungslösung	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl

dNTP-Lösung (25mM)	100 mM dATP 100 mM dCTP 100 mM dGTP 100 mM dTTP
E- Puffer (10x)	33 mM NaH ₂ PO ₄ 267 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM EDTA pH 7,3 bis 7,45 mit NaOH
E1- Puffer (Resuspensionslsg.)	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
E2- Puffer (Lysis)	200 mM NaOH, 1% SDS
E3- Puffer (Neutralisationslsg.)	3.0 M Natriumacetate (pH 5.5)
Erythrosin (Eosin)	0.5% Erythrosin in Ampuwa
Färbelösung (Haploidisierung)	1% FKS 100 µg/ml RNaseA 200 µg/ml Propidium Iodid in PBS
Fixierlösung	4% Paraformaldehyd in PBS
Fixierlösung (Chromosomenanalyse)	Methanol : Eisessig (3 : 1)
Fixierlösung (EM)	1% Paraformaldehyd 3% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer
Giemsa-Lösung	2 ml in 75 ml Phosphatpuffer filtrieren

Hypotone Lösung	Natriumcitrat (2 g / 500 ml) Kaliumchlorid (2,96 g / 500 ml)
Gewebe-Lysispuffer	50mM Tris-HCl pH 8.0 100mM EDTA 0.5% SDS
Hämalaun (nach Mayers)	1 g Hämatoxylin (Merck) 0,2 g Natriumjodat 50 g Kalialaun 50 g Chloralhydrat 1 g krist. Zitronensäure auf 1 l Aqua dest.
Hybridisierungslösung (für Southern-Blot)	10% Dextransulfat 12.5x Denhardt's Lösung 5x SSC 0.1% SDS
IPTG	100 mM in H ₂ O
Lysispuffer (DNA aus Zellen)	100 mM Tris-HCl pH 8.5 5 mM EDTA 0.2% SDS 200 mM NaCl 100 µg/ml Proteinase K
Lysispuffer (DNA aus Embryonen)	1% Tween 20 1% Triton X-100 5mM EDTA 10 mM Tris-HCl pH 7.5 2 mM DTT 20 µg/ml Proteinase K

Neutralisierungslösung	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄
PBS-Puffer (10x)	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7.5
Phosphatpuffer	5,92 g (Na ₂ HPO ₄) ₂ H ₂ O 4,5 g KH ₂ PO ₄ 1000 ml dH ₂ O, pH 6,8
Proteinlyse-puffer (Western Blot)	150 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 1 % NP-40 0,25% Natriumdeoxycholat PMSF (1 mM) Complete® (Proteaseinhibitoren)
Proteinlyse-puffer (Proteomics)	9,5 M Harnstoff 2 % CHAPS 2 % Ampholyte 1 % DTT 10 mM PMSF Complete™
Rehydrierungspuffer (Proteomics)	8 M Harnstoff 1 % CHAPS 0,2 % Ampholyte 15 mM DTT Bromphenolblau

Spüllösung (EM)	0,1M Cacodylatpuffer 0,1M Saccharose
SSC (20x)	3 M NaCl 0.3 M Tri- Natriumcitrat (pH 7.0)
Stop- Mix	15% Ficoll 400 200 mM EDTA, pH 7.4 0.1% Orange G
TBE (5x)	0.45 M Tris-HCl 0.45 M Borsäure 10 mM EDTA ; pH 8.5
Transferpuffer (10x)	25 mM Tris pH 8.3 150 mM Glycin 20% Methanol
X-Gal-Lösung	2% X-Gal in Dimethylformamid

2.6 Gebrauchsfertige Kits

DYEnamic ET- Terminator Mix	Amersham Biosciences, Freiburg
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices- System	Millipore Corporation, Bedford
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, Wisconsin, USA
PLATINUM® <i>Taq</i> DNA Polymerase-System	Gibco, BRL, Eggenstein
QIAEX II® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder™	Qiagen, Hilden
Rediprime™II Random Prime Labelling System	Amersham Biosciences, Freiburg
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
SUPERSCRIPT™II RNaseH Reverse Transcriptase	Invitrogen, Groningen, Niederlande

TriReagent™ Sigma, Deisenhofen

2.7 Vektoren

pEGFP-1	BD Bioscience, USA
pDsRed-Express-1	BD Bioscience, USA
pGEM-T Easy	Promega, Wisconsin, USA
pCMV-Myc	BD Bioscience, USA
pHyg	BD Bioscience, USA

2.8 Bakterien

Escherichia coli DH5 α (Hanahan, 1983)

2.8.1 Medien für die Bakterienkultur

LB (Luria-Bertani)-Medium (pH 7,5) 1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl

Zusätze zur Selektion: Ampicillin (0,1 mg/ml)
Kanamycin (0,05 mg/ml)

Zusätze für Oja-Platten: 100 μ M IPTG
0,4% X-Gal

Agarplatten enthielten 1,5 % (w/v) Agar

Die Medien wurden mit einfach destilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert.

Stammlösungen: 100 mg/ml Ampicillin in H₂O
25 mg/ml Kanamycin in H₂O
0,2 g/ml IPTG in H₂O
8% X-Gal in Dimethylformamid

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Antibiotika, IPTG und X-Gal wurden nach dem Autoklavieren den abgekühlten Medien (ca. 50°C) hinzugefügt. Platten und Flüssigmedien wurden bei 4°C gelagert.

2.9 Mausstämme

Die verwendeten Mäuse stammten aus institutseigenen Beständen, dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin (Göttingen) oder wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Haltungsbedingungen bestanden aus einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei 22°C und $55 \pm 5\%$ relativer Luftfeuchtigkeit. Tierfutter wurde von der Firma ssniff-Spezialdiäten (Soest) bezogen.

2.10 Eukaryotische Zelllinien

2.10.1 Medien für die Zellkultur

Medien und Zusätze zur Anzucht eukaryotischer Zellen wurden als sterile Lösungen bezogen (PAN, Aidenbach; Gibco BRL, Eggenstein).

ESC- bzw. SSC- Kulturmedium

DMEM

0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren

1 mM Natrium-Pyruvat

1 μM β -Mercaptoethanol

2 mM L-Glutamin

1 mM Penicillin/ Streptomycin

20 % FKS

1 000 U/mL LIF

MEF- Kulturmedium

DMEM

2 mM L-Glutamin

1 mM Penicillin/ Streptomycin

10 % FKS

M2-Medium

- 5 ml 10 x Hanks
- 1,25 ml 40 x HEPES
- 165 µl 300 x Na-Pyruvat
- 0,25 ml 1 M NaOH
- 0,5 ml Penicillin (6 mg/ml)
- Streptomycin (5 mg/ml)
- 43 ml Ampuwa
- 0,2 g BSA

M16-Medium

- 1 ml 10 x EARLE
- 270 µl 37,5 x NaHCO₃
- 33 µl 300 x Na-Pyruvat
- 100 µl Penicillin (6 mg/ml)
- Streptomycin (5 mg/ml)
- 8,6 ml Ampuwa
- 40 mg BSA

Zur Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff bzw. bei -152°C wurden folgende Einfriermedien verwendet:

ESC- bzw. SSC- Zellen

- 30 % Kulturmedium
- 50 % FKS
- 20 % DMSO

MEF- Zellen

- 30 % MEF-Kulturmedium
- 50 % FKS
- 20 % DMSO

2.11 Antikörper

Für die Immunohistochemie wurden folgende Antikörper verwendet:

Primärantikörper	Hersteller/ Bezugsquelle
anti-Nanog, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
anti-Sall4, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
anti-Oct4, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
anti-SOX2, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
anti-Zfp206, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Zheng-Xu Wang, Singapur, Singapur
anti-c-Myc, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
anti-KLF4, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
anti-SCP3, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
anti-Stra8, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
anti-FE-J1, monoklonaler Antikörper IgM, Maus	Hybridoma Bank, Iowa, USA
anti-Acrosin, polyklonaler Antikörper, IgM, Kaninchen	Institut für Reproduktionsbiologie, TiHo Hannover
anti-OAM, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Institut für Reproduktionsbiologie, TiHo Hannover
anti-Biotin-Cy3-Konjugat, monoklonaler Antikörper, IgG1, Maus	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Integrin- α 6-Biotin, monoklonaler Antikörper, [GoH3], IgG2a, Ratte	Abcam, Cambridge, UK
anti-CD9, monoklonaler Antikörper [MEM-61], IgG1, Maus	Abcam, Cambridge, UK
anti-TP2, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Department of Chemistry and Biochemistry South Carolina, USA
anti-DAZL, polyklonaler Antikörper, IgG, Kaninchen	Institut für Reproduktionsmedizin, Münster
anti-PHGPx, monoklonaler Antikörper, IgM, Maus	Institut für Biochemie (CCM), Berlin
anti- α -Tubulin, monoklonaler Antikörper, IgG1, Maus	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Sekundärantikörper	Hersteller/ Bezugsquelle
anti-Maus IgG, Cy3 konjugiert, Schaaf	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Kaninchen IgG, Cy3 konjugiert, Ziege	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Maus IgG, Alkalische Phosphatase konjugiert, Ziege	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Kaninchen IgG, Alkalische Phosphatase konjugiert, Ziege	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Maus IgM, Peroxidase konjugiert, Ziege	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Kaninchen IgG, Peroxidase konjugiert, Ziege	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.12 Sonden

EGFP- Fragment mit XhoI aus pEGFP-1 ausgeschnitten.

2.13 Oligonukleotide

Alle für die Experimente eingesetzten Primer wurden von der Firma Qiagen/ Operon bezogen. Es wurde mit Ampuwa eine Konzentration von 100 μ M (100 pmol/ μ l) eingestellt und als Stock bei -20°C gelagert. Die eingesetzte Konzentration der Primer lag bei 10 pmol/ μ l.

Name	Richtung/Name	Sequenz 5' - 3'	Amplifikatgröße
mDppa5	F1	CTC GAA TGT CTC ACA TCG AGC	226 bp
	R1	CTC GAT ACA CTG GCC TAG CTC	
mNanog	F1	CTG AGG CTG ACA AGG GCC CTG	485 bp
	R1	GGC CGT TCC AGG ACT GAG CGG	
mOct-4	F2	GGA TCA CCT TGG GGT ACA CCC	613 bp
	R2	GCC TCA GTT TGA ATG CAT GGG	
mRex1	F1	GGG TCC AAG GAG CTG AAC TCC	312 bp
	R1	CAG CAC AGT GAG GCG ATC CTG	
mUtf1	F1	GGA CCG CAG GCA GAC TCT GCC	529 bp
	R1	CAC GGC CCT GGG AAA GGC CAG	
mZfp206	F2	CAG TTC AAA TTG GCC AAT GAG CC	333 bp
	R2	GGT CTC CTG CCC TAC AGT TTG CG	
mTex19	F1	TGG CTC TGG AGT CAT TAG CT	589 bp
	R	CTC GAT GGA CTG AGA AGG TC	

Name	Richtung/Name	Sequenz 5' - 3'	Amplifikatgröße
hOct4	F1	GCC TTC TCG CCC CCT CCA GGT GGT GGA	685 bp
	R1	GAT CTG CTG CAG TGT GGG TTT C	
β -Globulin	F1	GTG GAG GCG TCG CGC TGG	490 bp
	R1	GGA GCA ACC TGC TCA GAT ACA TC	

Name	Richtung/Name	Sequenz 5' - 3'	Amplifikatgröße
mAcrosin	F2 R2	CTT GGG GCC TGG CCC TGG ATG GCA GGG TCC AAT GAA GTT CCC	335 bp
mBoll	F1 R1	CTA GTC TCA TGC CAG CGG CTG GGA ACA CAG CCA CCG TCT TGC	378 bp
mc-Kit	F R	CAA CAG CAA TGG CCT CAC GAG T GTG GTC ACC TTT GCT CTG CTC	1061 bp
mCreb3/4	F1 R1	CAG AAA CAT CTC CTG GTA GGG GGG CAG AGT AAT CCC TTC TTG	364 bp
mCycl1	F R	GAT CAG GAC CTT CAG AAT TAG CCA GAT TTA CTA CAC ATG AGC	284 bp
mDAZL	F2 R2	GAT CGA ACT GGT GTG TCG AAG CTG GTG AAC TTG GAT AAG GAG	306 bp
mDMC1	F R	GTA ACT GGA CAA CGT CTT CG AGC ACG TTG TCC AGT ACT GC	350 bp
mFragilis	F R	TTG CTC CGC ACC ATG AAC CA TGA AGC ACT TCA GGA CCG GA	460 bp
mGpx4(PHGPx)	F1 R1	CGC CAA AGT CCT AGG AAA CGC CAG GCA GAC CAT GTG CCC GTC	231 bp
mHaprin	F R	CCA GAA CAT GAG ACA GAG AG GGT GGT GCA GAT GAA CTT CAG	427 bp
mHPRT	F R	CGT CGT GAT TAG CGA TGA TG TAT GTC CCC CGT TGA CTG AT	321 bp
mInsl3	F R	TAC TGA TGC TCC TGG CTC TG AGG TCA TGA TGG GGC TTC TT	510 bp
mMIS	F R	TTG GTG CTA ACC GTG GAC TT GCA GAG CAC GAA CCA AGC GA	318 bp
mOvo11	F1 R1	CTG CCA CAT CTG CCA GAA GTC GTC TTG CGC AGC AGT GGG CTG	377 bp
mPgk2	F R	TCT CAT GAG TCA CCT CGG TCG AAC TGT GAG CCC GAT GTG CAG	346 bp
mPiwil2	F R	GCA CAG TCC ACG TGG TGG AAA TCC ATA GTC AGG ACC GGA GGG	680 bp
mPrm1	F2 R2	CCC ACA AAA TTC CAC CTG CTC CAG GTG GCA TTG TTC CTT AGC	375 bp
mRbm	F R	AAC CGA AGT AAC ATA TAC TCA ATC TGC TTT CTC CAC GAC CTC	208 bp
mRnf17	F R	GAC ACA CAG TCT AAC AGA GG AGG ACA GCA GCA TCT ACC TT	509 bp
mRnh2	F R	CAT AAG TGG CAA CGA AGA GC GTT ACA GGC TGC TAC CAT CA	585 bp
mSma	F R	CCC AGG GAT ATG ACT TCG AGT CTG ACT TGT AAG GGC ACC AAC	634 bp
mStella(Dppa3)	F2 R2	GCA GTC TAC GGA ACC GCA TTG GGC AGA AAG TGC AGA GAC ATC	235 bp
mSYCP3	F2 R2	GTT GCA GCA GTG GGA ACT GG CTA AAG GCA TGC CTC TTA GC	390 bp
mStra8	F R	TCA CAG CCT CAA AGT GGC AGG GCA ACA GAG TGG AGG AGG AGT	440 bp
mTHEG	F R	GCT CAG TAA CCC AAT CCC GGA GGT GGA TGG ACC AGA TGG GCG TTG TCC	601 bp
mTP2	F R	CGG CCT CAA AGT CAC ACC AGT AGT CCG TTT CCG CCT CCT GAC	254 bp
mTsx	F R	GAC TTG GGT ATC AGC TCC ACC CTG CCT GCT TAA TCA GTT GGG	501 bp
mVasa	F R	AGC ACA GCC TCT AGT TAA AGT ATA TCA GGT TTC ACA CTT CTG T	327 bp

Name	Richtung/Name	Sequenz 5' - 3'	Amplifikatgröße
Stra8-EGFP	F5	CGT AGT GTG CCA AAC TGA TGT GG	483 bp
Stra8-EGFP	R3	CAG GGT CAG CTT GCC GTA GGT GG	
Prm1pr	F2	CAT GTG GCT GTT TCA CCC ACC	521 bp
RED	R4	CAC TTG AAG CCC TCG GGG AAG	
Prm1	F2	TCC TGA TGC CCC TGC C	253 bp
RED	R2	CCG CCG TCC TTT CAT C	
mStra8pr	F1	TGG AAA CCC ACA ACG AAA GGC	2,4 kb
EGFP	R2	CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC	
Androgenrezeptor	F	ACA CTG AGG ATG GTT CTC CTC AAG	800 bp
Androgenrezeptor	R	CTG CCT CGT CTA GTG CTC CAG ATT TA	
Sry	F	TCA TGA GAC TGC CAA CCA CAG	750 bp
Sry	R	CAT GAC CAC CAC CAC CAC CAA	

Name	Richtung/Name	Sequenz 5' - 3'	Amplifikatgröße
ORF-Stra8-NotI	F	ACC GCG GCC GCA GGT ATG GCC ACC CCT GGA GAA GGC AAC CAA CCC AGT	1,1 kb
ORF-Stra8-NotI	R	TTG CCG CCG CCT ACC ACC TTA CAG ATC GTC AAA GGT CTC CAG GCA CCT	
ORF-Zfp206-XhoI	F	ATC TCT CGA GGT ATG CTG GCG GAA CCA GTC CCT GAT GCC CTG	2,4 kb
ORF-Zfp206-XhoI	R	TCC GAG CTC CCA CCA TTA GTA CAG CGA TTC CCG GGC ATG GGT TCG	

2.14 Molekulargewichtstandard

DNA- Längenstandard (1µg/µl): 1kb- Leiter (0.12 – 12.2 kb)

Protein- Längenstandard NuPAGE™ See Blue Plus2

Der DNA- Längenstandard wurde nach Herstellerangaben verdünnt und mit Stop- Mix versetzt. Der Protein- Längenstandard war bereits vorgefärbt und wurde direkt eingesetzt.

2.15 Datenbanken

Nukleotidsequenzen wurden mit den Sequenzdatenbanken GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>) mit Hilfe des BLAST-Programms (Altschul et al., 1990) analysiert.

2.16 Zellbiologische Methoden

2.16.1 Testikuläre Zellsuspension

Zur Herstellung einer testikulären Zellsuspension wurden die frisch entnommenen Testes in eine Petrischale mit PBS überführt und anschließend unter einer Sterilbank weiterbearbeitet. Die Tunica albuginea wurde vorsichtig mit zwei Pinzetten entfernt und das Gewebe in eine Kulturschale mit einer Collagenase/ HBSS- Lösung (1mg/ml) überführt. Die Tubuli seminiferi wurden vorsichtig zerpfückt und anschließend in der Collagenase- Lsg. für 15-30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Tubuli durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt und zusammen mit der Collagenase- Lsg. in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Tubuli wurden bei 270x g

für 5 min pelletiert, die Collagenase- Lsg. verworfen und das Pellet 3x mit HBSS-Medium gewaschen. Danach wurde das Pellet in einer Trypsin-EDTA- Lsg. aufgenommen, in eine Kulturschale überführt und bei 37°C für 5min inkubiert. Durch anschließendes mehrmaliges Pipettieren mit einer Pasteurpipette wurden einzelne Zellen aus dem Gewebeverband gelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von FKS gestoppt. Übrig gebliebene große Gewebestücke wurden durch Filtrieren über einen 70 µm Falcon- Filter entfernt. Die Einzelzellen wurden pelletiert, noch einmal mit HBSS-Medium gewaschen und anschließend in Kulturmedium aufgenommen und ausplattiert.

2.16.2 Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

Bei der Kultur von ES-Zellen ist es wichtig darauf zu achten, dass die Zellen in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden. Dies wird dadurch erreicht, dass die ES-Zellen auf Mitose-inhibierten Maus- Fibroblasten (Feederzellen) ausplattiert werden. Zusätzlich wird dem ES- Medium das Cytokin LIF (Leukemia Inhibitory Factor) beigegeben.

2.16.3 Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten

Feederzellen sind unentbehrlich für die Routinekultur der ES-Zellen. Feederzellen bestehen aus mitotisch inaktivierten Fibroblasten. Sie werden in einer gleichmäßig verteilten Zellschicht plattiert, auf die die ES-Zellen ausgesät werden. Geeignete Zellen für „Feederlayers“ sind die STO-Fibroblasten (Ware et al., 1972) oder embryonale Fibroblasten (MEFs). Die mitotische Inaktivierung der Zellen erfolgt durch Behandlung mit dem „Spindelgift“ Mitomycin C (Martin et al., 1975). Nach dieser Behandlung sind die Zellen nicht mehr teilungsfähig.

2.16.3.1 Isolation von murinen embryonalen Fibroblasten

Aus einer tragenden Maus wurden 13,5-15,5 Tage alte Embryonen isoliert und in PBS gewaschen. Die Abdomen der Embryonen wurden geöffnet und die Organe entfernt. Die Köpfe wurden abgetrennt und die Rumpfe zerkleinert. Anschließend wurde die Suspension in einen Kolben mit Glaskügelchen überführt, 20 ml Trypsin / EDTA und 1 ml DNase zugegeben und 30 min bei 37°C unter Rühren inkubiert. Die Zellsuspension wurde danach 10 min bei 270 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in MEF- Kulturmedium resuspendiert und in geeignete Kulturgefäße überführt. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte etwa 24 h später, um die nicht

adhärenten Zellen zu entfernen. Nach ca. 3 Tagen wurden die MEFs 1:3 gesplittet und nach weiteren 3-5 Tagen in Passage 1 kryokonserviert.

2.16.4 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Zur Kryokonservierung wurde eine konfluent bewachsene Platte mit PBS gewaschen und trypsinisiert (2.16.5). Mit dem jeweiligen Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen bei 270 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zuerst in 500 µl Kulturmedium resuspendiert und anschließend mit 500 µl des jeweiligen Gefriermediums gut gemischt. Die bereits beschrifteten Gefrier Röhrchen wurden sofort auf Eis gestellt. Das Einfrieren von Zellen sollte langsam erfolgen. Die Gefrier Röhrchen wurden deshalb in einer vorgekühlten Styroporbox bei -80 °C (nicht schneller als 1°C/min) üN eingefroren. Danach wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff oder bei -152°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Das Auftauen von gefrorenen Zellen hat rasch zu erfolgen. Die Zellen wurden daher im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und so schnell wie möglich in einer größeren Menge des jeweiligen Kulturmediums aufgenommen, um das DMSO entsprechend zu verdünnen. Nach Zentrifugation (5 min, 270 x g) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in einer zum Ausplattieren entsprechenden Menge Kulturmedium aufgenommen.

2.16.5 Passagieren von eukaryotischen Zellen

Nach zwei- bis viertägiger Inkubation (abhängig von der Zelllinie und der Zelldichte) sind die Zellen konfluent und können auf mehrere Kulturgefäße aufgeteilt werden. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend, abhängig von der Kulturgefäßgröße, 1-5 ml Trypsin/ EDTA zugegeben. Nach ca. 5 min Inkubation bei 37°C wurde das Ablösen der Zellen unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Hatten sich die Zellen vollständig vom Boden gelöst, wurde dasselbe Volumen Kulturmedium zugegeben und gut resuspendiert. Das im Kulturmedium enthaltene FKS inhibiert dabei das Trypsin, so dass keine schädigende Wirkung eintreten kann. Die Zellen wurden für 5 min bei 270 x g pelletiert, der Überstand abgenommen, das Pellet in entsprechender Menge Kulturmedium aufgenommen und in geeigneten Kulturgefäßen wieder ausplattiert. Der nächste Mediumwechsel erfolgte ca. 24 h später, um die bis dahin nicht adhären Zellen zu entfernen.

2.16.6 Mitomycin C- Behandlung von embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Mitomycin C wurde in MEF- Medium mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml aus einer 50x Stock-Lösung eingesetzt und auf die Fibroblasten gegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurden die Fibroblasten zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und auf Gelatine- beschichteten Platten ausplattiert (Mitomycin behandelte Fibroblasten können nicht mehr anwachsen, sondern werden nur durch die Gelatine am Boden des Kulturgefäßes fixiert).

2.16.6.1 Gelatine- Behandlung von Kulturgefäßen

Abhängig von der Größe der verwendeten Kulturgefäße wurden diese mit etwa 1 - 10 ml steriler 0,1%iger Gelatine beschichtet und mindestens 2 h bei 37°C, 5% CO₂, inkubiert.

2.16.7 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Grundsätzlich wurden für die Transfektionsexperimente nur Zellen benutzt, die sich in einer permanenten Wachstumsphase befanden. Zellen, die zu lange konfluent sind, lassen sich schwerer transfizieren als schnell wachsende (häufig und rechtzeitig passagierte) Zellen. Zu oft passagierte Zellen können ihre Morphologie und damit ihre Transfektionsbereitschaft verändern. Zur Transfektion wurden die Zellen einen Tag vor der DNA-Aufnahme in die entsprechenden Kulturschalen passagiert, so dass am folgenden Tag eine Konfluenz von 50-70 % erreicht wurde.

2.16.7.1 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine rein physikalische Methode zum Gentransfer. Sie basiert auf der Beobachtung, dass biologische Membranen durch die Einwirkung kurzer elektrischer Impulse oberhalb der kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert werden, ohne dass die Membranstruktur zerstört wird. Während der Phase erhöhter Durchlässigkeit kann ein Stofftransport durch die Membran erfolgen.

Für die Elektroporation wurden exponentiell wachsende Zellen nach der Behandlung mit Trypsin in 600 µl PBS und ca. 100 µg linearisierte und aufgereinigte DNA in einer Elektroporationsküvette vereinigt. Die Elektroporation erfolgte bei 240 V und 500 µF bei RT. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in geeigneten Kulturgefäßen ausplattiert.

2.16.7.2 Lipofectamin™2000

Bei Lipofectamin™2000 handelt es sich um ein kationisches Lipid, das eine Liposomenvermittelte Transfektion von eukaryotischen Zelllinien ermöglicht. Zur Transfektion wurden etwa 4 µg der linearisierten und aufgereinigten Konstrukt-DNA und 100 µl OptiMEM gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Gleichzeitig wurden 12 µl Lipofectamin™2000 und 100 µl OptiMEM gemischt und ebenfalls 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze zusammengegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde 1 ml OptiMEM zugegeben. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen, das Lipofectamin™2000-DNA-Gemisch wurde zu den Zellen zugegeben und es wurde 3 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde 1 ml OptiMEM mit 1% FKS zugegeben und weitere 3 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und in normalem Kulturmedium aufgenommen.

2.16.8 Selektion von positiven Klonen

Der Nachweis von transfizierten Zellen wurde über das Resistenzgen Neomycin geführt, welches in den verwendeten Vektoren enthalten ist. Das Neomycingen verleiht den Zellen eine Resistenz gegenüber Geneticin (G418), so dass eine positive Selektion möglich ist. Dazu wurden die Zellen nach der Transfektion für vier Tage einer höheren G418-Konzentration ausgesetzt (175 µg/ml) und anschließend bei einer niedrigen G418-Konzentration (100 µg/ml) weiterkultiviert.

2.16.9 Gewinnung von Einzelklonen

2.16.9.1 Picken von Einzelklonen

Nach ca. acht bis zehn Tagen G418- Selektion wurden resistente Klone isoliert und vereinzelt. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend wieder mit PBS überschichtet. Das Picken der positiven Klone erfolgte rein mechanisch, indem unter dem Lichtmikroskop die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Feederlayerschicht getrennt wurden. Die Kolonien wurden direkt mit der Pipettenspitze in eine 96- Loch-Platte überführt. Nach dem Picken von 24- 72 Einzelklonen wurden diese in der 96- Loch- Platte trypsiniert, durch gutes Resuspendieren vereinzelt und anschließend auf vorbereitete 24- Loch- Platten mit Feederlayer- Zellen ausplattiert. Da dieser Arbeitsschritt ein hohes Risiko für Kontaminationen mit sich bringt, wurde das Lichtmikroskop vorher gut desinfiziert, in die geöffnete Sterilbank gestellt und außerdem die ganze Zeit mit Mundschutz gearbeitet.

2.16.9.2 Kultivierung von Einzelklonen

Die gepickten Klone wurden in Anwesenheit der niedrigen G418- Konzentration weiterkultiviert. Eine 100%ige Konfluenz wurde nach vier bis sieben Tagen erreicht, wobei während dieser Zeit alle 24 h das Medium gewechselt wurde.

2.16.9.3 Replikaplattierung

Nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz wurden die positiven Klonen trypsiniert und auf zwei 24- Loch- Platten wieder ausplattiert. Dabei war eine der beiden Platten wieder mit einer Feederlayerschicht vorbereitet, während die andere mit Gelatine beschichtet war. Beide Platten wurden erneut bis zur 100%igen Konfluenz weiterkultiviert. Die Platte mit der Feederlayerschicht wurde mit Gefriermedium behandelt und bei -80°C gelagert, während aus den Zellen der anderen Platte DNA für die Genotypisierung mittels PCR isoliert wurde. Bei diesem Arbeitsschritt war es sehr wichtig auf die identische Beschriftung der beiden Platten zu achten, da anschließend nur die Klone wieder in Kultur genommen wurden, die laut PCR- Analyse das Insert trugen.

2.16.10 Induktion von Zellen mit Retinsäure

Retinsäure (RA) ist die hoch wirksame aktive Form des Vitamins A. Retinsäure hat ein großes Wirkungsspektrum und beeinflusst die Proliferation und Differenzierung einer großen Zahl von Zelltypen. Die Induktion der Zellen mit RA erfolgte bei einer Konzentration von 10^{-6}M aus einer Stocklösung von 10^{-3}M für 24 h bis 15 Tage. Die RA wurde direkt aus der Stocklösung zum Kulturmedium gegeben, nachdem die Zellen einmal mit PBS gewaschen wurden. Während der Induktionsphase wurde alle 24 h das Medium gewechselt und neue RA hinzugegeben.

2.16.11 Analyse der Haploidisierung

Die Durchflusszyto(fluoro)metrie (Flow Cytometrie) ist ein etabliertes Verfahren zur Analyse von Einzelzellen in Suspensionen auf der Grundlage von Fluoreszenz – und Streulichteigenschaften. Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften auf Einzelebene.

Die zu analysierenden Zellen werden dabei einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt und ihre Fluoreszenz durch senkrecht zu diesem Strahl angebrachte Photozellen gemessen. Propidiumiodid bindet an die DNA der Zellen und erlaubt so eine Detektion

des DNA- Gehaltes. Gefärbte Zellen mit z.B. einer Kopie ihres genetischen Materials (haploide Zellen) erscheinen mit halb so starker Fluoreszenz wie Zellen mit zwei Kopien (diploide Zellen).

2.16.11.1 Färbung von Zellen mit Propidiumiodid

Die zu färbenden Zellen wurden durch Trypsinbehandlung (2.16.5) von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst, abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl PBS aufgenommen und in ein steriles E- Cup überführt. Unter ständigem Vortexen wurde 1 ml eiskaltes 98%iges EtOH hinzugegeben, um die Zellmembranen zu permeabilisieren und für Propidiumiodid durchlässig zu machen. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen abzentrifugiert, in 1 ml PBS + 1% FKS gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 100 µl PBS + 0,25% Triton X-100 aufgenommen. Nach Inkubation bei RT für 3 min wurden die Zellen 3x mit PBS + 1% FKS gewaschen und anschließend in der Propidiumiodid-haltigen Färbelösung aufgenommen. In dieser wurde direkt gemessen.

2.16.11.2 FACS- Analyse

Propidiumiodid gefärbte Zellkerne emittieren Fluoreszenzlicht primär bei Wellenlängen zwischen 580 und 650 nm. Als optimal für die Propidiumiodidexzitation hat sich ein Argon-Ion-Laser erwiesen, der bei 488 nm emittiert. Die Einstellungen an dem FACScan™ Durchflußcytometer von Becton-Dickinson wurden anhand der Positivkontrolle (testikuläre Zellsuspension) vorgenommen und allen anderen Messungen zugrunde gelegt. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden bei jeder Probe 40000 Zellen (counts) analysiert. Die Auswertung erfolgte an der zum Gerät gehörenden Software.

2.16.12 FACS- Sortierung

Mit Hilfe einer FACS-Sortierung können Zellen sowohl aufgrund ihrer Größe und Granularität als auch aufgrund verschiedener Fluoreszenzen identifiziert werden. Hier erfolgte die Sortierung anhand der Expression von EGFP. EGFP- exprimierende Zellen exzitieren Fluoreszenzlicht bei 510 nm, was mit einem Argon-Ion-Laser, der bei 488 nm emittiert, gemessen werden kann.

Die zu sortierenden Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert, abzentrifugiert und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zusammen mit einer nicht-EGFP-exprimierenden Negativkontrolle am Durchflußcytometer sortiert. Die EGFP-

positiven Zellen wurden nach der Sortierung abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, in der entsprechenden Menge Kulturmedium aufgenommen und auf entsprechende Kulturgefäße ausplattiert.

2.16.13 Chromosomenanalyse

Die Chromosomenanalyse dient dem Erkennen von Veränderungen im Chromosomensatz der untersuchten Zellen. Hierzu wird die Mitose der Zellen in der Metaphase arretiert. Die Chromosomen werden im Lichtmikroskop ausgezählt.

Um die Chromosomen in der Metaphase zu arretieren, wurden 190 µl Colcemid zu 5 ml Medium der zu untersuchenden Zellen zugegeben und 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden danach mit PBS gewaschen und trypsiniert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 270 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 1 ml abgenommen und das Pellet durch vorsichtiges Vortexen gelöst. 10 ml der auf 37°C angewärmten hypotonen Lösung wurden dazugegeben und 8 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut resuspendiert und für weitere 8 min bei RT inkubiert. Es wurde 10 min bei 270 x g zentrifugiert, der Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen und das Pellet durch Vortexen gelöst. Danach wurden 10 ml Fixierungslösung langsam zu den Zellen gegeben, 5 min bei RT inkubiert und 10 min bei 270 x g zentrifugiert. Der Fixierungsschritt wurde dreimal wiederholt. Der Überstand wurde abgezogen, die Zellen vorsichtig mit der Pipette resuspendiert und auf entfettete Objektträger aufgetropft. Die Objektträger wurden getrocknet und anschließend 3 min in Giemsa-Lösung gefärbt und unter fließendem Wasser abgespült. Die Auszählung der Chromosomen erfolgte dann bei 600facher Vergrößerung im Lichtmikroskop.

2.16.14 Transplantation von Zellen in Testes von Busulfan-behandelten Mäusen (Transplantations- Assay)

(nach Ogawa et al., 1997)

Um zu untersuchen, ob die Zellen in der Lage sind, sich *in vivo* zu funktionsfähigen Spermien zu entwickeln, wurden sie in Testes Busulfan-behandelter Mäuse transplantiert. Hierfür wurde zuerst sechs bis acht Wochen alten männlichen Mäusen Busulfan in einer Konzentration von 40 mg / kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Damit werden alle Keimzellen im Testis zerstört. Sechs Wochen nach der Behandlung wurde bei einer Maus exemplarisch durch histologische Untersuchungen bestätigt, dass keine Keimzellen in den Testes mehr vorhanden sind. Die anderen Mäuse wurden mit

Wildtyp-Weibchen verpaart. Hierbei wurden in keinem Fall Nachkommen erzeugt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass auch diese Mäuse keine endogene Spermatogenese mehr besitzen. Zwei und drei Monate nach der Busulfan-Behandlung wurden dann Zellen der Zelllinie SSC15 Nr.12 in die Tubuli seminiferi der Mäuse injiziert. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, abzentrifugiert und in Kulturmedium aufgenommen. Jeweils 10 μ l (etwa $1 - 3 \times 10^7$ Zellen/ ml) der Zellsuspension wurden dann in den Rete testis injiziert. Da die Transplantation der Zellen nur in jeweils einen Testis der Mäuse durchgeführt wurde, konnte der nichttransplantierte Testis als interne Kontrolle dienen.

2.16.15 Teratombildung

Die Teratombildung wurde von Dr. Ralf Dressel, Immunogenetik, durchgeführt. Dazu wurden die zu injizierenden Zellen mit Hilfe von Trypsin vom Kulturgefäß gelöst und vereinzelt. Die Einzelzellsuspension wurde anschließend in dem jeweiligen Kulturmedium an Herrn Dr. Dressel gegeben. Es wurden je 10^6 Zellen pro immundefizientem Tier unter die Haut gespritzt. Nach sichtbarem Auftreten von tumorösen Veränderungen wurde die Größe des Tumors zu verschiedenen Zeiten abgeschätzt, protokolliert und die Teratome histologisch aufgearbeitet.

2.17 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Standardprotokolle für Molekularbiologische Methoden wurden laut Sambrook et al. (1989) ausgeführt.

2.17.1 Linearisierung und Aufreinigung von Konstrukten vor der Transfektion

Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, müssen die Konstrukte vor der Transfektion linearisiert werden. Dazu wurden ca. 100 μ g der DNA in einem 100 μ l Ansatz mit 80-100 U eines geeigneten Restriktionsenzym bei 37°C für 2 h verdaut. 2-3 μ l des Ansatzes wurden zur Kontrolle des vollständigen Verdaus auf einem Agarosegel aufgetrennt und bewertet. Bei vollständigem Verdau wurde die DNA durch eine Phenol-Chloroform- Extraktion aufgereinigt. Dazu wurde das Volumen mit Ampuwa auf 400 μ l aufgefüllt und mit 400 μ l Phenol/ Chloroform (1:1) gemischt. Nach Zentrifugation von 15 min bei 900 x g wurde die obere (wässrige) Phase in ein frisches E- Cup überführt und erneut mit 400 μ l Chloroform gut gemischt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 900 x g) wurde unter der Sterilbank weitergearbeitet. Die obere Phase wurde in ein

steriles E- Cup überführt, die Fällung mit Chloroform wiederholt und die obere Phase dann mit 350 µl Isopropanol gemischt. Nach abermaliger Zentrifugation (15 min, 900 x g) wurde das DNA- Pellet mit 70%igem Ethanol zweimal gewaschen und anschließend in 100 µl sterilem PBS üN gelöst. 2 µl der linearisierten und aufgereinigten DNA wurden zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen und bewertet.

2.17.2 Isolierung von genomischer DNA aus Geweben

(nach Laird et al., 1991)

Für die Genotypisierung von Mäusen wurden 1–2 cm der Schwanzspitze 5 Wochen alter Mäuse mit 700 µL Gewebe-Lysispuffer versetzt. Dazu wurden 30 µL Proteinase K (10 µg/µL) gegeben und dieser Ansatz üN bei 55°C im Thermomixer inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA mit 1 Vol Isopropanol präzipitiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in 100–200 µL H₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

2.17.3 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen

Für die Genotypisierung von Zellen nach der Transfektion wurde genomische DNA aus den Zellen nach der Replikplattierung isoliert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann üN mit ES- Lysispuffer bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension in sterile E- Cups überführt, die DNA mit 1 Vol Isopropanol gefällt und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die genomische DNA wurde in 50- 100 µl Ampuwa gelöst und bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert.

2.17.4 Isolierung von genomischer DNA aus Embryonen

Nach Mikroinjektion (2.21.2.4) erhaltene Zwei- bis Acht- Zeller wurden in 10 µl Lysispuffer (DNA aus Embryonen; 2.5) aufgenommen und je 2x für 10 min bei 95°C und anschließend bei -80°C für 15 min inkubiert. Die PCR zur Genotypisierung erfolgte direkt aus 5µl dieses Ansatzes.

2.17.5 Isolierung von Gesamt- RNA aus Zellen

Zur Isolierung von Gesamt- RNA aus Zellen wurde entweder TriReagent von Sigma oder das RNeasy- Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit dem jeweiligen Lysispuffer überschichtet und mit einem Zellschaber von dem Boden des Kulturgefäßes gelöst. Die Zellsuspension wurde in RNA- Cups überführt und die RNA anschließend entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben isoliert. Da RNA besonders anfällig gegenüber RNasen ist, wurden alle Arbeitsschritte so weit wie

möglich auf Eis ausgeführt und nur frisch autoklavierte, mit DEPC behandelte Filterspitzen verwendet. Die Gesamt-RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.17.6 Minipräparation von Plasmid- DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid -DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation) wurde mit den Lösungen E1, E2 und E3 von Qiagen mittels einer modifizierten Form der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) durchgeführt. Als Ausgangskultur dienten 5 ml LB-Übernachtskulturen mit entsprechendem plasmidkodiertem Antibiotikum. Die Qualität der nach dieser Methode isolierten DNA reicht für PCR- Analysen, Restriktionen und Sequenzierungen aus. Glycerinkryokulturen wurden aus den Übernachtskulturen für die Plasmid- Minipräparationen durch Zugabe von 300 µl sterilem Glycerin zu 700 µl der Bakteriensuspension hergestellt. Die Suspension wurde gut durchmischt und als Stock bei -80°C gelagert.

2.17.7 Endotoxin- freie Maxipräparation von Plasmid- DNA aus Bakterien

Für die Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen wurde das Plasmid mit dem EndoFree Plasmid Maxi-Kit (Qiagen) Endotoxin-frei präpariert. Dazu wurden 250 ml einer LB-Übernachtskultur mit entsprechendem plasmidkodiertem Antibiotikum abzentrifugiert und mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Zelltrümmer, Proteine und Salzkomplexe wurden durch Filtration in der QIAfilter Maxi Cartridge abgetrennt, das Lysat über eine äquilibrierte Säule gegeben, die gebundene DNA gewaschen und in ein steriles, Endotoxin-freies Zentrifugenröhrchen aus Glas eluiert. Nach der Präzipitation mit 1 Vol Isopropanol wurde das Pellet mit 70 %igem EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 100-150 µl Ampuwa aufgenommen. Anschließend wurde die Konzentration der Plasmid- DNA photometrisch bestimmt, bevor sie für die Transfektion in eukaryotische Zellen linearisiert und aufgereinigt wurde.

2.17.8 Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen

Diese Methode wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente zur Sequenzierung sowie für Hybridisierungs- und Klonierungsexperimente zu isolieren. Hierfür kamen das QIAEX II® Gel Extraktion Kit sowie das QIAquick® Gel Extraktion Kit zum Einsatz. Die entsprechende DNA-Bande wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem Transilluminator unter UV-Licht (354 nm) mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten,

in ein steriles E- Cup überführt, gewogen und mit der entsprechenden Menge des jeweiligen Puffers versetzt. Die weitere Isolierung erfolgte nach dem jeweiligen Protokoll. Die DNA wurde in 20-50 μ l Ampuwa aufgenommen. Ein Aliquot wurde zur Konzentrationsbestimmung auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.17.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Ausbeute an isolierter DNA aus Gelen wurde im Vergleich mit Proben bekannter Konzentration auf Agarosegelen abgeschätzt. Nach Plasmidpräparationen und Isolierung von RNA aus Zellen wurden die Konzentrationen mit einem Photometer (Eppendorf) bestimmt. Unter Annahme einer OD_{260} von 1 einer dsDNA Lösung von 50 ng/ μ l (bzw. 40 ng/ μ l für RNA) können die Konzentrationen nach Abzug des Hintergrundes des Lösungsmittels (H_2O) berechnet werden. Die zusätzlich angegebenen Quotienten $OD_{260/280}$ und $OD_{260/230}$ spiegeln die Protein- bzw. Salzkontamination wider und sollten $> 1,8$ bzw. $> 2,0$ sein.

Da man bei dem benutzten Eppendorf- Photometer allerdings bereits vor der Messung sowohl Art der Nukleinsäure als auch den Verdünnungsfaktor angibt, erhält man gleich die endgültige Konzentration in μ g/ μ l, so dass eine Berechnung nicht nötig war.

2.17.10 Enzymatische Modifikation von DNA

2.17.10.1 Restriktionsspaltung von Plasmid- DNA

Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsenzyme verschiedener Hersteller gespalten und weiter verarbeitet. Standardmäßig wurden 10 U Enzym pro 1 μ g DNA über 1-2h beim Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms eingesetzt. Zur „Insert“- Isolierung wurden entsprechend 10 μ g Plasmid-DNA mit 100 U Enzym (10 U/ μ l) in Reaktionsansätzen von 100-200 μ l eingesetzt. Für die simultane restriktionsenzymatische Spaltung mit zwei unterschiedlichen Enzymen wurde, soweit möglich, ein mit beiden Enzymen kompatibler Puffer eingesetzt oder die DNA wurde zwischen den beiden Reaktionen präzipitiert, um einen Pufferwechsel zu ermöglichen. Neigten die Restriktionsenzyme zu unspezifischen Reaktionen, wurde dem Restriktionsansatz 1 μ g BSA (10 mg/ml) zugegeben. Um den Verdau auf Vollständigkeit zu überprüfen, wurde anschließend ein Aliquot auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.17.10.2 Restriktionsspaltung von genomischer DNA

Für Southern-Blots wurden 10 μ g genomische DNA in einem 80 μ l Reaktionsvolumen mit 5 μ l Restriktionsenzym (50 U) ün im Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms

inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde auf einem Testgel überprüft und bei Bedarf durch eine erneute Zugabe von 3 µl Enzym und einer Erhöhung des Reaktionsvolumens auf 100 µl für 2 h weiterverdaut.

2.17.11 Polymerase- Kettenreaktion

Die PCR-Technik ist eine enzymatische Methode für die *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Saiki et al., 1988). Die Spezifität dieser Amplifikation basiert auf zwei Oligonukleotidprimern, die das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren und nach einer Hitzedenaturierung an den komplementären Strängen binden. Die hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) des Archeabakteriums *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976) synthetisiert bei ihrer optimalen Temperatur (72 °C) die DNA entlang der Region zwischen den Primern. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation) wird eine exponentielle Vermehrung des jeweiligen DNA-Fragmentes erreicht. Die meist verwendete Platinum® *Taq* DNA Polymerase verfügt über einen hitzelabilen Inhibitor, der während der Denaturierung inaktiviert wird und damit die Durchführung einer *hot start* PCR möglich macht, wodurch die Entstehung unspezifischer Amplifikate während des ersten Zyklus vermieden wird.

2.17.11.1 PCR an Plasmid-DNA

Die PCR an Plasmid-DNA wurde durchgeführt, um DNA-Fragmente zu amplifizieren, die nicht durch restriktionsenzymatische Spaltung isoliert werden konnten, oder um nach Transformation und Minipräparation das integrierte Insert zu bestätigen. Für die PCR wurden folgende Reagenzien aus dem PLATINUM® *Taq* DNA Polymerase-System (Gibco, BRL) in einem PCR-Reaktionsgefäß zu einem Gesamtansatz von 25 µl zusammenpipettiert:

x µl Plasmid-DNA (30-50 ng)

0,5 µl Primer 1 (10 pmol/ µl)

0,5 µl Primer 2 (10 pmol/ µl)

1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)

2,5 µl 10 x PCR-Puffer

1,5 µl 50 mM MgCl₂

0,5 µl PLATINUM® *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl)

auf 25 µl mit Ampuwa

Die Ansätze wurden in einem Thermocycler (PTC-100TM Peltier Thermal Cycler) mit folgendem PCR-Profil inkubiert:

5 min	95°C	Vordenaturierung	} 30-35 Zyklen
30 sek	95°C	Denaturierung	
45 sek	55-68°C	Annealing	
1-2 min	72°C	Elongation	
7 min	72°C	Auffüllreaktion	

Die „Annealing“-Temperatur (Anlagerung der Primer) war spezifisch für die einzelnen Primerpaare und wurde für jede Primerkombination optimiert. Die Spezifität des Produktes (Fragmentlänge) wurde nach der Amplifikation in einer horizontalen Agarosegelelektrophorese überprüft. Dazu wurden 5 µl des Reaktionsansatzes mit 3 µl Stop-Mix vermischt und auf das Gel aufgetragen. In präparativen Ansätzen zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurden 20 bis 30 µl des PCR-Ansatzes mit 5-7 µl Stop-Mix auf ein horizontales Agarosegel aufgetragen und wie unter 2.17.8 beschrieben aufgereinigt.

2.17.11.2 PCR an genomischer DNA

Die PCR an genomischer DNA wurde zur Amplifizierung von Sonden für die Hybridisierung, zur Genotypisierung von gepickten Klonen nach der Transfektion von eukaryotischen Zellen und zur Genotypisierung von Mäusen eingesetzt.

Ansätze und PCR- Programme entsprachen denen unter 2.17.11.1 beschriebenen Angaben.

2.17.11.3 RT- PCR

Unter der „Reversen Transkriptions-PCR“ versteht man die Amplifikation von cDNA-Sequenzen (komplementäre DNA), die zuvor durch reverse *in vitro*-Transkription der mRNA mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* synthetisiert wurden. Mittels der RT-PCR können kleinste Transkriptmengen in Geweben detektiert werden. Die RNA wird dabei in cDNA umgeschrieben (Erststrangsynthese der komplementären DNA). Die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA erfolgte mit dem SUPERSRIPTTMII RNaseH, Reverse Transcriptase- System von Invitrogen. Da für die geplanten Analysen mittels RT- PCR größere Mengen an cDNA benötigt wurden, wurde bewusst auf die

Möglichkeit verzichtet, cDNA- Synthese und PCR in einem Ansatz durchzuführen. Die vorherige Erststrangsynthese hat den Vorteil, dass man mehrere PCR- Analysen an ein und derselben cDNA machen kann.

Die cDNA- Synthese erfolgte laut Herstellerangaben, wobei für jeden 20 µl Ansatz 5µg RNA eingesetzt wurden. Zur Überprüfung der cDNA wurde eine Kontroll- PCR mit einem Primerpaar, das ein spezifisches Fragment eines ubiquitär exprimierten Gens (HPRT, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) amplifiziert, durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde für alle weiteren PCR- Analysen eine äquivalente Menge an cDNA eingesetzt.

2.17.12 Klonierung von DNA- Fragmenten

2.17.12.1 Ligation von PCR- amplifizierten DNA- Fragmenten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das pGEM-Teasy Vektorsystem (Amersham) genutzt. Das System enthält linearisierten Vektor mit 3'-T-Überhängen, die kompatibel zu den 3'-A-Überhängen von PCR- Produkten sind, die von den meisten DNA- Polymerasen erzeugt werden (Clark, 1988). Die aus dem Agarosegel isolierten PCR- Produkte wurden laut dem Herstellerprotokoll üN bei 4°C mit dem Vektor ligiert.

2.17.12.2 Transformation

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Für die Transformation eines Ligationsansatzes wurden 50 µl kompetente *E.coli* DH5α- Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Ligationsansatzes vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde bei 42°C für 45 sek einem Hitzeschock ausgesetzt und nach 2 min Inkubation auf Eis mit 950 µl SOC-Medium versetzt. Die transformierten Bakterien wurden für 1,5h bei 37°C unter Schütteln inkubiert und dann in verschiedenen Verdünnungsstufen (wichtig um Einzelkolonien zu erhalten) auf Selektionsplatten ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert. Waren am nächsten Tag Einzelkolonien zu erkennen, wurden diese mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und damit eine 5 ml LB- Übernachtskultur für die Minipräparation angeimpft.

2.17.13 Gelelektrophoretische Methoden

2.17.13.1 Horizontale Gelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese wurde hauptsächlich bei Testgelen, Gelen für Restriktionskartierungen und Insertisolierungen eingesetzt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0,8–2 %ige Gele in 0,5x TBE-Puffer hergestellt. Den

Gelen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt. Die DNA wurde mit Stop- Mix vermischt, aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Gele wurden fotografisch dokumentiert. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit der 1kb-DNA-Leiter.

2.17.13.2 Vertikale Gelelektrophorese

Die vertikale Gelelektrophorese wurde in Vorbereitung für einen Southern- Blot zur Auftrennung der restriktionsenzymatisch gespaltenen genomischen DNA verwendet. Die geringere Dicke des Gels gewährleistet eine bessere Übertragung der DNA beim Blotten. Zum Abdichten der Innenkammer (Glasgerätebau P. Ochs, Lenglern) wurde ein 1-2 cm dickes Sockelgel aus 2% Agarose gegossen und nach Aushärtung mit einem 0,8%igem Trenngel überschichtet. Als Lauf- und Gelpuffer wurde 1x E-Puffer benutzt. Um die Bildung von pH- und Salzgradienten zu verhindern, wurde die Elektrophorese ün bei einer Spannung von 20V unter ständigem Umwälzen (Peristaltikpumpe Ismatec Sa, Zürich) des Laufpuffers durchgeführt.

2.17.14 Transfertechniken und Hybridisierung

2.17.14.1 Southern Blot- Transfer von DNA auf Membrane

(Southern, 1975)

Mit Hilfe des Southern-Transfers werden DNA-Fragmente im Kapillarblottingverfahren aus Agarosegelen auf Nitrocellulosemembranen oder Nylonmembranen transferiert. Hierfür wurde ein Turboblotter™ der Firma Schleicher & Schüll (Dassel) verwendet. Nach Verdau und gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA wurde das Gel für 10 min in 1x E-Puffer + EtBr gefärbt und fotografisch dokumentiert. Anschließend wurden die Gele zunächst für 20 min in 0,25M HCl depuriniert, dann für 45 min mit Denaturierungslösung und anschließend für 1h mit Neutralisierungslösung behandelt. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die mit 20x SSC vorbehandelte Membran gelegt, unter der sich ein ebenfalls mit SSC getränktes Blottingpapier sowie ca. 30 weitere, trockene Blottingpapiere befanden. Auf das Gel wurden luftblasenfrei zwei weitere getränkte Blottingpapiere gelegt und mit einem langen Blottingpapier die Verbindung zu Puffertanks an zwei Seiten der Blot- Apparatur hergestellt. Die Größen der jeweiligen Papiere und Membranen wurden so gewählt, dass sie genau der Gelgröße entsprachen. Der Transfer erfolgte ün. Am nächsten Tag wurde die Position der Geltaschen auf der Membran markiert und diese kurz in 2x SSC gewaschen, bevor die Membran zur Fixierung der DNA für 2-3h bei 80°C gebacken wurde.

2.17.14.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA- Sonden

(Denhardt, 1966, modifiziert)

Die vorbereiteten DNA- Filter wurden in 2x SSC für ca. 15 min gewaschen und anschließend mit der DNA-beladenen Seite ins Lumen zeigend in Hybridisierungsröhren mit 15 ml Hybridisierungslösung (Kit: RediprimeTMII Random Prime Labelling System, Amersham Biosciences, Freiburg), die 5 µl denaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) enthielt, für 5-6 h bei 65°C im Rollofen vorhybridisiert. Zur Markierung der Sonde wurden ca. 100 ng des Inserts für 10-15 min bei 95°C denaturiert, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30-45 min mit 4 µl (= 40 µCi) radioaktiv markiertem dCTP bei 37 °C markiert. Die Sonde wurde über eine Säule (aus dem Kit) aufgereinigt und anschließend bei 95°C für 10 min zusammen mit 400 µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte in im Rollofen bei 65°C. Die Membran wurde am nächsten Tag für 2x 15 min in 2x SSC bei 65°C gewaschen, wobei die Abnahme der radioaktiven Signale mit einem Handmonitorgerät (β und γ Detektor, 122LB, Berthold) verfolgt wurde. Bei Detektion von mehr als ~3 Bq/cm² wurden die Filter zusätzlich gewaschen (60-70°C, 0,2 x SSC mit 0,1 % SDS). Die Filter wurden noch feucht in eine Folie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

2.17.15 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung wurde modifiziert nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Prinzip der durch den Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP) statistisch unterbrochenen DNA-Neusynthese. Es wurde mit dem DYEnamic ET-Terminator-Mix der Firma Amersham Pharmacia gearbeitet. Dieser Mix enthält dNTPs, mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs, DNA-Taq-Polymerase sowie Reaktionspuffer. Während der gelelektrophoretischen Analyse werden die Fluoreszenzfarbstoffe über Laserabtastung automatisch detektiert und können so analysiert werden.

Nach einer PCR zur Amplifizierung des zu sequenzierenden Fragmentes wurde das PCR-Produkt mit dem MontageTM PCR Centrifugal Filter Devices- System aufgereinigt und ein Aliquot auf ein Testgel aufgetragen, um die einzusetzende Menge für die anschließende Sequenz- PCR abzuschätzen.

Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Ansatz in einem dünnwandigen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

0,5-2 µl PCR- Produkt (1-1,5 µg)

1 µl Primer (10 pmol / µl)

4 µl DYEnamic ET-Mix

auf 10 µl mit Ampuwa

Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR in einem automatischen Thermocycler mit Deckelbeheizung standardmäßig mit dem folgendem PCR-Programm durchgeführt:

40 sek	95°C	Vordenaturierung	} 25 Zyklen
20 sek	95°C	Denaturierung	
25 sek	55-68°C	Annealing	
1 min	72°C	Elongation	

Nach der PCR wurden die Proben mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und dem hauseigenen Sequenzierservice zur Sequenzanalyse übergeben.

2.18 Proteinchemische Techniken

2.18.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen

Einer dicht bewachsenen (Konfluenz > 80%) großen (75 cm²) Zellkulturflasche wurde nach dem Waschen mit PBS 500 µl Lysis-Puffer zugefügt. Die adhärennten Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Suspensionszellen wurden bei 100 x g für 3 min zentrifugiert, mit PBS gewaschen und ebenfalls in 500 µl Lysis-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 16000 x g für 10 min entfernt. Der die Zellproteine enthaltende Überstand wurde in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt, die Proteinkonzentration (2.18.2) wurde bestimmt und das Lysat in geeigneten Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

2.18.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

(Bradford, 1976)

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford mit Hilfe von Roti®-Nanoquant (Roth) bestimmt. Hierbei wird ausgenutzt, dass der Coomassie-Farbstoff Brilliant-Blau in saurer Lösung an Proteine bindet, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 495 nm auf 595 nm zur Folge hat. Durch Mitführen einer

BSA-Eichreihe (0-6,7 µg/ml BSA) als interner Standard kann die Proteinkonzentration aus der Eichgeraden extrapoliert werden. 20 ml des Farbstoffes (5x-Konz.) wurden mit 80 ml H₂O gemischt. Je 200 µl dieser Arbeitslösung wurden zu 50 µl einer 1:100 Verdünnung der zu messenden Proteine gegeben. Die Messung der Extinktion erfolgte in flachbödigen 96well-Mikrotiterplatten, die in einem EL 800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, Vt.) bei 490/595 nm ausgewertet wurden. Es wurden je Probe drei Messungen durchgeführt und die Werte gemittelt.

2.18.3 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurden Gradientengele (NuPAGE™ 4-12% oder 10% Bis-Tris Gel, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieses Polyacrylamid-Gelsystem beruht auf dem SDS-PAGE- Prinzip (Laemmli, 1970). Durch die Verwendung von aufeinander abgestimmten Gelen und Puffern bei einem pH-Wert von 7.0 ist zum einen die Stabilität der Proteine, aber auch die der Gele erhöht, was zu einem besseren Ergebnis der Elektrophorese führt.

Die Proteinproben wurden mit 0,4 Vol Probenpuffer (LDS Sample Buffer (4x), NuPAGE™, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt, 10 min bei 70°C erhitzt und nach Abkühlen auf Eis auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x MES-Puffer (Invitrogen) bei 150-180 V für ca. 1 h. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine wurde parallel zu den Proteinproben ein vorgefärbter Proteinstandard (NuPAGE™ See Blue Plus2, Invitrogen) mitaufgetragen.

2.18.4 Western Blot- Analysen von Proteinen auf PVDF- Membranen

(Gershoni et al., 1982, 1983)

Eine auf die Größe des zu blottenden Polyacrylamidgels zugeschnittene PVDF-Membran (Macherey & Nagel) wurde kurz (5-10 sek) in 100% Methanol getaucht und anschließend in Transferpuffer für 10 min äquilibriert. Auf fünf ebenfalls auf die Größe zurechtgeschnittene Whatman GB003 Filter (Schleicher & Schüll, Dassel), die in Transferpuffer getränkt wurden, wurde die PVDF-Membran und sofort das nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mit Wasser abgespülte Polyacrylamidgel gelegt. Fünf weitere mit Transferpuffer getränkte Filter wurden nach dem *sandwich*-Modell oben aufgesetzt. Der Transfer wurde in einem Elektroblogger (Biometra, Göttingen) bei 100 mA für 1 – 2 h durchgeführt.

2.18.5 Färbung von Polyacrylamidgelen

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden zwecks Proteinfärbung oder Kontrolle des Western Blot- Transfers mit Coomassie-Lösung gefärbt, anschließend in H₂O entfärbt und in Folie eingeschweißt.

2.18.6 Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern

Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken, wurde die Membran zunächst in 1x PBS mit 5% Magermilchpulver (Blocklösung I) für 1 h bei RT inkubiert. Nach extensivem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei einer für den jeweiligen Antikörper entsprechenden Verdünnung in Blocklösung I bei 4°C üN. Anschließend wurde die Membran 3x 20 min in Waschlösung gewaschen und mit einem entsprechenden Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 bis 1:10000 in Blocklösung für 2 h bei RT inkubiert. Sollten die Proteine über Chemilumineszenz nachgewiesen werden, wurde die Membran nach 3x 20 min waschen 5 min in 1x PBS geschwenkt, um Milchpulverrückstände zu entfernen. Anschließend wurde etwa 1 ml der ECL Plus- Arbeitslösung hergestellt, indem Luminol/Enhancer-Lösung und die stabile Peroxid-Lösung der Firma Amersham 1:40 gemischt wurden. Die HRP setzt das Substrat der Arbeitslösung um. Die Produkte bilden ein lichtemittierendes Präzipitat um den Antigen- Antikörperkomplex. Die Lösung wurde auf die Membran gegeben und 5 min inkubiert. Anschließend wurde die abgetropfte Membran in Plastik eingeschweißt und in eine Filmkammer gelegt. Der Film wurde in der Dunkelkammer aufgelegt und nach 10 sek bis 20 min entwickelt. Je nach Intensität der Banden konnte die Entwicklungszeit verlängert oder verkürzt werden.

2.19 Proteomics

Für die Proteom- Analysen der Zellen wurden diese durch Behandlung mit Trypsin von der Kulturschale gelöst, pelletiert und in einer geringen Menge PBS auf Eis zu Dr. Hassan Dihazi (Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie) gebracht. Alle weiteren Schritte wurden von Mitarbeitern der AG Dihazi durchgeführt, so dass hier nicht weiter auf die Durchführung eingegangen werden kann.

2.20 Histologische Methoden

Die Analyse der Zellen erfolgte an einem (Fluoreszenz-) Fotomikroskop (BX 60, Olympus), einem inversen (Fluoreszenz-) Fotomikroskop (IX81, Olympus) sowie an einem Konfokalmikroskop (Olympus).

2.20.1 Fixierung von Zellen auf Objektträgern

In Vorbereitung für histologische Untersuchungen wurden die Zellen mindestens 2 Tage vorher auf Zellkultur- Objektträger mit zwei Kammern der Firma Falcon ausplattiert, um ein gutes Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Die Zellen wurden dann 3x mit PBS gespült und anschließend für 10 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS konnten die Zellen für die jeweilige Untersuchungsmethode weiterbehandelt werden.

2.20.2 Fixierung von Organen und Geweben

Die zu untersuchenden Organe wurden aus der Maus entnommen und zwei Tage unter Schütteln bei 4°C in 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Organe üN in 70% EtOH unter Schütteln gewaschen. Danach wurden die Organe in einer aufsteigenden Ethanolreihe (1x 15 min 70% EtOH, 3x 20 min 80% EtOH, 4x 30 min 90% EtOH, 4x 30 min 96% EtOH, 5x 20 min 100% EtOH) entwässert und üN in Isopropanol geschüttelt. Nachfolgend wurden die Gewebe jeweils 30 min in verschiedenen Isopropanol-Xylol-Gemischen (75:25, 50:50, 25:75) inkubiert und üN in 100% Xylol aufbewahrt. Anschließend konnten die Gewebe in Paraffin eingebettet und dann mit dem Mikrotom geschnitten werden.

2.20.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke mit dem fixierten Gewebe wurden zu Quadern geeigneter Größe zurechtgeschnitten und in das Mikrotom (JUNG RM 2035, Leica) eingespannt. Die Schnittdicke betrug 5-7 µm. Mit Hilfe eines feinen Pinsels wurden die Schnitte auf 58°C warmes Wasser gelegt, mit einem Objektträger aufgenommen und getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei 4°C gelagert.

2.20.3 Hämatoxylin- Eosin- Färbung von eukaryotischen Zellen

Nach dem Fixieren der Zellen mit Paraformaldehyd wurde einmal mit dH₂O gewaschen und 7 min mit 1,6%igem Hämatoxylin gefärbt. Anschließend wurde erneut mit dH₂O

gewaschen und 12 min in Leitungswasser gebläut. Nachdem erneut mit dH₂O gewaschen worden war, erfolgte eine Färbung für 10 sek in Eosin und eine weitere Inkubation in dH₂O. Die Zellen wurden nach der Färbung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min 70%, 80%, 90%, 96%, 100% EtOH) entwässert und zweimal 3 min in Xylol inkubiert. Nachfolgend konnten die Zellen in Eukitt eingebettet werden.

2.20.4 Hämatoxylin- Eosin- Färbung von Gewebeschnitten

Um das Paraffin aus den Schnitten zu entfernen, wurden die Gewebeschnitte zunächst 3x 3 min in Xylol inkubiert, Danach wurde das Gewebe durch eine absteigende Ethanolreihe (je 2 min 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50% EtOH) bewässert und in dH₂O rehydriert. Es wurde 7 min in 1,6% Hämatoxylin gefärbt, in dH₂O gewaschen und 12 min in Leitungswasser gebläut. Nachdem erneut in dH₂O gewaschen worden war, wurde 10 sek mit Eosin gefärbt und das Gewebe anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% EtOH) wieder entwässert und 2x 3 min in Xylol inkubiert. Danach konnten die gefärbten Schnitte in Eukitt eingebettet werden.

2.20.5 Antikörperfärbung

Die fixierten und mit PBS gewaschenen Zellen wurden für 1-4h mit einem Blocking-Puffer inkubiert und anschließend mit einer 1:200 Verdünnung des ersten Antikörpers überschichtet und üN bei 4°C in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Die in dieser Kammer gehaltene Feuchtigkeit verhindert das Austrocknen der Zellen. Am nächsten Tag wurde der erste Antikörper abgenommen, 3x mit PBS gewaschen und dann für 2-3h mit einer 1:500 Verdünnung des zweiten Antikörpers ebenfalls bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen bei fluoreszenzkonjugiertem 2. Antikörper mit DAPI eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Bei alkalischer Phosphatase konjugiertem 2. Antikörper wurde für 15 min mit Sigma-FastRed laut Herstellerangaben gefärbt, erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit Eukitt eingedeckelt.

2.20.6 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Analyse der Zellen wurde von Prof. Dr. Andreas Meinhardt, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Giessen, durchgeführt. Die Analyse diente der Beobachtung von Meiosestadien.

2.20.6.1 Fixierung der Zellen für die EM

Zur Fixierung der Zellen für die Elektronenmikroskopie wurden diese durch Trypsinbehandlung von der Oberfläche der Kulturgefäße gelöst, abzentrifugiert und 3x in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen der Fixierlösung (2.5) aufgenommen und für 8-12h bei 4°C inkubiert. Zum Waschen der Zellen wurden diese bei 4°C 3x mit der Spüllösung (2.5) behandelt, abschließend auch in dieser aufgenommen und zur weiteren Analyse zu Prof. Meinhardt nach Giessen geschickt.

2.20.7 Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung (FISH)

Bei der *in situ* Hybridisierung (ISH) werden die Chromosomen mit chromosomenspezifischen DNA-Sonden mittels Hybridisierung an entsprechend komplementären DNA-Zielsequenzen sichtbar gemacht. Diese Technik wurde erstmals von Pardue und Gall (1969) sowie von John et al. (1969) unabhängig voneinander beschrieben (Übersichtsarbeiten: Leitch et al., 1994; Swiger und Tucker, 1996). Als markierte Hybride können den Chromosomen fluoreszenzoptische Stoffe angelagert werden, um komplementäre DNA-Sequenzen zu detektieren (Pinkel et al., 1986). Diese ermöglichen es, die Chromosomen als Signale im Fluoreszenzmikroskop auszuwerten (FISH = Fluoreszenz- in situ- Hybridisierung). Mit dieser Methode ist es möglich, eine Aussage bezüglich der Anzahl und Lage von Chromosomenbereichen zu treffen. Bei dieser Technik wird die Sonden- DNA durch Hitze denaturiert und mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Für die Hybridisierung muss auch die Ziel- DNA, die im Präparat erkannt werden soll, als Einzelstrang vorliegen. Dies wird durch chemische Denaturierung erreicht. Im folgenden Renaturierungsschritt wird die Ziel- DNA wieder zu einem Doppelstrang vereint, allerdings ist der Partner hierbei die oben schon genannte Sonden- DNA, die im Überschuss der Reaktion hinzugegeben wird. Diese Sonden- DNA muss zwei Charakteristika besitzen:

1. sie ist homolog zu dem DNA-Abschnitt, der markiert werden soll, und
2. es haben sich fluoreszenzoptische Stoffe angelagert.

Dadurch wird erreicht, dass sich nach der Hybridisierung (Bilden eines Hybrids aus Ziel- und Sonden- DNA) fluoreszierende Sonden- DNA im gewünschten Detektionsbereich befindet. Der Nachweis der Hybridisierung erfolgt unter Anregung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht und der daraus resultierenden Emission von Licht einer

spezifischen Wellenlänge. Mit der FISH-Technik ist es möglich, ein spezielles ganzes Chromosom (Einsatz von sogenannten whole chromosome painting-Sonden), das Zentromer eines bestimmten Chromosoms oder auch simultan alle Chromosomen eines Chromosomensatzes (Zentromer-Sonden), Chromosomenenden (Telomer-Sonden) oder einzelne Abschnitte auf einem Chromosom (Gen-Sonden) zu lokalisieren. Mit der neuen Methode der Multi-Color-FISH ist es inzwischen sogar möglich geworden, alle 24 verschiedenen Chromosomen (1-22, X, Y) des menschlichen Karyotyps simultan anfärben zu können (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sonden für die murinen Chromosomen X, Y, 8 und 11 verwendet. Die Vorbereitung der Proben erfolgte laut 2.16.13; die Färbung wurde an Metaphasechromosomen durchgeführt. Die fertigen Präparate wurden für 10 min in Formaldehyd fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Anschließend folgten eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 85%, 99%) und das Trocknen der Objektträger an der Luft. Nach Auftragen der jeweiligen Sonde (5-8 μ l) wurden die Objektträger zur Denaturierung für 3 min bei 74°C inkubiert und anschließend bei 37°C \bar{u} N hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate mit SSC- Puffer gewaschen und anschließend mit DAPI eingedeckelt und ausgewertet.

2.21 Embryologische Methoden

2.21.1 Blastozysteninjektion

Die Blastozysteninjektion erfolgte in der Tierhaltung des MPI für experimentelle Medizin, Göttingen. Dazu wurden die zu injizierenden Zellen mit Hilfe von Trypsin von dem Kulturgefäß gelöst und vereinzelt. Die Einzelzellsuspension wurde anschließend in dem jeweiligen Kulturmedium auf Eis zum MPI gebracht. Hier wurden ca. 15- 25 Zellen pro Blastozyste injiziert. Die injizierten Blastozysten wurden anschließend in scheinchwangere Mäuse retransferiert.

2.21.2 Intracytoplasmatische Gameten- Injektion

Die Intracytoplasmatische Injektion von haploiden Gameten wurde von Prof. Dr. Hans-W. Michelmann, Frauenklinik des Universitätsklinikums Göttingen, auf einer selbst konstruierten Mikroinjektionsanlage durchgeführt.

2.21.2.1 Behandlung von Oocyten- Donor- Mäusen

Bei dem im Tierstall vorgegebenem Hell-Dunkel-Rythmus (7-18, 18-7 Uhr) ovulieren die Weibchen alle 4-5 Tage 3-5 h nach Einsetzen der Dunkelperiode. Um die Ausbeute an reifen Eizellen zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erhöhen, wurden die Tiere der Stämme CD1 oder NMRI hormonell behandelt. Den Tieren wurde um 15 Uhr 10 IU PMSG i.p. injiziert. Nach 48h wurden 10 U hCG auf die gleiche Weise injiziert. hCG entspricht dem Luteinisierungshormon und wird für die Superovulation benötigt. 12 h später konnten pro Tier 10- 20 Oocyten gewonnen werden.

2.21.2.2 Isolierung von Oocyten

Die Isolierung der reifen Oocyten erfolgte in 35 mm Kulturschalen, von denen zur Vorbereitung einige mit M2- bzw. M16-Medium befüllt und im Wärmeschrank bei 37°C (M2) bzw. im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ (M16) inkubiert wurden. In eine weitere Kulturschale wurden drei einzelne Tropfen M16-Medium gegeben und mit Mineralöl überschichtet (Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂). Bei den zur Oocytenentnahme getöteten Tieren wurde die Bauchdecke geöffnet, die Eileiter von den Uterushörnern abgetrennt und in M2-Medium (auf 37°C vorgewärmt) gegeben. Die weitere Arbeit erfolgte unter einem Stereomikroskop (Stemi SV 11, Fa. Zeiss) unter Durchlicht auf einer mit 37°C beheizten Arbeitsplatte. Mit Hilfe von spitz ausgeschmiedeten Pinzetten wurden die geschwollenen Ampullen angerissen, worauf die von Cumulusmasse umgebenen Oocyten wegen des vorliegenden Überdrucks herausgepresst wurden. Restliche Zellen wurden mit den Pinzetten aus den Ampullen herausgestrichen, die leeren Reste der Ampullen entfernt. Zum Ablösen der Cumuluszellen wurde 20 µl Hyaluronidase (10 mg/ml) zugegeben. Nach 5 minütiger Inkubation wurde die Oocyten mit einem Mundschlauch in eine über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Pasteurpipette eingesaugt und mit möglichst wenig Cumuluszellen oder Geweberesten in frisches M2-Medium gegeben. Auf dieselbe Weise wurden die Oocyten solange weitergewaschen bis alle Cumuluszellen, Gewebereste oder zerstörten Oocyten abgetrennt waren. Danach wurden die Oocyten zum Mediumwechsel einmal kurz in M16-Medium gewaschen, bevor sie in die zur Kultivierung vorbereiteten M16-Tropfen unter Mineralöl gegeben und bis zur Mikroinjektion bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert wurden.

2.21.2.3 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen, die zur Injektion in reife Oocyten verwendet werden sollten, wurden 24h-72h vor der geplanten Injektion mit RA (10⁻⁶M) induziert. Am Tag der Mikroinjektion

wurden die adhärenen Zellen durch Trypsinbehandlung von der Oberfläche der Kulturgefäße gelöst, abzentrifugiert, 2x in PBS gewaschen und in einem geeigneten Volumen an Kulturmedium bis zur Injektion bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Die Zellen im Überstand wurden ebenfalls abzentrifugiert, 2x in PBS gewaschen und auch in Kulturmedium unter denselben Bedingungen aufbewahrt.

2.21.2.4 Mikroinjektion

Reife Oocyten wurden auf mehrere mit Mineralöl überschichtete M16-Tropfen verteilt. In einen anderen M16- Tropfen wurden die zu injizierenden Zellen aufgenommen. Die Kulturschale wurde auf dem Mikroskopisch fixiert, die Ebene der Oocyten fokussiert und die Haltepipette an eine Oocyte herangeführt. Die Oocyte wurde dann über einen angelegten Unterdruck an der Haltepipette fixiert. Ansaugen und Abstoßen der Oocyten erfolgte solange, bis sie so fixiert waren, dass die Vorkerne leicht zu erkennen waren. Eine zu injizierende Zelle geeigneter Größe wurde durch Unterdruck in die Injektionskapillare aufgenommen. Zur Injektion wurde vorsichtig in die Oocyte gestochen und die Zelle aus der Injektionskapillare ausgestoßen. Die so behandelten Oocyten wurden in M16- Medium bei 37°C und 5% CO₂ weiterkultiviert und die Entwicklung zu 2- und Mehrzellern jeden Tag photographisch dokumentiert. Für den Retransfer wurden alle am Tag 1,5 nach Injektion erhaltenen 2-Zeller verwendet.

2.21.3 Retransfer von Zweizellern in scheinchwangere Mäuse

Die am Tag 1,5 nach Injektion zu 2-Zellern entwickelten Embryonen wurden in die Eileiter eines Tag 1,5 scheinchwangeren Weibchens (CD1 oder NMRI) retransferiert. Dazu wurden am Vorabend des Retransfers mehrere Weibchen im Alter zwischen 2-3 Monaten mit vasktomierten Männchen verpaart. Nach positiver VP-Kontrolle wurde die Maus mit Ketavet® (0,01 ml/1 g Körpergewicht) narkotisiert. Die Rückengegend der bäuchlings auf einer Wärmeplatte liegenden Maus wurde desinfiziert und das Fell im Bereich der Leiste durch einen ca. 10 mm langen Schnitt aufgetrennt. Über dem durchscheinenden Ovar wurde die Unterhaut aufgeschnitten und das Ovar am anliegenden Fettgewebe herausgezogen. Das Ovar wurde mit einer Gefäßklemme (angebracht am Fettgewebe) so orientiert festgelegt, dass Ovidukt und Uterus gut zu erkennen waren. Mit zwei Pinzetten wurde danach die Bursa angerissen und die Ampulle freigelegt. Ein Tropfen Adrenalinlösung verhinderte das Einbluten. Das Infundibulum wurde mit einer Pinzette hervorgehoben und mit der anderen Pinzette vorsichtig

aufgeweitet. In die sog. Retransferkapillare, einer besonders schmal ausgezogenen Pasteurpipette, waren vorher M2-Medium, eine Luftblase und 10-20 Zweizeller perlschnurartig aufgesogen worden. Mit einer Pinzette wurde das Infundibulum des Ovidukts festgehalten, die Spitze der Retransferkapillare in das Infundibulum eingeführt und die Zellen hineingeblasen. Das unter dem Binokular gut sichtbare Erscheinen der Luftblase im Eileiter zeigte den erfolgreichen Retransfer an. Nach erfolgtem Retransfer wurden die Organe in die richtige Lage zurückgebracht, die Wundränder aneinandergelagt und geklammert und zur Desinfektion die Wunde mit Leukase-Puder behandelt. Die Maus wurde dann bis zum Aufwachen aus der Narkose in ein Zellstofftuch eingewickelt und auf eine Wärmeplatte gelegt, wobei die Augen durch aufgelegte Wassertropfen vor der Austrocknung geschützt wurden.

2.22 Methylierungs- und Imprinting- Untersuchungen

Für diese Untersuchungen wurde aus den entsprechenden Zellen DNA isoliert und zu Dr. Ulrich Zechner, Humangenetik Mainz, geschickt. Alle weiteren Schritte wurden von Mitarbeitern der AG Zechner durchgeführt, so dass an dieser Stelle nur generell auf die Methodik eingegangen wird.

2.22.1 Bisulfit- Modifikation der DNA

Der Begriff Epigenetik beschreibt Veränderungen der Genfunktion, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen. Die DNA- Methylierung, bei der die Base Cytosin methyliert wird, ist eine der wichtigsten epigenetischen Veränderungen. Auswirkungen der DNA- Methylierung finden sich in der Regulation der Genexpression. Das Verfahren der Bisulfitmodifikation dient der gezielten Basenumwandlung innerhalb eines DNA-Moleküls. Durch die Behandlung mit Natrium- Bisulfit werden nicht-methylierte Cytosin- Reste zu Uracil- Resten desaminiert, während methylierte Cytosine aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe unverändert als 5-Methylcytosine aus der Reaktion hervorgehen. Durch anschließende Einzelstrang-PCR und Sequenzierung kann methylierte von nicht- methylierter DNA unterschieden werden.

Die Umwandlungsreaktion beruht auf der hohen Affinität von Natrium- Bisulfit zur 5,6-Doppelbindung von Cytosin. Hierbei entsteht durch die Reaktion von Cytosin mit dem Bisulfit- Ion ein Bisulfit- Intermediat, welches durch anschließende hydrolytische Desaminierung ein sulfoniertes Uracil bildet. Durch alkalische Desulfonierung entsteht schließlich Uracil. Da die Umwandlung von Cytosin zu Uracil aufgrund der sterischen Anordnung des C₆-Kohlenstoffatoms des Cytosinringes nur in einzelsträngiger DNA

stattfinden kann und nach der Umwandlung die beiden Stränge nicht mehr komplementär zueinander sind, erfolgt anschließend eine einzelstrangspezifische PCR mit strangspezifischen Primern. Nicht umgewandeltes, methyliertes Cytosin erscheint nach der PCR weiterhin als Cytosin, während Uracil als Thymin amplifiziert wird, welches im komplementären Strang einem Adenin entspricht. Es kommt also zum Austausch eines CG-Basenpaares gegen ein TA-Basenpaar.

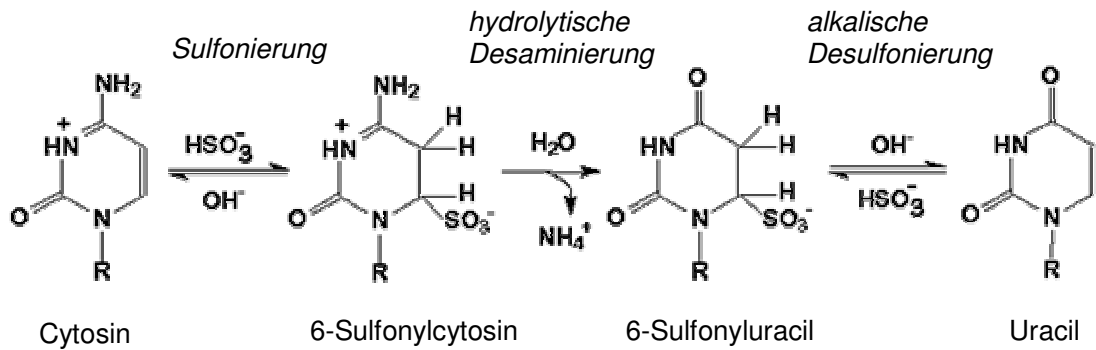


Abbildung 3: Ablauf der Desaminierung (modifiziert nach <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/hajkova-petra-2002-09-16/HTML/chapter3.html>)

Ein generelles Problem der Bisulfit-Modifikation besteht darin, dass in der Regel lange Reaktionszeiten nötig sind, um eine möglichst hohe Konversionsrate zu erreichen. Dadurch kommt es aber auch häufig zur DNA-Degradation und zu DNA-Verlusten. Die Bisulfitbehandlung wurde hier mit den Kit-Systemen von zwei verschiedenen Herstellern durchgeführt. Verwendet wurde sowohl das MethylEasyTM DNA-Bisulphite Modification Kit von Human Genetic Signatures als auch das EpiTect Bisulfite Kit von Qiagen. Beide Kits führten zuverlässig zur Konversion der Cytosine.

2.22.2 Pyrosequenzierung

2.22.2.1 Prinzip der Pyrosequenzierung

Durch eine Sequenzierung kann die genaue Reihenfolge der Nukleotide in einem DNA-Abschnitt bestimmt werden. Bei der Pyrosequenzierung handelt es sich um ein neuartiges Verfahren, bei dem vier unterschiedliche Enzyme zum Einsatz kommen: die DNA-Polymerase, die Luciferase, die Apyrase und die ATP-Sulfurylase.

Nach PCR-Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts mit Hilfe eines biotinylierten und eines nicht-biotinylierten Primers werden zunächst die biotinylierten Einzelstränge von den nicht-biotinylierten getrennt und anschließend als Template für die Pyrosequenzierungsreaktion genutzt. Dabei werden die biotinylierten Einzelstränge

mit dem entsprechendem Sequenzierprimer, den Enzymen und den Substraten Luciferin und Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) inkubiert. Nach Bindung des Sequenzierprimers kommt es zur Zugabe des ersten von vier Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP). Ist das zugegebene Nukleotid komplementär zum entsprechenden Nukleotid im Template, wird es durch die DNA-Polymerase in die DNA eingebaut und dadurch der Sequenzierprimer verlängert. Jedesmal, wenn ein dNTP in die DNA eingebaut wird, wird eine äquimolare Menge Pyrophosphat (PP_i) abgespalten, das durch das Enzym ATP- Sulfurylase in Anwesenheit von Adenosin-5'-phosphosulfat in ATP umgesetzt wird. Dieses ATP bewirkt die luciferaseabhängige Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin, wodurch es zur Freisetzung eines Lichtquants kommt. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass jedes eingebaute Nukleotid in einer Lichtfreisetzung resultiert. Dieses Licht wird von einer Kamera detektiert und anschließend im Pyrogramm als Peak dargestellt. Die Nukleotide, die nicht in die DNA eingebaut wurden, werden durch das Enzym Apyrase degradiert. Anschließend kann das nächste dNTP zum Reaktionsansatz gegeben werden. Bei der Pyrosequenzierung wird statt dATP 2'-Deoxyadenosine-5'-O'-1-Thiotriphosphat (dATP α S) eingesetzt. Das Nucleotid dATP α S wird im Gegensatz zu dATP nur von der DNA-Polymerase erkannt und in die DNA eingebaut, nicht aber von der Luciferase.

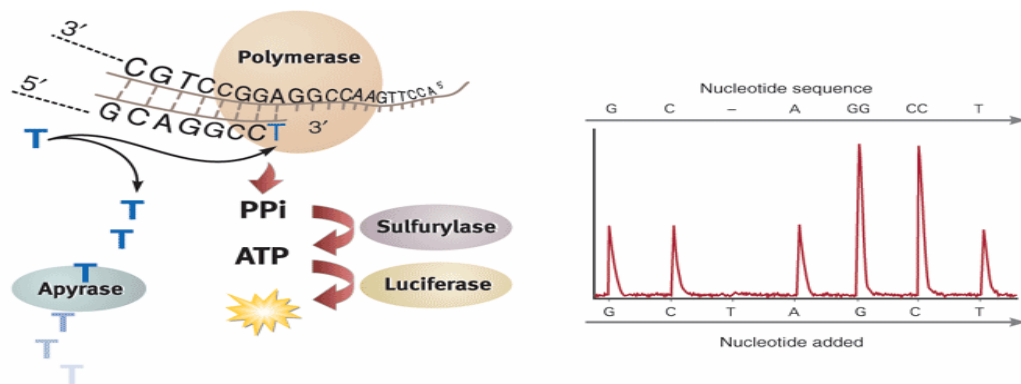


Abbildung 4:

Das Prinzip der Pyrosequenzierung.

Durch den Einbau eines Nukleotids wird Pyrophosphat freigesetzt, das durch die Sulfurylase in ATP umgewandelt wird. Dieses ATP wird von der Luciferase genutzt, um Licht zu generieren, das durch eine Kamera detektiert wird und im Pyrogramm als Peak dargestellt wird. Überschüssige Nucleotide werden von der Apyrase abgebaut (Quelle: www.pyrosequencing.com).

2.22.2.2 Auswertung der Pyrosequenzierung

Die Auswertung der Pyrosequenzierung erfolgte mit Hilfe der Pyro Q-CpG Software der Firma Biotage (Grenzach-Wyhlen). Die Ergebnisse werden in Form eines Pyrogramms dargestellt und der prozentuale Methylierungsgrad für jedes einzelne analysierte CpG direkt angegeben. Bei den meisten Template-DNAs war es möglich, Cytosine, die nicht von einem Guanin gefolgt wurden, als interne Kontrolle für die Qualität der Bisulfit-Behandlung zu verwenden. Bei einer erfolgreichen Bisulfit-Behandlung sollten alle nicht von einem Guanin gefolgten Cytosine zu Uracil und in der folgenden PCR zu Thymin umgewandelt werden. Folglich sollten in einem Pyrogramm für solche Cytosine nur Thymin-Peaks angezeigt werden.

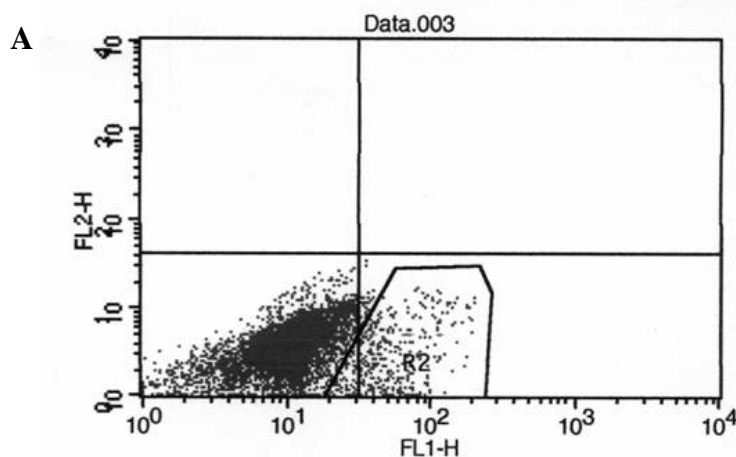
3 ERGEBNISSE

3.1 Generierung von SSC- und ES- Zelllinien

3.1.1 Isolierung und Kultivierung von murinen Spermatogonialen Stammzellen

In unserer Arbeitsgruppe wurde im Rahmen einer biologischen Doktorarbeit eine transgene Maus generiert, die unter der Kontrolle des 1,4 kb- Stra8- Promotors EGFP in allen Spermatogonien exprimiert (Jaroszynski, 2005). Dass über dieses Konstrukt SSCs isoliert und angereichert werden können, wurde in mehreren Arbeiten mit murinen Teratokarzinomzellen bzw. Embryonalen Stammzellen gezeigt (Nayernia et al., 2004; Nolte, Diplomarbeit, 2005; Nayernia et al., 2006; Nolte et al., 2007).

Um die EGFP positiven Spermatogonien der transgenen Maus isolieren zu können, wurden Testes adulter Mäuse verschiedenen Alters (6 Wochen bis 6 Monate) mittels einem modifizierten enzymatischen Zwei-Schritt-Verdau nach Ogawa et al. (1997) dissoziiert (vergl. auch Abb.7). Die so erhaltene Einzelzell- Suspension wurde über einen FACSORTer sortiert und die EGFP positiven Zellen (Spermatogonien) in Kultur genommen. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der Sortierung der Zellen einer Testissuspension einer 6 Wochen alten Maus.



B

Region Statistics								
File: Data.003	Log Data Units: Linear Values							
Sample ID: Shra 8-EGFP Nr.55	Patient ID:							
Tube: Untitled	Panel: Untitled Acquisition Tube List							
Acquisition Date: 29-Apr-08	Gate: G1							
Gated Events: 9192	Total Events: 36134							
X Parameter: FL1-H (Log)	Y Parameter: FL2-H (Log)							
Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	9192	100.00	25.44	13.93	11.43	4.17	3.65	1, 2
R2	430	4.68	1.19	56.71	48.89	3.54	2.60	3, 4

Abbildung 5: FACSSortierung EGFP positiver Zellen aus der Testessuspension einer 6 Wochen alten transgenen Stra8-EGFP- Maus

A: Dot Plot- Darstellung: Zellen im Gate R2 sind EGFP positiv

B: Statistik: Im Gate R2 befinden sich 4,68% der Gesamtzellen

Um isolierte und kultivierte SSCs in späteren Versuchen besser detektieren zu können, wurde die Stra8- EGFP- transgene Maus mit einer Rosa26-LacZ Maus verpaart, die β -Galaktosidase ubiquitär unter der Kontrolle des Rosa26- Promotors exprimiert und deren Zellen daher über eine einfache LacZ- Färbung angefärbt werden können. Aus der so erhaltenen doppelt transgenen Maus Stra8-EGFP/ Rosa26-LacZ wurden Spermatogonien mittels FACSSortierung isoliert und kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass die kultivierten Zellen ähnliche Eigenschaften wie Embryonale Stammzellen besitzen und damit als pluripotent einzustufen sind (Guan,..., Nolte et al., 2006). Abbildung 6 gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau der dieser Arbeit zu Grunde liegt.

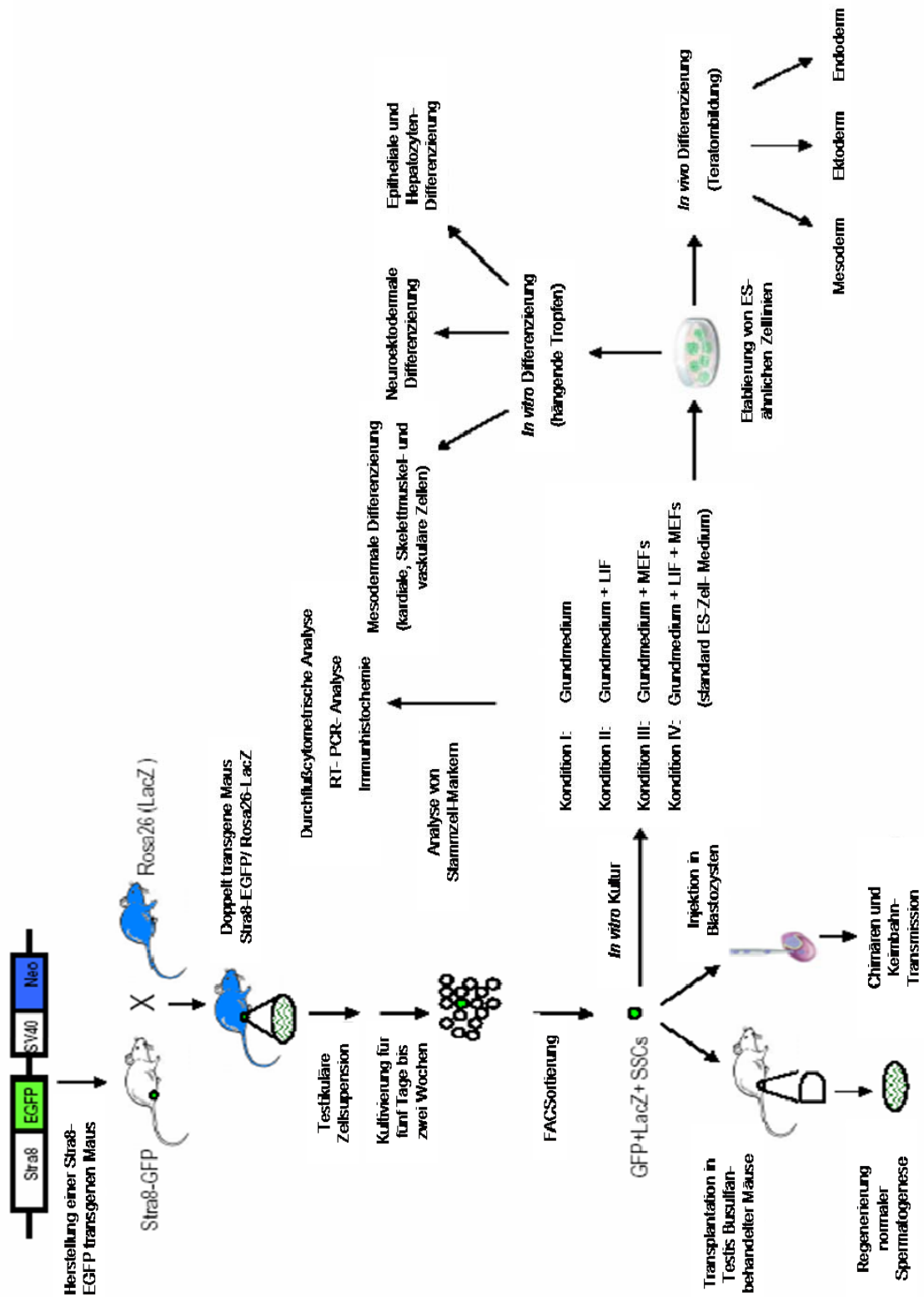


Abbildung 6: Strategie für die Gewinnung und Differenzierung von ES- Zell-ähnlichen SSC- Zelllinien (modifiziert nach Guan,..., Nolte et al., 2006)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass kultivierte SSCs ESC- ähnliche Eigenschaften besitzen. Sie sind *in vivo* in der Lage, nach Blastozysteninjektion Chimären zu bilden und führen zur Entwicklung von Teratomen, wenn man sie unter die Haut von immundefizienten Mäusen spritzt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die kultivierten SSCs die so genannten Pluripotenzgene exprimieren und in Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren.

Nachdem wir herausgefunden hatten, unter welchen Bedingungen sich die über die EGFP- Fluoreszenz angereicherten SSCs kultivieren lassen (Standard- ES- Zell- Bedingungen: mit LIF und auf MEFs), konnten auch SSC- Zelllinien aus WT- Mausstämmen isoliert werden. Dazu wurden Testes adulter Mäuse dissoziiert und die Zellen ausplattiert. Nach einigen Tagen wurden innerhalb der sehr heterogenen Kultur einzelne Zellcluster sichtbar, die gepickt und so vom Rest der Kultur getrennt werden konnten. Aus der Kultur einiger solcher Kolonien konnten SSC- Zelllinien mit ES- ähnlichen Eigenschaften gewonnen werden. Abbildung 7 gibt eine schematische Zusammenfassung der Isolationsstrategie.

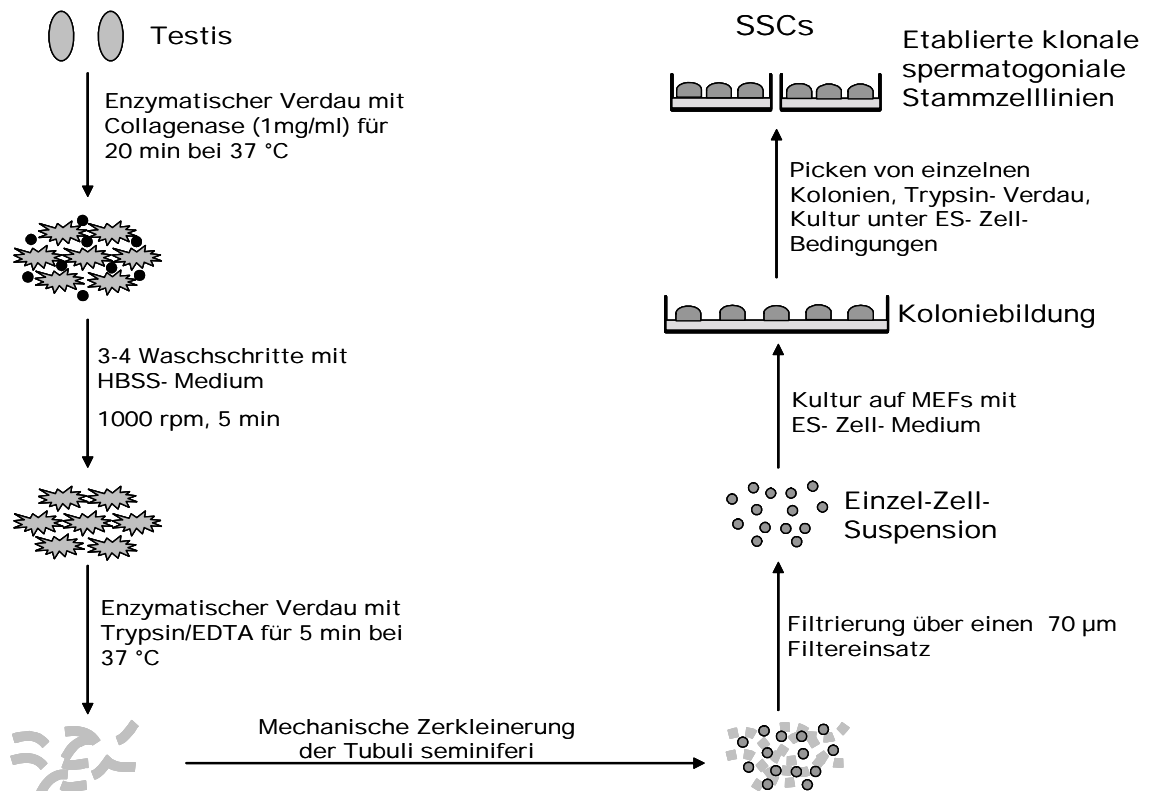


Abbildung 7: Schematische Abbildung der Isolationsstrategie von SSCs aus adulten Testes von Wildtyp- Mäusen

Als entscheidendes Kriterium bei der Isolierung von SSC- Zelllinien stellte sich das Vorhandensein von GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor) im Kulturmedium heraus. GDNF wird von den Sertoli- Zellen produziert und war schon von Meng et al. (2000) als der wahrscheinlich wichtigste Wachstumsfaktor für die Regulierung von Selbsterneuerung und Proliferation von SSCs beschrieben worden.

Über diese Isolierungs- und Kulturstrategie konnten SSC- Zelllinien aus vier verschiedenen genetischen Hintergründen gewonnen werden, die im Rahmen dieser Arbeit genauer charakterisiert und *in vitro* zu haploiden männlichen Keimzellen differenziert werden sollten. Die Zelllinien der verschiedenen WT- Hintergründe werden entsprechend ihrer Herkunft bezeichnet (SSC 129 SV, SSC C57Bl, SSC FVB), die Zelllinien, die aus der doppelt- transgenen Maus (Stra8-EGFP/ Rosa26- LacZ) isoliert wurden, tragen die Bezeichnung SSC15 (isoliert aus Maus Nr. 15). Aus dieser Maus konnten mehrere klonale Zelllinien generiert werden, die durchnummeriert wurden (z.B. SSC15 Nr.12).

3.1.2 Isolierung und Kultivierung von murinen Embryonalen Stammzellen

Da die Charakterisierung der SSC- Zelllinien immer im Vergleich zu Embryonalen Stammzellen erfolgen muss (diese sind bekanntermaßen pluripotent), sollten auch ES- Zellen aus diesen vier verschiedenen genetischen Hintergründen isoliert werden. Im Institut war bis dahin nur die ES- RI- Zelllinie vorhanden, die aus dem 129SV- Hintergrund stammt (Nagy et al., 1993).

Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste isoliert. Aus diesem Grund wurden Blastozysten am Tag 3,5 nach Befruchtung aus 1-3 Mäusen isoliert und in ES- Zellmedium (2.10.1) auf MEFs ausplattiert. Nach 3 bis 5 Tagen „schlüpft“ die innere Zellmasse und wird aufgrund erhöhter Proliferation auf dem Feeder sichtbar. Diese Zellcluster kann man nun wieder picken und so von den anderen Zellen trennen (Methode modifiziert nach Cheng et al., 2004). Aus einigen dieser gepickten Kolonien konnten nach erneuter Dissoziation in Einzelzellen ES- Zelllinien generiert werden (Abb.8).

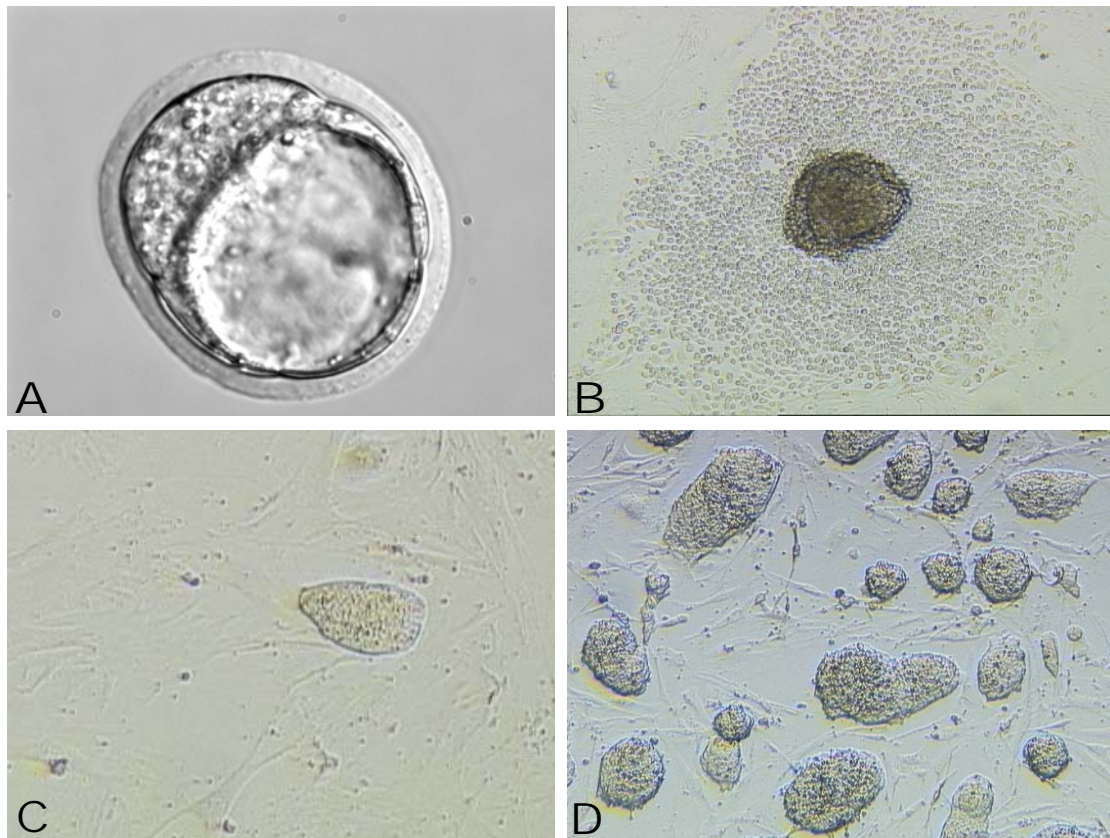


Abbildung 8: Isolation und Generierung von Embryonalen Stammzellen

- A:** Isolierte Blastozyste am Tag 3,5 nach Befruchtung
- B:** „geschlüpfte“ innere Zellmasse
- C:** erster ES- Zellcluster (ca. 10 Tage nach dem Picken)
- D:** etablierte ES- Zelllinie (ca. 20 Tage nach dem Picken)

Um diese Zellen für einen Vergleich mit den SSC- Zelllinien verwenden zu können, mussten ES- Zelllinien verwendet werden, die einen XY- (männlichen) Genotyp besitzen. Dazu wurde aus allen generierten ES- Zelllinien DNA isoliert (2.17.3) und mittels PCR analysiert. Als Marker wurden das Gen für den Androgenrezeptor, welches auf dem X- Chromosom lokalisiert ist, und das SRY- Gen, welches auf dem Y- Chromosom liegt, verwendet. Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Genotypisierungen für einige neue ES- Zelllinien.

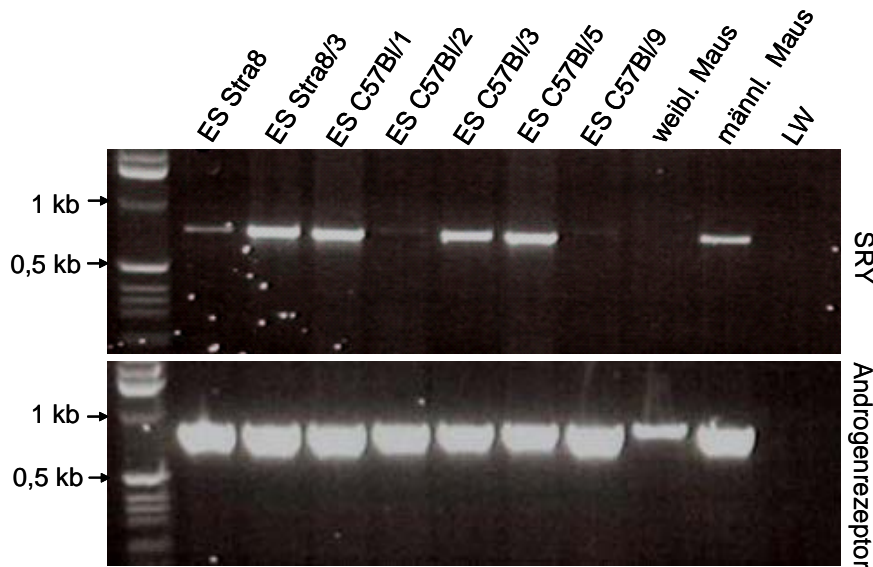


Abbildung 9: Genotypisierung der neuen ES- Zelllinien

Für die ES- Zelllinien C57Bl/2 und C57Bl/9 ergab sich ebenso wie für die weibliche Maus kein Amplifikat für SRY. Es handelt sich also um weibliche ES- Zelllinien.

Als Kontrolle diente DNA je einer weiblichen und einer männlichen Maus.

LW: negative Kontrolle (ohne Template)

Um zu beweisen, dass es sich bei den generierten Zellen tatsächlich um pluripotente ES-Zellen handelte, wurden daraus Proteine isoliert und mittels Western Blot- Analyse auf das Vorhandensein von Pluripotenz- Markern untersucht. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der Western Blot- Analysen und die Auswertung mittels Densitometrie. Soweit vorhanden, wurde von jedem Hintergrund eine männliche und eine weibliche Zelllinie getestet (siehe Tabelle 2). Bei allen Zelllinien konnten die als Pluripotenz- Marker bekannten Proteine Oct4, Nanog und Sox2 nachgewiesen werden. Auch die erst kürzlich als Pluripotenz- Marker beschriebenen Gene *Zfp206* (Zhang et al., 2006a; Wang et al., 2007a + b) und *Sall4* (Zhang et al., 2006b) werden von den neu generierten ES- Zelllinien exprimiert.

B

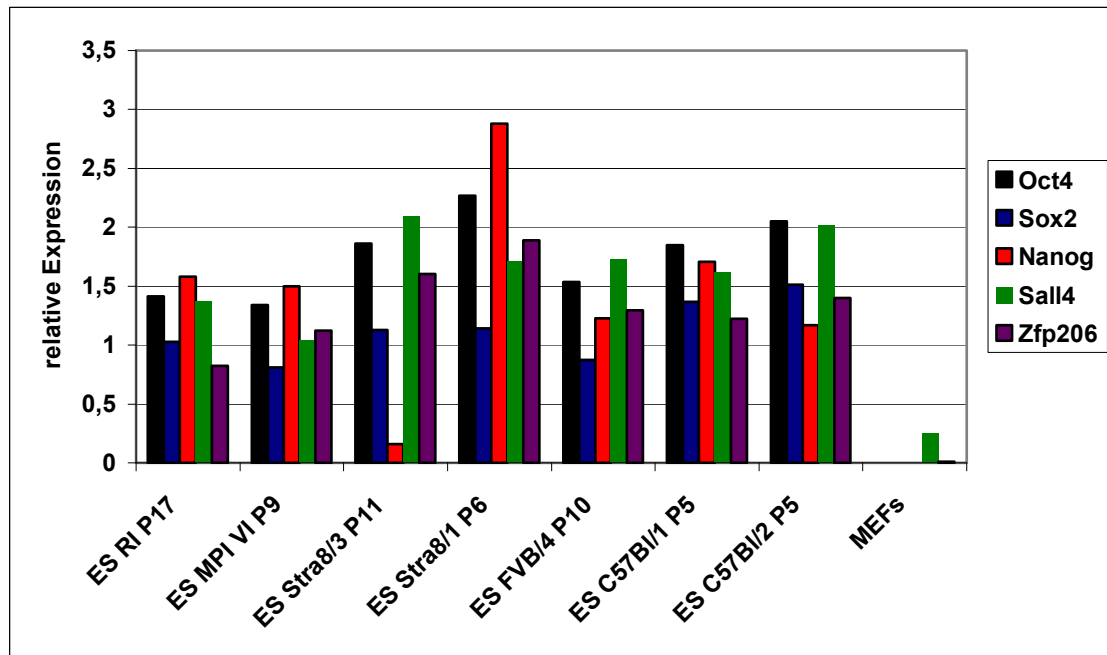


Abbildung 10: Expression der Pluripotenz- Gene und – Marker in den neuen ES-Zelllinien

A: Western Blot- Analyse

Es konnten alle untersuchten Pluripotenzmarker in den neuen ES- Zelllinien detektiert werden.

B: Densitometrische Auswertung der Western Blot- Ergebnisse

ES RI und ES MPI VI haben 129SV Hintergrund und sind Zelllinien, die nicht neu generiert wurden, sondern im Institut vorhanden waren. Ihre Pluripotenz ist hinreichend bekannt (Wurst und Joyner, 1993), so dass sie hier als positive Kontrollen fungieren konnten.

ES Stra8/3 und ES Stra8/1 wurden von der doppelt transgenen Stra8-EGFP/ Rosa26- LacZ- Maus isoliert.

Die anderen ES- Zelllinien werden entsprechend ihrem Hintergrund bezeichnet. P... gibt die Passage der Zellen an, aus denen Proteine isoliert wurden.

Damit war hinreichend bestätigt, dass die Zellen nicht nur den typischen ES- Zell-Phänotyp besitzen (vergl. Abb. 8D), sondern auch alle relevanten Pluripotenzgene in gleicher Weise exprimieren wie die Kontroll- ES- Zelllinien ES RI und ES MPI VI. Die neu isolierten ES- Zelllinien dienen in allen weiteren Charakterisierungsversuchen innerhalb der Arbeitsgruppe als positive Kontrollen bzw. als Vergleichszellen.

3.1.3 Isolierung und Kultivierung humaner Spermatogoniale Stammzellen

Die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung humaner Spermatogoniale Stammzellen könnte eine große Bedeutung für die regenerative Medizin haben. Sollte es möglich sein, aus Testis- Biopsien eines z.B. Herzinfarkt- Patienten SSC- Zelllinien zu gewinnen und diese Zellen *in vitro* zu Kardiomyozyten zu differenzieren, so könnten bei einer Transplantation dieser Zellen Immunreaktionen ausgeschlossen werden. Bei erfolgreicher *in vitro* Spermatogenese solcher Zellen, könnte auch der Kinderwunsch von z.B. nach Chemotherapie infertilen Männern erfüllt werden.

Als Gewebematerial dienten zum einen Testes- Biopsien von TESE- Patienten aus dem Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf, Abteilung für Andrologie, Prof. Dr. W. Schulze, und zum anderen Testes von Transsexuellen Patienten, die sich in der chirurgischen Privatklinik Bogenhausen, München, einer Geschlechtsumwandlung unterzogen haben. Unter TESE (testikuläre Spermienextraktion) versteht man die Gewinnung von Spermien aus einer Hodenbiopsie für die Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Diese Methode findet z.B. dann Anwendung, wenn der Spermientransport in den ableitenden Samenwegen blockiert ist und keine Spermien in der Samenflüssigkeit vorhanden sind. Die aus den Testesbiopsien gewonnenen Spermien werden in die unbefruchteten Eizellen injiziert. Sowohl Testesbiopsien als auch Testes transsexueller Patienten sind für die Isolierung von SSCs nur sehr eingeschränkt geeignet. Bei den Biopsien aus Hamburg handelte es sich zwar um geeignetes Material, da dieses im Rahmen der Routineuntersuchungen von Prof. Schulze für jeden Patienten als geeignet eingestuft wurde (Spermatogonien und somit auch Spermatogoniale Stammzellen waren vorhanden), allerdings umfasst eine Biopsie von der Größe 5x5 mm nicht ausreichend Gewebe, um die Isolierung und Kultivierung von SSCs zu etablieren. Das Problem der zu geringen Menge trat bei den Testes aus München zwar nicht auf, da hier ganze Organe zur Verfügung gestellt wurden, hier lag das Problem eher darin, dass die Patienten vor einer Geschlechtsumwandlung über Monate bzw. Jahre mit Hormonen behandelt wurden. Bei der histologischen Untersuchung dieser Proben durch Prof. Schulze stellte sich heraus, dass bei einigen Präparaten eine Schädigung der Spermatogonien (und somit wohl auch der SSCs) vorlag. Insgesamt wurden 16 Biopsien und 5 Testes von transsexuellen Männern verarbeitet. Beide Gewebeursprünge hatten den Nachteil, dass es sich bei den Patienten

überwiegend um ältere Männer handelte (> 40 Jahre). Die Isolierung aus Gewebematerial jüngerer Patienten scheint aussichtsreicher zu sein, da in jüngeren Jahren noch wesentlich mehr Spermien gebildet werden und somit auch die SSCs einer höheren Selbsterneuerung unterliegen dürften. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen Histologien einiger Präparate.

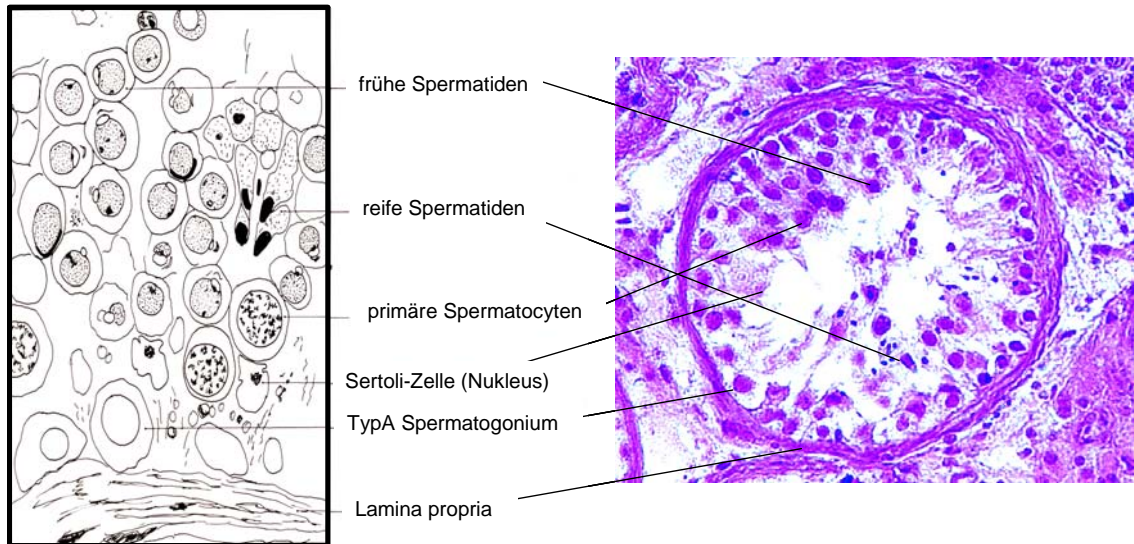


Abbildung 11: HE- Färbung eines Schnittes einer Testis- Biopsie aus Hamburg

Die Gewebeproben der Biopsien aus Hamburg zeigten vollständige Spermatogenese. Zur Orientierung ist im linken Teil eine schematische Darstellung der Spermatogenese zu sehen. Einige Stadien sind definiert (Pfeile).

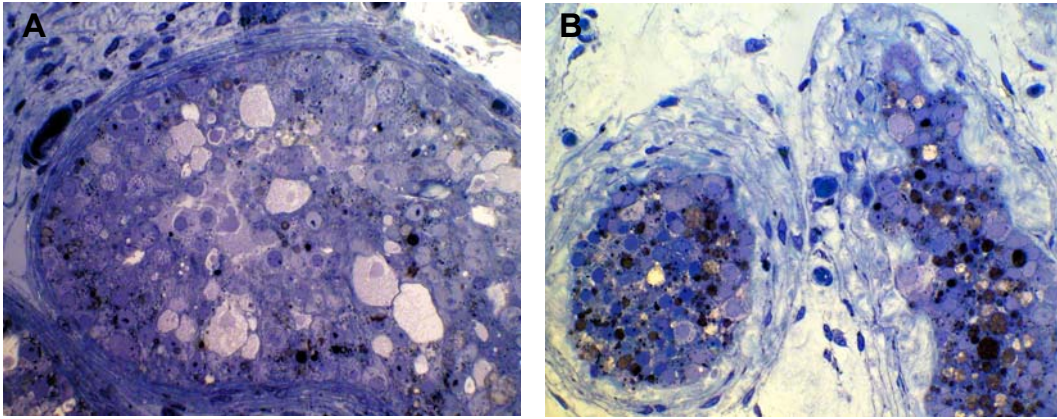


Abbildung 12: Histologie von Semidünnschnitt- Präparaten zweier Gewebeproben von Testis transsexueller Männer (angefertigt von Prof. Schulze, Hamburg)

- A:** Man sieht hier in den geschrumpften Hodenkanälchen lediglich Sertolizellen mit ovoiden Zellkernen sowie TypA Spermatozyten (Beurteilung durch Prof. Schulze).
- B:** Hier besteht eine Hypospermatogenese (reduzierte Anzahl reifer Spermatozyten) mit allen Keimzelltypen (Beurteilung durch Prof. Schulze).

Die in Abbildung 12A und B dargestellten Befunde der Gewebeproben transsexueller Männer stellte sich als charakteristisch heraus. Insgesamt wurden von fünf Patienten Gewebeproben untersucht. Bei einem Präparat konnten gar keine Keimzellen mehr detektiert werden (Sertoli-Zell-Only-Symptomatik). Bei allen anderen Präparaten waren immer TypA Spermatozyten enthalten, so dass von diesen Präparaten versucht wurde, SSCs zu isolieren und zu kultivieren.

3.1.3.1 Isolationsmethoden

Es wurden zwei verschiedene Isolationsmethoden verwendet. Die erste basiert auf einer von Ogawa et al. (1997) beschriebenen zwei-Schritt Strategie, wie sie auch bei der Isolierung muriner SSCs angewendet wurde. Im Detail wurden die Biopsien direkt in einer Collagenase-HBSS- Lösung (1mg/ml) für 15 bis 20 min bei 37 °C inkubiert, anschließend 2 bis 4 mal in HBSS- Medium gewaschen und dann für 5 min bei 37°C in einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% Trypsin in 1mM EDTA) inkubiert. Nach mechanischer Zerkleinerung des Gewebes wurden große Gewebestückchen durch Filtrieren über einen 70 µm Falcon- Filtereinsatz entfernt (vergl. auch Abb.7). Die Zellen wurden anschließend in dem jeweiligen Kulturmedium oder PBS aufgenommen und entweder über differentielles Plattieren oder MACSorting weiter aufgereinigt oder direkt ausplattiert. Auch bei den Testes transsexueller Männer wurde in gleicher Weise

verfahren, jedoch wurde vor der Inkubation in Collagenase die Tunica albuginea entfernt und das Gewebe mechanisch zerkleinert, um die Oberfläche zu vergrößern. Die so erhaltenen kleinen Gewebestücke wurden wie die Biopsien behandelt.

In einer Abwandlung dieser Methode wurde häufig auf den Schritt des Trypsin-Verdaus verzichtet, da von humanen Embryonalen Stammzellen bekannt ist, dass diese durch eine Behandlung mit Trypsin geschädigt werden.

Die zweite Isolationsstrategie basiert auf der von Shamlott et al. (1998) beschriebenen Methode. Hierbei wurden die Gewebeproben in einer Enzymlösung aus 0,01% Hyaluronidase Typ V, 0,1% Collagenase Typ IV und 0,002% DNaseI in HBSS-Medium für 2h bei 37°C inkubiert. Direkt im Anschluss wurde die Zellsuspension über einen 70 µm Falcon-Filter filtriert und anschließend wie bereits oben beschrieben weiter behandelt.

3.1.3.2 Differentielles Plattieren

Bei der Methode des differentiellen Plattierens macht man sich die verschiedenen Bindungseigenschaften der unterschiedlichen Zelltypen zunutze. So wurde von Shinohara et al. (1999; 2000) beschrieben, dass $\alpha 6$ -Integrin ein Oberflächenmarker für murine SSCs ist und dessen Expression in einer verstärkten Bindung an Laminin resultiert, was wiederum ausgenutzt werden kann, um SSCs anzureichern.

Für das differentielle Plattieren wurden entsprechende Kulturgefäße mit einer Lamininlösung (20µg/ml in PBS) beschichtet und üN bei 37°C inkubiert. Vor dem Ausplattieren der Zellen wurde die Lamininlösung abgezogen und das Kulturgefäß zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 1h bei 37°C mit einer BSA-Lösung (0,5 mg/ml in PBS) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde die BSA-Lösung wieder abgezogen, dreimal mit PBS gewaschen und die frisch isolierten Zellen darauf ausplattiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die nicht gebundenen Zellen abgewaschen und die gebundenen Zellen durch 5 min Inkubation in Collagenase-Lösung vom Laminin gelöst. Die Zellen wurden pelletiert (450x g, 5 min) und in entsprechendem Kulturmedium aufgenommen und ausplattiert.

3.1.3.3 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Die Methode des MACS (magnetic cell sorting, Miltenyi Biotech GmbH) ermöglicht es, Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmarker zu sortieren. Daher konnte die MACSortierung ebenfalls zur Anreicherung $\alpha 6$ -Integrin positiver Zellen (s.o.) benutzt werden. Das Prinzip der magnetischen Zellsortierung beruht auf dem Einsatz mikroskopisch kleiner, paramagnetischer, Antikörper- gekoppelter Kügelchen (beads, ca. 100 nm Durchmesser), die keinen Einfluss auf die Funktionalität der Zellen haben und im Verlaufe von Zellteilungen wieder verloren gehen (Schumm et al., 1999). Die Separation der Zellen kann entweder direkt oder indirekt erfolgen: direkt, wenn vom Hersteller ein bereits mit einem Beat gekoppelter Antikörper angeboten wird, und indirekt über den Einsatz eines sekundären Antikörpers. In diesem speziellen Fall wurden die Zellen indirekt sortiert. Nach der Isolierung der Zellen wurden diese mit einem Biotin- gekoppelten $\alpha 6$ - Integrin- Antikörper in einer 0,1%igen BSA/ PBS- Lösung für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten erfolgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C mit den anti-Biotin-Beads von Miltenyi. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen über eine magnetisierbare Säule innerhalb eines Magneten gegeben. Die Zellen, an denen der Antikörper gebunden hat, verbleiben in der Säule. Nach drei Waschschritten zur Entfernung unspezifisch gebundener Zellen, wurde die Säule aus dem Magneten genommen und laut Herstellerangaben eluiert. Die so isolierten Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und ausplattiert.

3.1.3.4 Kulturmedien

Die isolierten Zellen wurden entweder direkt in Kulturmedium aufgenommen oder vorher über differentielles Plattieren oder MACSortierung angereichert. Es kamen verschiedene Kulturmedien zum Einsatz (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Kulturmedien

Medium/ Bezeichnung	Zusammensetzung
M1	DMEM mit Glutamin
	10 ng/ml EGF
	10% FKS
	1 mM Penicillin/Streptomycin
	10 ng/ml hLIF
M1+	M1 plus 4 ng/ml GDNF
M2	DMEM/ F12
	4 ng/ml bFGF
	0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	2 mM L-Glutamin
	20% Serum Replacer
	1 mM Penicillin/Streptomycin
M2 +	M2 plus 4 ng/ml GDNF
M3	DMEM/ F12
	1 mM Natrium-Pyruvat
	0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	2 mM L-Glutamin
	1 mM Penicillin/Streptomycin
	5% FKS
M3 +	M3 plus 4 ng/ml GDNF
M4	Knock-Out DMEM
	4-8 ng/ml GDNF
	2mM L-Glutamin
	1 mM Penicillin/ Streptomycin
	20% FKS
M5	DMEM
	2 mM L-Glutamin
	0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	1 mM Penicillin/ Streptomycin
	50 µM β-Mercaptoethanol
	1000 U/ml hLIF
M6	DMEM/ F12
	4 ng/ml bFGF
	4 ng/ml GDNF
	1000U/ml hLIF
	1 µM β-Mercaptoethanol
	0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	1 mM Natrium-Pyruvat
	2mM L-Glutamin
	1 mM Penicillin/ Streptomycin
	20% Serum Replacer

Medium/ Bezeichnung	Zusammensetzung
M7	DMEM/ F12
	20 ng/ml bFGF
	8 ng/ml GDNF
	1 μ M β -Mercaptoethanol
	0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	1 mM Natrium-Pyruvat
	2mM L-Glutamin
	1 mM Penicillin/ Streptomycin
	20% Serum Replacer
M7-1+	M7 plus 1000 U/ml hLIF
M7-2+	M7 plus 80 μ g/ml Insulin
M7-3+	M7 plus 20 ng/ml FSH
M7-4+	M7 plus 1 U/ml Erythropoetin
M8	KnockOut-DMEM
	4 ng/ml bFGF
	4-8 ng/ml GDNF
	1000U/ml hLIF (1000U)
	1 μ M β -Mercaptoethanol
	0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	1 mM Natrium-Pyruvat
	1 mM Penicillin/ Streptomycin
	10% Serum Replacer
M9	KnockOut-DMEM
	20 ng/ml bFGF
	8 ng/ml GDNF
	1 μ M β -Mercaptoethanol
	0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	1 mM Natrium-Pyruvat
	1 mM Penicillin/ Streptomycin
	20% Serum Replacer
M9-1+	M9 plus 1000 U/ml hLIF
M9-2+	M9 plus 80 μ g/ml Insulin
M9-3+	M9 plus 20 ng/ml FSH
M9-4+	M9 plus 1 U/ml Erythropoetin

Medium/ Bezeichnung	Zusammensetzung
M10	DMEM
	15% FKS
	0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	0.1 mM β -Mercaptoethanol
	2 mM Glutamin
	1 mM Natrium-Pyruvate
	1 mM Penicillin/ Streptomycin
	1000 U/ml hLIF
	1 ng/ml human bFGF
	10 μ M Forskolin
M11	DMEM
	15% FKS
	0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	50 μ M β -Mercaptoethanol
	2 mM Glutamin
	1 mM Penicillin/ Streptomycin
	4 ng/ml bFGF
	10 ng/ml Aktivin
M11+	M11 mit humanem Serum
M12	KnockOut-DMEM
	4 ng/ml bFGF
	8 ng/ml GDNF
	10 ng/ml Aktivin
	50 μ M β -Mercaptoethanol
	0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	2 mM L-Glutamin
	1 mM Natrium-Pyruvat
	1 mM Penicillin/ Streptomycin
	25% Serum Replacer

Insgesamt konnten mit allen verwendeten Medien in den ersten Tagen nach Isolierung typische Kolonien erzielt werden. Deutliche Unterschiede gab es in der weiteren Kultivierung der Zellen. So stellten sich die Medien M6, M7, M11 und M11+ als am Besten geeignet heraus, um auch nach 5 bis 8 Passagen noch Kolonienbildung zu erhalten. Mit den in diesen Medien kultivierten Zellen wurden auch die weiteren Analysen durchgeführt.

3.1.3.5 Histologie und Morphologie der Zellen ohne Anreicherung

In der Abbildung 13 sind einige charakteristische Morphologien dargestellt. So konnten innerhalb von zwei bis zehn Tagen nach Isolation Zellcluster beobachtet werden, die stark an die Zellcluster bei der Isolierung von murinen SSCs erinnern. Die Schwierigkeit bestand darin, diese Zellcluster von den umliegenden Zellen zu trennen und einzeln weiterzukultivieren. Dieses wurde über verschiedene Ansätze versucht: Erstens, analog zu der Isolierung von murinen SSCs, indem die Zellcluster mit einer ausgezogenen Pasteurpipette gepickt und anschließend mit Trypsin dissoziiert wurden; Zweitens, Zellcluster nur picken und mechanisch zerkleinern und drittens über den Verdau mit verschiedenen Enzymen (Collagenase, Dispase, Accutase, Hyaluronidase). Nach dem Picken der Cluster wurden diese dann entweder auf Gelatine- beschichtete Platten oder auf MEFs in dem entsprechendem Kulturmedium wieder ausplattiert. Nur in sehr seltenen Fällen konnte überhaupt ein Wachstum von Zellen detektiert werden, jedoch nie in den zu erwartenden ES- Zell- ähnlichen Zellclustern.

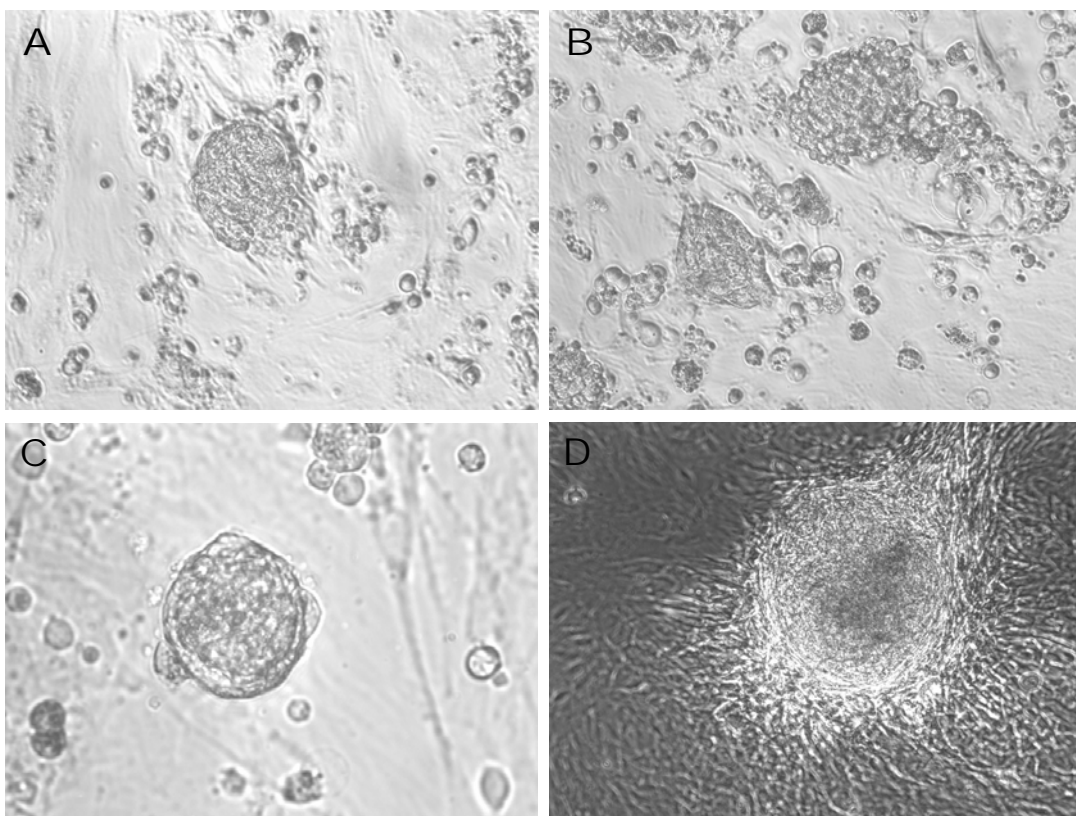


Abbildung 13: Hellfeld- Aufnahmen von Zellclustern, die innerhalb von zwei bis zehn Tagen nach der Isolation auftraten.

- A:** Isolation nach Ogawa et al. (1997) mit Trypsin; Medium M6
- B:** Isolation nach Ogawa et al. (1997) ohne Trypsin; Medium M7
- C:** Isolation nach Shablott et al. (1998); Medium M10
- D:** Isolation nach Shablott et al. (1998); Medium M11

Auch das „Splitten“ der Gesamtkultur führte nur in einigen Fällen zu einer erneuten Clusterbildung, die sich jedoch nie weiter als bis zur Passage sechs fortsetzte. Damit konnten im Rahmen dieser Arbeit keine proliferierenden Zelllinien generiert werden.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den sich entwickelnden Zellclustern um pluripotente Zellen handelte, wurden je 50 dieser Cluster gepickt und daraus RNA isoliert. Eine RT-PCR-Analyse von Oct4 zeigte zwar ein Produkt (Abb.14), jedoch stellte sich nach Klonierung in pGEMTeasy und anschließender Sequenzierung von 20 Klonen heraus, dass in 75% der Klone das Oct4-Pseudogen amplifiziert wurde und nur in 25% das (richtige) Oct4-Transkript.

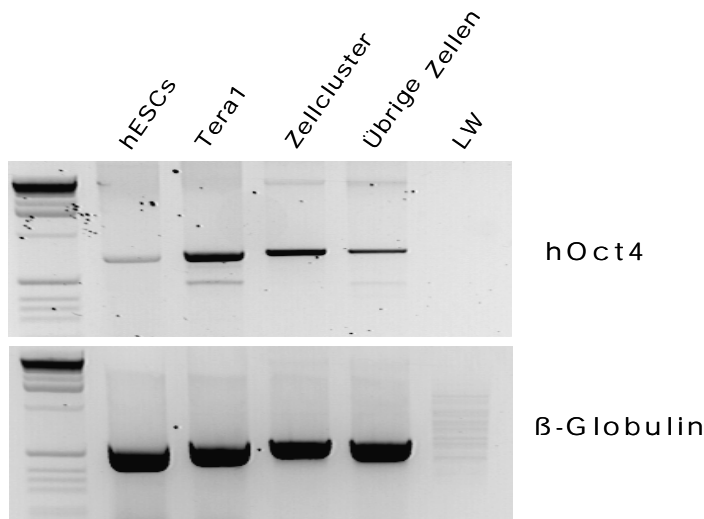


Abbildung 14: RT- PCR für das humane Oct4

Als Kontrollen dienten cDNAs humaner ES- Zellen (hESC) und der humanen Teratokarzinom- Zelllinie Tera1. Bei diesen bestanden die pGEMTeasy- Klone zu ca. 80% aus dem (richtigen) Oct4- Transkript. Nach der Klonierung und Sequenzierung der Amplifikate aus den Zellclustern zeigten 25% das Oct4- Transkript, die übrigen aus humanem Testis erhaltenen Zellen (Monolayer) zeigten noch in 3% der Klone das Oct4- Transkript .

Die Sequenzierung der PCR- Produkte zeigte zwar an, dass von den Zellen innerhalb eines Zellclusters Oct4 exprimiert wird, jedoch nicht mit dem gleichen prozentualen Anteil wie in den positiven Kontrollen hESC und Tera1.

Eine weitere Methode, um die Pluripotenz von kultivierten Zellen nachzuweisen, ist der Nachweis der Alkalischen Phosphatase- Aktivität. Pluripotente Stammzellen besitzen eine sehr hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP), was über spezielle Detektions- Kits nachgewiesen werden kann. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis einer AP-Färbung mit dem „ES Cell Characterization Kit“ von Chemicon. AP- exprimierende Zellen werden dabei lila angefärbt.

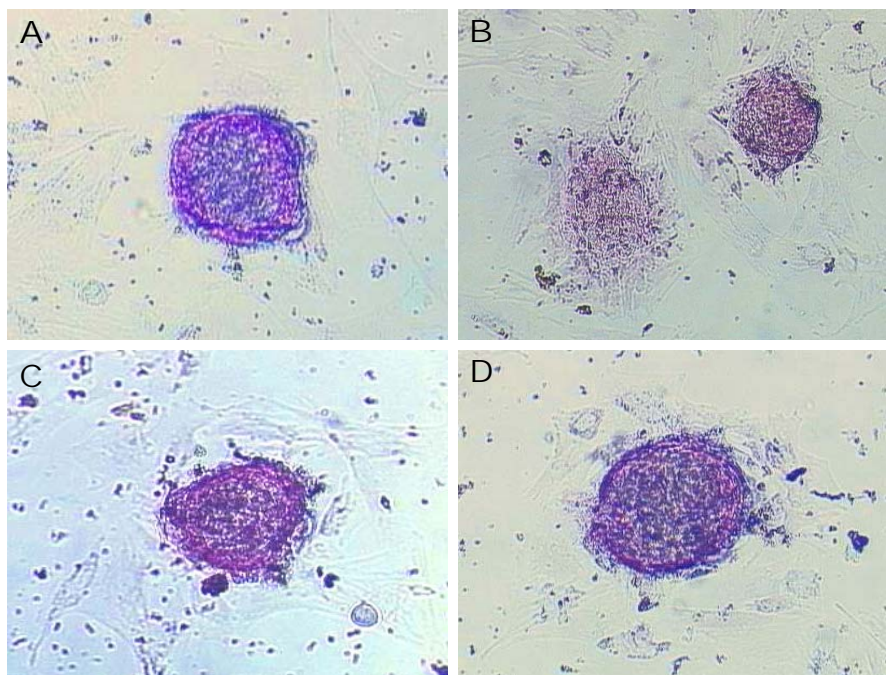


Abbildung 15: AP- Färbung an Zellclustern innerhalb der ersten 5 Tage nach Isolation (100fache Vergrößerung)

- A:** Isolation nach Ogawa et al. (1997) ohne Trypsin; Medium M11+
- B:** Isolation nach Ogawa et al. (1997) mit Trypsin; Medium M11+
- C:** Isolation nach Shablott et al. (1998); Medium M11
- D:** Isolation nach Shablott et al. (1998); Medium M11+

Damit konnte gezeigt werden, dass die von uns isolierten Zellen, welche sich in Zellverbänden anordnen, tatsächlich charakteristische Pluripotenzmarker exprimieren. Nichts desto trotz war es nicht möglich, eine Zelllinie zu generieren, mit der weitere Versuche hätten unternommen werden können.

3.1.3.6 Histologie und Morphologie der Zellen nach Anreicherung

Wurden die Zellen nach der Isolierung entweder durch MACS oder differentielles Plattieren aufgereinigt, zeigte sich ein homogeneres Erscheinungsbild der Zellen (Abb.16). Allerdings bildeten sich hier erst nach ca. zwei Wochen Zellcluster, unabhängig davon, ob die Zellen nach der Aufreinigung auf MEFs oder auf Gelatine ausplattiert wurden.

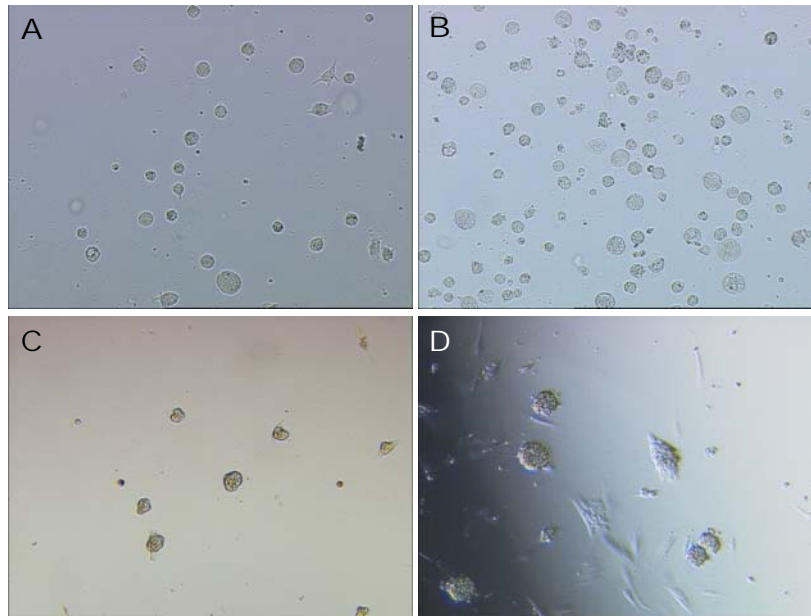


Abbildung 16: Hellfeld- Aufnahmen von humanen Zellen nach Aufreinigung (50fache Vergrößerung)

- A:** Zellen am Tag 1 nach differentiellem Plattieren; Medium M12
- B:** Zellen am Tag 1 nach MACSortierung; Medium M12
- C:** Zellen 14 Tage nach differentiellem Plattieren auf Gelatine; Medium M12
- D:** Zellen 14 Tage nach MACSortierung auf Gelatine; Medium M12

Die so erhaltenen Zellcluster zeigten kaum weiteres Wachstum, was darauf schließen lässt, dass die Zellen, die bei der direkten Ausplattierung erhalten bleiben, einen positiven Einfluss auf die SSCs haben. Da auch mit dieser Methode kein Fortschritt in der Generierung von proliferierenden Zelllinien zu erkennen war, wurde noch eine weitere Strategie ausgetestet.

3.1.3.7 Isolierung der Zellen mittels Selektionskonstrukten

Um die SSCs nicht unmittelbar nach der Isolierung von ihren Umgebungszellen trennen zu müssen, sollte die Ausgangspopulation mit Promotorkonstrukten stabil transfiziert werden, und dann sollten die Zellen in einem späteren Stadium durch FACSSortierung isoliert werden. Die Idee war, dass die SSCs nach einer gewissen Umprogrammierungsphase soweit proliferieren, dass eine größere Menge isoliert und somit auch besser kultiviert werden können.

Dazu wurden zwei Promotorkonstrukte verwendet: der humane Oct4- Promotor vor EGFP und der humane Stra8- Promotor vor EGFP (Abb.17).

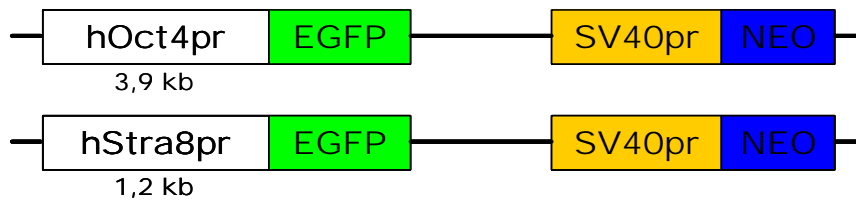


Abbildung 17: Schematische Darstellung der verwendeten Promotorkonstrukte

Das humane Oct4- Promotorkonstrukt wurde uns von der Arbeitsgruppe von Lesley Gerrard (Gerrard et al., 2005) zur Verfügung gestellt. Hier ist eine 3,9 kb große Region 5' vom Start-Codon des humanen Oct4-Gens in den Vektor pEGFP-1 (Clontech) kloniert. Das humane Stra8- Promotorkonstrukt wurde in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer biologischen Doktorarbeit hergestellt (Jaroszynski, 2005) und enthält eine 1,2 kb große Region 5' vom Start-Codon des humanen Stra8-Gens.

Zunächst wurden die Zellen transient mit Hilfe von Lipofectamin transfiziert (2.16.7.2) um zu überprüfen, ob EGFP⁺ Zellen detektiert werden können. Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die Ergebnisse dieser transienten Transfektion.

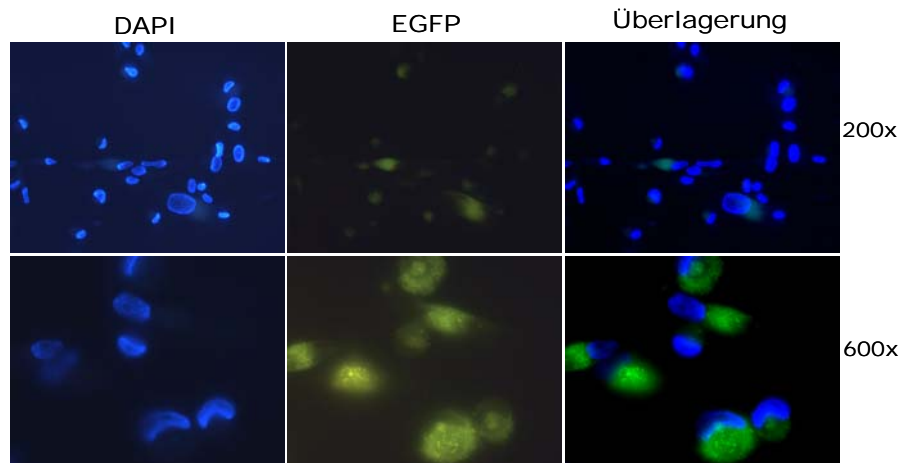


Abbildung 18: Transiente Transfektion frisch isolierter humaner Testeszellen mit dem Stra8- Promotorkonstrukt

Die transiente Transfektion erfolgte am Tag 3 nach der Isolation, die Aufnahmen wurden am Tag 2 nach der Transfektion gemacht.

Es konnten einige EGFP⁺ Zellen detektiert werden, was darauf hindeutet, dass das Konstrukt funktioniert und auch Stra8- exprimierende Zellen isoliert werden konnten.

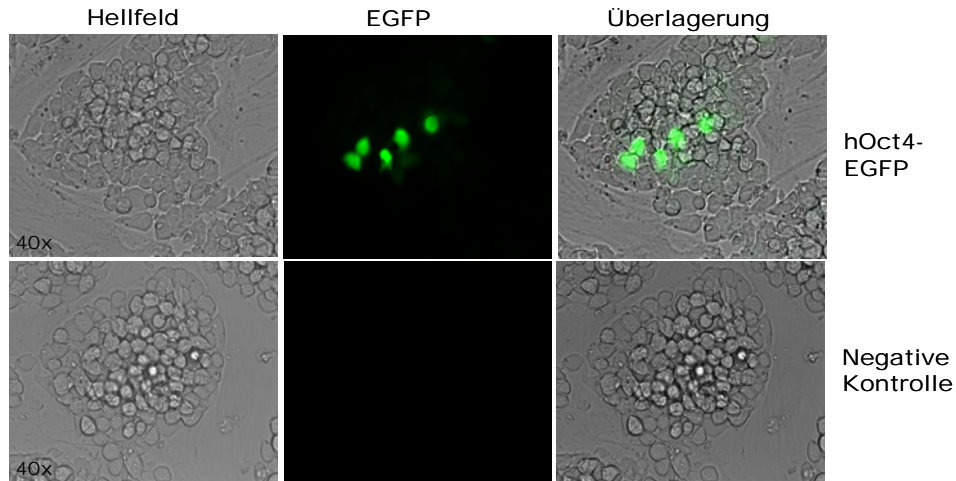


Abbildung 19: Transiente Transfektion frisch isolierter humaner Testeszellen mit dem Oct4- Promotorkonstrukt

Die transiente Transfektion erfolgte am Tag 8 nach der Isolation, die Aufnahmen wurden am Tag 2 nach der Transfektion gemacht

Innerhalb der sich bildenden Zellcluster konnten $EGFP^+$ Zellen detektiert werden, wenn auch nur in einer geringen Anzahl.

Da bei beiden transienten Transfektionen nur sehr wenige $EGFP^+$ Zellen detektiert werden konnten, was allerdings auch an einer schlechten Transfektionseffizienz liegen kann, wurden die Transfektionen wiederholt und über eine Neomycinselektion versucht, stabil transfizierte Zelllinien zu erhalten. Dies war aber leider auch nach vielen verschiedenen Ansätzen nicht möglich. Entweder starben die Zellen innerhalb der ersten Woche nach der Transfektion ab oder es konnten keine Zellen kultiviert werden, die ein Konstrukt stabil integriert hatten und somit die Neomycinselektion überlebten.

Zusammengefasst ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, proliferierende humane SSC- Zelllinien zu generieren. Laut Informationen anderer Arbeitsgruppen, die sich ebenfalls mit der Isolierung und Kultivierung humaner SSCs befassen, war es auch bei diesen bisher nicht möglich, über der Stadium pluripotenter Zellcluster direkt nach der Isolierung hinauszukommen.

3.2 Pluripotenz von SSCs: Vergleich mit ES- Zellen

3.2.1 Expression von Pluripotenzmarkern auf Proteinebene

Um die Pluripotenz der SSC- Zelllinien weiter zu bestätigen, wurden zunächst Western Blot- Analysen für die Pluripotenzgene *Oct4*, *Sox2* und *Nanog* sowie für die Pluripotenzmarker *Zfp206* und *Sall4* durchgeführt. Hierzu wurden aus den vier SSC- Zelllinien in einer vergleichbaren Passage Proteine isoliert, über ein Proteingel aufgetrennt und nach dem Blotten auf eine Membran mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert (2.16.8). Als positive Kontrolle diente die gut charakterisierte Zelllinie ES-RI, als negative Kontrolle dienten MEFs. Alle untersuchten Marker konnten in den verschiedenen SSC- Zelllinien nachgewiesen werden (Abb.20).

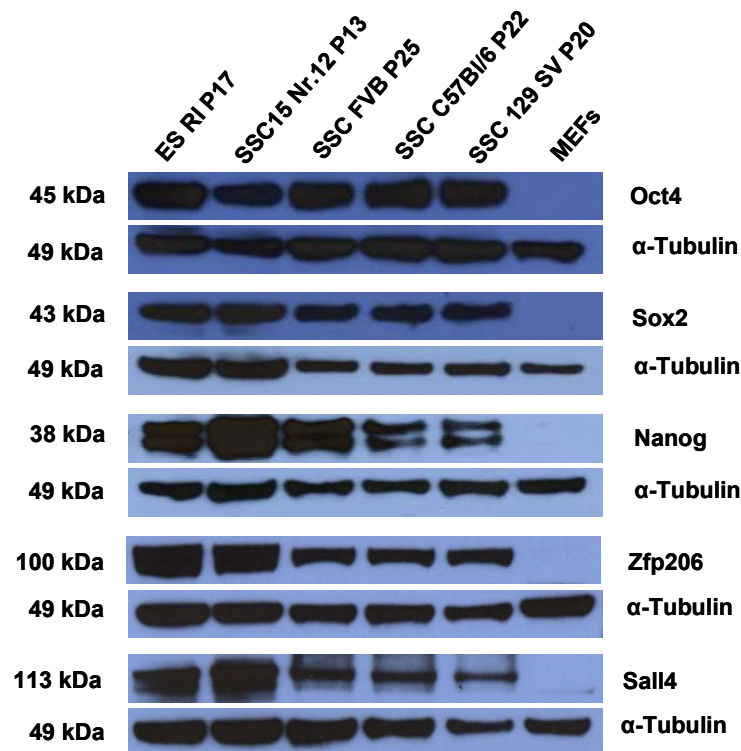


Abbildung 20: Western Blot- Analysen der vier SSC- Zelllinien für die Pluripotenzmarker Oct4, Sox2, Nanog, Zfp206 und Sall4

Als positive Kontrolle diente die pluripotente Zelllinie ES-RI, als negative Kontrolle dienten MEFs. Alle untersuchten Marker werden von den SSC- Zelllinien exprimiert; als Ladekontrolle wurde in jedem Western Blot der α -Tubulin-Antikörper verwendet.

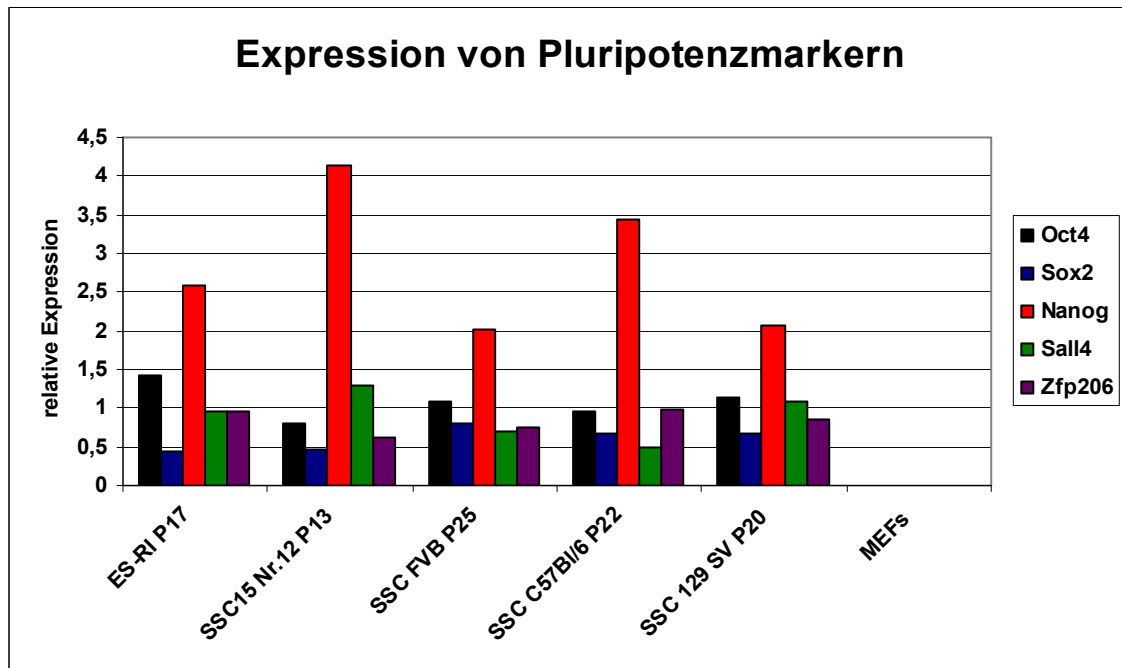


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Expressionsprofile im Western Blot

Die Western Blot- Befunde wurden densitometrisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Es sind Schwankungen im Expressionprofil der einzelnen Zelllinien zu erkennen, die auch beim Vergleich von verschiedenen ES- Zelllinien auftreten (vergl. Abb.10).

Auch die anschließende densitometrische Auswertung zeigte, dass die SSC- Zelllinien ein ähnliches Expressionsprofil für die untersuchten Pluripotenzmarker aufweisen wie die ES-RI- Zelllinie.

Um die Pluripotenz der SSC- Zelllinien auch in späteren Passagen zu bestätigen, wurde von der Zelllinie SSC FVB eine Langzeitkultur angelegt. Die Zellen wurden alle 4-5 Tage geteilt und nach jeder fünften Passage wurden Proteine isoliert. Bis dato erstreckt sich die Langzeitkultur auf über ein Jahr und wird auch weiterhin fortgeführt. Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Ergebnisse der Western Blot- Analysen der Passagen 20 bis 70.

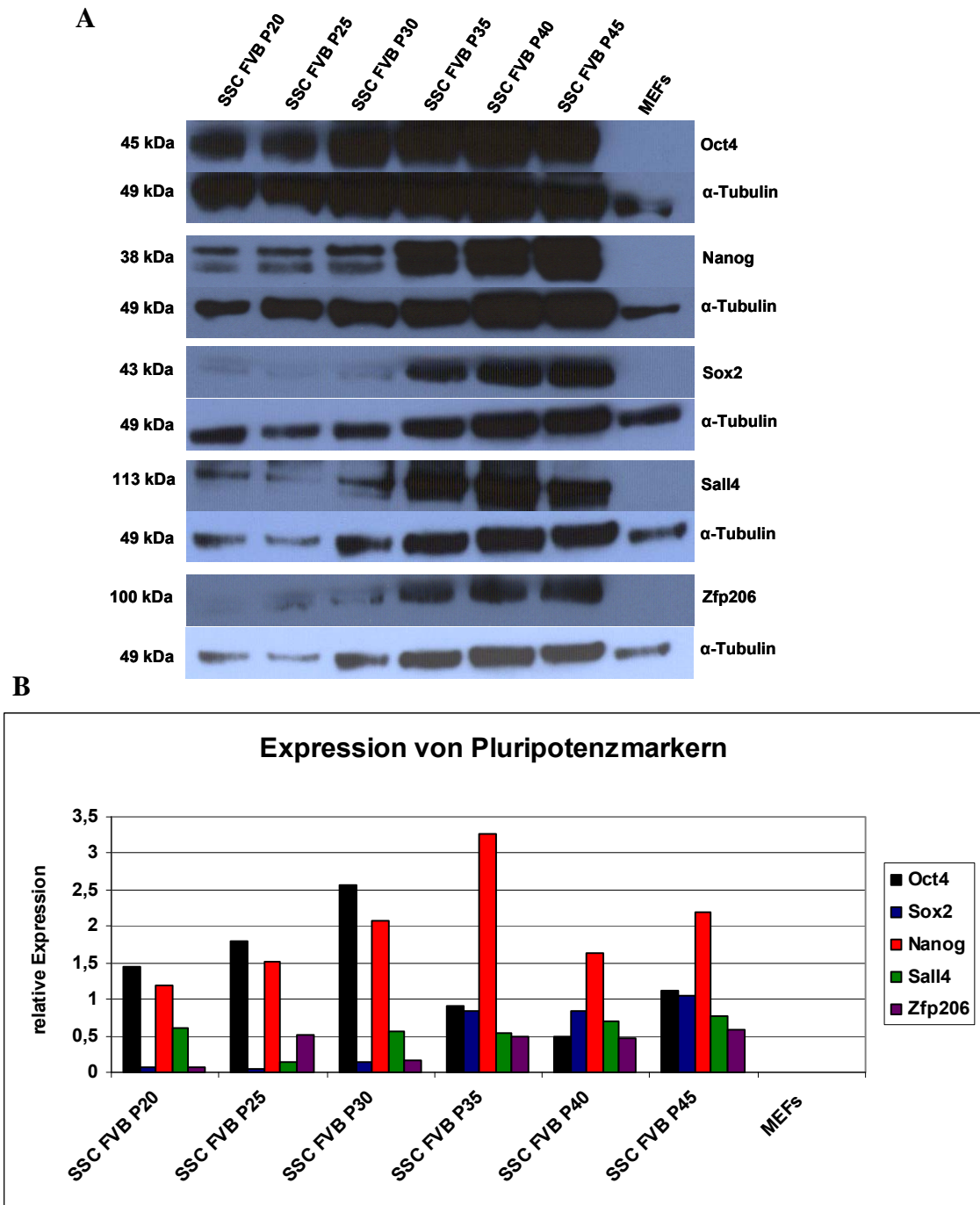
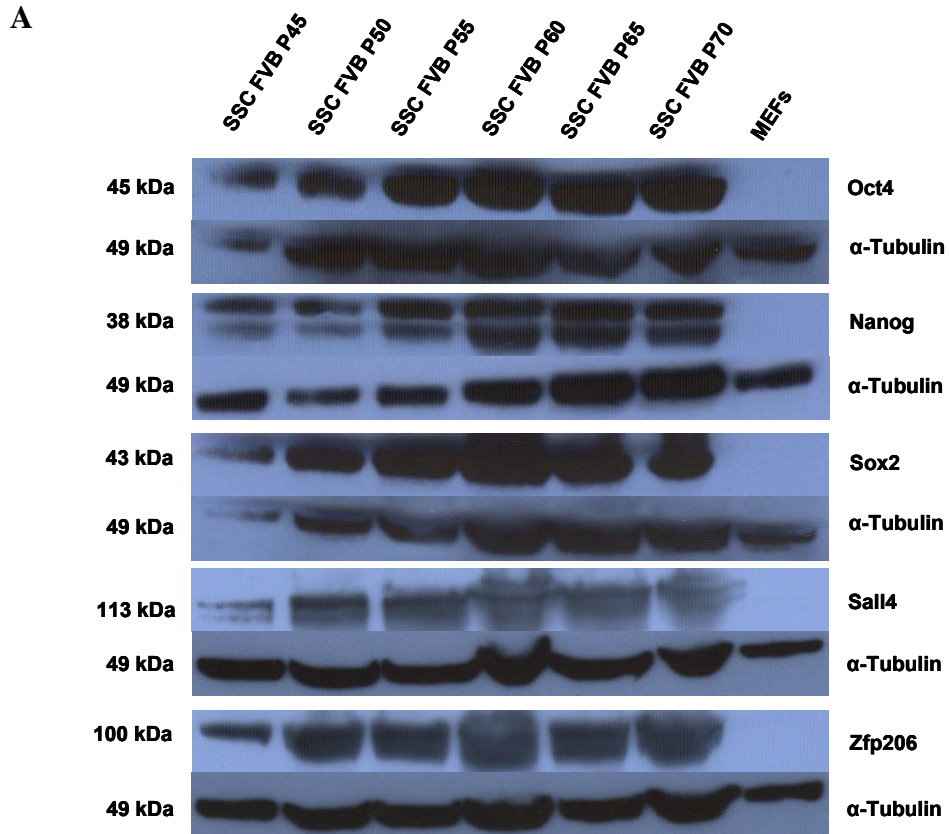


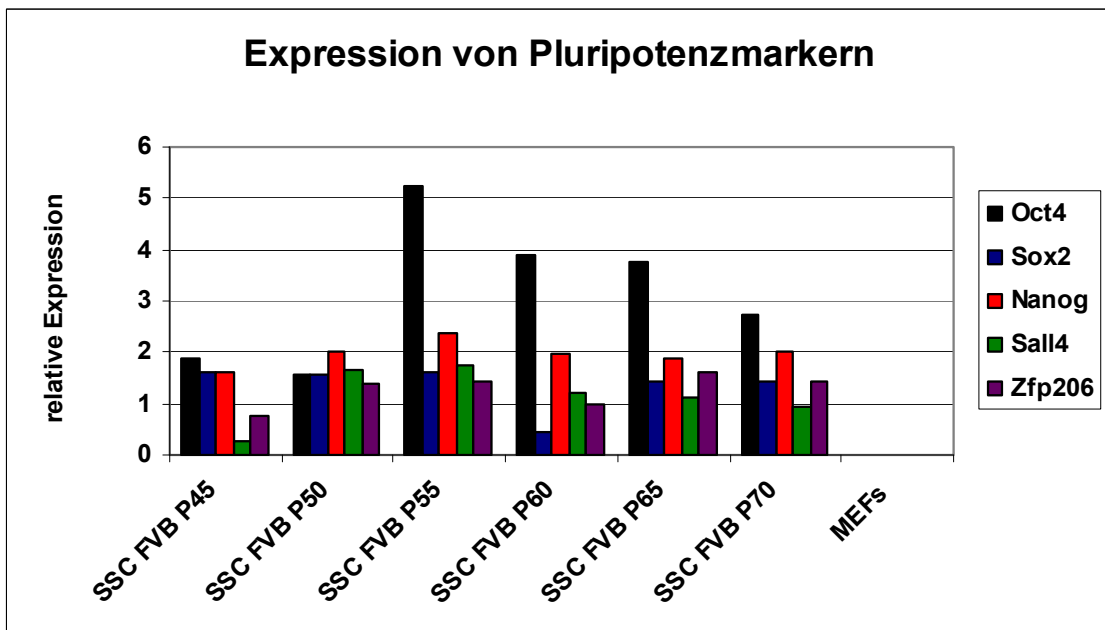
Abbildung 22: Western Blot- Analysen von SSC FVB P20 bis P45 für die Pluripotenzmarker Oct4, Sox2, Nanog, Sall4 und Zfp206

A: Western Blot der Zelllinie SSC FVB P20 bis P45; als negative Kontrolle dienten Proteine aus MEFs. Alle untersuchten Marker werden von den SSC- Zelllinien exprimiert; als Ladekontrolle diente in jedem Western Blot der α -Tubulin- Antikörper.

B: Graphische Darstellung der Expressionsprofile nach densitometrischer Auswertung.
 Die Pluripotenzgene Oct4 und Nanog zeigen bereits bei der Passage 20 eine relativ hohe Expression, während die anderen Marker erst in höheren Passagen vermehrt exprimiert werden.



B



B

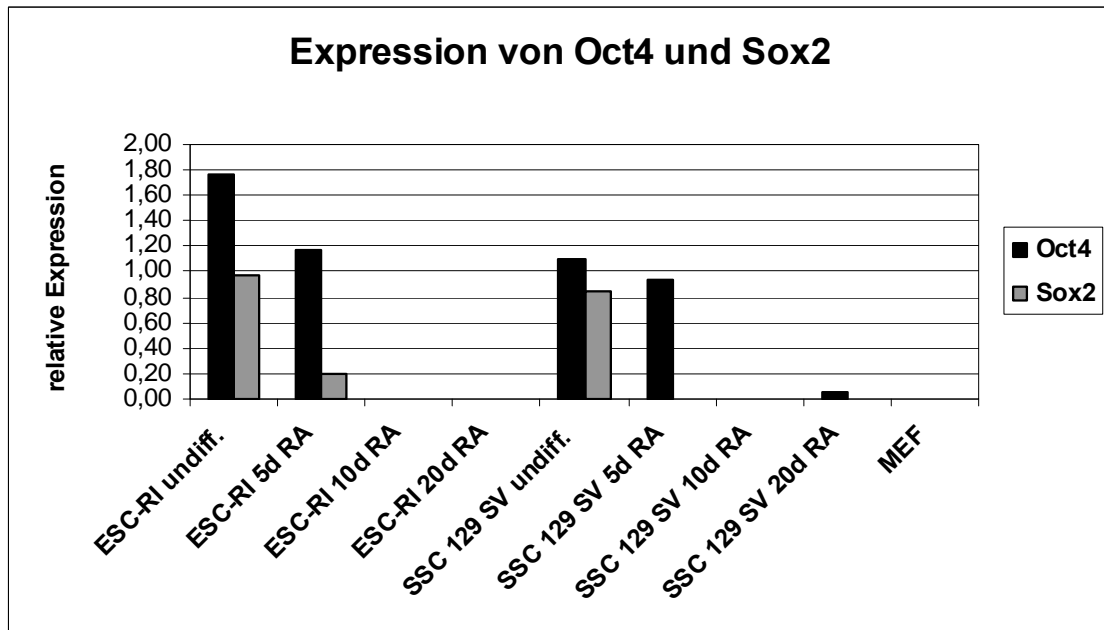


Abbildung 24: Western Blot- Analysen von ES-RI und SSC 129SV – undifferenziert und differenziert – für Oct4 und Sox2

A: Western Blot- Analysen der Zelllinien ES-RI und SSC 129SV; die Proteine wurden jeweils am fünften, zehnten und zwanzigsten Tag nach Beginn der Retinsäureinduktion isoliert; als negative Kontrolle dienten Proteine aus MEFs.

B: Graphische Darstellung der Expressionsprofile nach densitometrischer Auswertung.

Am Tag 10 der Induktion mit RA konnten leider keine Proteine isoliert werden (mit Ausnahme von ES-RI 10d RA; Blot für Oct4); hier war wohl die Zellzahl zu gering. Am Tag 5 der Induktion konnte bei beiden Zelllinien noch Oct4- Expression nachgewiesen werden, bei ES-RI auch noch Sox2. Am Tag 20 der Induktion war bei der Zelllinie ES-RI keine Expression der beiden getesteten Marker mehr nachzuweisen, bei der Zelllinie SSC 129 SV noch eine sehr geringe Expression von Oct4.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die verschiedenen Versuchsansätze in der Arbeitsgruppe immer 20 Tage induzierte Zellen benutzt. Im Rahmen der biologischen Doktorarbeit von Frau Sandra Meyer wurde mit RealTime- PCR bestätigt, dass die Expression der Pluripotenzmarker auch auf RNA- Ebene am Tag 20 deutlich reduziert war.

3.2.2 Chimärenbildung nach Blastozysteninjektion

Ein weiterer Beweis für die Pluripotenz von Zellen ist die Chimärenbildung nach Blastozysteninjektion. Bei Guan et al. (2006) wurden kultivierte SSC- Zellen ca. 2-3 Wochen nach der Isolierung in Blastozysten injiziert, und es konnten hochprozentige

Chimären erhalten werden, die auch transmittierten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Blastozysteninjektionen mit Zellen aus länger kultivierten SSC- Zelllinien (Passagen 17 bis 27) und ES-RI- Zellen, sowie mit auf Stra8-EGFP sortierte Zelllinien durchgeführt. Abbildung 25 gibt eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse.

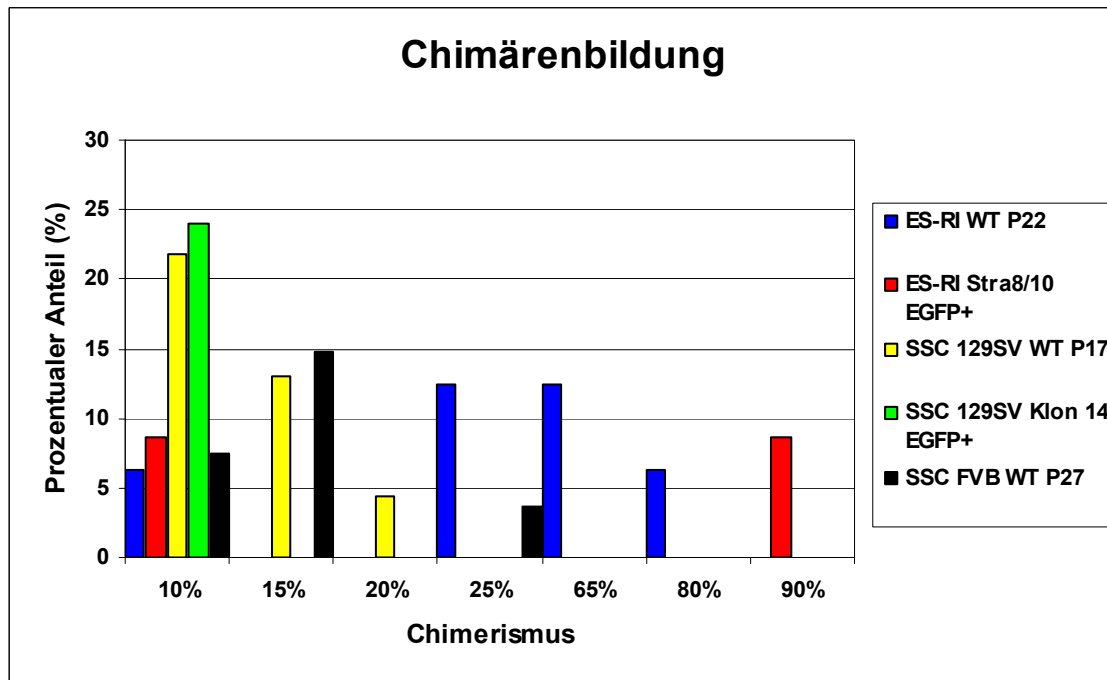


Abbildung 25: Graphische Zusammenfassung der erhaltenen Chimären nach Blastozysteninjektion

ES-RI Stra8/10 EGFP⁺ ist eine mit dem Stra8-EGFP-Konstrukt stabil transfizierte Zelllinie, die vor der Injektion auf EGFP-Expression sortiert wurde. Das gleiche gilt für SSC 129 SV Klon14 EGFP⁺.

Alle eingesetzten Zelllinien brachten 10%ige Chimären hervor, wobei die beiden SSC 129 SV- Zelllinien prozentual deutlich mehr hervorbrachten als die anderen drei Zelllinien. 15%ige Chimären wurden von den beiden SSC- Zelllinien SSC 129SV P17 und SSC FVB P27 erhalten, 20%ige nur von SSC 129SV P17. Von der Zelllinie SSC FVB P27 konnten 25%ige Chimären generiert werden. Alle höherprozentigen Chimären stammten entweder aus der WT ES-RI- Zelllinie oder aus der auf EGFP sortierten ES-RI- Zelllinie.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden EGFP exprimierende Zellen aus Testissuspensionen transgener Stra8-EGFP- Mäuse sortiert. Die EGFP⁺ Zellen wurden für drei Tage kultiviert und dann für die Blastozysteninjektion verwendet. Aus diesen Injektionen konnten keine Chimären gewonnen werden.

Insgesamt konnte der hohe Chimärismus resultierend aus der Injektion von SSC- Zelllinien, wie in Guan et al. (2006) beschrieben, nicht bestätigt werden. Mit der

Injektion von länger kultivierten SSC- Zelllinien wurden in diesem Versuch maximal 25%ige Chimären generiert. Ein weiterer Unterschied zu den publizierten Daten ist die Tatsache, dass alle generierten Chimären nicht transmittierten, mit Ausnahme der ES-RI- Chimären. Durch die Injektion von frisch sortierten EGFP⁺ Zellen konnten keine Chimären generiert werden.

3.2.3 Testikuläre Transplantation von SSCs

Der SSC- Transplantations- Assay ist ein funktionaler Test, bei dem Zellsuspensionen in Testis von Empfänger- Mäusen transplantiert werden. Bei den Empfänger-Tieren wurde durch die Behandlung mit Busulfan die endogene Spermatogenese zerstört, so dass die in der Zellsuspension enthaltenen SSCs die Repopulation der Testis bewirken können (Brinster und Avarbock, 1994; Brinster und Zimmermann, 1994; Creemers et al., 2002). In der Arbeit von Guan et al. (2006) wurden frisch isolierte und nur für sehr kurze Zeit kultivierte SSCs transplantiert, und es konnte gezeigt werden, dass sich wieder eine vollständige Spermatogenese entwickelte. In dieser Arbeit wurden Zellen einer höheren Passage (P16) transplantiert, die auch vorher auf die EGFP- Expression unter Kontrolle des Stra8- Promotors sortiert wurden. Abbildung 26 verdeutlicht die Methode der Transplantation.

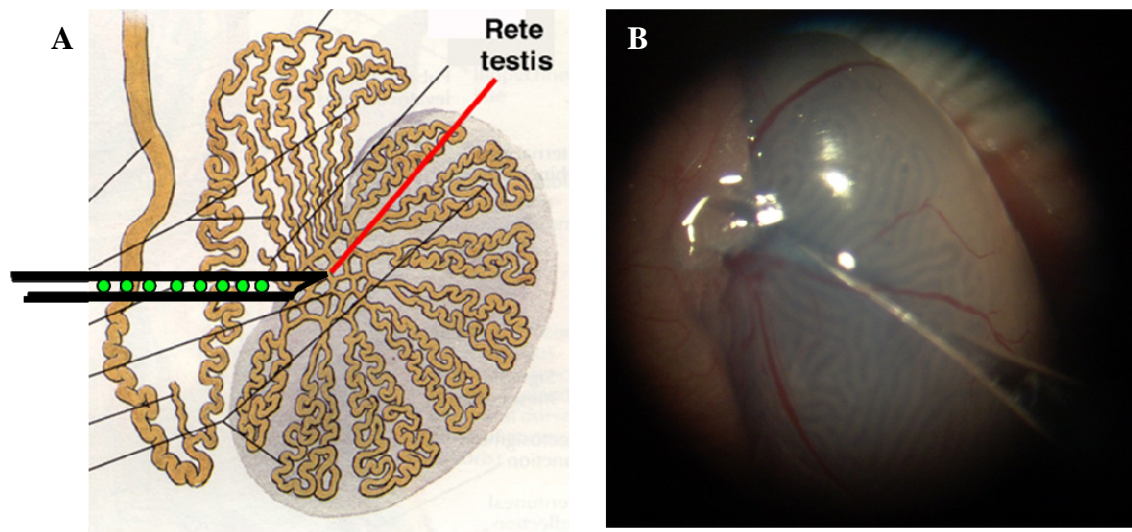


Abbildung 26: Transplantations- Assay

- A:** Schematische Darstellung: die auf EGFP- Expression sortierten Zellen werden mit einem blauen Farbstoff versetzt, um die Injektion verfolgen zu können. Die Injektion erfolgt in den Rete testis; von hier aus erfolgt eine Verteilung in die Tubuli seminiferi.

- B:** Aufnahme eines Testis nach der Injektion der Zellsuspension. Durch die zugesetzte blaue Farbe ist deutlich zu erkennen, dass die Zellsuspension sich in den Tubuli seminiferi verteilt hat.

Vor der Transplantation der Zellen wurden Kontrollmäuse abgetötet und deren Testes histologisch untersucht, um die vollständige Zerstörung der endogenen Spermatogenese zu bestätigen. Abbildung 27 zeigt HE- Färbungen von Testisschnitten Busulfan-behandelter Mäuse, sechs Wochen nach Busulfan- Injektion.

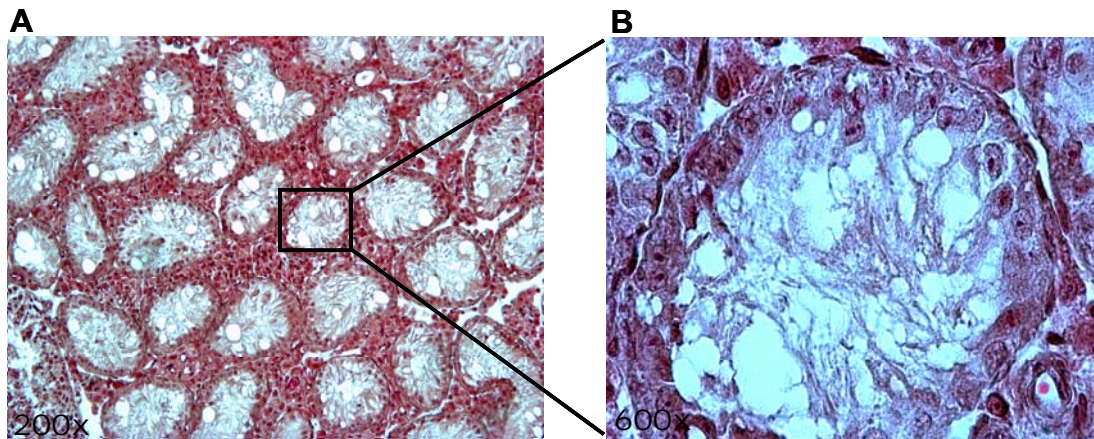


Abbildung 27: HE- Färbung von Testisschnitten Busulfan- behandelte Mäuse

- A:** Übersicht über die Testisstruktur einer Busulfan- behandelten Maus.
- B:** Vergrößerung eines Tubulus seminiferus.
Es ist deutlich zu erkennen, dass die endogene Spermatogenese zerstört ist. Im Tubulus befinden sich nur noch einige wenige Spermatozoen.

Damit konnte gezeigt werden, dass die endogene Spermatogenese durch die Busulfan-Behandlung zerstört wurde. Die Zellen wurden in die übrigen Mäuse transplantiert. Es wurde die Zelllinie SSC15 Nr.12 nach FACSII verwendet. Wie in Abschnitt 3.4.3 dargestellt wird, wurden bei dieser Zelllinie 92% EGFP⁺ Zellen sortiert. Die EGFP⁺ Zellen wurden in fünf Mäuse transplantiert, wobei die Injektion jeweils nur in den rechten Testis erfolgte; der linke Testis diente als interne Kontrolle. Alle fünf Tiere entwickelten innerhalb von vier Wochen nach Transplantation Tumore (Abb.28).



Abbildung 28:
Tumorbildung nach Testis-
Transplantation von SSC15 Nr.12
FACSII

Der rechte, transplantierte Testis (hier links im Bild) zeigt eine riesige tumoröse Veränderung, während der linke, nicht transplantierte Testis (hier rechts im Bild) keinerlei Veränderung zeigt.

Die histologische Untersuchung dieser Tumore zeigte neben tumorösem Gewebe auch einige Tubuli seminiferi, in denen wieder Spermatogenese festgestellt werden konnte (Abb.29). Bei der histologischen Untersuchung der internen Kontrolle (nicht transplantierte Testis) konnte keine Spermatogenese gefunden werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Spermatogenese in einigen Tubuli seminiferi innerhalb des Tumors von den injizierten Zellen ausging. Eine genauere Untersuchung der Tumoren findet zurzeit in der Pathologie (Dr. med. Stefan Schweyer) des Universitätsklinikums Göttingen statt.

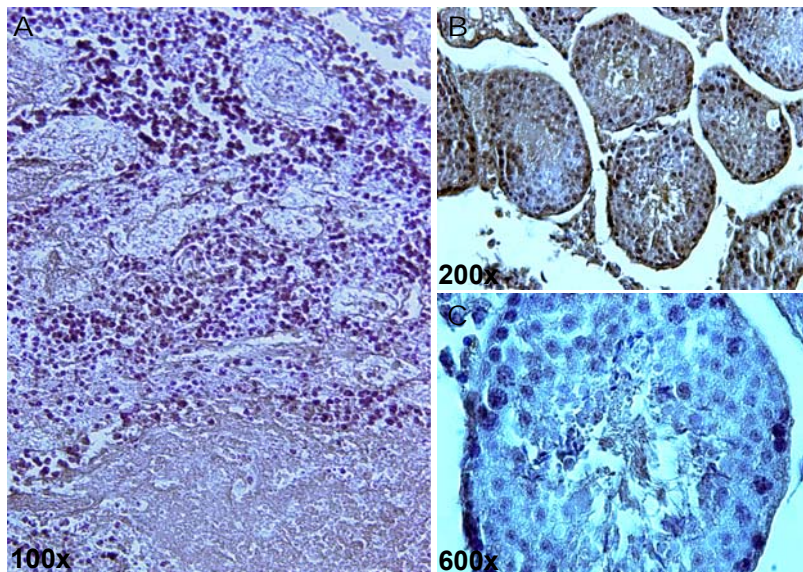


Abbildung 29: HE- Färbung an Schnitten eines Tumors nach SSC-
Transplantation

- A:** Tumoröses Gewebe, welches den überwiegenden Teil ausmacht.
- B:** Innerhalb des Tumors konnten Bereiche gefunden werden, in denen normale Spermatogenese in den Tubuli seminiferi stattgefunden hat.
- C:** Vergrößerung eines Tubulus seminiferus. Es konnten alle Stadien der Spermatogenese detektiert werden.

3.2.4 Methylierungsanalysen

In Zusammenarbeit mit Dr. Ulrich Zechner (Institut für Humangenetik Mainz) wurden an je zwei sowohl undifferenzierten als auch differenzierten (vergl. Abschnitt 3.2.1) SSC- und ES- Zelllinien Methylierungsanalysen durchgeführt. Ziel dieser Analysen war es festzustellen, ob es Unterschiede in den Methylierungsmustern zwischen den einzelnen pluripotenten Zelllinien gibt. In einem ersten Versuchsansatz wurde bei den Zelllinien der Methylierungsgrad einiger geprägter Gene untersucht. Für die Gene *Igf2r*, *H19* und *Snrpn* kam hierbei die klassische Bisulfit- Sequenzierung zum Einsatz (2.22.1), die Methylierung von *Meg3* wurde über Pyro- Sequenzierung (2.22.2) untersucht. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse dieser Analysen.

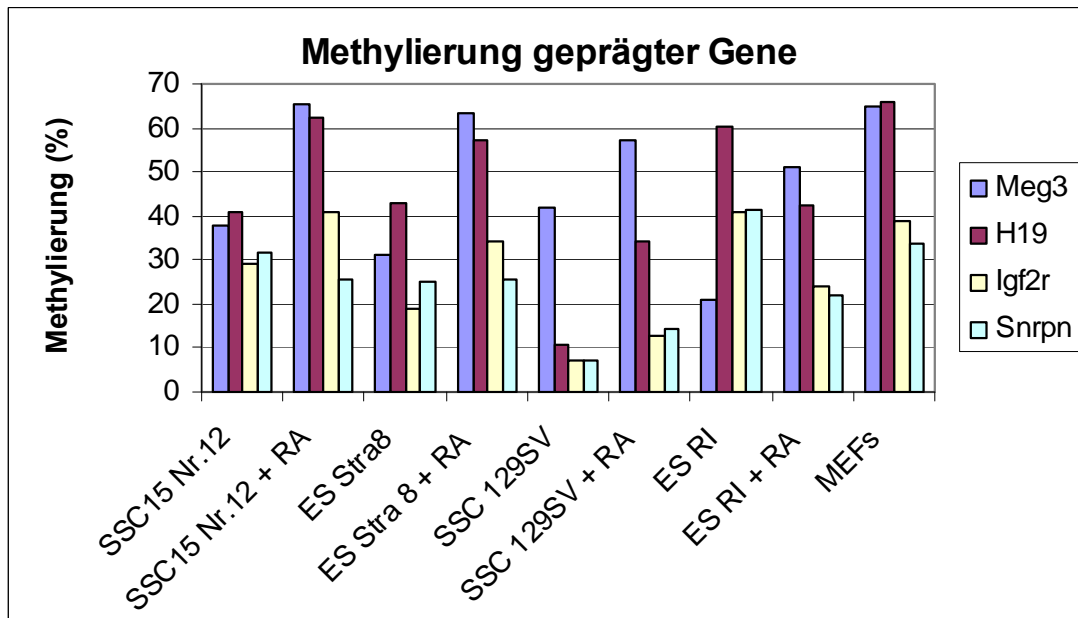


Abbildung 30: Methylierung geprägter Gene in den Zelllinien SSC15 Nr.12, ES-Stra8, SSC 129SV und ES-RI jeweils vor und nach Differenzierung +RA bedeutet, dass diese Zellen für 20 Tage mit Retinsäure differenziert wurden.

Auffällig hierbei ist, dass die Zelllinien des Stra8- EGFP- Hintergrundes (SSC15 Nr.12 und ES- Stra8) sowohl vor als auch nach Differenzierung ein sehr ähnliches Methylierungsprofil aufweisen, während es bei den Zelllinien des 129 SV- Hintergrundes (SSC 129SV und ES-RI) sowohl vor als auch nach der Differenzierung deutliche Unterschiede gibt. Als Kontrolle dienten hier nicht- pluripotente MEF- Zellen.

In einem weiteren Versuchansatz wurde bei den bereits verwendeten Zelllinien mittels Pyro-Sequenzierung der Methylierungszustand der Promotorregionen der beiden Pluripotenzgene Oct4 und Nanog untersucht. Als Kontrolle dienten ebenfalls nicht-pluripotente MEFs. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

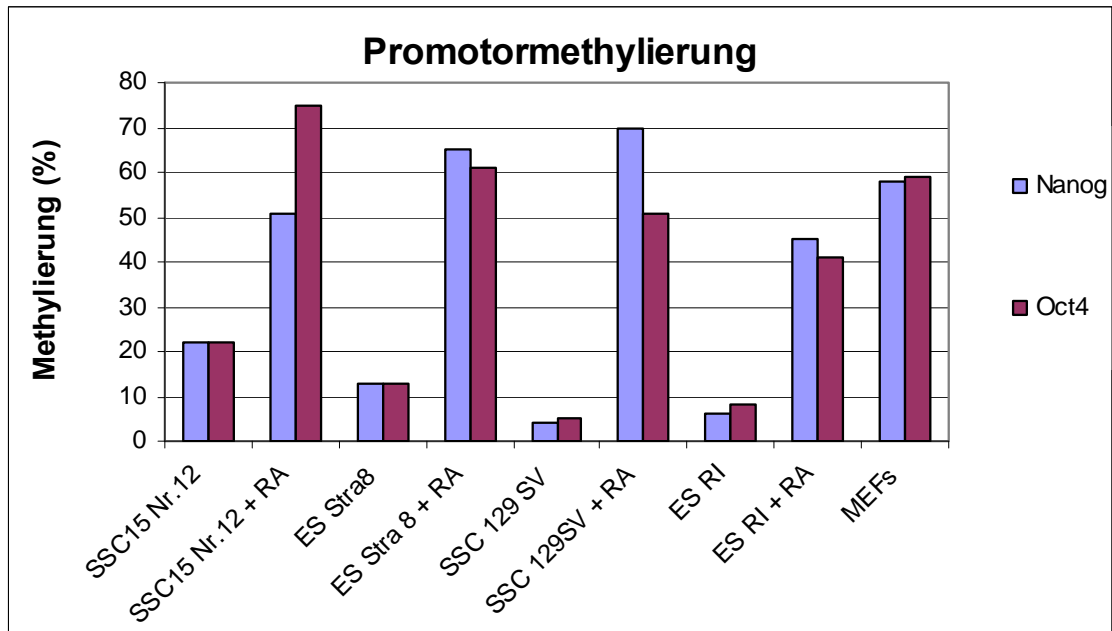


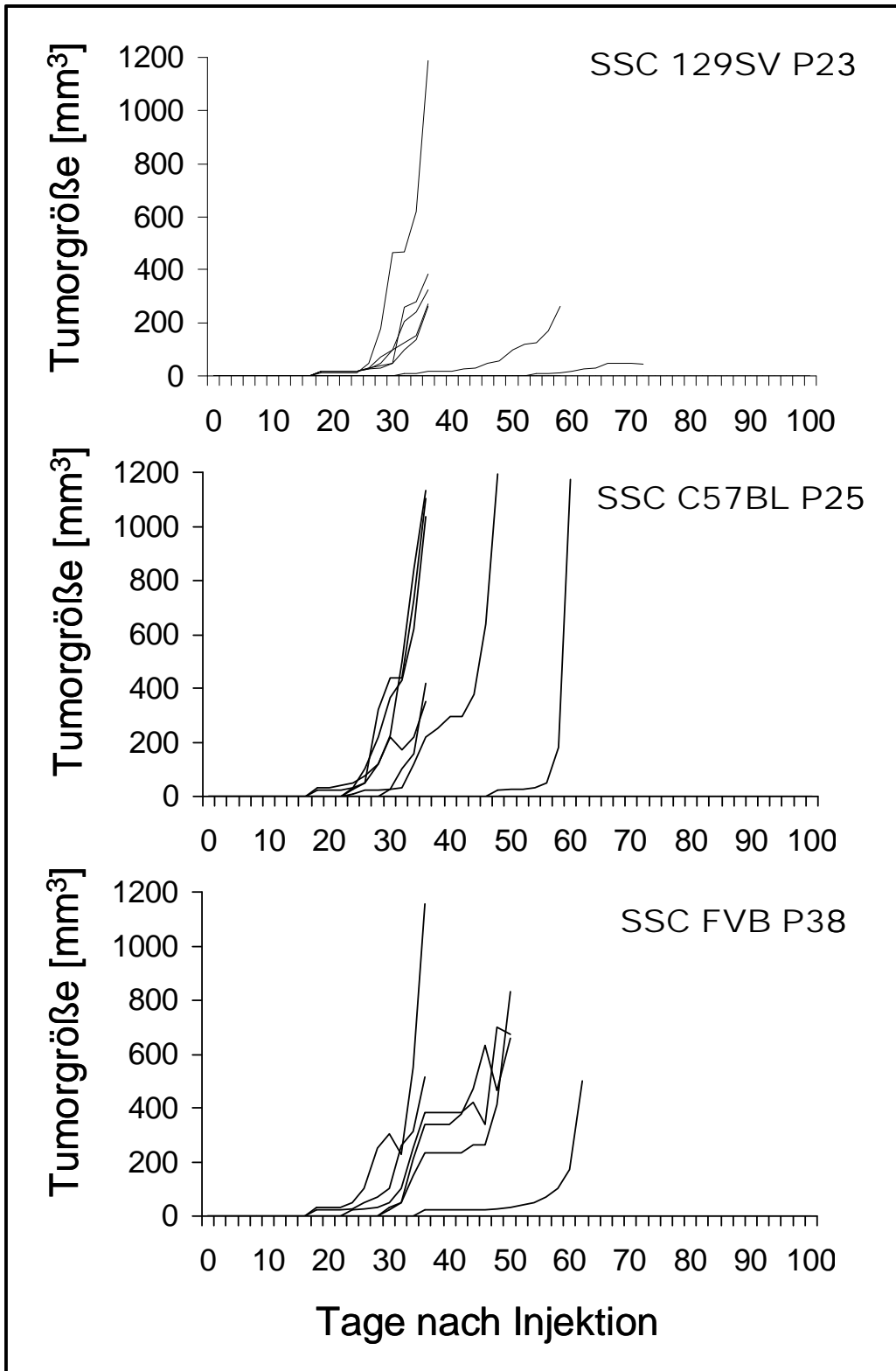
Abbildung 31: Methylierung der Promotorregionen von Oct4 und Nanog in den Zelllinien SSC15 Nr.12, ES- Stra8, SSC 129SV und ES-RI jeweils vor und nach Differenzierung
 +RA bedeutet, dass diese Zellen für 20 Tage mit Retinsäure differenziert wurden (vergl. Abschnitt 3.2.1).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Promotorregionen in den undifferenzierten, also pluripotenten Zellen eine geringere Methylierung aufweisen als in den differenzierten Zellen. Bei diesen ist das Methylierungsprofil vergleichbar mit dem des nicht-pluripotenten Feeders (MEFs).

3.2.5 Teratombildung

Ein weiterer Beweis für die Pluripotenz von Zellen ist ihre Fähigkeit, nach Injektion unter die Haut immundefizienter Mäuse Teratombildung zu induzieren. Dass die SSC-Zelllinien Teratome hervorrufen können, wurde bereits in Guan et al. (2006) gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Vergleich zwischen den verschiedenen SSC- und ES-Zelllinien bezüglich ihrer Fähigkeit, Teratome zu bilden, durchgeführt. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Ralf Dressel (Abteilung Immunogenetik, Göttingen). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 32 und Tabelle 4 zusammengefasst. Zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit lagen nur die detaillierten Ergebnisse einer ES-Zelllinie (ES-RI) vor.

In Tabelle 4 sind die Daten der einzelnen Injektionen zusammengefasst. Angegeben sind das Geschlecht des Empfängertieres sowie die Größe der Teratome in mm^3 am jeweiligen Tag nach Injektion. Pro Tier wurden 10^6 Zellen injiziert. Nach der Injektion von Zellen der Zelllinie SSC 129SV P23 entwickelten sich in 7 von 9 Mäusen Teratome (78%), bei SSC C57Bl P25 7 von 10 (70%), bei SSC FVB P38 6 von 7 (86%) und bei ES-RI P21 5 von 10 (50%).



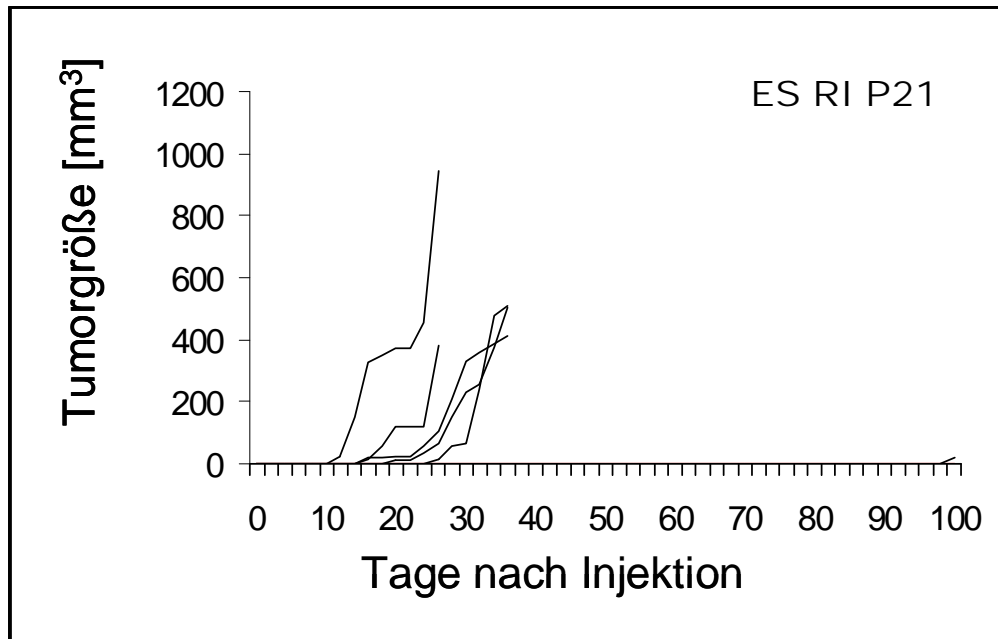


Abbildung 32: Verlauf der Teratombildung nach Injektion verschiedener Zelllinien unter die Haut immundefizienter Mäuse

Die Zellen aller untersuchten Zelllinien verursachten Teratome. Bei den SSC- Zelllinien traten diese ab ca. 18 Tage nach Injektion auf, während bei der ES-RI- Zelllinie bereits nach 14 Tagen Teratombildung beobachtet werden konnte.

Insgesamt lässt sich sagen, dass sowohl ES- Zellen als auch SSC- Zellen Teratombildung hervorrufen. Nach der Injektion von ES-Zellen setzt die Teratombildung ca. 14 Tage nach der Injektion ein, nach der Injektion von SSC-Zellen ca. 18 Tage nach Injektion. Die Häufigkeit der Teratombildung ist bei SSC- Zellen mit 70-86% deutlich höher als bei ES-Zellen (50%). Es bleibt abzuwarten, ob dieses Verhältnis auch nach der Injektion weiterer ES- Zelllinien bestehen bleibt.

3.2.6 Proteomics: Vergleich von ES- und SSC- Zelllinien auf Proteinebene

Im Rahmen der biologischen Doktorarbeit von Frau Sandra Meyer wurden die vier Zelllinien ES-RI, ES-dT Stra8, SSC 129SV und SSC15 auf Transkriptom-Ebene (Transcriptomics) miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass sich ES- und SSC- Zelllinien bezüglich ihrer RNA- Ausstattung sehr ähnlich sind. Besonders die Expression der Pluripotenzgene und –marker zeigte keine nennenswerten Unterschiede. Auf diesem Hintergrund sollten diese vier Zelllinien auch bezüglich ihrer

Proteinausstattung miteinander verglichen werden. Die „Proteomics“ wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Hassan Dihazi (Nephrologie und Rheumatologie, UMG) durchgeführt. Nach 2D- Gelelektrophorese wurden die einzelnen Protein-Spots ausgestanzt, mit Trypsin verdaut und anschließend über ein Massenspektrometer analysiert. Abbildung 33 zeigt die Übereinanderlagerung jeweils zweier Gele: je eine ES- Zelllinie zusammen mit der SSC- Zelllinie desselben genetischen Hintergrundes.

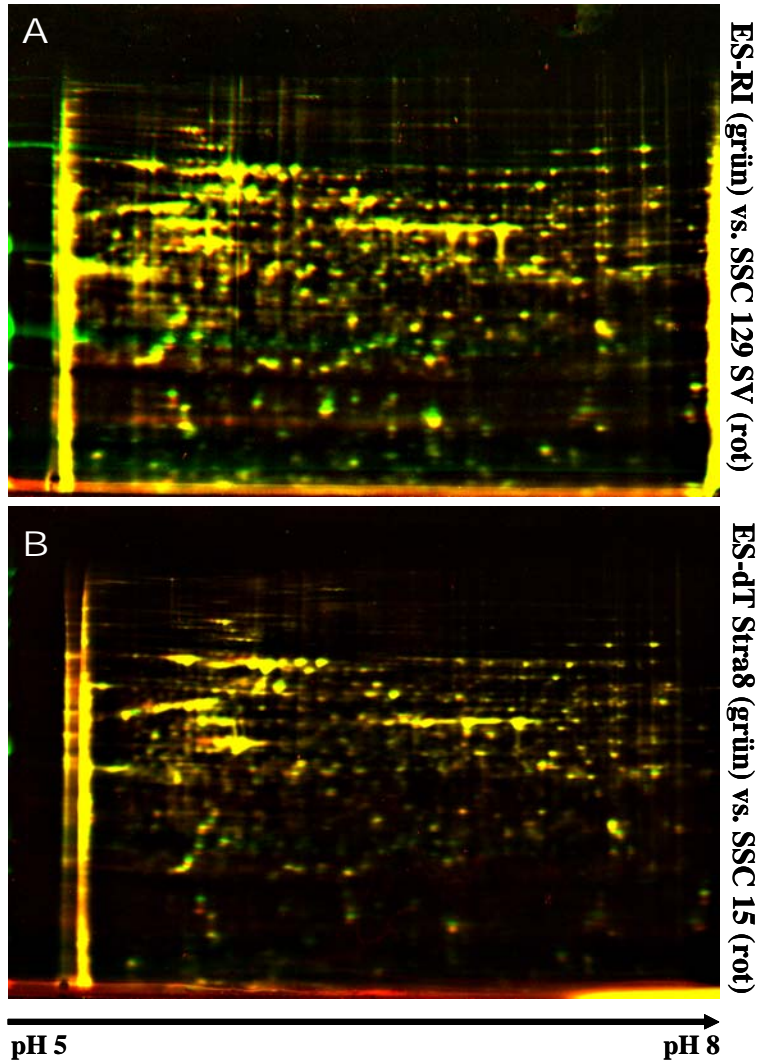


Abbildung 33: Übereinanderlagerung der 2D- Gele von Proteinen aus Zellen je einer ES- und einer SSC- Zelllinie des gleichen genetischen Hintergrundes

- A:** Übereinanderlagerung der 2D- Gele von Proteinen aus ES-RI-Zellen, angefärbt in grün, und von Proteinen aus SSC 129 SV-Zellen, angefärbt in rot. Die bei Übereinstimmung der Expression sichtbare gelbe Farbe zeigt an, dass es nur sehr wenige Unterschiede in der Proteinausstattung der beiden Zelllinien gibt.
- B:** Übereinanderlagerung der 2D- Gele von Proteinen aus ES-dT Stra8- Zellen, angefärbt in grün, und von Proteinen aus SSC15 Nr.12 Zellen, angefärbt in rot. Die bei Übereinstimmung der Expression sichtbare gelbe Farbe zeigt an, dass es auch hier nur

sehr wenige Unterschiede in der Proteinausstattung der beiden Zelllinien gibt.

Insgesamt wurden 264 Proteinspots aus einem Gel ausgestanzt und analysiert. Dabei konnten 193 verschiedene Proteine detektiert werden, von denen 20 Proteine unterschiedlich in ES- und SSC- Zellen exprimiert werden. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die detektierten Gene.

Tabelle 5: Übersicht über die detektierbaren und analysierbaren Proteine, die aus den 2D-Gelen aufgereinigt werden konnten.

Rot markierte Proteine zeigen unterschiedliche Expression in ES- und SSC- Zellen, bei allen anderen Proteinen gibt es keinen Expressionsunterschied.

Nummer	Proteinname
1	26S protease regulatory subunit 6B (Proteasome 26S subunit ATPase 4) (MIP224)
2	2-phospho-D-glycerate hydro-lyase
3	40S ribosomal protein S12
4	40S ribosomal protein SA
5	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
6	60S acidic ribosomal protein p2
7	78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78) (Heat shock 70 kDa protein 5)
8	Acireductone dioxygenase 1
9	Actin, aortic smooth muscle
10	Actin, cytoplasmic 1
11	Adenylate kinase 1
12	Adenylate kinase 2 isoform a
13	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial
14	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial, isoform CRA_a
15	Aldolase 1, A isoform
16	Aldose reductase
17	AIF-C1
18	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; type A/B hnRNP p40
19	Alpha enolase
20	Alpha-cardiac actin
21	Alpha-tubulin
22	Alpha-tubulin isotype M-alpha-2
23	Ash-m: growth factor receptor bound protein 2
24	ATP synthase beta subunit
25	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d
26	Atp5b protein
27	Basic transcription factor 3 isoform B
28	Beta tubulin
29	Beta-tropomyosin
30	Calmodulin - salmon
31	Calponin 3, acidic
32	Calreticulin [Mus musculus]
33	Calreticulin precursor
34	Calumenin isoform 1 [Mus musculus]

35	Capping protein alpha 1 subunit
36	CCT (chaperonin containing TCP-1) beta subunit
37	Chain A, Crystal Structure Of A Mammalian 2-Cys Peroxiredoxin, Hbp23.
38	Chain A, Crystal Structure Of Murine Cyclophilin C Complexed With Immunosuppressive Drug Cyclosporin
39	Chaperonin 10, cpn10
40	Chaperonin subunit 5 (epsilon)
41	Chromobox homolog 1 (HPI beta)
42	Cofilin 1, non-muscle
43	Creatine kinase, brain
44	Cu/Zn-superoxide dismutase
45	Cystatin B
46	D-dopachrome tautomerase
47	dUTPase
48	Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide
49	Elongation factor 1-beta
50	Elongation factor 1-beta homolog
51	Elongation factor Tu
52	Elongation factor Tu
53	Enhancer of rudimentary homolog
54	Enolase 1
55	Epidermal growth factor receptor
56	Erp61, GRP58=stress-inducible luminal endoplasmic reticulum protein
57	Esterase D/formylglutathione hydrolase
58	Eukaryotic translation initiation factor 5A
59	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
60	F1-ATPase beta subunit
61	F-actin capping protein beta subunit
62	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart
63	Fatty acid-binding protein, heart
64	Ferritin light chain 1
65	Fibroblast growth factor 2
66	FK506 binding protein 4, isoform CRA_a
67	Galectin-1
68	Gamma-actin
69	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial
70	Glutathione S-transferase omega 1
71	Glutathione transferase omega 1
72	Glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase
73	Glyoxalase 1 [Mus musculus]
74	GroEL_like type I chaperonin
75	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1
76	Heat shock 70 kDa protein 4 (Heat shock 70-related protein APG-2)
77	Heat shock 70kD protein 5
78	Heat shock cognate 71 kDa protein
79	Heat shock protein 65
80	Heat shock protein HSP27
81	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
82	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform a
83	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
84	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
85	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1
86	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2

87	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
88	High mobility group box 2
89	High mobility group protein B1 (High mobility group protein 1) (HMG-1)
90	Histone H2B
91	Hnrpf protein
92	Homeobox prox 1
93	Hsc70-interacting protein
94	Hspd1 protein
95	IMP dehydrogenase
96	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMP dehydrogenase 2) (IMPDH-II) (IMPD 2)
97	Kappa-B motif-binding phosphoprotein
98	Keratin 10
99	Keratin K6
100	KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)
101	Lactoylglutathione lyase
102	Lamin B
103	Lamin B1
104	Leucine aminopeptidase 3 Lap3
105	M2 pyruvate kinase
106	Macrophage migration inhibitory factor
107	Modifier 2: Chromobox protein homolog 3
108	Mortalin mot-1=hsp70 homolog cytosolic form
109	Myosin light polypeptide 6
110	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
111	Nuclear distribution gene C homolog
112	Nuclear protein Hcc-1
113	Nucleolar protein B23.2
114	Nucleolin
115	Nucleolin (Protein C23)
116	Nucleolin, isoform CRA_b
117	Nucleophosmin
118	Nucleophosmin 1
119	Nucleoside-diphosphate kinase 2
120	p38-2G4: Proliferation-associated protein 2G4
121	Parathyrosin
122	Parkinson disease protein 7
123	Pdhb protein : pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
124	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) (Rotamase A) (Cyclophilin A)
125	Peptidylprolyl isomerase A
126	Peroxiredoxin 1
127	Peroxiredoxin 4
128	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1
129	Phosphoglycerate kinase 1
130	Phosphoglycerate mutase type B subunit
131	Poly(rC) binding protein 1
132	Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein 1) (PABP 1)
133	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1
134	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 5
135	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6
136	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 7
137	Proteasome 26S ATPase subunit 2
138	Proteasome beta 3 subunit

139	Proteasome subunit beta type-2 (Proteasome component C7-I) (Macropain subunit C7-I)
140	Proteasome subunit beta type-4 precursor (Proteasome beta chain) (Macropain beta chain)
141	Proteasome subunit beta type-6 precursor
142	Proteasome subunit R-DELTA
143	Protein disulfide isomerase associated 3
144	Protein disulfide-isomerase A3 precursor
145	Protein disulfide-isomerase precursor (PDI) (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta)
146	Protein DJ-1
147	Prothymosin alpha
148	Purine nucleoside phosphorylase
149	Put. beta-actin (aa 27-375)
150	Putative RNA-binding protein 3 (RNA-binding motif protein 3)
151	Pyrophosphatase
152	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
153	Pyruvate kinase M
154	Ran/TC4 Binding Protein
155	Ras-related nuclear protein
156	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha
157	Ribosomal protein S12
158	SERPINE1 mRNA binding protein 1 isoform 3 (Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein)
159	Set beta isoform
160	Similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)
161	Similar to insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2 isoform a
162	Similar to keratin complex 2, basic, gene 6a isoform 1
163	Small ubiquitin-related modifier 2 precursor
164	Sod2 protein
165	Sperm associated antigen 5 [Rattus norvegicus] (Spag5)
166	Spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein 4d
167	Spermatogenic cell-specific gene 2
168	Spermidine synthase
169	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)
170	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 isoform 1
171	Srp20
172	Stathmin
173	Stress-induced phosphoprotein 1
174	TAR DNA binding protein isoform 1
175	T-complex protein 1
176	Thioredoxin 1
177	Transcription elongation factor B polypeptide 2
178	Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta) (Tripartite motif-containing protein 28)
179	Translationally-controlled tumor protein
180	Triosephosphate isomerase
181	tRNA pseudouridine synthase A
182	Tropomyosin 4
183	Tropomyosin alpha-1 chain
184	Tropomyosin alpha-3 chain
185	Tubulin beta-5 chain
186	Tumor metastatic process-associated protein NM23
187	Tumor protein, translationally-controlled 1
188	type II keratin Kb15

189	Type II peroxiredoxin 1
190	Uncertain (multiple)
191	Vimentin
192	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1) (mVDAC1) (mVDAC5) (Outer mitochondrial
193	Wbscr1 alternative spliced product; eukaryotic translation initiation factor 4H

Zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit wurde auch der Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen unternommen. Dieser Ansatz dient dazu, evtl. neue Pluripotenzgene zu identifizieren bzw. die unterschiedliche Differenzierung von ES- und SSC- Zellen besser zu verstehen.

3.2.7 Chromosomenanalyse

Abschließend wurden die verschiedenen ES- und SSC- Zelllinien bezüglich ihrer Chromosomenausstattung untersucht. Dazu wurden aus den einzelnen Zelllinien Chromosomenpräparate angefertigt (2.16.13), mit Giemsa angefärbt und je 50 Metaphasen ausgezählt. Abbildung 34 zeigt eine Aufnahme eines solchen Präparates. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

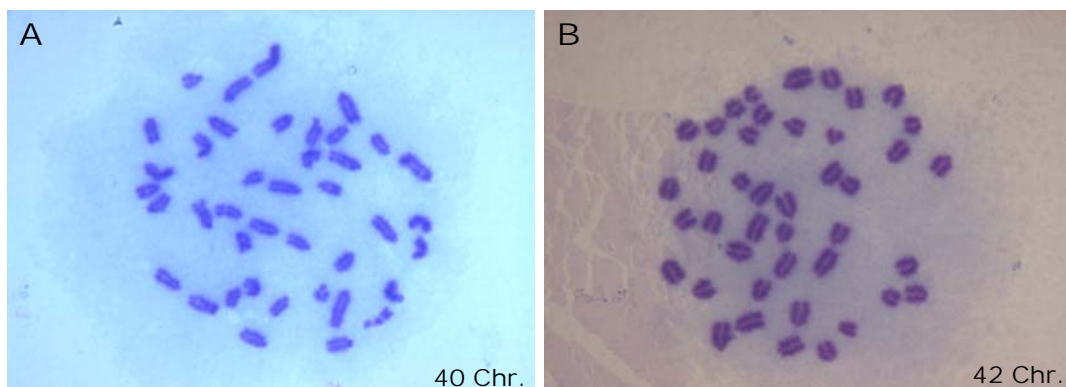


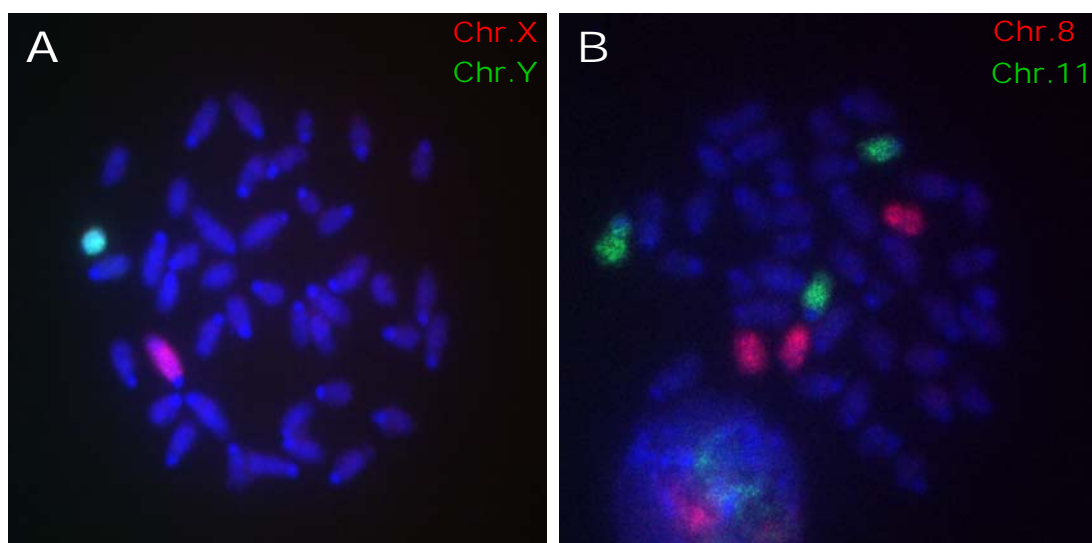
Abbildung 34: Metaphase- Chromosomen nach Giemsa- Färbung

- A:** Metaphase- Chromosomen der Zelllinie ES-RI P18. Es handelt sich um einen normalen Chromosomensatz mit 40 Chromosomen.
- B:** Metaphase- Chromosomen der Zelllinie SSC C57Bl P18. Es ist ein aneuploider Chromosomensatz mit 42 Chromosomen zu sehen.

Tabelle 6: Auszählung der Metaphase-Chromosomen (n=50)

Zelllinie	Anzahl der Chromosomen						
	38	39	40	41	42	43	44
ES-RI P18	2%	12%	82%	4%	0	0	0
ES C57BI P8	0	10%	84%	6%	0	0	0
ES FVB P31	0	2%	0	16%	82%	0	0
SSC 129SV P16	0	0	0	6%	22%	68%	4%
SSC C57BI P18	0	0	2%	6%	90%	0	2%
SSC FBV P31	0	0	0	6%	90%	4%	0
SSC15 Nr.12 P29	0	0	10%	82%	8%	0	0

Es ist auffällig, dass bei den beiden ES- Zelllinien ES- RI P18 und ES C57BI P8 ein annähernd normaler Chromosomensatz zu finden ist, während bei den anderen untersuchten Zelllinien vorwiegend ein aneuploider Chromosomensatz mit 41 bzw. 42 Chromosomen vorliegt. Da bekannt ist, dass sowohl ES- Zellen als auch SSC- Zellen häufig eine Trisomie für die Chromosomen 8 und 11 haben (Takehashi et al., 2007), wurde exemplarisch an der Zelllinie SSC FVB P34 eine FISH- Analyse mit Sonden für Chromosom 8, Chromosom 11 sowie für die Geschlechtschromosomen durchgeführt (2.20.7). Abbildung 35 zeigt die Bilder der FISH- Hybridisierung.

**Abbildung 35: FISH- Analyse an Zellen der Zelllinie SSC FVB P34**

- A:** Metaphase- Chromosomen hybridisiert mit Sonden für das X- Chromosom (rot) und das Y- Chromosom (grün). Wie erwartet haben die Zellen einen männlichen Chromosomensatz ohne Aneuploidie der Geschlechtschromosomen.
- B:** Metaphase- Chromosomen hybridisiert mit Sonden für Chromosom 8 (rot) und Chromosom 11 (grün). Wie bereits für ES- und SSC- Zelllinien beschrieben, zeigen die Zellen eine Trisomie für die beiden untersuchten Chromosomen.

Abschließend und zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich SSC- Zelllinien in den untersuchten Parametern nur in einem sehr geringen Umfang von ES- Zelllinien unterscheiden. Die Unterschiede, die gefunden werden konnten, sind teilweise auf die verschiedenen genetischen Hintergründe zurückzuführen und können auch bei dem Vergleich von verschiedenen ES- Zelllinien gefunden werden.

3.3 Expressionsanalysen von *Stra8*

3.3.1 Expression in Präimplantations- Embryonen: Expressionsanalyse für *Stra8* mittels RT- PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *Stra8*- Expression während der frühen Embryonalentwicklung untersucht. Zudem war von großem Interesse, welche Rolle *Stra8* bezüglich der Pluripotenz von Stammzellen spielt, da *Stra8*- Expression sowohl in ESCs als auch in SSCs detektiert werden kann. Einige Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit der medizinischen Doktorandin, Frau Linda Kotzenberg, generiert.

In einem ersten Versuchsansatz wurde aus je 50 isolierten Entwicklungsstadien (unbefruchtete Oocyte bis Blastocyste) Gesamt- RNA mit dem RNeasy Mini- Kit (Qiagen) isoliert und die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben. Die HPRT- Kontroll-PCR zeigt die erfolgreiche cDNA- Synthese an (Abb.36). Zusammen mit der *Stra8*- Expression wurde die Expression zweier weiterer, erst kürzlich als Pluripotenz- assoziiert beschriebener Gene untersucht: *Zfp206* (Zhang et al., 2006a; Wang et al., 2007a + b) und *Tex19* (Kuntz et al., 2008).

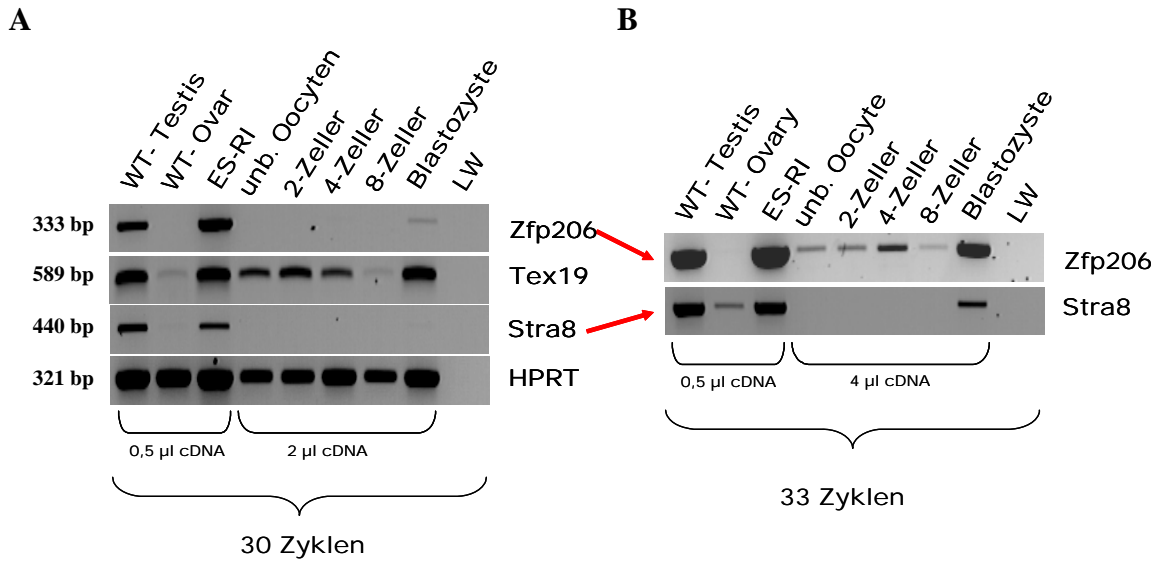


Abbildung 36: RT-PCR- Analyse an frühen Embryonen

- A:** Beim ersten Durchgang mit der vierfachen Menge an cDNA aus den Embryonen konnte *Zfp206* nur in Blastozysten detektiert werden. *Tex19* wurde in allen Embryonalstadien detektiert. Für *Stra8* konnte keine Expression in den Embryonen nachgewiesen werden.
- B:** Nach einer Erhöhung der Zyklenzahl auf 33 und dem Einsatz der achtfachen Menge an cDNA konnte *Zfp206* in allen Stadien nachgewiesen werden, *Stra8* hingegen nur in Blastocysten.
- cDNA- Proben wie Beschriftung; LW= negative Kontrolle ohne Template.

Beim ersten Durchgang wurde die vierfache Menge an cDNA der Embryonalstadien, verglichen mit den Kontrollen WT-Testis, WT-Ovar und ES-RI, eingesetzt. Die für *Zfp206* publizierten Daten konnten nicht bestätigt werden. Eine Wiederholung der RT-PCR unter gleichen Ansatz- Bedingungen, jedoch mit einer Zykluserhöhung von 30 auf 33 brachte das Expressionsmuster, welches für *Zfp206* publiziert ist. Es konnte nun auch *Stra8*- Expression im adulten Ovar und in der Blastozyste nachgewiesen werden. *Stra8*- Expression in Ovar und Blastozyste konnte erst nach einer Erhöhung der Zyklenzahl und Verdoppelung der cDNA- Menge detektiert werden. Auch die Ergebnisse für *Zfp206* stimmten erst jetzt mit dem bereits publizierten Expressionsprofil überein (Zhang et al., 2006a). Das Expressionsmuster für *Tex19* war bereits mit 30 Zyklen wie erwartet.

Um sicher zu gehen, dass die Ergebnisse speziell für *Stra8* reproduzierbar und kein Artefakt darstellen, wurde noch einmal Gesamt-RNA isoliert, diesmal jedoch nur aus 8-Zellern, Morulae und Blastozysten, dafür aber aus je 100 Embryonen. Die Analyse

zeigte für das *Zfp206* das gleiche Expressionsprofil wie bereits zuvor (vergl. Abb.36). *Stra8* hingegen konnte diesmal in allen getesteten Stadien detektiert werden (Abb.37).

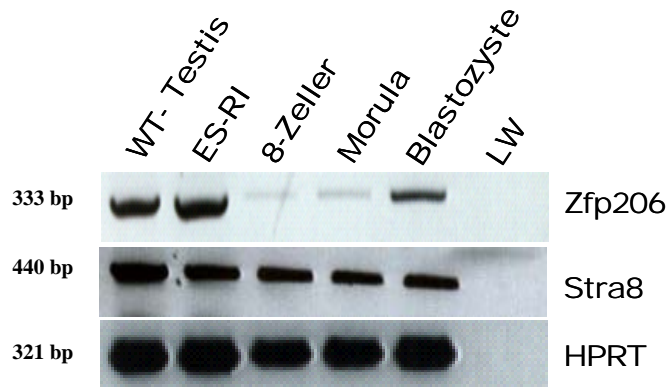


Abbildung 37: RT- PCR- Analyse an Embryonen

Bei diesem Durchgang wurde RNA aus je 100 Embryonen isoliert und komplett zur cDNA- Synthese verwendet. Das Expressionsprofil von *Zfp206* stimmte mit dem bereits zuvor erhaltenen überein (vergl. Abb.36). *Stra8*- Expression konnte in allen Embryonalstadien detektiert werden. cDNA- Proben wie Beschriftung; LW= negative Kontrolle ohne Template

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in allen untersuchten präimplantativen Embryonalstadien *Stra8*-mRNA vorhanden ist.

3.3.2 Expressionsanalyse für *Stra8* mittels Immunohistochemie

Um die *Stra8*- Expression auf Proteinebene zu untersuchen, wurde ein kommerziell erwerbbarer Peptidantikörper gegen *Stra8* auf Schnitten aus Paraffin- eingebettetem WT-Testis getestet. Aus der Literatur ist bekannt, dass *Stra8* in TypA und TypB Spermatogonien sowie in präleptotänen und frühen leptotänen Spermatozyten exprimiert wird (Oulad- Abdelghani et al., 1996; Baltus et al., 2006; Zhou et al., 2008a und b). Abbildung 38 zeigt eine Antikörperfärbung auf Schnitten eines adulten Testis. Es konnte gezeigt werden, dass nur die erwarteten Zelltypen der Spermatogenese positiv für *Stra8* sind. Diese Beobachtung wurde von Prof. Andreas Meinhardt (Anatomischen Institut, Universität Giessen) bestätigt.

Nach diesem Vorversuch war sichergestellt, dass der Antikörper spezifisch für Stra8 ist. In den folgenden Versuchen wurde dieser Antikörper benutzt, um an den verschiedenen Embryonalstadien sowie an verschiedenen Zelllinien Stra8- Protein nachzuweisen.

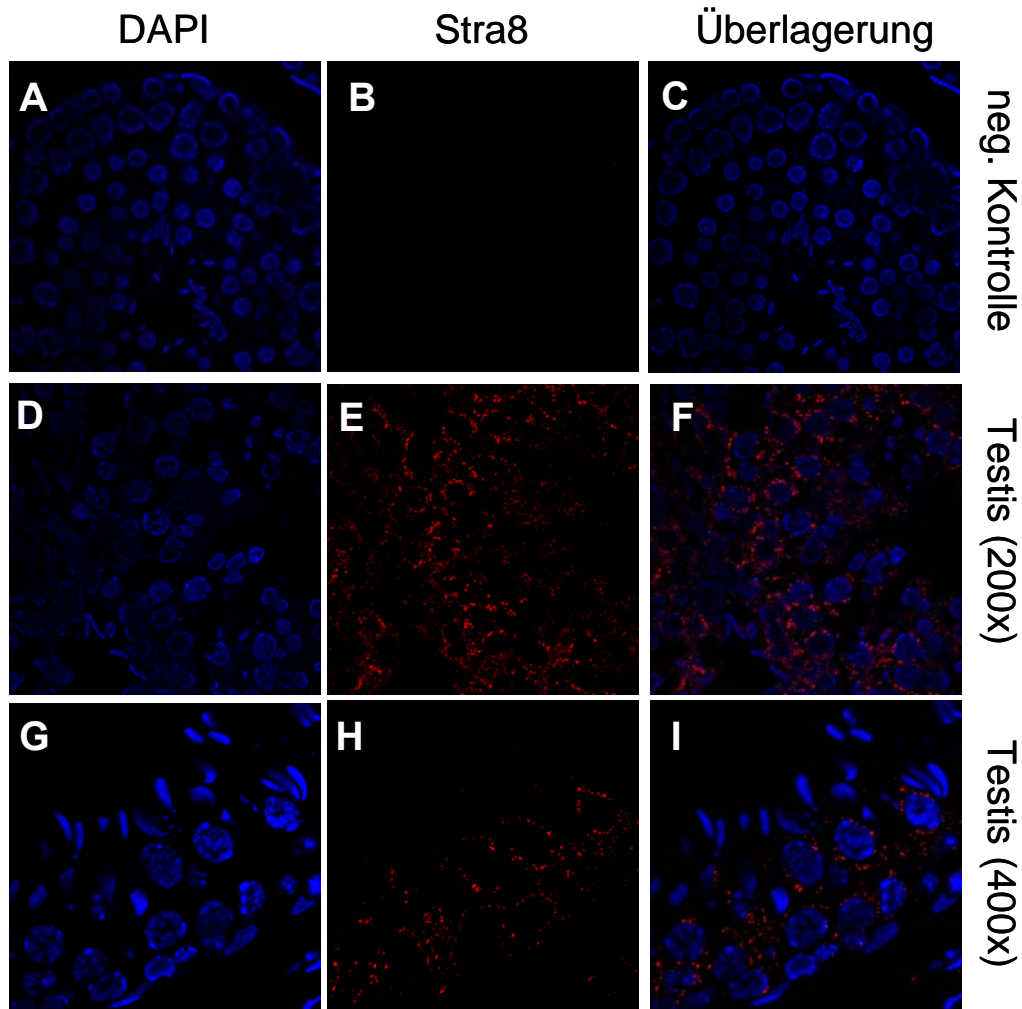


Abbildung 38: Stra8- Antikörperfärbung auf Schnitten von adultem WT- Testis

A-C: negative Kontrolle (nur sekundärer Antikörper)

D-I: Stra8- Antikörper

Für die Antikörperfärbung in Embryonen wurden die verschiedenen Stadien isoliert und einer Immunhistochemie unterzogen. Anschließend wurden die Embryonen auf einem Hohlschliffobjektträger konfokal mikroskopiert. Die Abbildungen 39 bis 44 zeigen jeweils zwei der 10 bis 15 untersuchten Embryonen mit jeweils einer negativen Kontrolle (nur sekundärer Antikörper).

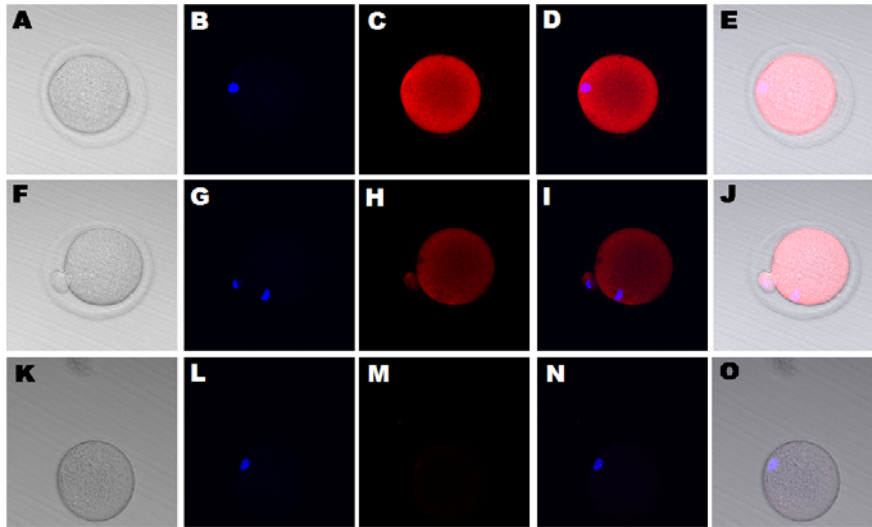


Abbildung 39: Stra8- Antikörperfärbung auf unbefruchteten Oocyten

- A, F, K:** Hellfeld- Aufnahme der Oocyte
- B, G, L:** Kernfärbung mit DAPI
- C, H, M:** Stra8 (Cy3)
- D, I, N:** Überlagerung der Fluoreszenzen
- E, J, O:** Gesamt- Überlagerung
- K – O:** negative Kontrolle (nur sek. Antikörper)

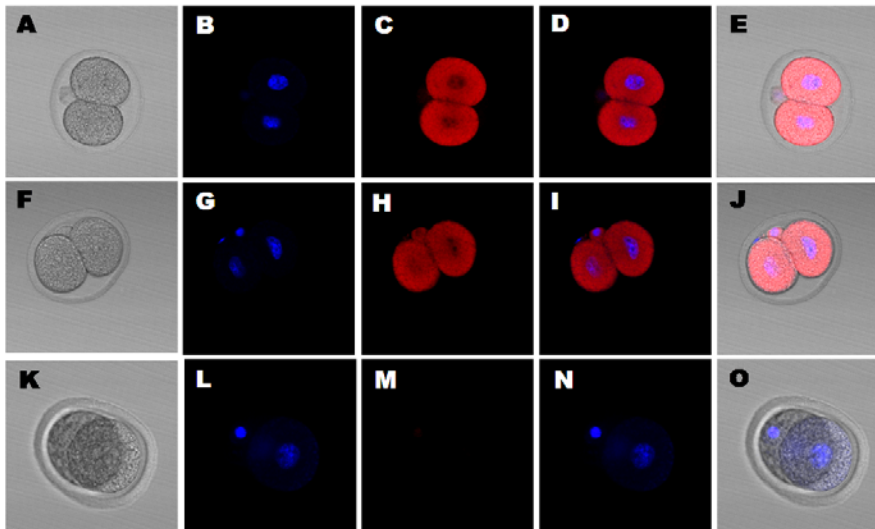


Abbildung 40: Stra8- Antikörperfärbung auf 2- Zellern

- A, F, K:** Hellfeld- Aufnahme des 2- Zellers
- B, G, L:** Kernfärbung mit DAPI
- C, H, M:** Stra8 (Cy3)
- D, I, N:** Überlagerung der Fluoreszenzen
- E, J, O:** Gesamt- Überlagerung
- K – O:** negative Kontrolle (nur sek. Antikörper)

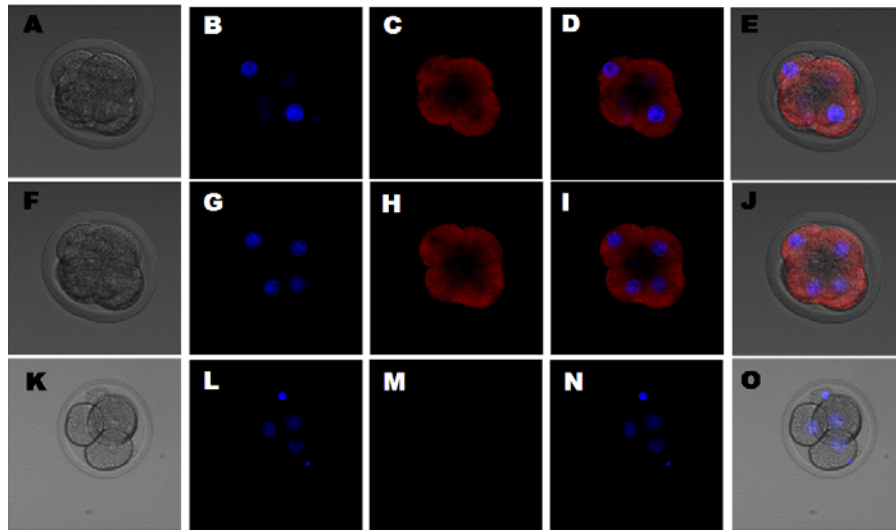


Abbildung 41: Stra8- Antikörperfärbung auf 4- Zellern

- A, F, K: Hellfeld- Aufnahme des 4- Zellers
- B, G, L: Kernfärbung mit DAPI
- C, H, M: Stra8 (Cy3)
- D, I, N: Überlagerung der Fluoreszenzen
- E, J, O: Gesamt- Überlagerung
- K – O: negative Kontrolle (nur sek. Antikörper)

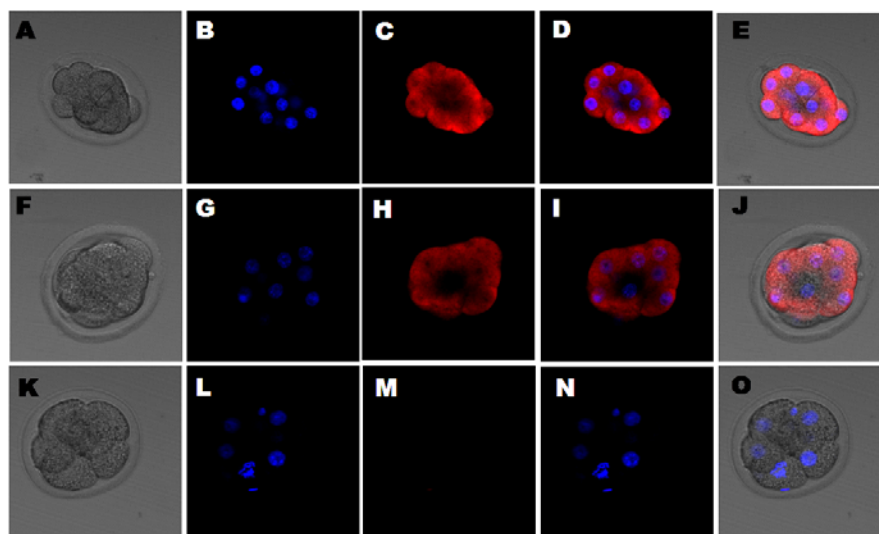


Abbildung 42: Stra8- Antikörperfärbung auf 8- Zellern

- A, F, K: Hellfeld- Aufnahme des 8- Zellers
- B, G, L: Kernfärbung mit DAPI
- C, H, M: Stra8 (Cy3)
- D, I, N: Überlagerung der Fluoreszenzen
- E, J, O: Gesamt- Überlagerung
- K – O: negative Kontrolle (nur sek. Antikörper)

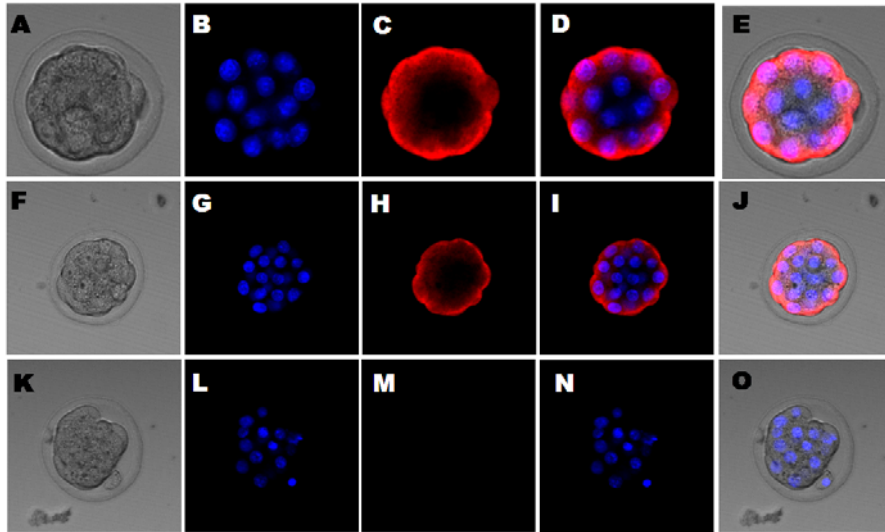


Abbildung 43: Stra8- Antikörperfärbung auf Morulae

- A, F, K:** Hellfeld- Aufnahme der Morula
- B, G, L:** Kernfärbung mit DAPI
- C, H, M:** Stra8 (Cy3)
- D, I, N:** Überlagerung der Fluoreszenzen
- E, J, O:** Gesamt- Überlagerung
- K – O:** negative Kontrolle (nur sek. Antikörper)

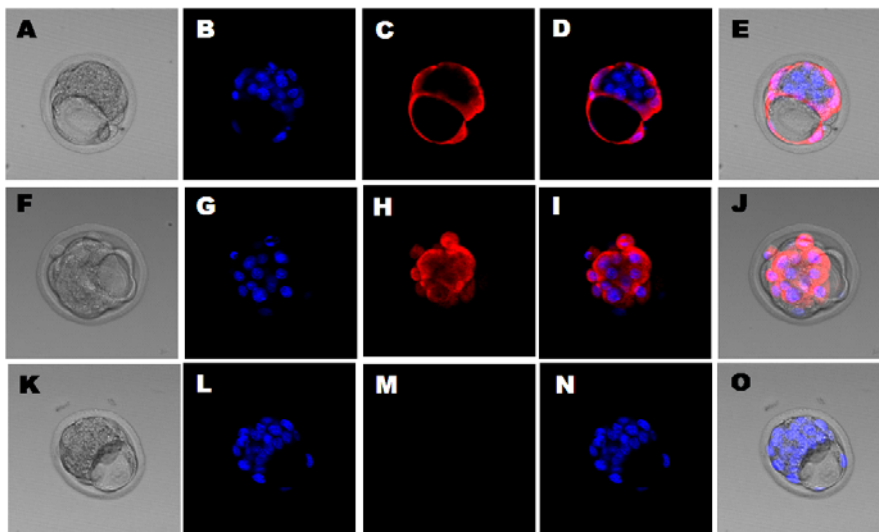


Abbildung 44: Stra8- Antikörperfärbung auf Blastozysten

- A, F, K:** Hellfeld- Aufnahme der Blastozyste
- B, G, L:** Kernfärbung mit DAPI
- C, H, M:** Stra8 (Cy3)
- D, I, N:** Überlagerung der Fluoreszenzen
- E, J, O:** Gesamt- Überlagerung
- K – O:** negative Kontrolle (nur sek. Antikörper)

Das Stra8- Protein konnte in allen Embryonalstadien jeweils im Cytoplasma nachgewiesen werden. In der Blastozyste ist Stra8 sowohl in den Zellen der inneren Zellmasse als auch in den Zellen des Trophoblasten exprimiert. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung stimmen mit denen zuvor in der RT- PCR erhaltenen überein. Es konnte in allen präimplantativen Embryonalstadien Stra8- Expression nachgewiesen werden.

Da Stra8 bereits in unbefruchteten Oocyten nachgewiesen werden konnte (Abb.39), wurde eine Antikörperfärbung auf Schnitten aus Paraffin- eingebettetem WT-Ovar (adult und 15d) durchgeführt. Abbildung 45 zeigt, dass die Stra8- Expression, die mit RT- PCR im Ovar detektiert werden konnte, aus der Expression in den Oocyten resultiert.

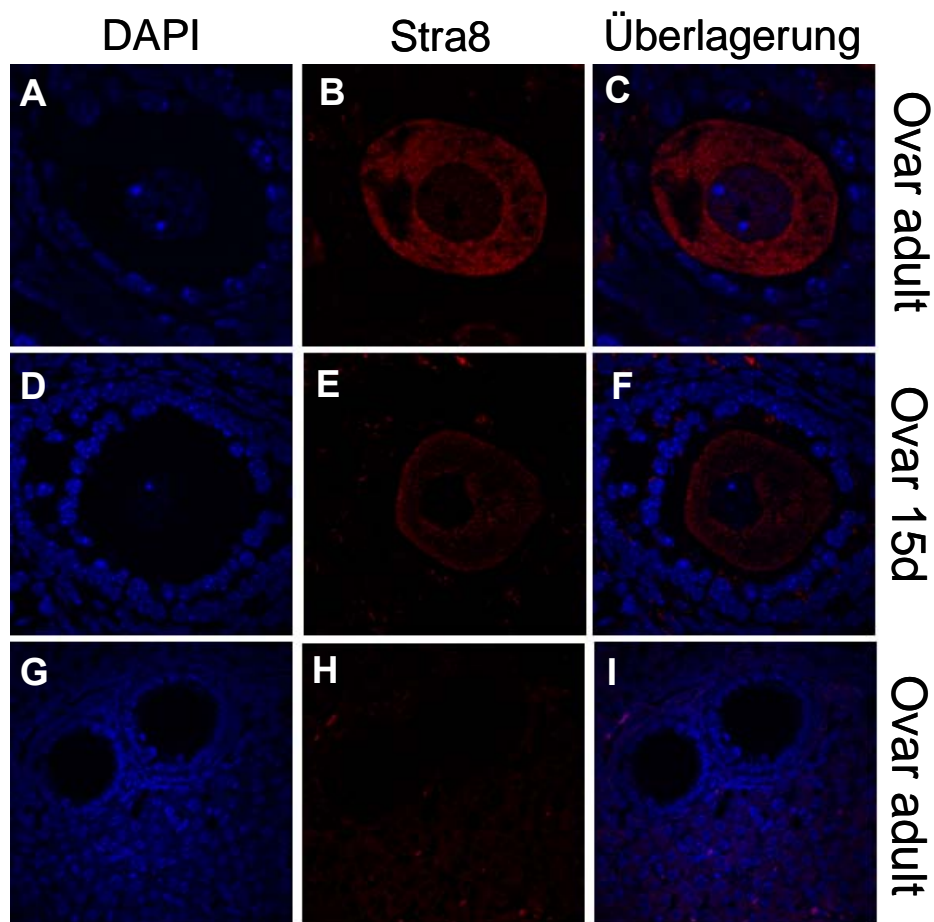


Abbildung 45: Stra8- Antikörperfärbung auf Ovarien aus adulten und 15 Tage alten Mäusen
A, D, G: Kernfärbung mit DAPI
B, E, H: Stra8 (Cy3)
C, F, I: Überlagerung der Fluoreszenzen
G – I: negative Kontrolle (nur sek. Antikörper)

Da *Stra8*- Expression auch in allen SSC- Zelllinien sowie in der ES- Zelllinie RI mit RT- PCR nachgewiesen werden konnte (Abb.46), wurden Antikörperfärbungen auf allen im Institut verfügbaren SSC- und ES- Zelllinien durchgeführt.

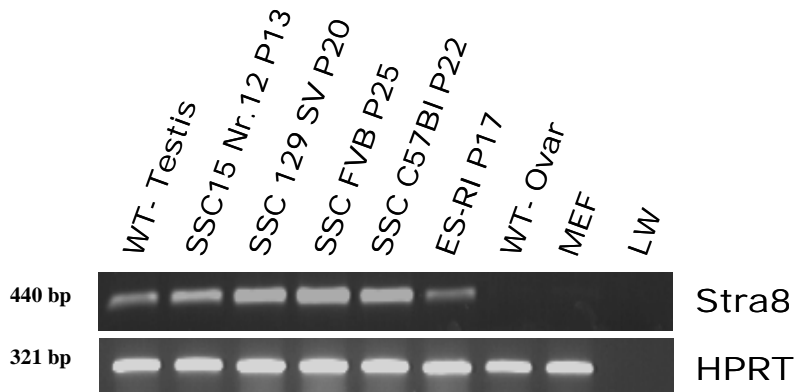


Abbildung 46: Stra8- RT- PCR mit RNA aus den vier SSC- Zelllinien und aus der Zelllinie ES-RI

Als Kontrollen dienten WT- Testis (positive Kontrolle) sowie Ovar und MEFs (negative Kontrolle). LW = negative Kontrolle ohne Template. *Stra8*- Expression konnte unter den gewählten Bedingungen in allen Zelllinien, jedoch nicht im WT- Ovar nachgewiesen werden (vergl. auch Abb.36)

Abbildung 47 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Antikörperfärbung in Zellen der Zelllinien SSC C57Bl, ES C57Bl, SSC FVB und ES FVB. In allen Zelllinien konnte *Stra8* nachgewiesen werden. Interessanterweise gab es eine Lokalisation sowohl im Cytoplasma als auch im Kern. Dies wird bei der Zelllinie SSC FVB besonders deutlich (Abb.47L). Hier kommen Zellen vor, die entweder cytoplasmatische oder Kernlokalisierung des *Stra8*- Proteins aufweisen.

Dieses Ergebnis widerspricht den publizierten Daten, da *Stra8* bisher nur als cytoplasmatisches Protein beschrieben wurde.

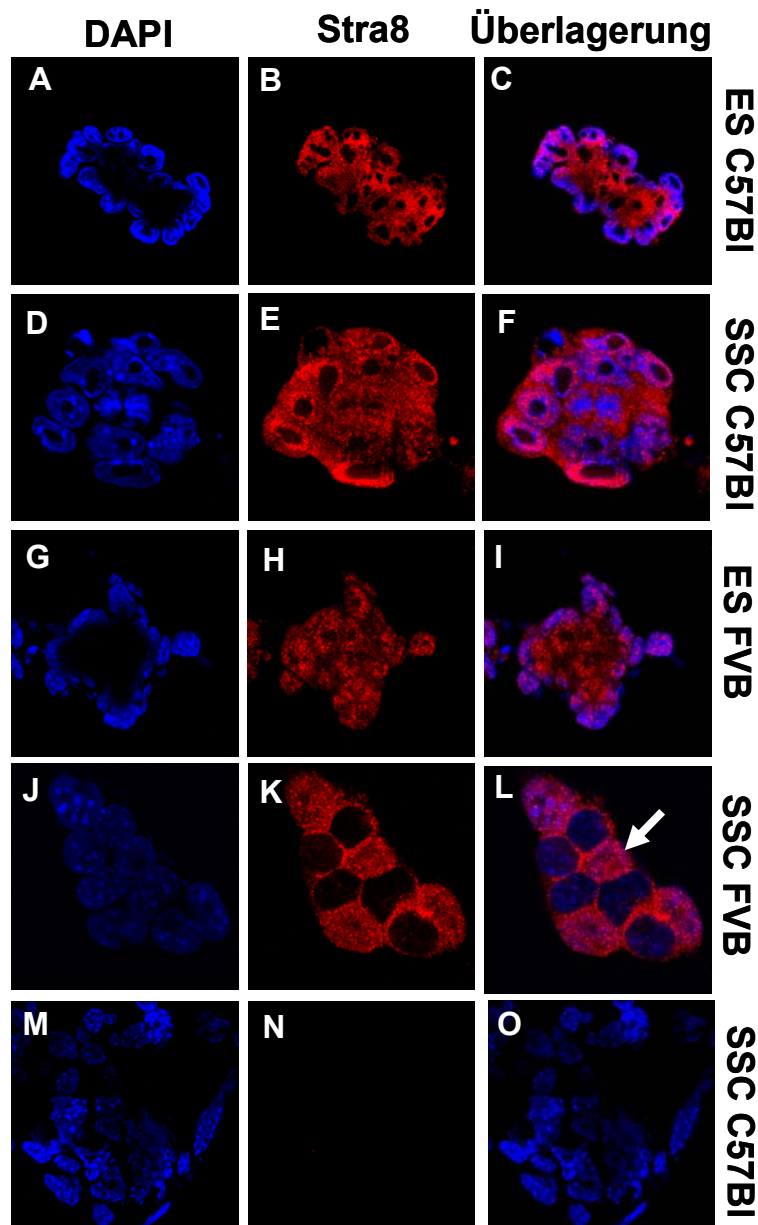


Abbildung 47: Stra8- Antikörperfärbung auf ES- und SSC- Zelllinien

- A, D, G, J, M:** Kernfärbung mit DAPI
- B, E, H, K, N:** Stra8 (Cy3)
- C, F, I, L, O:** Überlagerung der Fluoreszenzen
- M – O:** negative Kontrolle (nur sek. Antikörper)

Es konnte in allen Zelllinien Stra8- Expression nachgewiesen werden. Bei einigen Zelllinien (SSC FVB Abb.47L) ist deutlich zu erkennen, dass Stra8 sowohl im Cytoplasma als auch im Kern (➔) lokalisiert ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse verstärkte sich der Verdacht, dass Stra8 als Pluripotenzgen bzw. als Pluripotenz- assoziiertes Gen in pluripotenten Zelllinien fungieren könnte. Alle bisher bekannten Gene, die eine Rolle bezüglich der Pluripotenz spielen, weisen eine Kernlokalisierung auf.

Um dies in einem ersten Ansatz zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Zelllinien des gleichen genetischen Hintergrunds, nämlich ES-RI (129SV) und SSC 129SV, einer ungerichteten Differenzierung unterzogen. Hierzu wurden die Zellen für 35 Tage auf Gelatine und unter RA- Induktion kultiviert. Die Expression von Pluripotenzgenen bzw. von Pluripotenz- assoziierten Genen verschwindet mit der vollständigen Ausdifferenzierung der Zellen. Aus den Zellen wurde nach den 35 Tagen Gesamt- RNA isoliert (2.17.5) und davon 5 µg in cDNA umgeschrieben (2.17.11.3). Anschließend erfolgte eine RT- PCR mit RNA aus undifferenzierten und differenzierten Zellen. Als positive Kontrolle diente die Expression des Gens *Zfp206*, für das bereits gezeigt wurde, dass die Expression in differenzierten Zellen verschwindet (Zhang et al., 2006a). Für *Tex19* ist bekannt, dass die Expression in differenzierten Zellen schwächer ist als in nicht- differenzierten Zellen, jedoch nicht vollständig verschwindet (Kuntz et al., 2008). Abbildung 48 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches.

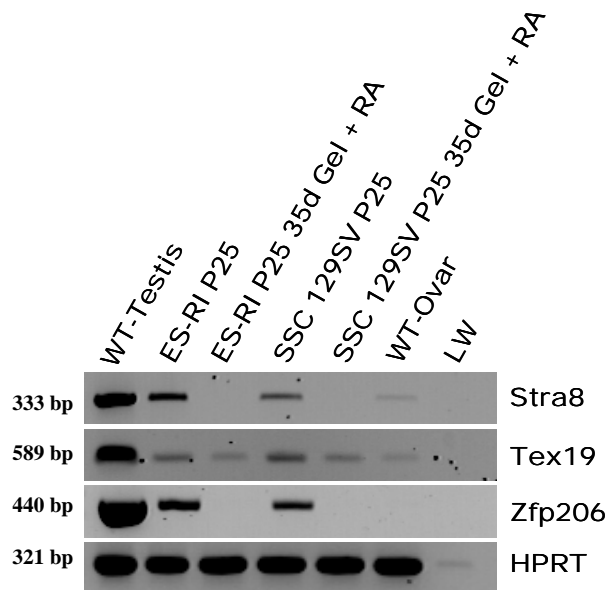


Abbildung 48: RT- PCR- Analyse mit RNA aus differenzierten Zellen

WT-Testis: positive Kontrolle

ES-RI P25 und SSC 129SV P25: undifferenzierte Zellen

35d Gel + RA: differenzierte Zellen; Kultivierung für 35 Tage auf Gelatine plus Retinsäure

WT-Ovar: Kontrolle

LW: negative Kontrolle (ohne Template)

Das Ergebnis ist ein weiteres Indiz dafür, dass *Stra8* Pluripotenz- assoziiert sein könnte. Wie bei *Zfp206* ist in den differenzierten Zellen keine Expression mehr nachzuweisen. Auch bei *Tex19* ist eine Abnahme der Expression zu erkennen.

Als nächstes wurde die Frage gestellt, ob der Anteil an Zellen in der Zelllinie ES-RI, der Stra8 positiv ist, „pluripotenter“ ist als eine Mischpopulation aus Stra8⁺- und Stra8⁻-Zellen. Dazu wurde die Zelllinie ES-RI-Stra8/10, die in Nayernia et al. (2006) benutzt wurde, um *in vitro* Spermatogenese durchzuführen, einem FACSorting auf EGFP unterzogen. Für die *in vitro* Spermatogenese wurde diese Zelllinie stabil mit dem Stra8-EGFP- Promotorkonstrukt transfiziert. Anschließend wurde eine Blastozysteninjektion zur Herstellung von Chimären mit den EGFP positiven im Vergleich zu den unsortierten Zellen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tabelle 7 zusammengefasst; Abbildung 49 zeigt eine der 90%igen Chimären.

Tabelle 7: Ergebnisse der Blastozysteninjektion

Zelllinie	Anzahl der Embryonentransfere	Anzahl der NKO's	Chimären
ES-RI WT	2	16	1 x 10% 2 x 25% 2 x 65% 1 x 80%
ES-RI-Stra8/10 EGFP+	2	23	2 x 10% 2 x 90%



Abbildung 49:
90%ige Chimäre mit den auf EGFP- Expression sortierten Zellen

Die ES-RI- Zellen haben 129SV-Hintergrund (braune Fellfarbe); die Zellen wurden in Blastozysten aus C57Bl/6- Mäusen (schwarze Fellfarbe) injiziert.

Die Experimente geben kein eindeutiges Ergebnis. Zwar wurden nach der Injektion von EGFP positiven Zellen zwei hochprozentige Chimären (90%) geboren, die Injektion von nicht sortierten Zellen brachte aber insgesamt mehr Chimären– wenn auch nur eine höherprozentige (80%). Dies lässt darauf schließen, dass Stra8 wohl tatsächlich eine gewisse Rolle bezüglich der Pluripotenz spielt, diese jedoch nicht in einer Schlüsselfunktion liegen sollte.

3.3.3 Strategie zur Überexpression von *Stra8* in ES- und SSC- Zellen

Um die Rolle von *Stra8* bezüglich der Pluripotenz von kultivierten Stammzelllinien genauer zu untersuchen, soll *Stra8* in jeweils einer ES- und einer SSC- Zelllinie stabil überexprimiert werden. Diese Methode wurde auch von Wang et al. (2007a) verwendet, um die Rolle von *Zfp206* bezüglich der Pluripotenz von ES- Zellen zu untersuchen. Im Rahmen der Überexpression von *Stra8* soll auch *Zfp206* in ES- und SSC- Zellen überexprimiert werden, zum einen, um zu zeigen, dass die Methode in unseren Händen funktioniert (Vergleich zu den bereits publizierten Daten) und zum anderen, um zu zeigen, dass auch SSC- Zellen in gleicher Weise reagieren wie ES- Zellen.

Für die Überexpression wurde der Vektor pCMV-Myc ausgewählt (Abb.50). Dieser Vektor enthält den CMV- Promotor und einen Myc- Tag, über den später die Expression mittels Western Blot- Analyse nachgewiesen werden soll. Dies ist nötig, da der *Stra8*-Antikörper im Western Blot keine eindeutigen Ergebnisse bringt.

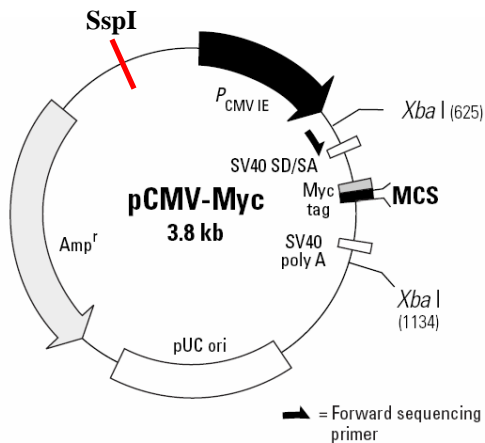


Abbildung 50:
pCMV- Myc- Vektor

Die Expression des gewünschten Gens wird von dem CMV- Promotor kontrolliert und ist über einen Myc- Tag vor der Multiple Cloning Site (MCS) detektierbar. Angegeben ist die Lage der Schnittstelle (*SspI*) für die Integration der Hygromycin- Resistenz- Kasette.

Da dieser Vektor keine Antibiotika- Resistenz für die Selektion in eukaryotischen Zellen besitzt, sollte die Hygromycin- Resistenz- Kasette aus dem Vektor pTK- Hyg (Abb.51) in den pCMV- Myc- Vektor eingebaut werden.

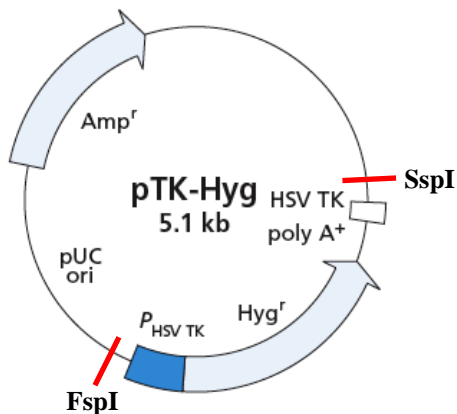


Abbildung 51:
pTK- Hyg- Vektor

Aus diesem Vektor sollte die Hygromycin- Resistenz- Kasette ausgeschnitten und in den pCMV- Myc- Vektor eingebaut werden. Angegeben ist die Lage der Schnittstellen, über die die Resistenz- Kasette ausgeschnitten wurde (*SspI* und *FspI*).

Dazu wurde die Hygromycin- Resistenz- Kasette aus dem pTK- Hyg- Vektor mittels der Blunt- End- Restriktionsenzyme FspI und SspI herausgeschnitten (2.17.10.1) und in den mit SspI aufgeschnittenen pCMV- Myc- Vektor ligiert. In den so erhaltenen pCMV- Myc- Hyg- Vektor sollte der ORF des *Stra8*- bzw- des *Zfp206*- Gens kloniert werden. Dazu wurden Primer hergestellt, die eine NotI- bzw. XhoI- Schnittstelle an die Enden des jeweiligen ORFs amplifizieren und so die Ligation in die MCS des pCMV- Myc- Hyg- Vektors ermöglichen. Abbildung 52 zeigt die Amplifikation der ORFs beider Gene mit den Primerpaaren ORF-*Stra8*-NotI-F/ ORF-*Stra8*-NotI-R bzw. ORF-*Zfp206*-XhoI-F/ ORF-*Zfp206*-XhoI-R.

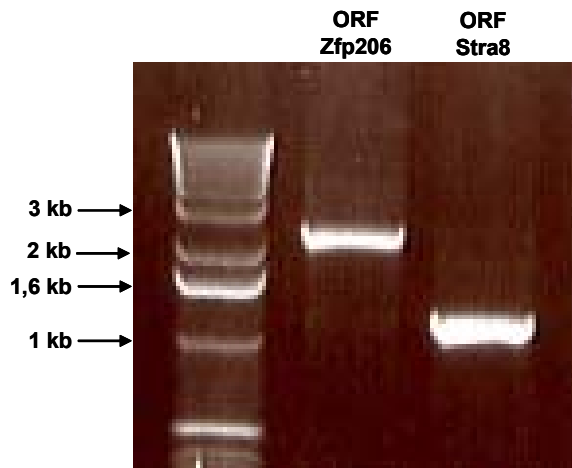


Abbildung 52:
Amplifikation der ORFs von
Zfp206 und Stra8

Der ORF von Zfp206 ist 2,4 kb groß;
Der ORF von Stra8 ist 1,2 kb groß.

Zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit war die Generierung des pCMV- Myc- Hyg- Vektors in Arbeit. Die ORFs der beiden Gene *Stra8* und *Zfp206* sind in pGEMTeasy kloniert und einer Sequenzanalyse unterzogen worden. Die Fertigstellung der Konstrukte sowie die stabile Transfektion der Zelllinien ES- RI und SSC 129SV und die anschließenden Analysen werden von Frau Linda Kotzenberg im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit durchgeführt.

3.4 *In vitro* Differenzierung muriner Spermatogonialer Stammzellen (mSSCs) zu haploiden Keimzellen

3.4.1 Strategie für die Differenzierung

Der in dieser Arbeit verwendeten Differenzierungsstrategie liegt eine doppelte Selektion über zwei Promotorkonstrukte zugrunde. Hierbei handelt es sich zum einen um den prämeiotisch aktiven Stra8-Promotor (1,4 kb) in einem EGFP-Expressionsvektor (pEGFP-1) und zum anderen um den postmeiotisch aktiven Prm1-Promotor (0,5 kb) in einem DsRed-Expressionsvektor (pDsRed-Express-1).

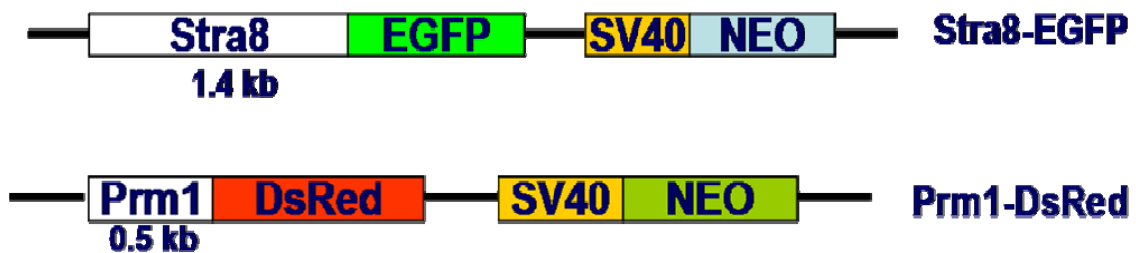


Abbildung 53: Schematische Darstellung der Promotorkonstrukte

Die Selektionskonstrukte (Abb.53) waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden, weshalb hier nicht weiter auf deren Generierung eingegangen werden soll. Außerdem wurde mit diesen Konstrukten bereits erfolgreich die *in vitro* Spermatogenese von murinen Embryonalen Stammzellen (ESCs) durchgeführt (Nolte, Diplomarbeit, 2005; Nayernia et al., 2006; Nolte et al., 2007), so dass die Funktionalität der beiden Konstrukte bereits bewiesen war. Abbildung 54 gibt eine generelle Übersicht über die hier verwendete Differenzierungsstrategie.

In der verwendeten Zelllinie SSC15 Nr.12 war das Stra8-EGFP-Konstrukt bereits enthalten, da diese aus der in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen doppelt-transgenen Maus Stra8-EGFP/ ROSA26-LacZ isoliert worden war. Die für diese Arbeit ebenfalls verwendeten WT-SSC- Zelllinien hingegen wurden erst noch mit dem Stra8-EGFP-Konstrukt transfiziert (Abschnitt 3.4.2).

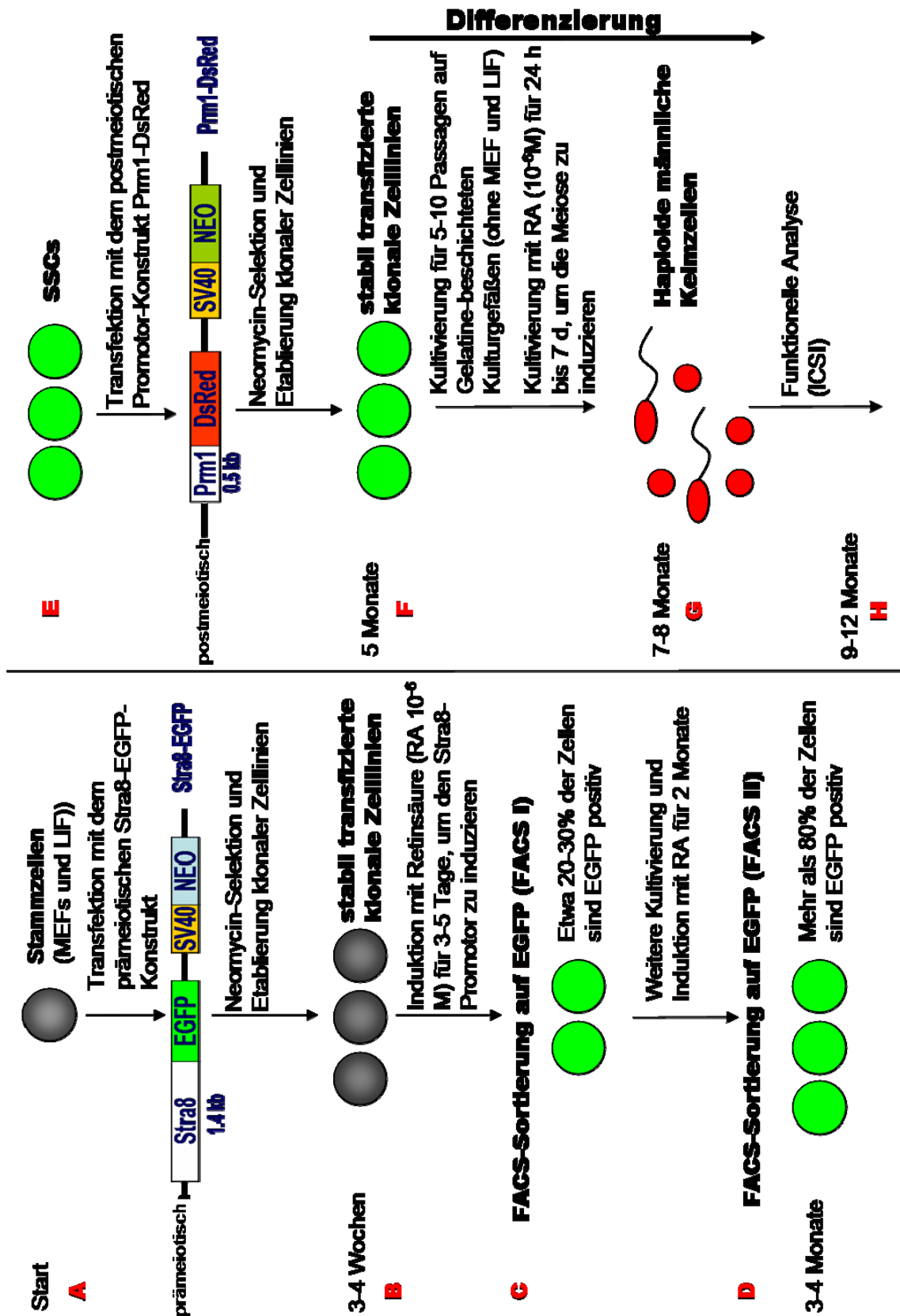


Abbildung 54: Generelle Strategie für die *in vitro* Spermatogenese ausgehend von pluripotenten Stammzellen

Die Abbildung enthält eine theoretische Zeitvorgabe für die verschiedenen Versuchsabschnitte.

Die WT- SSC- Linien wurden mittels Elektroporation mit dem Stra8-EGFP- Konstrukt transfiziert (2.16.7.1). Nach Neomycinselektion wurden mehrere Klone gepickt und mittels Genotypisierungs- PCR auf das Vorhandensein des Konstruktes untersucht. Positive Klone wurden einer Sequenzierung unterzogen und wieder in Kultur genommen, um stabil transfizierte klonale Zelllinien zu generieren (Abb.54A). Nachdem von den ausgewählten Zelllinien genügend Stocks eingefroren und die Zellen noch einmal auf das Vorhandensein des Konstruktes überprüft waren, folgte eine Retinsäureinduktion für 3-5 Tage (Abb.54B) mit anschließender FACSSortierung (FACS I, Abb.54C) der EGFP⁺ Zellen. Die EGFP⁺ Zellen wurden wieder in Kultur genommen und unter Differenzierungs- hemmenden Bedingungen (+LIF,+MEFs) für weitere zwei Monate mit Retinsäure induziert. Anschließend folgte eine weitere FACSSortierung (FACS II, Abb.54D) mit erneuter Kultur der EGFP⁺ Zellen unter Differenzierungs- hemmenden Bedingungen. Nachdem auch aus diesem Versuchsstadium genügend Stocks eingefroren waren, wurden die Zellen mit dem Prm1-DsRed- Konstrukt wie oben beschrieben transfiziert (Abb.54E). Nach Neomycinselektion und Genotypisierung der generierten klonalen Zelllinien wurden als geeignet befundene Zelllinien wieder in Kultur genommen und nach mehreren Passagen nochmals auf das Vorhandensein beider Konstrukte überprüft. Einige der doppelt transgenen Zelllinien wurden dann für 5-10 Passagen unter Differenzierungsbedingungen (ohne LIF, ohne MEFs) auf Gelatine- beschichteten Kulturgefäßen kultiviert, bevor sie erneut mit Retinsäure induziert wurden (Abb.54F). Nach 24 bis 72h RA- Induktion konnten DsRed- exprimierende Zellen detektiert werden, die demzufolge die Meiose durchlaufen hatten und als haploid zu bezeichnen waren (Abb.54G). Diese Zellen wurden anschließend zur funktionellen Analyse für die intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) verwendet (Abb.54H). Während der gesamten Differenzierungsstrategie wurde aus den Zellen der einzelnen Zwischenstadien DNA und RNA isoliert, um auch auf Methylierungs- bzw. Transkriptionsebene den Verlauf der Differenzierung verfolgen zu können.

3.4.2 Stabile Transfektion der WT- SSC- Zelllinien mit dem Stra8-EGFP- Promotorkonstrukt

(vergl. Abb.54A)

Die drei WT-SSC-Zelllinien SSC FVB, SSC C57Bl und SSC 129SV wurden mit dem linearisierten und steril aufgereinigten (2.17.1) Stra8-EGFP-Promotorkonstrukt mittels Elektroporation transfiziert (2.16.7.1). Nach Neomycinselektion (2.16.8) und nach Replikaplattierung (2.16.9.3) wurde auf das Vorhandensein des Konstruktes mittels Genotypisierungs-PCR getestet. Hierzu wurden die Primer Stra8-EGFP-F5 und Stra8-EGFP-R3 (2.13) verwendet.

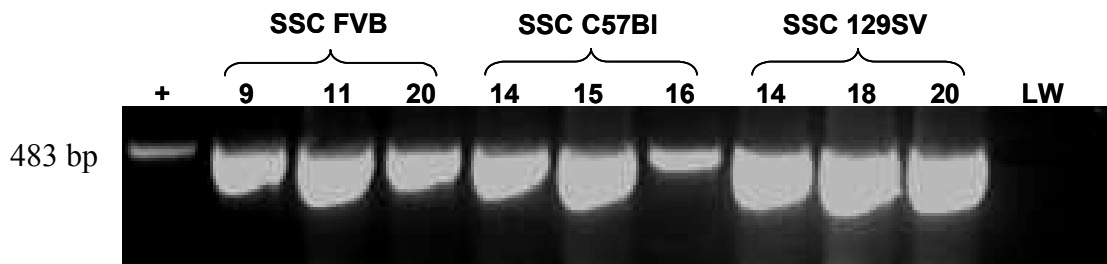


Abbildung 55: Genotypisierungs-PCR auf das Stra8-EGFP-Konstrukt

Es wurden je drei Klone pro WT-Zelllinie ausgewählt und mittels Sequenz-PCR überprüft.

+: positive Kontrolle (stark verdünntes Plasmid)

SSC FVB 9/ 11/ 20: positive Klone der Zelllinie SSC FVB

SSC C57Bl 14/ 15/ 16: positive Klone der Zelllinie SSC C57Bl

SSC 129 SV 14/ 18/ 20: positive Klone der Zelllinie SSC 129 SV

LW: negative Kontrolle (ohne Template)

Die DNA aller neun Klone wurde einer Sequenzanalyse unterzogen (2.17.15). Dabei wurden die Primer mStra8pr-F1 und EGFP-R2 (2.13) verwendet, um sowohl die Promotorregion als auch die Sequenz der kodierenden Region des EGFPs zu überprüfen. Nach Auswertung der erhaltenen Sequenzen stand fest, dass SSC FVB/20, SSC C57Bl/16 und SSC 129SV/14 das Konstrukt in voller Länge und ohne Mutationen integriert hatten. Die entsprechenden Klone wurden von der kryokonservierten DNA-Platte nach Replikaplattierung (2.16.9.3) erneut in Kultur genommen.

3.4.3 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

(vergl. Abb.54B + C)

Um aus der Gesamtpopulation der verschiedenen SSC- Zelllinien die EGFP⁺ Zellen anzureichern, wurden diese über einen FACSORTER sortiert (FACS I). Der Anteil der

EGFP⁺ Zellen jeder Zelllinie ist in den Abbildungen 56 bis 59 zu sehen. Die EGFP⁺ Zellen wurden nach der Sortierung wieder in Kultur genommen und unterschiedlich weiterkultiviert, um den Effekt verschiedener Strategien zu analysieren.

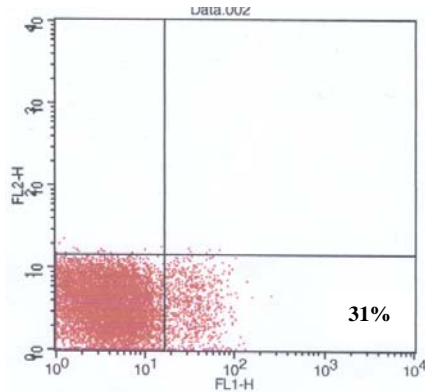


Abbildung 56: FACSoring der Zelllinie SSC15 Nr.1

Es konnten 31% EGFP positive Zellen detektiert und sortiert werden. Die EGFP⁺ Zellen sind im unteren, rechten Quadranten dargestellt.

Die Zelllinie SSC15 Nr.1 (Abb.56) zeigte 31% EGFP positive Zellen und wurde abweichend vom Standardprotokoll nicht unter Standard- Bedingungen plus Retinsäureinduktion weiterkultiviert, sondern direkt mit dem Prm1-DsRed-Konstrukt stabil transfiziert (Abschnitt 3.4.5) (vergl. Abb.54E).

Zellen der Zelllinie SSC 15 Nr. 12 wurden nach fünf Tagen Induktion mit Retinsäure (10^{-6} M) sortiert (FACS I; vergl. Abb.54B). Es konnten 2,8% der Zellen als EGFP positiv detektiert und sortiert werden (Abb.57).

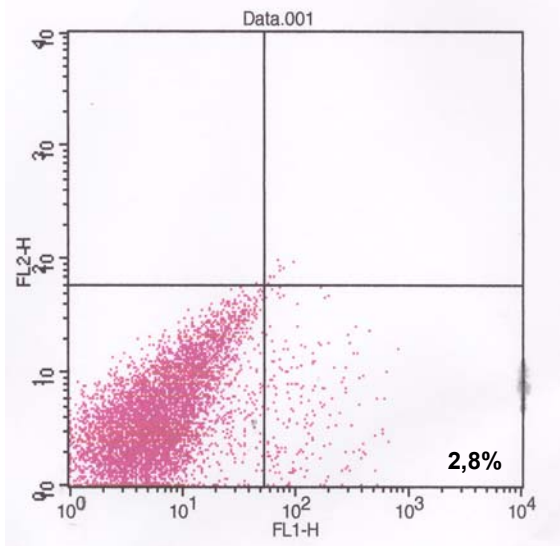
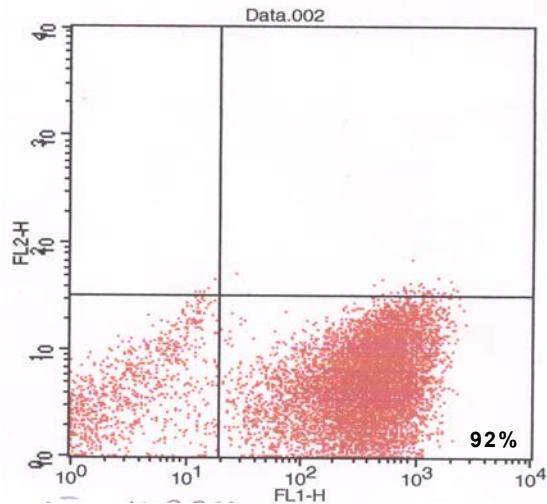


Abbildung 57: FACSoring I der Zelllinie SSC15 Nr.12

Es konnten 2,8% EGFP positive Zellen detektiert und sortiert werden. Die EGFP⁺ Zellen sind im unteren, rechten Quadranten dargestellt.

Die Zellen wurden nach dem Sortierten entsprechend dem in Abbildung 54C beschriebenen Protokoll unter Standard- Bedingungen plus Retinsäureinduktion (10^{-6} M) weiterkultiviert. Nach ca. zweimonatiger Induktion wurden die Zellen ein weiteres Mal auf EGFP- Fluoreszenz sortiert (FACS II; Abb.54D).

**Abbildung 58:****FACSoring II der Zelllinie SSC15 Nr.12**

Es konnten 92% EGFP positive Zellen detektiert und sortiert werden. Die EGFP⁺ Zellen sind im unteren, rechten Quadranten dargestellt.

Damit konnte der Anteil an Stra8-exprimierenden Zellen durch zweimonatige Induktion mit Retinsäure von ca. 3% auf ca. 90% gesteigert werden. Um diese Population zu stabilisieren, wurden die Zellen für weitere drei Passagen unter Standard- Bedingungen plus Retinsäureinduktion (10^{-6} M) weiterkultiviert, bevor sie mit dem Prm1-DsRed-Konstrukt stabil transfiziert wurden.

Auch die mit dem Stra8-EGFP-Promotorkonstrukt stabil transfizierten WT-SSCs wurden der „Zwei-FACS“-Strategie unterzogen. Bei keiner der drei Zelllinien konnte jedoch eine so starke Zunahme der EGFP⁺ Population beobachtet werden. Allerdings war in allen drei Zelllinien die Ausgangspopulation an EGFP⁺ Zellen nach fünftägiger Retinsäureinduktion deutlich höher (>35%; FACS I) als bei den bisher sortierten SSC15- Zelllinien. Dieser Anteil konnte im Wesentlichen durch die Weiterkultivierung unter Standard- Bedingungen plus Retinsäureinduktion (10^{-6} M) gefestigt werden (FACS II; Abb.59).

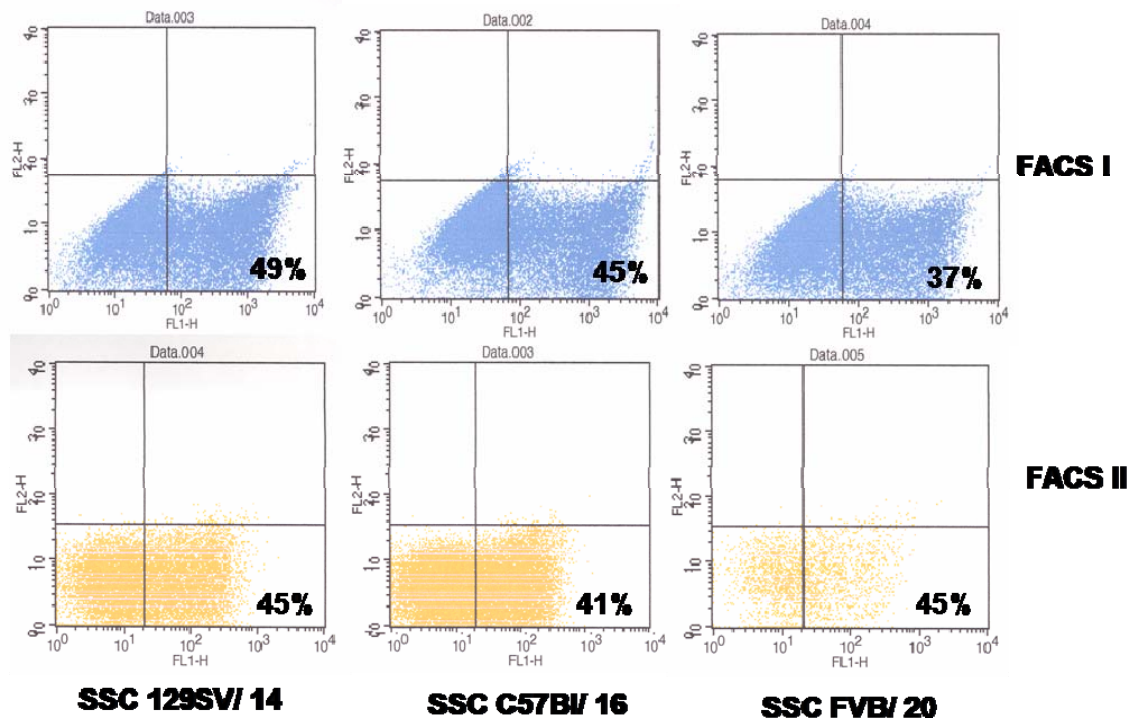


Abbildung 59: FACSsortierungen der WT-SSC-Klone

Die FACSsortierungen der EGFP⁺ Zellen aus den WT- Zelllinien (vergl. Abb.54C + D) zeigte jeweils eine stabile Population an Stra8 exprimierenden Zellen.

3.4.4 Histologie und Morphologie der SSC- Zelllinien vor und nach FACSsortierung

Die einmal sortierten und auf Gelatine kultivierten Zellen der Zelllinie SSC15 Nr.1 zeigten vor der Sortierung (vergl. Abb.54B) einen heterogenen Phänotyp und bildeten Zellcluster aus, die im folgenden als „Embryoid- Body- like“- Zellcluster bezeichnet werden. Die „Embryoid- Body- like“- Zellcluster sind dreidimensionale Strukturen, die in der Kulturschale schon mit bloßem Auge zu erkennen sind. Abbildung 60 versucht einen Eindruck dieser Dreidimensionalität zu vermitteln.

Dieser Phänotyp konnte bei den anderen vier Zelllinien, welche der „Zwei -FACS“- Strategie unterzogen wurden, nicht beobachtet werden. Als Beispiel zeigt Abbildung 61 die Morphologie von SSC15 Nr.12 – die WT- SSC- Zelllinien entsprachen diesem Phänotyp.

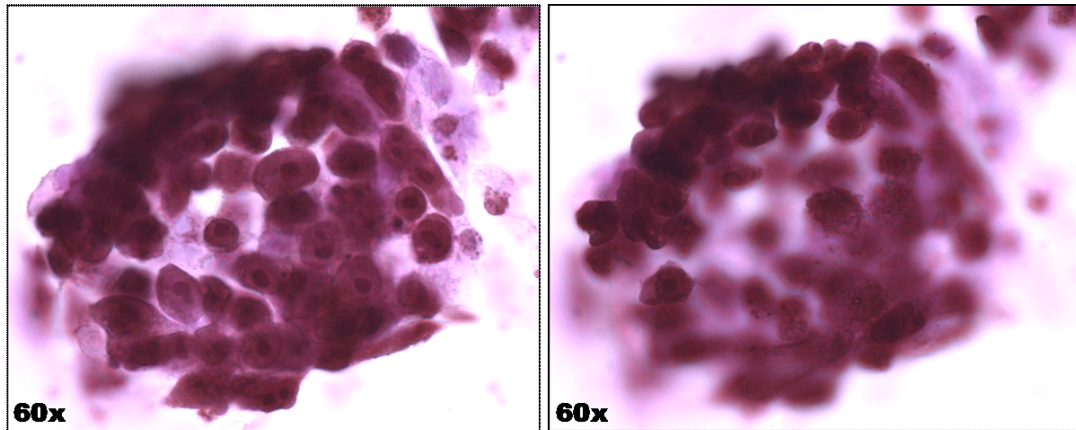


Abbildung 60: HE-Färbung eines „Embryoid- Body- like“- Zellclusters der Zelllinie SSC15 Nr.1 (vergl. Abb.54B)
 Im linken Photo ist die untere Ebene der Struktur fokussiert, während das rechte Photo die obere Ebene darstellt.

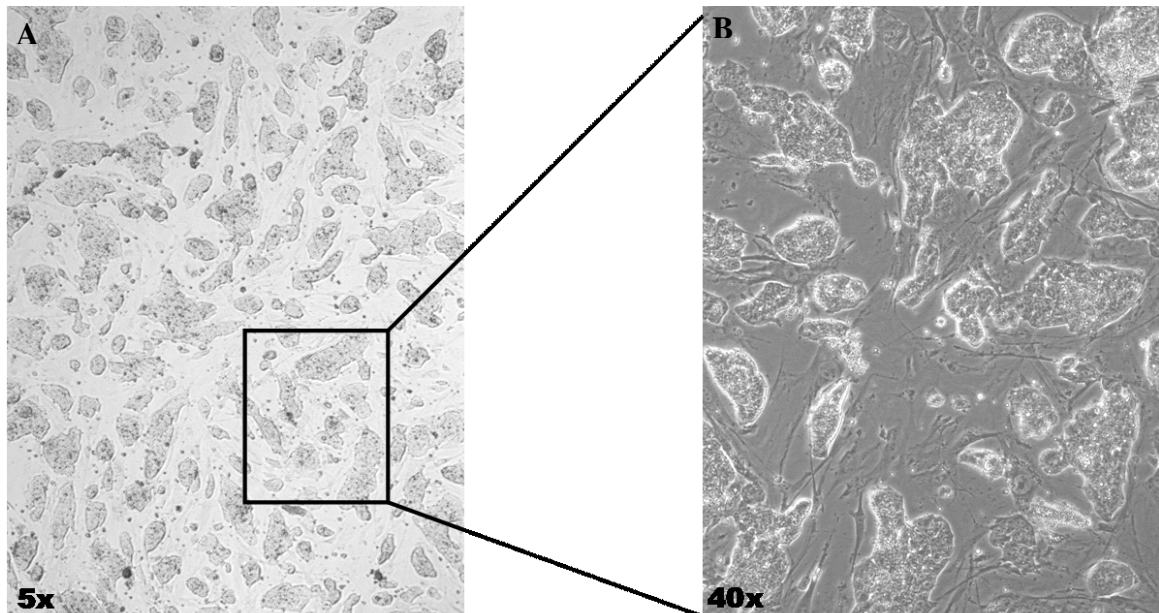


Abbildung 61: Morphologie von SSC15 Nr.12 vor FACS I (vergl. Abb.54B)
 Hellfeld- Aufnahmen (A: 50fache Vergrößerung; B: 400fache Vergrößerung). Die Zellen zeigen einen homogenen Phänotyp, der dem Embryonaler Stammzellen entspricht. Es sind deutlich die SSC-Zellen und der darunterliegende Feeder zu erkennen.

Während sich die Morphologie der unter Standard- Bedingungen kultivierten SSC-Zelllinien nicht änderte, konnte bei SSC15 Nr.1 eine deutliche Veränderung des Phänotyps nach der Sortierung festgestellt werden. Die Zellen waren deutlich homogener in ihrem Erscheinungsbild, sie bildeten rundliche Zellkörper, und es kam nur gelegentlich zu Clusterbildungen. Nach weiterer Kultivierung dieser Zellen für fünf Passagen auf Gelatine, aber in LIF-haltigen Medium, zeigte sich erneut die Bildung von

„Embryoid- Body- like“- Zellclustern, die aber insgesamt ein wesentlich homogeneres Erscheinungsbild hatten als vor der Sortierung (Abb.62).

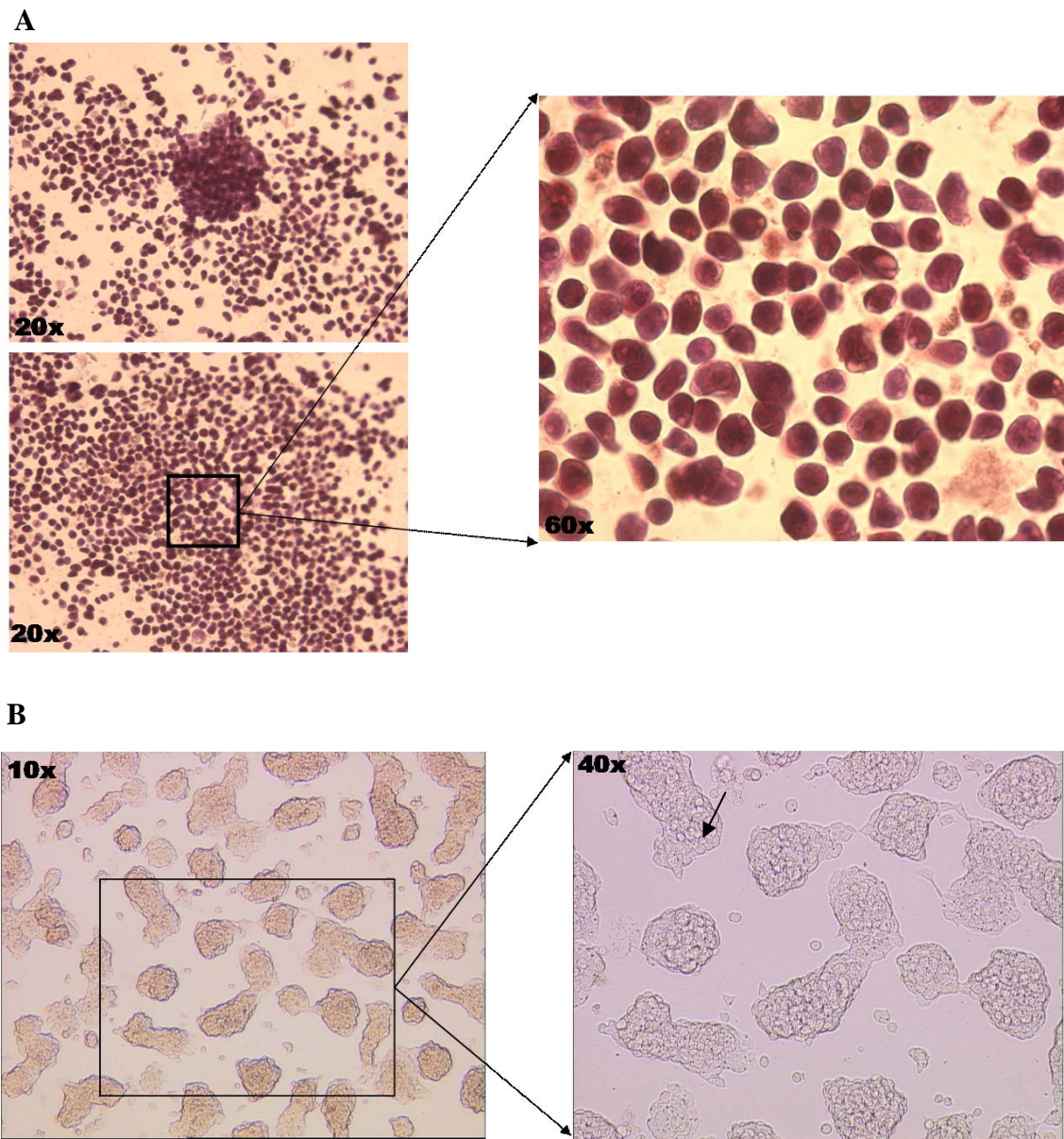


Abbildung 62: Morphologie von SSC15 Nr.1 nach FACS I (vergl. Abb.54C)

A: HE- Färbung

In der 20fachen Vergrößerung ist der deutlich homogenere Phänotyp mit gelegentlicher Clusterbildung zu erkennen (vergleiche Abb.60). In der 60fachen Vergrößerung ist die rundliche Morphologie der Zellen gut zu erkennen.

B: Hellfeld- Aufnahmen

Die Zellen zeigen insgesamt ein sehr homogenes Erscheinungsbild, wobei nahezu alle Zellen in Clustern vorkommen (Pfeil). Der Phänotyp erinnert stark an die Morphologie von ESCs und SSCs unter Standard- Bedingungen (vergleiche Abb.61).

3.4.5 Stabile Transfektion aller SSC- Zelllinien mit dem Prm1-DsRed- Promotorkonstrukt

(vergl Abb.54E)

Die SSC-Zelllinien SSC15 Nr.1, SSC15 Nr.12, SSC FVB/20, SSC C57Bl/16 und SSC 129SV/14 wurden mit dem linearisierten und steril aufgereinigten (2.17.2) Prm1-DsRed-Promotorkonstrukt mittels Elektroporation transfiziert (2.16.7.1). Nach Neomycyaselektion (2.16.8) und Replikaplattierung (2.16.9.3) wurde auf das Vorhandensein des Konstruktes mittels Genotypisierungs-PCR getestet. Hierzu wurden die Primer Prm1pr-F2 und RED-R4 (521 bp) bzw. Prm1-F2 und RED-R2 (253 bp) verwendet (Abb.63 und 64). Von allen Linien konnten positive Klone isoliert werden.

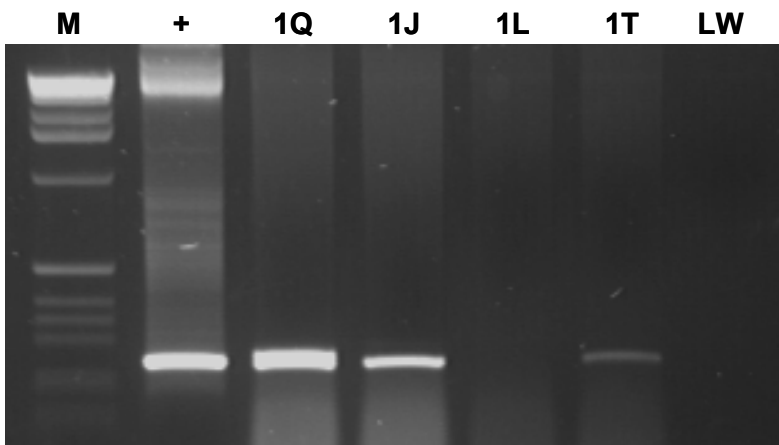


Abbildung 63:
Genotypisierung der SSC15 Nr.1- Klone nach Transfektion mit dem Prm1-DsRed- Konstrukt
 M: 1kb- Leiter
 +: Plasmid (verdünnt)
 1Q-1T:Klone von SSC15 Nr.1
 LW: negative Kontrolle (ohne Template)

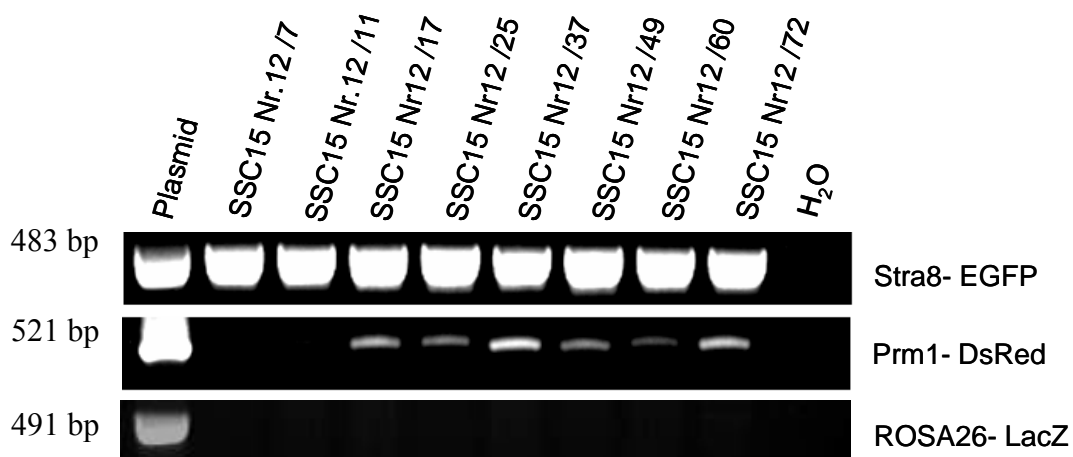


Abbildung 64: Genotypisierungs- PCRs der SSC15 Nr.12- Klone nach der Prm1-DsRed- Transfektion

Die Klone wurden durchnummeriert und sind folgendermaßen bezeichnet: z.B. SSC15 Nr.12 (Ausgangszelllinie)/7 (Klon Nummer 7 nach Prm1-DsRed- Transfektion); es ist nur eine Auswahl der gepickten Klone dargestellt

In den Klonen der Zelllinie SSC15 Nr.12 wurde zusätzlich zur Genotypisierung auf das Prm1-DsRed- Konstrukt auch auf das Vorhandensein der beiden Konstrukte aus der transgenen Maus genotypisiert (Stra8-EGFP und ROSA26-LacZ)(Abb.64). Da alle getesteten Klone negativ für das ROSA26-LacZ- Konstrukt waren, wurde eine Genotypisierung von Zellen aus den verschiedenen Stadien des bis dahin durchgeführten Differenzierungsprotokolls durchgeführt (Abb.65). Es konnte gezeigt werden, dass das ROSA26-LacZ- Konstrukt nach der zweiten FACSsortierung (FACS II; vergl Abb.54D) verlorengegangen war.

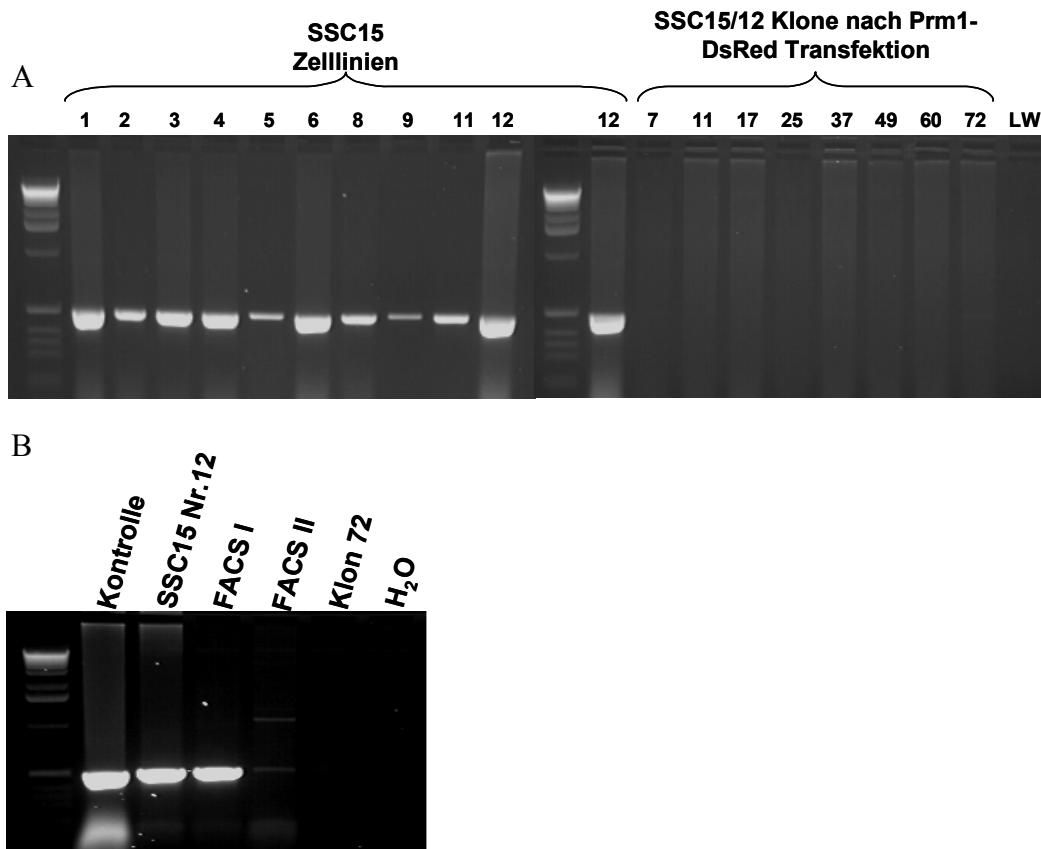


Abbildung 65:

Genotypisierung auf ROSA26-LacZ

A: Alle aus der doppelt-transgenen Maus isolierten Zelllinien (1-12) sind positiv (links), während die Prm1-DsRed- Klone von SSC15 Nr.12 negativ sind (rechts).

B: Bei detaillierterer Analyse der Zellen aus den verschiedenen Stufen des Differenzierungsprotokolls von SSC15 Nr. 12 stellte sich heraus, dass das Rosa26-LacZ-Konstrukt nach der zweiten Sortierung (FACS II) verloren gegangen war.

Zuordnung der untersuchten Zellen:

SSC15-Zelllinien, z.B. SSC15 Nr.12: vergl. Abb.54**A+B**; FACS I (**C**), FACS II (**D**), Klone nach Prm1-DsRed-Transfektion, z.B. Klon 72 (**F**).

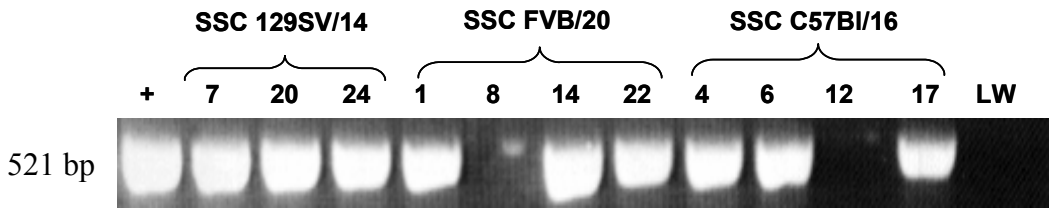


Abbildung 66: Genotypisierung der WT-SSC- Klone nach der Prm1-DsRed- Transfektion (vergl. Abb.54E)
Die Zelllinien SSC 129SV/14, SSC FVB/20 und SSC C57Bl/16 (E) wurden mit dem Prm1-DsRed- Konstrukt transfiziert und aus den resultierenden Klonen stabil transfizierte doppelt transgene Zelllinien generiert (F).

Nach Sequenzanalyse aller positiven Klone wurden folgende Zelllinien von der jeweiligen kryokonservierten DNA- Platte nach Replikaplattierung (2.16.9.3) wieder in Kultur genommen:

- SSC15 Nr.1Q
- SSC15 Nr.1J
- SSC15 Nr.12/72
- SSC FVB/20/22
- SSC C57Bl/16/4
- SSC 129SV/14/24

Die zwei doppelt transgenen WT-SSC- Zelllinien SSC FVB/20/22 und SSC C57Bl/16/4 (vergl. Abb.54F) wurden nur einmal hochgezogen und dann kryokonserviert (2.16.4), um die Anzahl der Zelllinien zu minimieren. Die übrigen vier Zelllinien wurden dem weiteren Differenzierungsprotokoll unterzogen, wobei jedoch nur die SSC15- Zelllinie genauer analysiert wurde.

3.4.6 Untersuchung molekularer Marker für die *in vitro* Spermatogenese (RT-PCR)

Für die folgenden RT- PCR- Analysen wurde Gesamt- RNA aus den Zellen isoliert (2.17.5) und anschließend aus je 5 µg RNA cDNA synthetisiert. Die Konzentration wurde mittels HPRT- PCR überprüft und äquivalente Mengen für die folgenden PCRs eingesetzt. Es wurden verschiedene Marker für unterschiedliche Stadien der Keimzellendifferenzierung verwendet. Abbildung 67 gibt einen Überblick über die eingesetzten Marker und den ungefähren Zeitpunkt ihrer Expression während der Keimzellendifferenzierung.

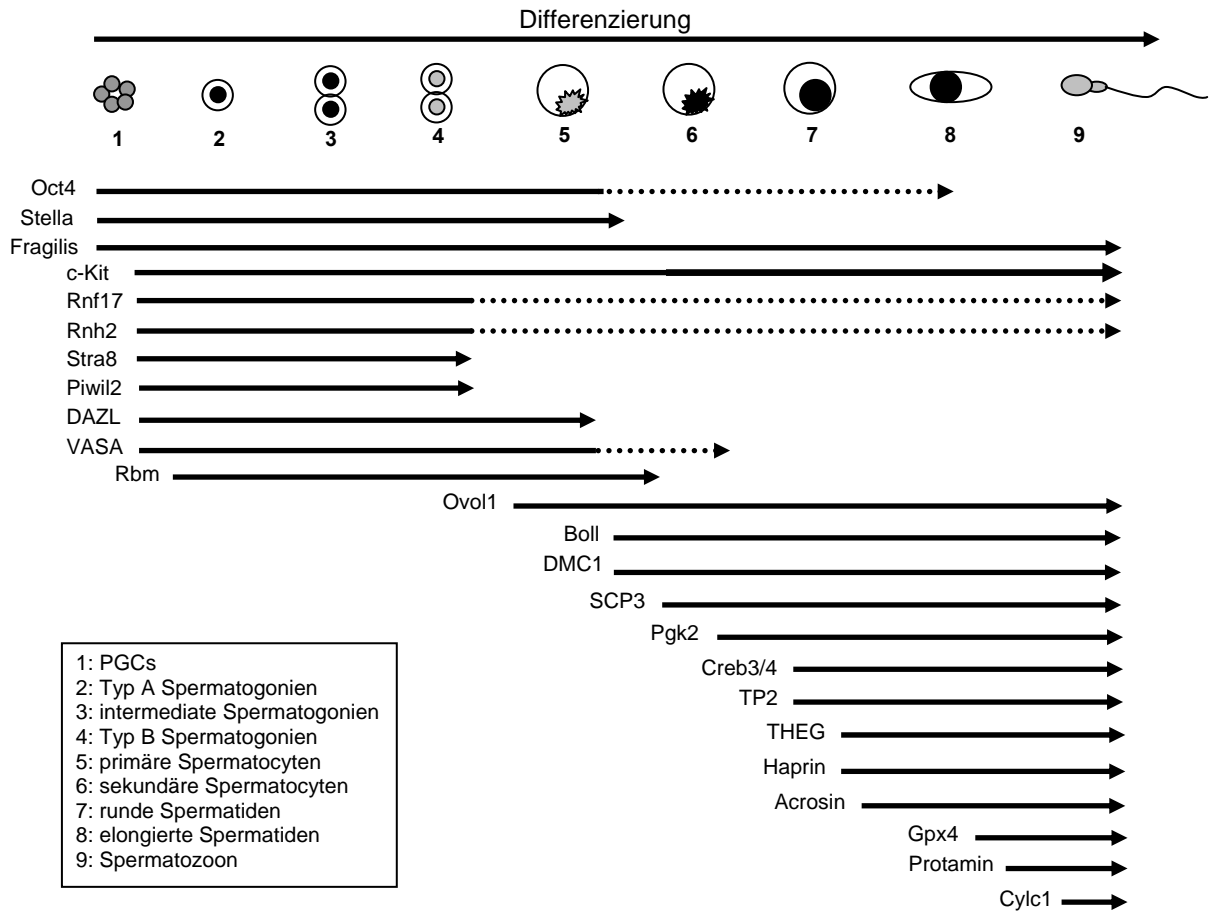


Abbildung 67: Expressionsmuster von Genen, die in verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermatogenese exprimiert werden und hier als Marker verwendet wurden.

Bereits nach der ersten FACSSortierung der Zelllinien SSC15 Nr.1 und Nr.4 konnten alle prämeiotischen, sowie einige meiotische und einige postmeiotische Marker detektiert werden (Abb.68). Nach 48h Induktion mit Retinsäure (vergl. Abb.54F) konnten alle getesteten Marker detektiert werden. Das Panel erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit, da die Liste der Marker zu einem späteren Zeitpunkt noch erweitert wurde.

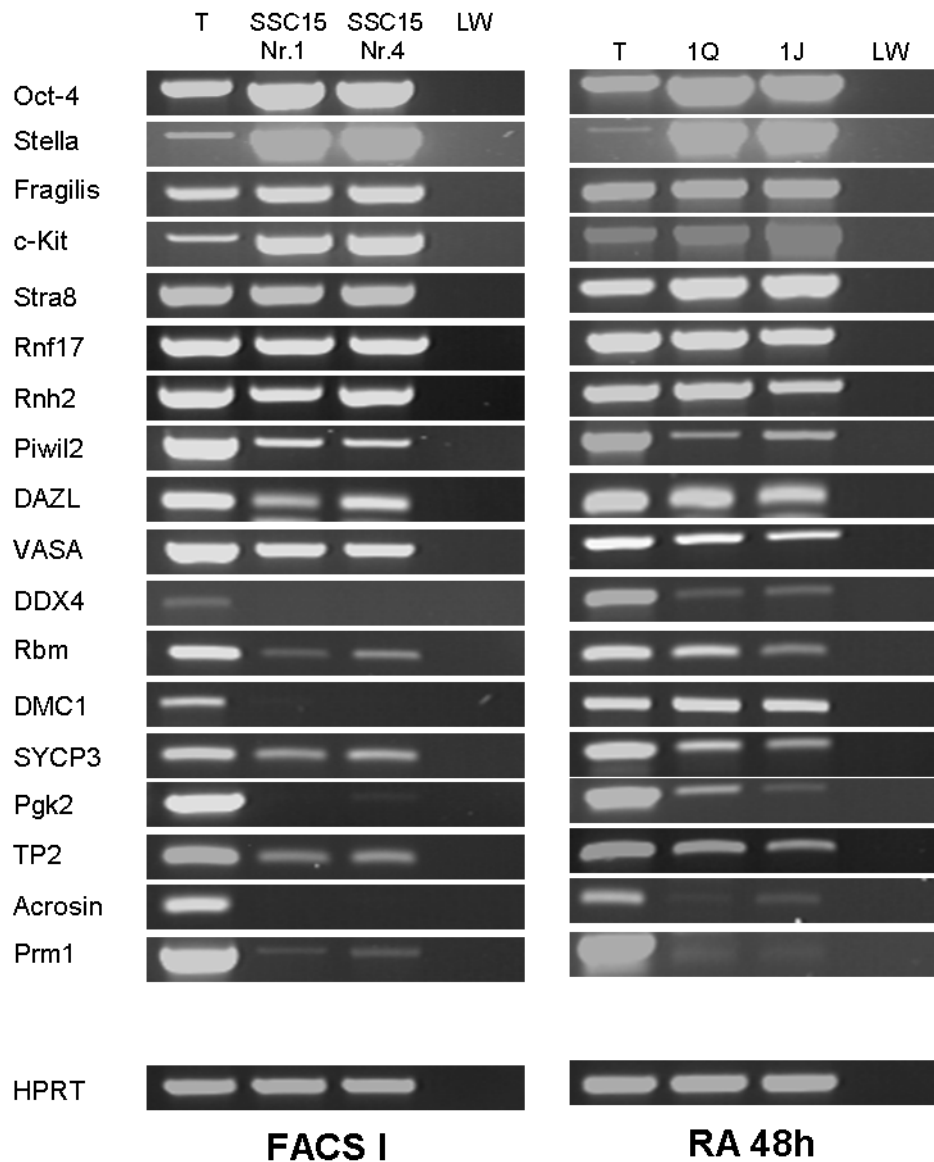


Abbildung 68: RT-PCR-Analyse von SSC15 Nr.1 und Nr.4 sowie den Prm1-DsRed- Klonen 1Q und 1J

Die linke Seite zeigt das Expressionsprofil nach FACS I (vergl. Abb.54C), die rechte Seite das nach 48h Induktion mit Retinsäure (vergl. Abb.54F)

T: positive Kontrolle (WT- Testis)

LW: negative Kontrolle (ohne Template)

Bereits in den unbehandelten Ausgangszellen SSC15 Nr.1 und SSC15 Nr.4 konnte die Expression der Gene Tsx (Testis specific X-linked gene) und MIS (Müllerian Inhibitory Substance) detektiert werden. Beide Gene werden in Sertoli- Zellen exprimiert. Auch exprimieren die Zellen SMA (Smooth Muscle Actin), welches ein spezifisches Markerprotein für testikuläre Muskelzellen ist. Der Leydig-Zell-Marker Insl3 hingegen wird von den Zellen nicht exprimiert (Abb.69A). Die Ausgangspopulation der SSC-Zelllinien scheint also auch Sertoli-Zellen zu enthalten. Auch die Marker THEG und Haprin, die in einem späten Stadium der Spermatogenese exprimiert werden, wurden untersucht. Allerdings wird nur Haprin exprimiert, was auf das Vorhandensein differenzierter Zellen hindeutet und nicht dem Muster der *in vivo* Differenzierung entspricht. Kultiviert man diese Zellen dagegen für sechs Passagen auf Gelatine ohne LIF, aber auch ohne RA- Induktion, so scheint es zu einer spontanen weiteren Differenzierung zu kommen, da unter diesen Bedingungen auch das THEG- Transkript (testis haploid expressed gene) detektiert werden kann (Abb.69B).

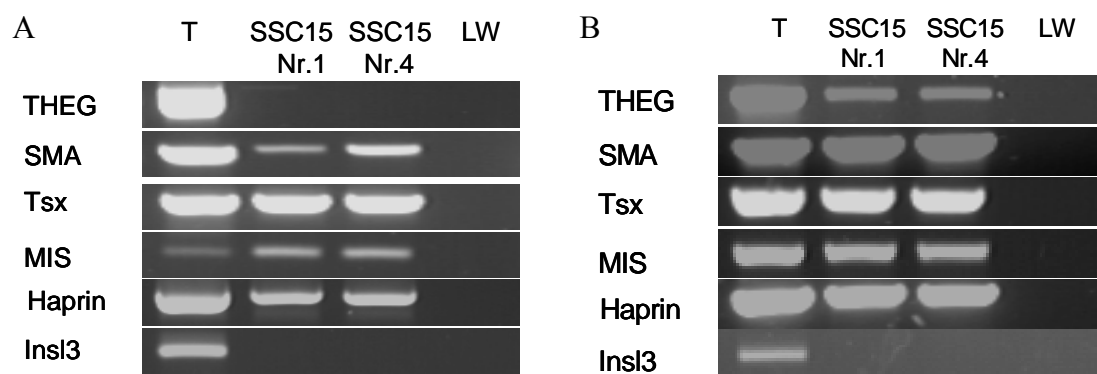


Abbildung 69: RT-PCR-Analyse der Ausgangszelllinien SSC15 Nr.1 und Nr.4

In Abbildung A ist das Expressionsprofil für die Ausgangszelllinien (vergl. Abb.54A+B) dargestellt; Abbildung B zeigt das Expressionsprofil nach sechs Passagen ohne Differenzierungs-hemmende Kulturbedingungen (vergl. Abb.54F).

T: positive Kontrolle (WT- Testis)

LW: negative Kontrolle (ohne Template)

Bei der Zelllinie SSC15 Nr.12 wurden etwas detailliertere RT-PCR-Analysen durchgeführt (Abb.70A). Hier wurden neben den Ausgangszellen (vergl. Abb.54B) und den Zellen am Ende des Differenzierungsprotokolls (vergl. Abb.54G) auch Zellen aus den einzelnen Zwischenschritten (vergl. Abb.54C bis F) analysiert. Außerdem wurden hier alle in Abbildung 67 aufgeführten Marker verwendet. Insgesamt blieb das Expressionsprofil aber vergleichbar. In allen untersuchten Stadien der Differenzierung

B

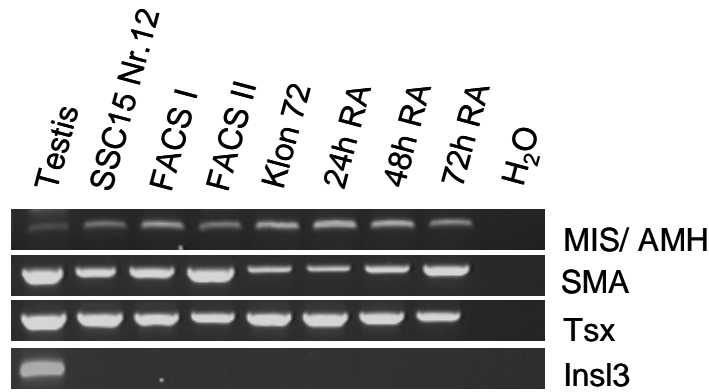


Abbildung 70: RT-PCR Analyse von SSC15 Nr.12 während der Differenzierung (vergl. Abb.54A bis G)

- A:** Expression der Spermatogenese- spezifischen Marker in der Ausgangszelllinie SSC15 Nr.12, nach FACS I, nach FACS II, nach Prm1-DsRed Transfektion (Klon72) und nach verschiedenen Induktionszeiten (24h, 48h und 72h) mit RA.
- B:** Expression der Leydig (Insl3)- und Sertoli-Zell-Marker (MIS und Tsx) sowie des Markers SMA für testikuläre Muskelzellen in der Zellpopulation.

3.4.7 Analyse der Haploidisierung: Bestimmung der DNA- Menge mittels Durchflußcytometrie

Um zu bestätigen, dass im Verlauf der Differenzierung der SSCs *in vitro* Haploidisierung stattgefunden hat, wurden die Zellen der Zelllinien SSC15 Nr.12/72 nach 48h Induktion mit RA und die Zellen der Zelllinien SSC15 Nr.1Q und 1J nach 72h Induktion mit RA (vergl. Abb.54F) über Durchflußcytometrie untersucht (2.16.11). Die Abbildung 71 zeigt die von der zum FACS- Gerät gehörenden Software gemachten Auswertungen in Diagrammform. Als positive Kontrolle und um die Parameter am FACS- Gerät einzustellen, diente eine testikuläre Zellsuspension (2.16.1). Man kann hier die unterschiedlichen Zellpopulationen nach dem DNA- Gehalt (1C, 2C, 4C) erkennen. Wichtig ist bei diesen Auswertungsprofilen nicht unbedingt die Lage der einzelnen Peaks, sondern vielmehr, ob der 1C- Peak laut Ordinatenbeschriftung genau halb so groß ist wie der Peak für 2C und dieser wiederum halb so groß ist wie der Peak für 4C. Die Lage der einzelnen Peaks wird auch durch die Art der Zellen, also Zellgröße, Granularität etc., mitbestimmt und ist daher für diese Untersuchung nicht von großer Bedeutung. Sind die Peaks allerdings in ihrer Lage übereinstimmend, bedeutet das, dass auch die Art der Zellen, die in der entsprechenden Zellpopulation detektiert werden, vergleichbar sind.

Die Analyse der Haploidisierung der Zelllinien SSC15 Nr.1J und 1Q zeigte das gleiche Grundmuster wie in der als Kontrolle verwendeten testikulären Zellsuspension. In der Zelllinie SSC15 Nr.12/72 ist auch die Lage der einzelnen Peaks vergleichbar. Die Zellen scheinen sich also ähnlich wie die Zellen im Testis zu verhalten, was bedeutet, dass ein bestimmter Teil die Meiose durchlaufen hat und somit als haploide Zellen detektiert werden kann.

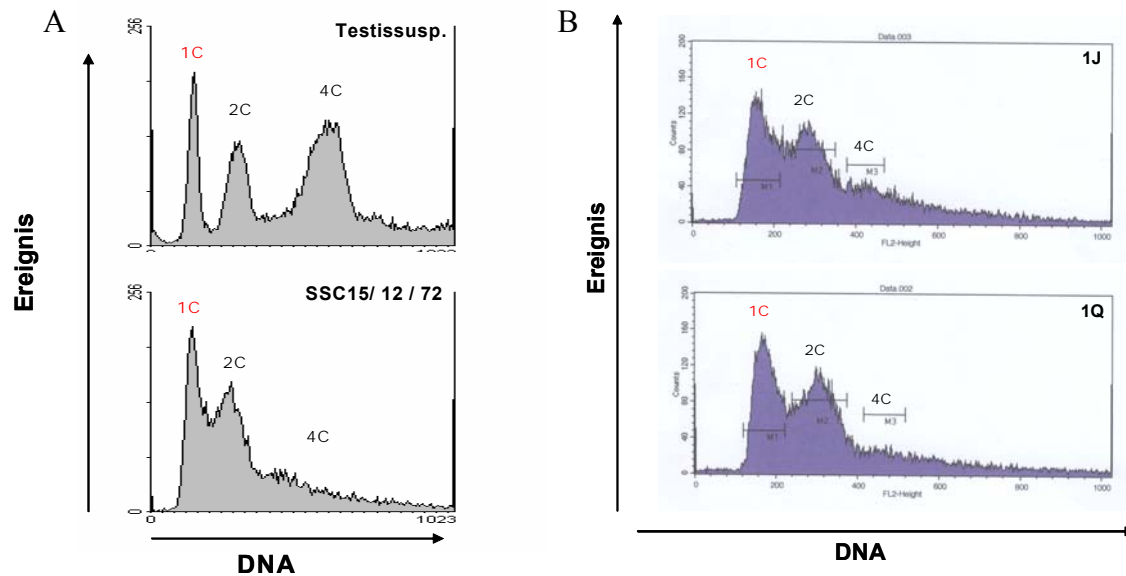


Abbildung 71: Analyse der Haploidisierung mittels Durchflußcytometrie

- A:** Die obere Abbildung zeigt das DNA- Profil einer Testissuspension (Positivkontrolle), die untere das Profil der Zelllinie SSC15 Nr.12/72 48h mit Retinsäureinduktion (vergl. Abb.54**F-G**).
- B:** Die obere Abbildung zeigt die Zelllinie SSC15 Nr.1J, die untere SSC15 Nr.1Q, jeweils nach 72h Induktion mit RA (vergl. Abb.54**F-G**).

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der prozentualen Anteile der verschiedenen Zellen mit 1C, 2C und 4C in den Zelllinien SSC15 Nr.12/72 48h RA, SSC15 Nr.1Q und 1J 72h RA (vergl. Abb.54**F-G**), entnommen aus den Auswertungen der FACScan Software.

Tabelle 8: Prozentualer Anteil der Zellen mit verschiedenen DNA- Gehalten während der *in vitro* Differenzierung

	Testissuspension	SSC15 Nr.1Q	SSC15 Nr. 1J	SSC15 Nr.12/72
1C	32,43 %	32,56 %	30,54 %	31,87 %
2C	12,68 %	35,36 %	28,16 %	24,93 %
4C	38,83 %	7,17 %	10,37 %	6,87 %

3.4.8 Analyse des Meiose- spezifischen synaptonemalen Komplexes

Um die Ergebnisse der Haploidisierungsanalyse zu unterstützen, sollte der Nachweis von Meiose-spezifischen Strukturen erfolgen. Am besten detektierbar ist hierbei der synaptonemale Komplex, der im Leptotän der Prophase I ausgebildet wird. Zellen, bei denen der synaptonemale Komplex nachgewiesen werden kann, sind also definitiv in die Meiose eingetreten. Der Nachweis erfolgte zum einen über eine Antikörperfärbung mit dem SCP3-Antikörper (Abb.72C). SCP3 steht für „synaptonemal complex protein 3“ und ist zusammen mit SCP1 und SCP2 maßgeblich an der Ausbildung des synaptonemalen Komplexes beteiligt. Ein weiterer Nachweis über die Ausbildung des Komplexes erfolgte über Elektronenmikroskopie (EM) und wurde von Prof. A. Meinhardt (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Giessen) durchgeführt. In den EM-Bildern ist deutlich die „Leiter“-Struktur des Komplexes zu erkennen (Abb.72B). Zum besseren Verständnis zeigt die Abbildung auch eine schematische Abbildung (Abb.72A).

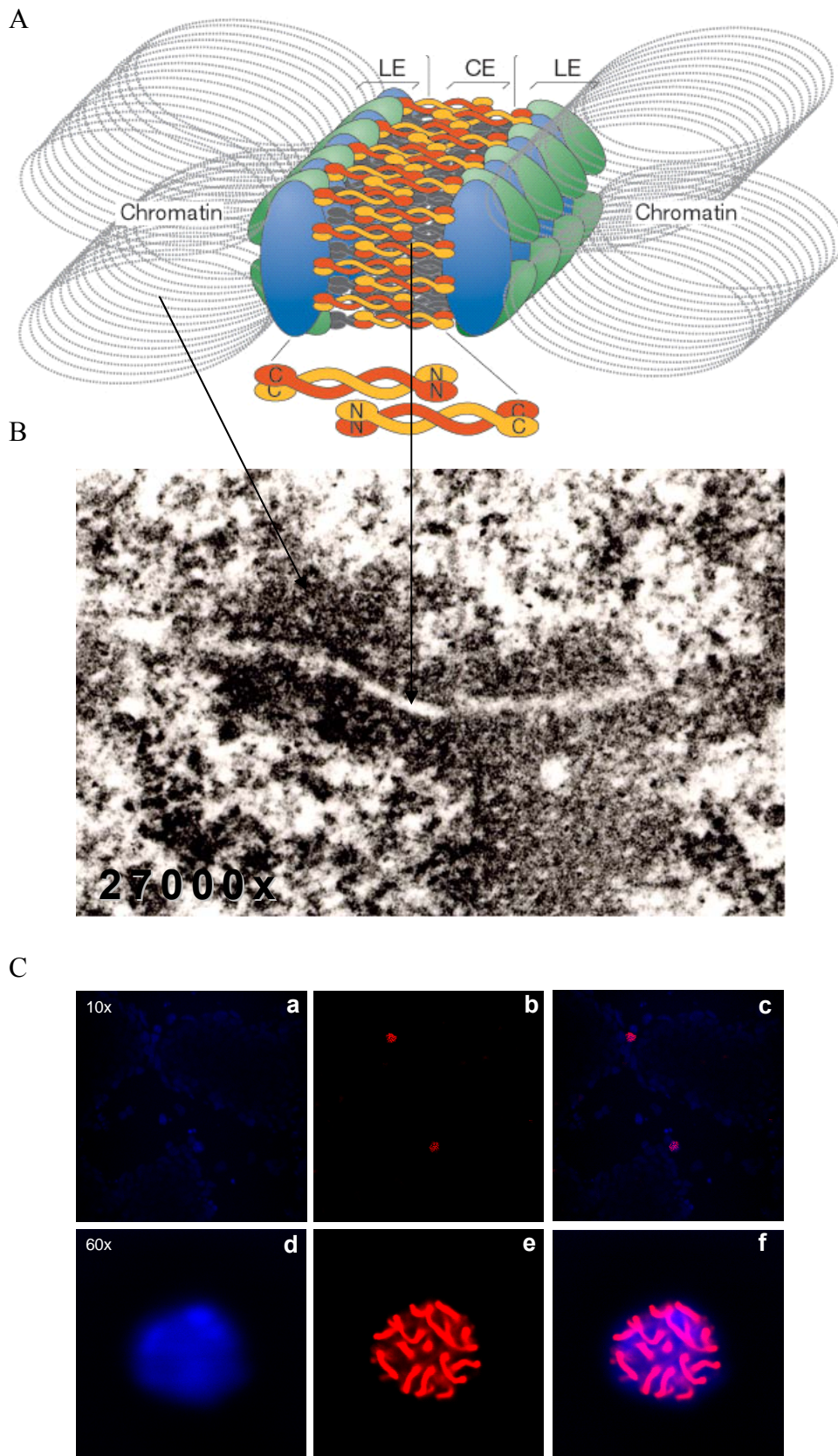


Abbildung 72: Analyse/ Darstellung des synaptonemalen Komplexes in SSC15 Nr.12/72- Zellen nach 48h Induktion mit Retinsäure (vergl. Abb.54F-G)

- A:** Schematische Darstellung (modifiziert nach Page & Hawley, 2004); LE: laterales Element; CE: zentrales Element
- B:** EM-Aufnahme des synaptonemalen Komplexes. Es sind deutlich die Chromatinschleifen und die Anordnung von LE-CE-LE zu erkennen.
- C:** Antikörperfärbung mit dem SCP3-Antikörper. a-c: 100fache Vergrößerung; d-f: 600fache Vergrößerung; a+d: Kernfärbung mit DAPI; b+e: SCP3; c+f: Überlagerung.

3.4.9 Detektion der Eigenfluoreszenz in den „Embryoid-Body-like“-Strukturen

Die Expression der Fluoreszenzproteine aus den Promotorkonstrukten zeigt den Differenzierungszustand der Zellen an. So bedeutet die EGFP- Expression unter dem Stra8-Promotor, dass sich die Zellen in der premeiotischen Phase der Spermatogenese befinden, während die DsRed- Expression unter dem Protamin1- Promotor auf einen Differenzierungszustand in der postmeiotischen Phase hinweist. Mit Beginn der Differenzierung bilden sich wie bereits erwähnt so genannte „Embryoid-Body-like“-Strukturen aus. Innerhalb dieser dreidimensionalen Strukturen findet die Differenzierung statt. Abbildung 73 zeigt eine konfokale Aufnahme solch einer Struktur nach der zweiten FACSSortierung (vergl. Abb.54**D**), sowie nach 72h Induktion mit Retinsäure von SSC15 Nr.12/72 (vergl. Abb.54**F-G**). Wie zu erwarten, sind in der FACS II- Abbildung nur EGFP⁺ Zellen zu erkennen, während nach 72h Induktion auch DsRed⁺ Zellen zu finden sind.

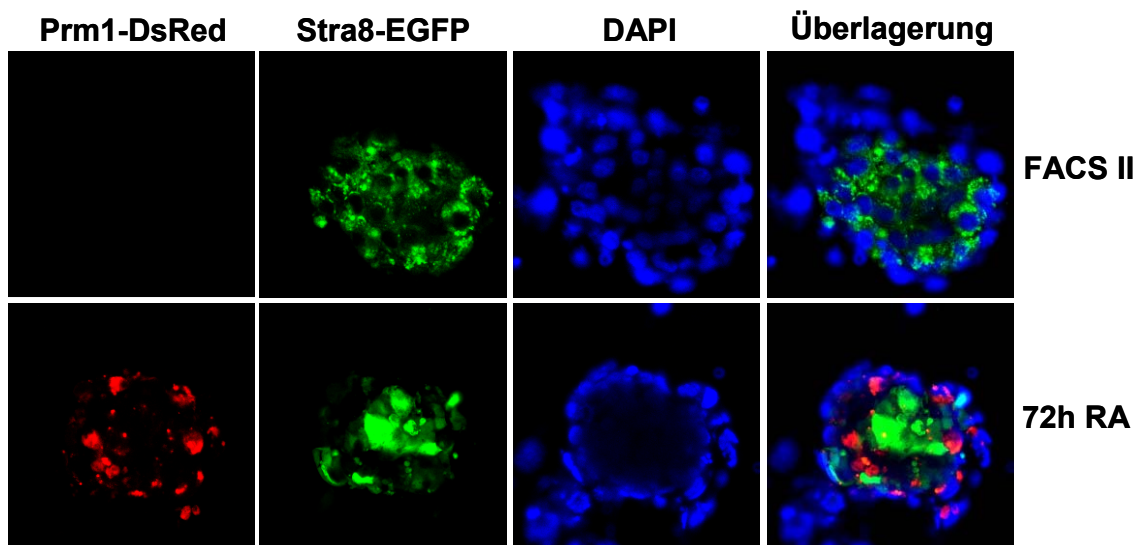


Abbildung 73: Konfokale Aufnahmen von „Embryoid-Body-like“- Strukturen in der SSC15 Nr.12/72- Linie

Um die Lokalisation der fluoreszierenden Zellen besser detektieren zu können, wurde ein solcher „Body“ mittels konfokaler Mikroskopie Ebene für Ebene gescannt (Abb.74).

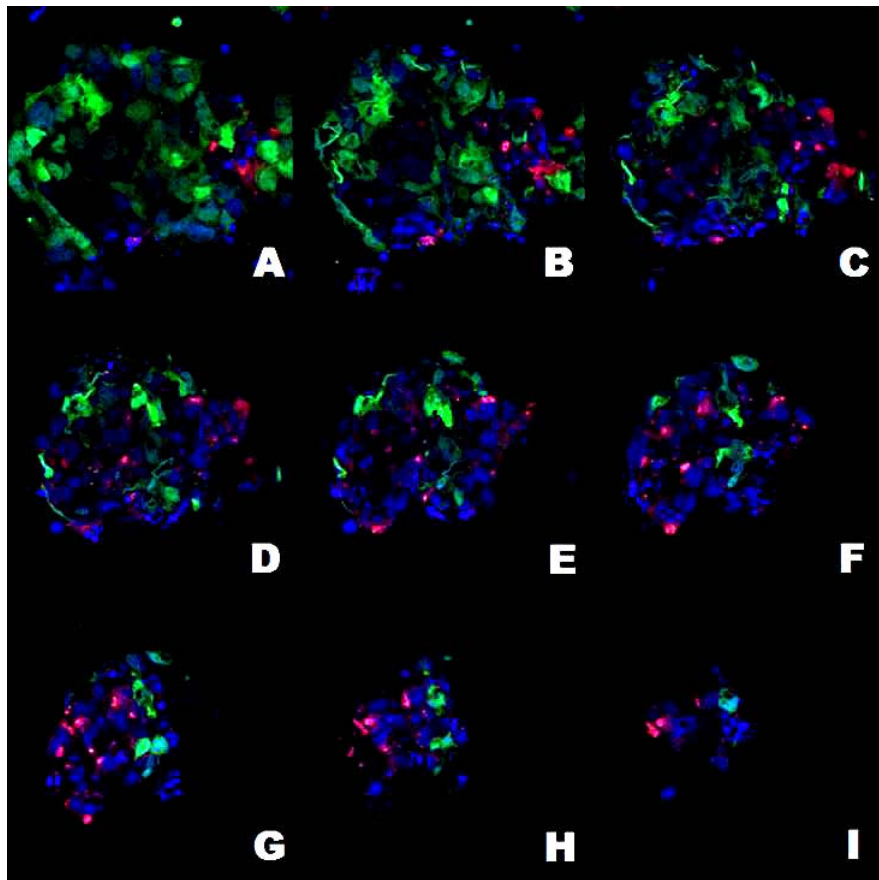


Abbildung 74: Konfokales Ebenen-Scanning einer „Embryoid-Body-like“ Struktur
Ein „Body“ der Zelllinie SSC15 Nr.12/72 72h RA (vergl. Abb.54**F-G**) wurde von der Oberfläche des Objektträger (A) nach oben hin bis zur letzten Zellschicht (I) gescannt.

In dieser Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass sich die prämeiotischen Zellen eher im unteren Teil eines „Bodies“ befinden, während die postmeiotischen Zellen eher im oberen Teil zu finden sind. Dies geht einher mit der Beobachtung, dass einige der postmeiotischen, „roten“ Zellen auch im Medium zu finden sind. Sie scheinen von den „Bodies“ ins Medium abgegeben zu werden (Abb.75).

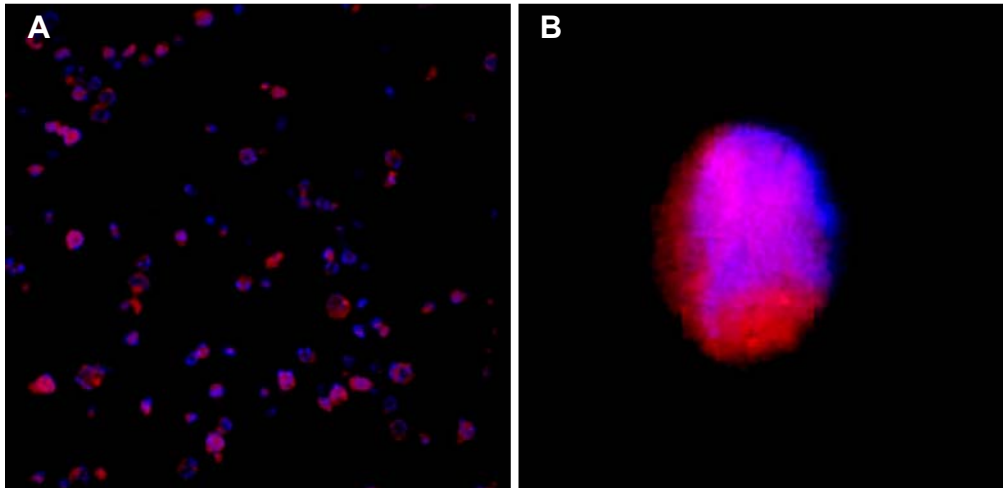


Abbildung 75: Einige sich im Medium befindliche Zellen zeigen DsRed-Expression

A: 100fache Vergrößerung

B: 600fache Vergrößerung

Blau: Kernfärbung mit DAPI

3.4.10 Immunhistochemie

Um die durch RT-PCR nachgewiesene Expression haploider Marker zu bestätigen, wurden an Zellen der Zelllinie SSC15 Nr.12/72 72h RA (vergl. Abb.54**F-G**) Antikörperfärbungen für verschiedene Marker durchgeführt (in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit). In Abbildung 76 ist zu erkennen, dass einige der Zellen deutlich positiv für die untersuchten Marker sind. Um der DsRed-Expression unter dem Prm1-Promoter zu entgehen, wurde hier ein alkalische Phosphatase- konjugierter sekundärer Antikörper gewählt und mit SIGMA FastRed[®] gefärbt. Nachdem im Institut ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop zur Verfügung stand, konnten die Färbungen für DAZL und PHGPx auch mit einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper durchgeführt werden. Es wurde über die gezielte Auswahl der Filter möglich, DsRed und Cy3 voneinander zu unterscheiden.

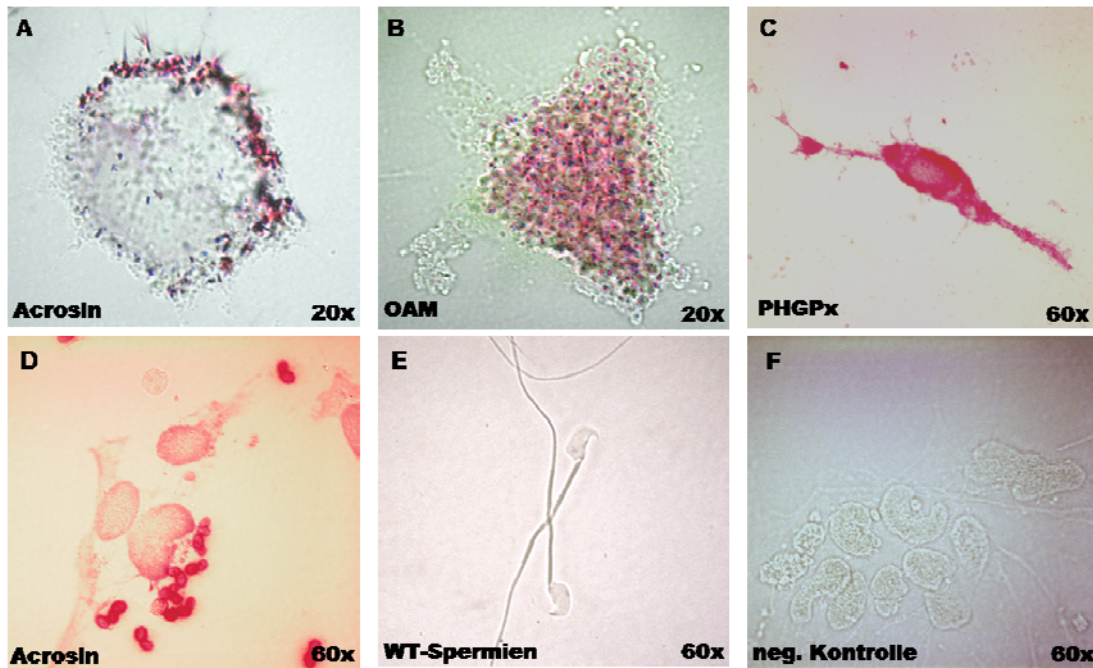


Abbildung 76: Immunhistologie von SSC15 Nr.12/72, 72h RA (vergl. Abb.54F)

- A: anti-Acrosin, 200fache Vergrößerung
- B: anti-OAM, 200fache Vergrößerung
- C: anti-PHGPx, 600fache Vergrößerung
- D: anti-Acrosin, 600fache Vergrößerung
- E: WT-Spermien, 600fache Vergrößerung, Größenvergleich
- F: negative Kontrolle, 600fache Vergrößerung

Dazl, ein Gen der DAZ („Deleted in Azoospermia“) Gen-Familie, wird nur in Keimzellen exprimiert. Es wird sowohl für die Entwicklung von Primordialen Keimzellen als auch für die Differenzierung und Reifung von Keimzellen späterer Stadien benötigt. Das Dazl- Protein ist bei Gonocyten im Nukleus und im Cytoplasma lokalisiert. In Spermatogonien zeigt DAZL Kernlokalisierung, während es während der Keimzeldifferenzierung, und hierbei explizit in der Meiose, zurück ins Cytoplasma transloziert (Reijo et al. 2000). In Abbildung 77 ist zu erkennen, dass in der Zellpopulation von SSC15 Nr.12/72 72h RA (vergl. Abb.54F-G) sowohl premeiotische (Kernlokalisierung) als auch meiotische Zellen (Cytoplasmalokalisierung) zu finden sind.

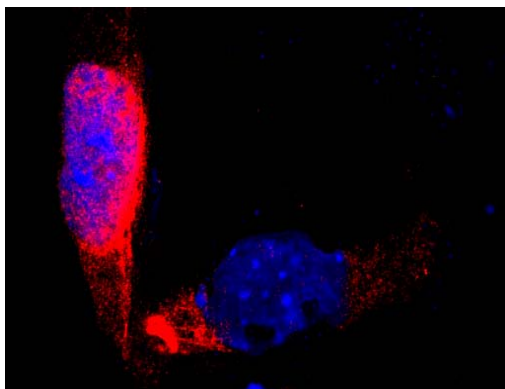


Abbildung 77: Antikörperfärbung gegen DAZL (konfokale Aufnahme)

Es ist deutlich zu erkennen, dass in der linken Zelle DAZL sowohl im Kern als auch im Cytoplasma lokalisiert ist, während in der rechten Zelle schon eine vollständige cytoplasmatische Lokalisation erkennbar ist. Die linke Zelle befindet sich also am Anfang der Meiose, während die rechte bereits die Meiose durchlaufen hat.

PHGPx (Phospholipid Hydroperoxid Glutathion Peroxidase) ist ein Selenoprotein und gehört zur Familie der Glutathion Peroxidasen. PHGPx- Expression ist spezifisch für Leydig-Zellen und postmeiotische Keimzellen im Testis. PHGPx-Protein ist in den Mitochondrien von Spermien lokalisiert (Nayernia et al, 2004b). Abbildung 78 zeigt PHGPx- Antikörperfärbung in länglichen Auswüchsen von induzierten SSC15 Nr.12/72- Zellen. Dies könnte auf eine beginnende Schwanzbildung hindeuten.

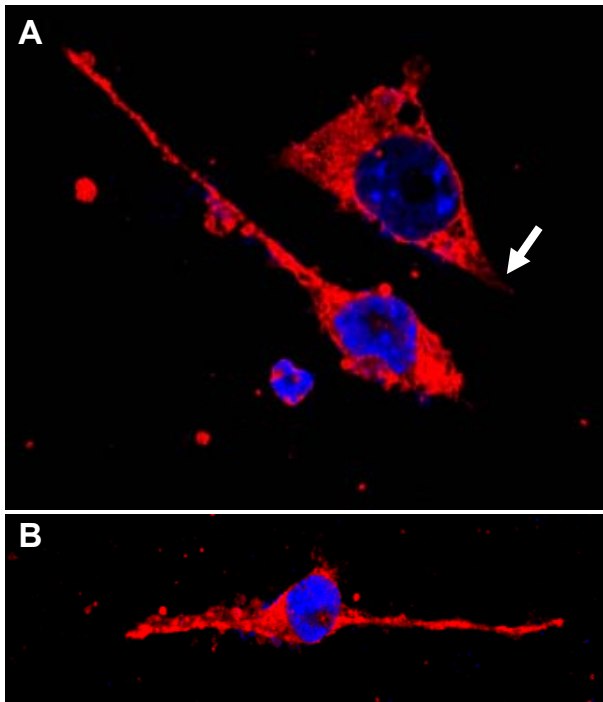


Abbildung 78:
PHGPx-Antikörperfärbung
(konfokale Aufnahme)

A: Es ist eine Spermien-ähnliche Schwanzstruktur bei einer der beiden Zellen zu erkennen. Bei der zweiten Zelle (→) könnte es sich um beginnende Schwanzbildung handeln.

B: Bei einigen Zellen konnten auch zwei Schwanz-ähnliche Auswüchse beobachtet werden.

3.4.11 Analyse der genomischen Prägung

Um die *in vitro* Differenzierung der Zellen weiter zu untersuchen, wurden die geprägten Gene H19, Snrpn und Igf2r in Zusammenarbeit mit Dr. Ulrich Zechner (Institut für Humangenetik, Mainz) mittels Bisulfit-Sequenzierung untersucht. Von diesen Genen ist bekannt, dass sich ihre Methylierung während der Spermatogenese ändert (Abb.79) (Lucifero et al., 2002).

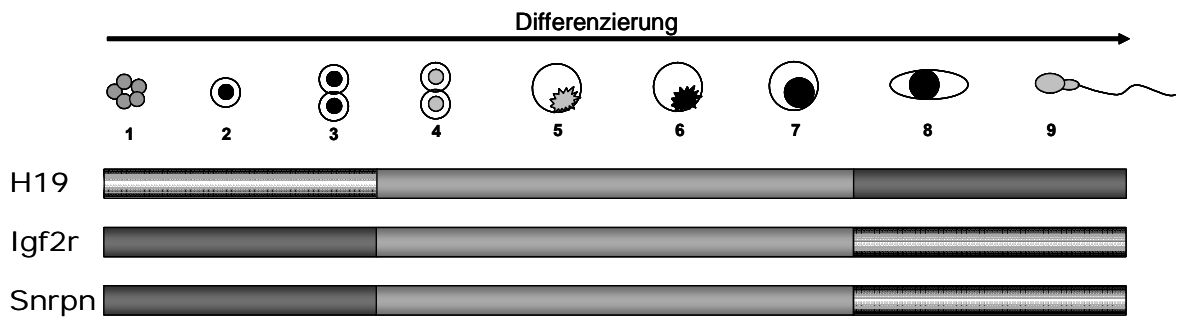


Abbildung 79: Schematische Darstellung der Methylierung in den ausgewählten Regionen der drei untersuchten Gene H19, Igf2r und Snrpn

Hellgrau: unmethyliert

Mittelgrau: beginnende Methylierung/ Demethylierung

Dunkelgrau: methyliert

1: PGCs (primordial germ cells)

2: Typ A Spermatogonien

3: intermediate Spermatogonien

4: Typ B Spermatogonien

5: primäre Spermatozyte

6: sekundäre Spermatozyte

7: runde Spermatiden

8: elongierte Spermatiden

9: Spermatozoon

Abbildung 80 zeigt jeweils ein Beispiel der erhaltenen Rohdaten nach der Bisulfit-Sequenzierung. Abbildung 81 enthält alle in Zusammenarbeit mit Dr. Zechner generierten Daten zur Methylierung der Gene während der *in vitro* Spermatogenese.

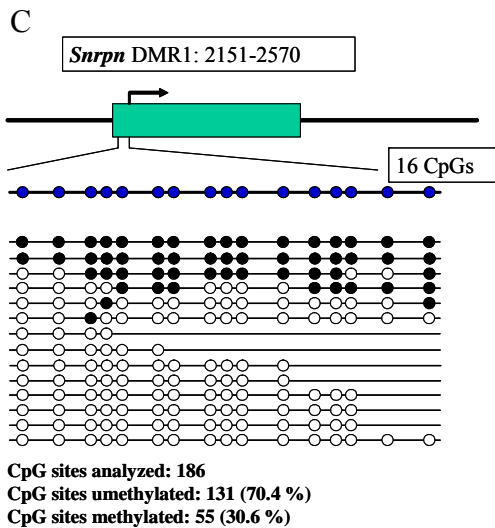
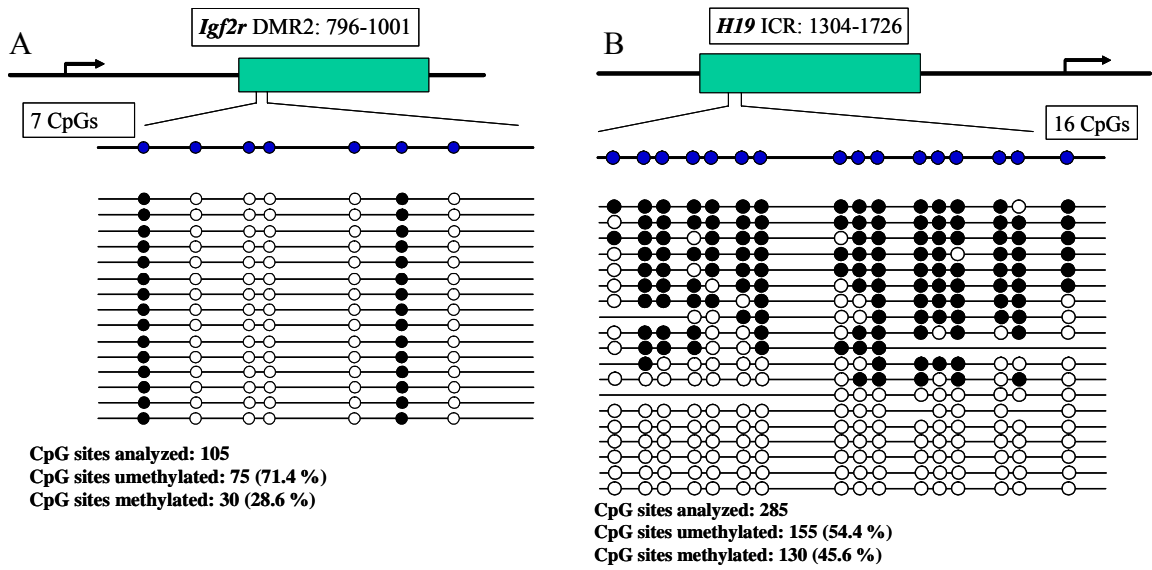
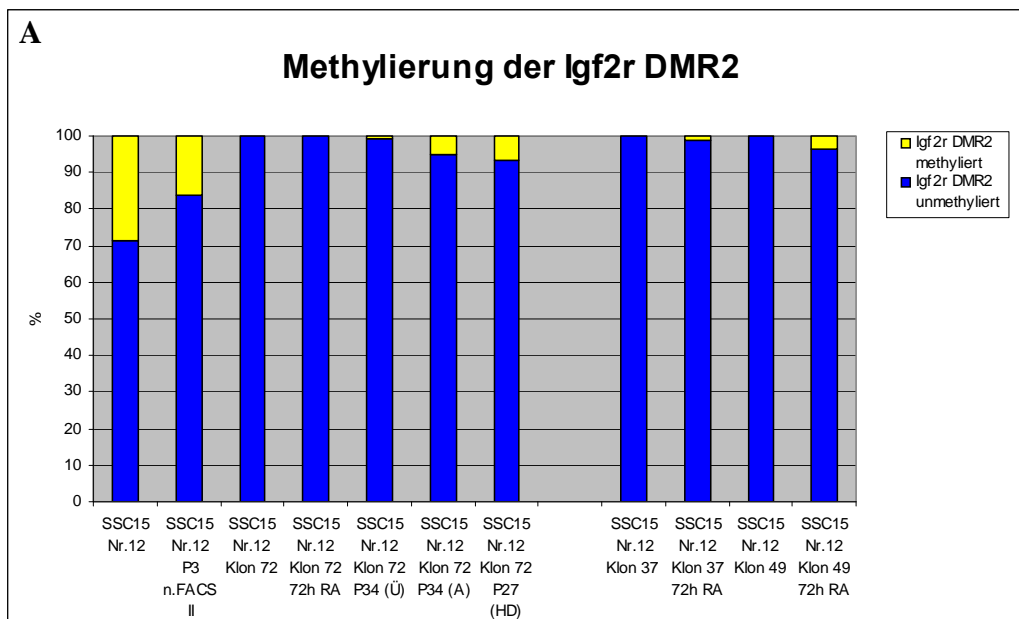


Abbildung 80: Rohdaten der Bisulfit-Sequenzierung für die Zellen der Zelllinie SSC15 Nr.12

- A: *Igf2r*- DMR2 (differentiell methylierte Region 2)
 - B: *H19*- ICR (imprinting control region)
 - C: *Snrpn*- DMR1 (differentiell methylierte Region 1)
- methylierte CpG- Inseln
 - nicht methylierte CpG- Inseln



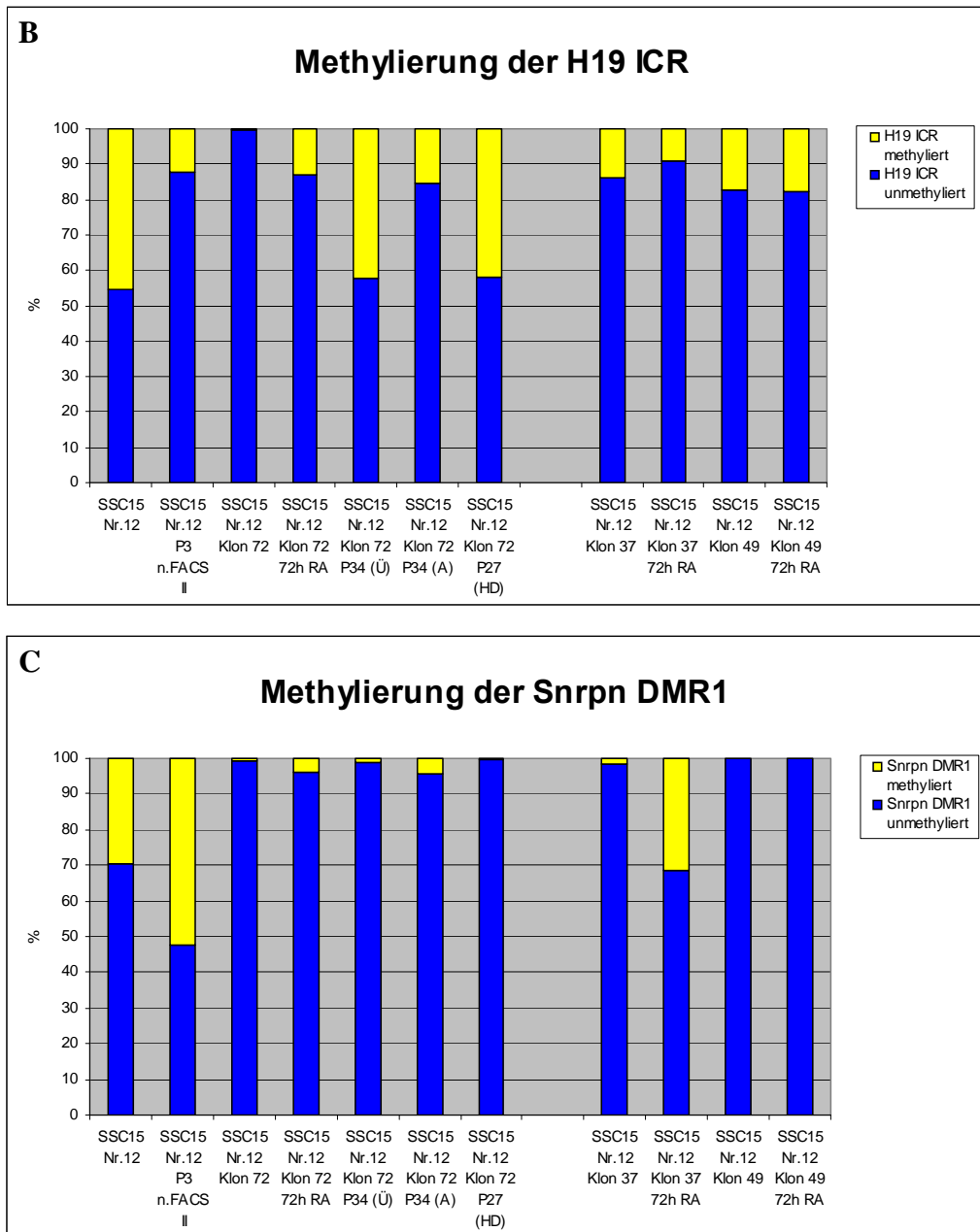


Abbildung 81: Graphische Darstellung des Methylierungs- Status in den untersuchten Regionen

- A: Methylierung in der DMR2 von Igf2r
- B: Methylierung in der ICR von H19
- C: Methylierung in der DMR1 von Snrpn

Dargestellt sind die Daten für die Zellen der Zelllinie SSC15 Nr.12 in verschiedenen Differenzierungsstadien (vergl. Abb.54A-G).

- 72h RA:** Induktion mit RA für 72h
- Ü:** Zellen aus dem Überstand
- A:** Adherente Zellen
- HD:** Zellen aus dem hängenden Tropfen

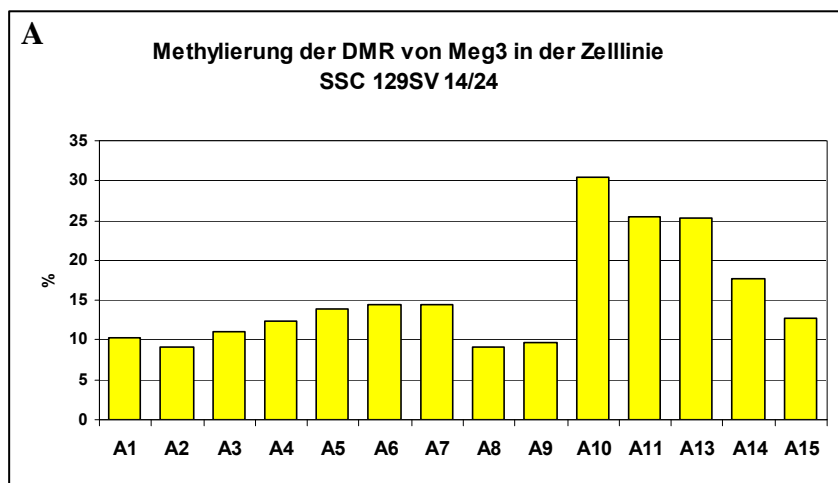
Anhand dieser Daten kann man erkennen, dass die Demethylierung von Igf2r und Snrpn schon während der ersten Schritte der Differenzierung relativ vollständig ist (vergl. Abb.54A-E). Die Methylierung von H19 hingegen erreicht auch in der Differenzierung der Zellen im hängenden Tropfen nicht mehr als ca. 40 % (vergl. Abb.54F-G). Die Differenzierung im hängenden Tropfen wurde an dieser Stelle zusätzlich untersucht, da es sich hierbei um ein Standard- Protokoll zur Differenzierung von pluripotenten Stammzellen handelt. Zu diesem Zeitpunkt konnte man also sagen, dass die Zellen teilweise entsprechend den Erwartungen methyliert/ demethyliert sind, dass aber das H19- Imprint noch nicht dem elongierter Spermatiden bzw. Spermatozoen entspricht. Zu diesem Zwecke wurden die Zellen der Zelllinien SSC15 Nr.12/72 und SSC129SV 14/24 einer Langzeit- Kultur mit bis zu 18tägiger Induktion mit Retinsäure unterzogen (vergl. Abb.54F-G) und davon sowohl die adhärenenten als auch die Zellen aus dem Überstand untersucht. Da es darum ging, die Methylierung von H19 zu überprüfen, wurde die Analyse auf Meg3 (maternally expressed gene 3) mittels Pyrosequenzierung (2.22.2) umgestellt. Für Meg3 wurde gezeigt, dass sich die Methylierung während der Spermatogenese ebenso verhält wie die für H19 (Hiura et al., 2007). Da die Pyrosequenzierung wesentlich schneller zu Ergebnissen führt, diese aber bis dato nur für Meg3 etabliert ist, wurden von den Proben aus Tabelle 9 CpG- Dinucleotide der DMR4 von Meg3 untersucht.

Tabelle 9: Zusammenstellung der Proben, in denen Meg3-Methylierung untersucht wurde.

Zellart Ü = Zellen, die ins Medium abgegeben wurden
 Zellart A = Adhärente Zellen der jeweiligen Zelllinie

Nr.	Zelllinie	Gelatine	RA (10-6M)	Zellart
A1	SSC 129SV 14/24	P22/ P13 auf Gelatine	ohne RA	Ü
A2	SSC 129SV 14/24	P22/ P13 auf Gelatine	24h RA	A
A3	SSC 129SV 14/24	P22/ P13 auf Gelatine	24h RA	Ü
A4	SSC 129SV 14/24	P23/ P14 auf Gelatine	48h RA	A
A5	SSC 129SV 14/24	P23/ P14 auf Gelatine	48h RA	Ü
A6	SSC 129SV 14/24	P23/ P14 auf Gelatine	72h RA	A
A7	SSC 129SV 14/24	P23/ P14 auf Gelatine	72h RA	Ü
A8	SSC 129SV 14/24	P22/ P14 auf Gelatine	8d RA	A
A9	SSC 129SV 14/24	P22/ P14 auf Gelatine	8d RA	Ü
A10	SSC 129SV 14/24	P21/ P13 auf Gelatine	10d RA	A
A11	SSC 129SV 14/24	P21/ P13 auf Gelatine	10d RA	Ü
A12				
A13	SSC 129SV 14/24	P21/ P13 auf Gelatine	15d RA	Ü
A14	SSC 129SV 14/24	P22/ P14 auf Gelatine	18d RA	A
A15	SSC 129SV 14/24	P22/ P14 auf Gelatine	18d RA	Ü
B1	SSC15 Nr.12/72	P22/ P12 auf Gelatine	ohne RA	Ü
B2	SSC15 Nr.12/72	P22/ P12 auf Gelatine	24h RA	A
B3	SSC15 Nr.12/72	P22/ P12 auf Gelatine	24h RA	Ü
B4	SSC15 Nr.12/72	P23/ P13 auf Gelatine	48h RA	A
B5	SSC15 Nr.12/72	P23/ P13 auf Gelatine	48h RA	Ü
B6	SSC15 Nr.12/72	P23/ P13 auf Gelatine	72h RA	A
B7	SSC15 Nr.12/72	P23/ P13 auf Gelatine	72h RA	Ü
B8	SSC15 Nr.12/72	P21/ P13 auf Gelatine	8d RA	A
B9	SSC15 Nr.12/72	P21/ P13 auf Gelatine	8d RA	Ü
B10	SSC15 Nr.12/72	P22/ P12 auf Gelatine	10d RA	A
B11	SSC15 Nr.12/72	P21/ P11 auf Gelatine	10d RA	Ü
B12				
B13	SSC15 Nr.12/72	P21/ P11 auf Gelatine	15d RA	Ü
B14	SSC15 Nr.12/72	P22/ P13 auf Gelatine	18d RA	A
B15	SSC15 Nr.12/72	P22/ P12 auf Gelatine	18d RA	Ü

Die Abbildung 82 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Analyse.



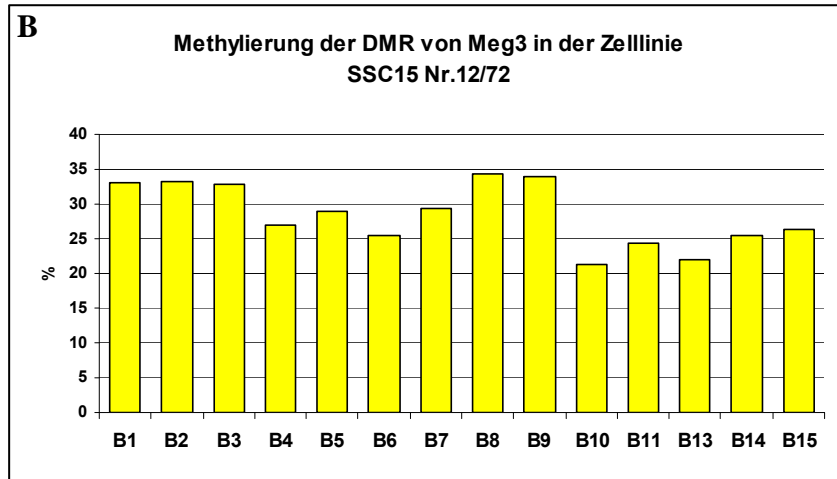


Abbildung 82: Ergebnisse der Pyrosequenzierung der DMR von Meg3

- A:** Methylierung in den unterschiedlich differenzierten Zellen der Zelllinien SSC129SV 14/24 (Probenbezeichnung siehe Tabelle 9).
- B:** Methylierung in der unterschiedlich differenzierten Zellen der Zelllinie SSC15 Nr.12/72 (Probenbezeichnung siehe Tabelle 9).

In der Zelllinie SSC129SV 14/24, die bislang noch nicht weiter hinsichtlich der Methylierung untersucht wurde, konnte nur nach 10 bis 15 Tagen Induktion (A10 – A13) eine Zunahme der Methylierung auf bis zu 30% detektiert werden. Dies liegt jedoch deutlich unter den Werten für die Zelllinie SSC15 Nr.12/72, bei welcher bereits ohne Langzeitkultur eine Methylierung von ca. 40% beobachtet werden konnte. Aber auch hier bewegte sich der Anteil der methylierten Zellen in der Langzeitkultur bei fast allen Proben zwischen 30 und 35%, wobei der Anteil bei den länger induzierten Zellen eher wieder abzunehmen scheint.

3.4.12 Intrazytoplasmatische Spermien- Injektion (ICSI)

(vergl. Abb.54H)

Um die Funktionalität der generierten und sehr wahrscheinlich haploiden Zellen zu testen, wurden intracytoplasmatische Gameten- Injektionen (intracytoplasmic sperm injection = ICSI) durchgeführt. Dazu wurde in den ersten Durchgängen versucht, die DsRed- exprimierenden (haploiden) Zellen mittels FACS zu isolieren (Abb.83). Da das vorhandene FACS- Gerät aber nicht genau auf die Wellenlänge der DsRed- Fluoreszenz eingestellt werden kann, gestaltete sich dieses Vorhaben schwierig. Zum einen konnten nur wenige Zellen aufgereinigt werden und zum anderen wiesen die Zellen nach der Sortier- Prozedur morphologisch sichtbare Schäden auf. Nach der Injektion dieser

Zellen konnten keine oder nur degenerierte 2-Zeller erhalten werden (Tabelle 10, Versuch 1-6).

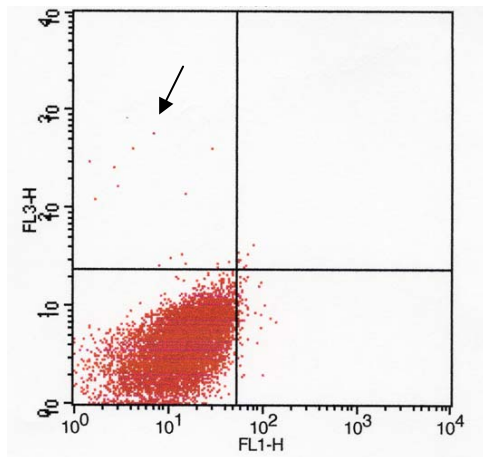


Abbildung 83:
FACSoring auf DsRed- positive Zellen

Die DsRed⁺ Zellen (siehe Pfeil) machten einen Anteil von 0,16% aus. Das entsprach in diesem Versuch 256 Zellen.

Zelllinie SSC15 Nr.12 1Q

Nach mehreren missglückten Versuchen, auf DsRed sortierte Zellen für die ICSI zu verwenden, wurden Zellen der Zelllinie SSC15 Nr.12/72 in verschiedenen Differenzierungszuständen und sowohl adhärenzte als auch Zellen aus dem Überstand für die ICSI verwendet. Da man davon ausgehen muss, dass haploide Zellen kleiner sind als diploide, war das Selektionskriterium für die Auswahl der Zellen für die Injektion (ICSI) lediglich die Größe. Tabelle 10 gibt einen Überblick, wie viele Injektionen mit welchen Zellen bis dato durchgeführt wurden.

Tabelle 10: Zusammenfassung aller bis dato durchgeführten Injektionen

Laufende Nummer	Zelllinie	Zellart	Differenzierung	Anzahl der Injektionen	Anzahl 2-Zeller	Retransfer	Bemerkung
1	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	51	1	nein	FACS- Sortierung auf DsRed-Expression
2	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	42	0	----	FACS- Sortierung auf DsRed-Expression
3	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	20	0	----	FACS- Sortierung auf DsRed-Expression
4	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	20	2	nein	FACS- Sortierung auf DsRed-Expression
5	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	32	1	nein	FACS- Sortierung auf DsRed-Expression
6	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	24	3	nein	FACS- Sortierung auf DsRed-Expression
7	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	24	1	ja	keine NKO's
8	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	21	7	ja	keine NKO's
9	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	27	6	nein	
10	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	24	3	nein	
11	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	25	1	nein	
12	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	17	1	nein	
13	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	18	8	nein	
14	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	8	1	nein	
15	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	31	21	ja	C57Bl Oocyten
16							keine NKO's
17	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	27	17	ja	C57Bl Oocyten
18							keine NKO's
19	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	27	14	nein	hohe Parthenogenererate
20	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	20	9	nein	bei Kontrollzellen
21	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	39	22	nein	hohe Parthenogenererate
22	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	30	18	nein	bei Kontrollzellen
23	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	19	5	nein	
24	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	14	7	nein	
25	SSC15 Nr.12/72	Adherent	72h RA	12	7	nein	
26	SSC15 Nr.12/72	Überstand	72h RA	10	8	nein	
27	SSC15 Nr.12/72	Adherent	5d RA	7	0	----	unreife Oocyten
28	SSC15 Nr.12/72	Überstand	5d RA	7	0	----	unreife Oocyten
29	SSC15 Nr.12/72	Adherent	5d RA	15	2	nein	unreife Oocyten
30	SSC15 Nr.12/72	Überstand	5d RA	15	0	----	unreife Oocyten
31	SSC15 Nr.12/72	HD	10 Tage +RA	36	33	nein	hohe Parthenogenererate
32	SSC15 Nr.12/72	Überstand	5d RA	36	29	nein	bei Kontrollzellen
33	SSC15 Nr.12/72	HD	10 Tage +RA	48	39	nein	hohe Parthenogenererate
34	SSC15 Nr.12/72	Überstand	5d RA	48	38	nein	bei Kontrollzellen
35	SSC15 Nr.12/72	HD	10 Tage +RA	32	18	nein	hohe Parthenogenererate
36	SSC15 Nr.12/72	Überstand	5d RA	29	18	nein	bei Kontrollzellen
37	SSC15 Nr.12/72	HD	10 Tage +RA 10-5	44	18	nein	hohe Parthenogenererate
38							bei Kontrollzellen
39	SSC15 Nr.12/72	HD	10 Tage +RA 10-5	56	15	nein	Kultur
40	SSC15 Nr.12/72	HD	10 Tage +RA 10-5	24	2	nein	
41	SSC15 Nr.12/72	Adherent	10 Tage +RA	8	0	----	Kultur in M16
42	SSC15 Nr.12/72	Überstand	10 Tage +RA	12	0	----	Kultur in humanem ICSI- Medium
43	SSC15 Nr.12/72	Adherent	10 Tage +RA	12	0	----	Kultur in humanem ICSI- Medium
44	SSC15 Nr.12/72	Überstand	10 Tage +RA	8	2	nein	Kultur in M16
45	SSC15 Nr.12/72	Adherent	10 Tage +RA	52	7	nein	Kultur in humanem ICSI- Medium
46							Weiterentwicklung bis zum 8-Zeller
47	SSC15 Nr.12/72	Adherent	10 Tage +RA	33	6	nein	Genotypisierungs- PCR
48	SSC15 Nr.12/72	Überstand	10 Tage +RA	32	6	nein	Genotypisierungs- PCR
49	SSC 129SV 14/24	Adherent	72h RA	26	23	nein	hohe Parthenogenererate
50	SSC 129SV 14/24	Überstand	72h RA	26	23	nein	bei Kontrollzellen
51	SSC 129SV 14/24	Adherent	72h RA	28	0	----	NMRI Oocyten
52	SSC 129SV 14/24	Überstand	72h RA	28	0	----	NMRI Oocyten
53	SSC 129SV 14/24	Adherent	5 Tage RA	11	0	----	NMRI Oocyten
54	SSC 129SV 14/24	Überstand	5 Tage RA	8	0	----	NMRI Oocyten
55	SSC15 Nr.12/72	Adherent	5 Tage RA	26	23	ja	NMRI Oocyten aus dem MPI
56	SSC15 Nr.12/72	Überstand	5 Tage RA	26	23	ja	NMRI Oocyten aus dem MPI
57	SSC15 Nr.12/72	Adherent	5 Tage RA	32	14	ja	NMRI Oocyten aus dem MPI
58	SSC15 Nr.12/72	Überstand	5 Tage RA	27	13	ja	NMRI Oocyten aus dem MPI
59	SSC15 Nr.12/72	Adherent	5 Tage RA	28	21	ja	NMRI Oocyten aus dem MPI
60	SSC15 Nr.12/72	Überstand	5 Tage RA	28	9	ja	NMRI Oocyten aus dem MPI
61	SSC15 Nr.12/72	Adherent	5 Tage RA	24	6	ja	NMRI Oocyten aus dem MPI
62	SSC15 Nr.12/72	Überstand	5 Tage RA	23	7	ja	NMRI Oocyten aus dem MPI
63	SSC15 Nr.12/72	Adherent	5 Tage RA	24	5	ja	NMRI Oocyten aus dem MPI
64	SSC15 Nr.12/72	Überstand	5 Tage RA	24	7	ja	NMRI Oocyten aus dem MPI

Die aus Versuch 47 und 48 erhaltenen 2-Zeller wurden auf das Vorhandensein des Prm1-DsRed- Konstruktes genotypisiert. Es wurde aus insgesamt 11 2-Zellern DNA isoliert (2.17.4) und mit dem Primerpaar Prm1pr-F2 und RED-R4 genotypisiert (Abb.84).



Abbildung 84: Prm1-DsRed- Genotypisierung der 2-Zeller

- +: Prm1-DsRed- Plasmid (Verdünnung)
- 1-11: 2-Zeller aus Versuch 47 und 48
- : negative Kontrolle (genomische DNA einer WT-Maus)
- LW: negative Kontrolle (ohne Template)

Von den elf getesteten 2-Zellern konnte in zweien das Prm1- DsRed- Konstrukt nachgewiesen werden. Leider reichte die isolierte DNA nur für eine PCR aus, so dass weder eine Aussage darüber gemacht werden kann, ob es auch positive 2-Zeller für das Stra8-EGFP- Konstrukt gibt, noch, ob überhaupt aus allen 2-Zellern DNA gewonnen werden konnte.

Die aus Versuch 44 und 45 stammenden 2-Zeller wurden weiter kultiviert, um zu sehen, wie weit sich die Embryonen in Kultur entwickeln (Abb.85). Die Embryonen entwickelten sich teilweise zu 4-Zellern und auch zu 8-Zellern, wobei diese dann aber anfangen zu degenerieren.

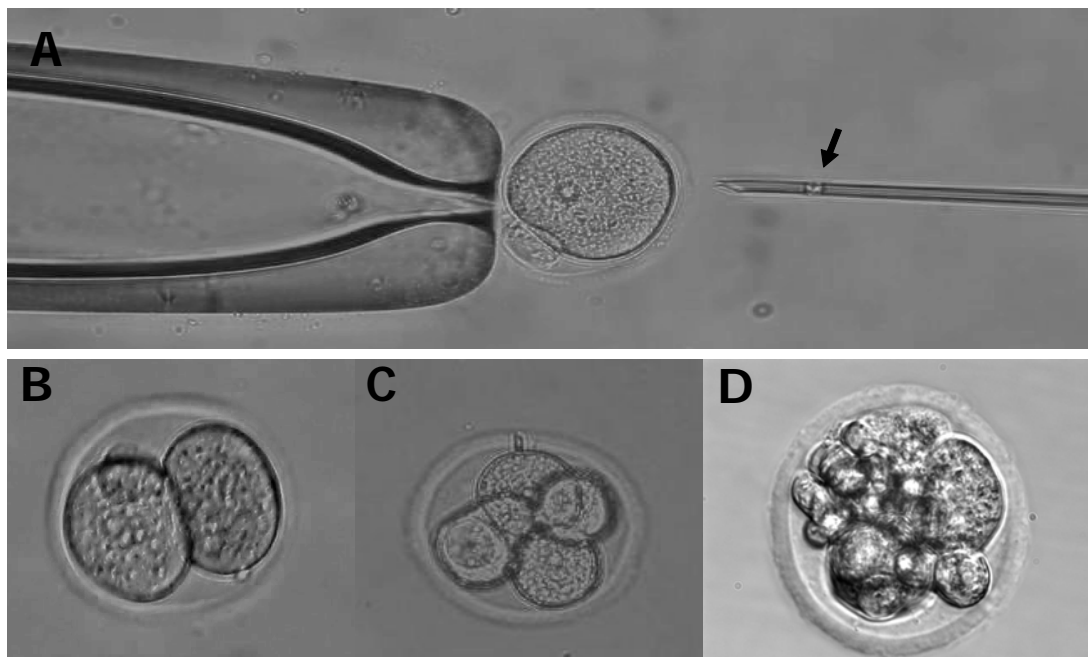


Abbildung 85: Intracytoplasmatische Injektion von haploiden Keimzellen

- A: Oocyte, durch die Haltepipette fixiert. Haploide Zelle (Pfeil) in der Injektionskanüle.
- B: 2-Zeller (Tag1 nach ICSI)
- C: 4-Zeller (Tag2 nach ICSI)
- D: Degenerierter 8-Zeller (Tag3 nach ICSI)

Die aus den Versuchen 55 bis 64 erhaltenen 2-Zeller wurden in scheinsschwangere CD1 oder NMRI- Weibchen retransferiert (2.21.3). Je nach Anzahl der aus der ICSI stammenden Embryonen wurden auch so genannte Helferembryonen mittransferiert. Dabei handelt es sich um auf natürlichem Wege generierte 2-Zeller aus dem gleichen genetischen Hintergrund. Das Mittransferieren von Helferembryonen ist nötig, da es bei einer zu geringen Anzahl an Embryonen nicht zu einer Weiterentwicklung kommt. Es wurden also insgesamt immer 14 bis 16 Embryonen retransferiert. Bis dato wurden neun Mäuse nach Retransfer geboren. Die Genotypisierung für das Prm1-DsRed-Konstrukt brachte keine deutlichen Ergebnisse. Die Genotypisierung für das Stra8-EGFP- Konstrukt hingegen zeigte möglicherweise 4 positive Mäuse an (Abb.86).

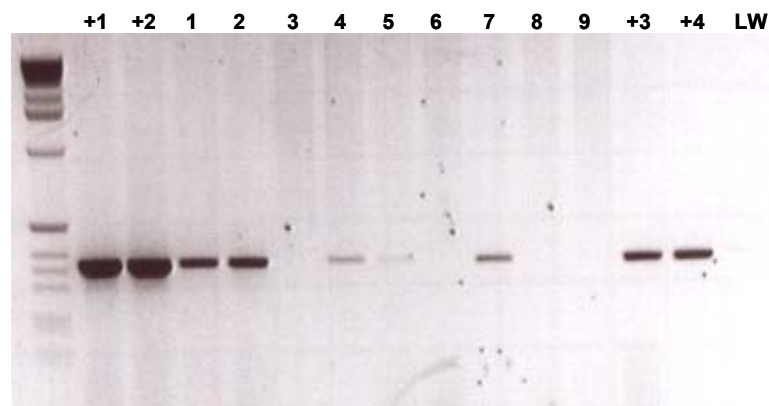


Abbildung 86: Genotypisierung der ICSI- NKOs auf das Stra8-EGFP- Konstrukt

- +1, +2: positive Kontrollen (genomische DNA aus Schwanzbiopsien einer für das Stra8-EGFP- Konstrukt transgenen Maus)
 1 bis 9: genomische DNA aus Schwanzbiopsien der ICSI- NKOs
 +3, +4: positive Kontrollen (SSC15 Nr.12 und Nr.1)
 LW: negative Kontrolle (ohne Template)

Um zu bestätigen, dass es sich bei den laut Genotypisierungs- PCR positiven Tieren tatsächlich um Nachkommen der Zellen handelt, die für die ICSI verwendet wurden, werden momentan Southern Blot- Analysen durchgeführt.

4 DISKUSSION

4.1 Generierung und Vergleich von murinen ES- und SSC- Zelllinien

4.1.1 Generierung von ES- Zelllinien

Da es für den Vergleich mit den verschiedenen, bereits im Institut vorhandenen SSC- Zelllinien nötig war, ES- Zelllinien aus Mäusen des jeweils gleichen genetischen Hintergrundes zu haben, sollten ES- Zelllinien der Hintergründe Stra8-EGFP (transgene Maus), FVB und C57Bl/6 generiert werden. Eine ES- Zelllinie des Hintergrundes 129 Sv (ES- RI) existiert bereits (Nagy et al., 1993) und konnte bei der Analyse der neuen ES- Zelllinien als Kontrolle verwendet werden. Die Isolierung erfolgte leicht modifiziert nach einer bereits publizierten Methode (Cheng et al., 2004). Dabei wurde gezeigt, dass die Isolierung und Generierung von ES- Zelllinien mit einem neu auf den Markt gekommenen Serum- freien Medium effizienter und einfacher ist, als mit dem herkömmlichen Serum- haltigen Medium.

Insgesamt konnten aus allen drei Hintergründen mehrere ES- Zelllinien generiert werden, die sich morphologisch nicht von der Zelllinie ES- RI unterschieden. Um Zellen des gleichen Geschlechts miteinander vergleichen zu können, mussten die einzelnen ES- Zelllinien genotypisiert werden. Der Vergleich mit den SSC- Zelllinien erfolgte immer mit einer XY- ES- Zelllinie des gleichen genetischen Hintergrundes. Bevor die neu generierten ES- Zelllinien für die Vergleichsanalysen verwendet werden konnten, wurden sie mittels Western Blot- Analysen auf die Expression der bekannten Pluripotenzmarker Oct4, Sox2, Nanog, Sall4 und Zfp206 untersucht. Es zeigte sich, dass alle eingesetzten ES- Zelllinien eine ähnliche Expression dieser Marker haben – Unterschiede lassen sich durch den genetischen Hintergrund erklären.

4.1.2 Generierung von SSC- Zelllinien

Die Generierung von SSC- Zelllinien wurde bis dato schon mehrmals beschrieben. So erzeugte z.B. die Arbeitsgruppe um Li-Xin Feng (Feng et al., 2002) eine spermatogoniale Stammzelllinie aus isolierten TypA Spermatogonien. Diese Zellen

wurden in Kultur über ein Retrovirus- System mit der Telomerase katalytischen Komponente TERT transfektiert und über den Einsatz von Retroviren selektioniert. TERT wird in den Stammzellen der männlichen Keimbahn stark exprimiert (Ravindranath et al., 1997), aber während der Keimzellendifferenzierung nimmt die Expression stark ab. Es konnte eine Stammzelllinie etabliert werden, die auch nach einem Jahr in Kultur noch spermatogoniale Marker wie c-Kit, Oct-4 und DAZL exprimierten. Nach induzierter Differenzierung durch SCF (stem cell factor) konnten über einen SCP3- spezifischen Antikörper meiotische Zellen nachgewiesen werden, eine Analyse der Zellen über Durchflußzytometrie zeigte das Vorhandensein von haploiden Zellen und auch die Expression von Acrosin und Protamin wurde nachgewiesen.

Auch die Arbeitsgruppe um Marie-Claude Hofmann (Hofmann et al., 2005) isolierte TypA Spermatogonien und kultivierte sie als Keimbahn- Stammzellen, jedoch ist es aufgrund der geringen Anzahl von Spermatogonien im Testis bis dato immer ein Problem gewesen, eine homogene Population von Spermatogonien bzw. SSCs zu isolieren (Sofikitis et al., 2005). Auch konnte von den o.g. Arbeitsgruppen zwar nachgewiesen werden, dass es sich um eine Kultur von SSCs bzw. Spermatogonien handelt, es ist aber nicht gelungen, die Zellen zu einem pluripotenten Status zu reprogrammieren.

Die erste Arbeit, die die Generierung von pluripotenten ES- Zell- ähnlichen Stammzelllinien aus SSCs beschreibt, wurde 2004 von Kanatsu-Shinohara et al. veröffentlicht. Die Arbeitsgruppe verwendete testikuläre Zellsuspensionen aus Testes neugeborener Mäuse. Naturgemäß sind in diesem Stadium der Entwicklung nur frühe Spermatogonien inklusive der SSCs vorhanden. So konnte von vornherein eine Anreicherung von SSCs erzielt werden. Nach Kultur dieser Zellen unter ES- Zell- Kulturbedingungen und unter Zugabe von GDNF (glial cell derived neurotrophic factor) konnten nach 4-7 Monaten Zellcluster generiert werden, die nach Trennung von den übrigen Zellen und Vereinzelung proliferierende ES- Zell- ähnliche Zelllinien hervorbrachten. GDNF wird *in vivo* von den Sertolizellen produziert und ist wahrscheinlich der wichtigste Wachstumsfaktor für die Regulation von SSC- Proliferation und -Selbsterneuerung (Meng et al., 2000; Kubota et al., 2004; Ryu et al., 2005; Oatley et al., 2006). Die weitere Analyse dieser Zelllinien zeigte, dass sie alle Kriterien einer pluripotenten Zelllinie erfüllen: Die Zellen konnten sowohl *in vivo* (Teratome) als auch *in vitro* zu Derivaten aller drei Keimblätter differenzieren, sie exprimierten alle bekannten Pluripotenzmarker und brachten nach Injektion in

Blastozysten Chimären hervor, die auch transmittierten. Die Isolierung solcher Zelllinien aus adulten Mäusen war dieser Arbeitsgruppe nicht gelungen, wahrscheinlich aufgrund eines fehlenden Markers zur Anreicherung der SSCs.

Hier lag der Vorteil unseres Ansatzes zur Isolierung von SSCs aus adultem Testis (Guan,..., Nolte et al., 2006). Über die Isolierung von spermatogonialen Stadien (inklusive der SSCs) über die *Stra8* Expression in unserer *Stra8*-EGFP- transgenen Maus konnten wir eine ähnliche Anreicherung erzielen wie die Gruppe um Kanatsu-Shinohara. Indem die Zellen nach der FACS Sortierung direkt unter ES- Zell-Bedingungen unter Zusatz von GDNF kultiviert wurden, konnten bereits innerhalb von zwei Wochen ES- Zell- ähnliche Zellcluster beobachtet werden, die, isoliert und vereinzelt, ES- Zell- ähnliche Zelllinien hervorbrachten. Diese Zelllinien (genannt maGSC – multipotent adult germ line stem cells) erfüllen alle Kriterien einer pluripotenten Stammzelllinie: Sie konnten sowohl *in vivo* (Teratome) als auch *in vitro* in Derivate aller drei Keimblätter differenzieren, exprimierten Pluripotenzmarker und brachten Chimären hervor. Nachdem die Isolations- und Kulturbedingungen etabliert waren, gelang es auch aus testikulären Zellsuspensionen von Wildtyp- Mausstämmen (FVB, C57Bl/6, 129SV) SSC- Zelllinien zu generieren, wenn auch – aufgrund der fehlenden Anreicherung – zu einem geringeren Prozentsatz.

2007 wurden die Ergebnisse unserer Arbeit von der Arbeitsgruppe Seandel et al. bestätigt. Auch sie waren in der Lage, ES- Zell- ähnliche SSC- Zelllinien aus adulten Testis zu generieren. Über eine knock-in Maus, die β -Galaktosidase unter der Kontrolle des nativen *Gpr125*- Promotors exprimiert, konnten die spermatogonialen Stadien angereichert werden. *Gpr125* kodiert für einen Rezeptor, der im Testis ausschließlich in Spermatogonien und frühen Spermatozyten exprimiert ist. Die Ausgangspopulation entsprach also in etwa der unsrigen, da das Expressionsprofil von *Gpr125* mit dem von *Stra8* übereinstimmt. Ein Unterschied in der Generierung von pluripotenten Zelllinien aus diesen Zellpopulationen ergab sich, da Seandel et al. die Zellen nach der Isolierung für drei Monate auf inaktivierten somatischen testikulären Zellen mit GDNF im Medium kultivierte und erst nach der Isolierung und Vereinzelnung der sich bildenden Zellcluster auf ES- Zell- Bedingungen umstellte. Evtl. ist das der Grund, warum die Etablierung von pluripotenten SSC- Zelllinien wesentlich mehr Zeit in Anspruch nahm als das bei uns der Fall war. Alle weiteren Ergebnisse konnten aber mit den von Seandel et al. generierten Zelllinien bestätigt werden.

Kürzlich wurden zwei weitere Arbeiten veröffentlicht, in welchen die Generierung von pluripotenten Zelllinien aus SSCs beschrieben ist (Kanatsu-Shinohara et al., 2008; Izadyar et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Francisco Silva (Izadyar et al., 2008) wählte für die Isolierung von SSCs eine transgene Maus (OG2), die EGFP unter der Kontrolle des Keimbahn- spezifischen Oct4 Promotors exprimiert (Yeom et al., 1996). Nach differentiellem Plattieren konnten aus testikulären Suspensionen neugeborener Mäuse 4-10% EGFP⁺ Zellen und aus adulten Mäusen 0,01- 0,05% EGFP⁺ Zellen angereichert werden. Dieser Anteil entspricht dem Anteil an SSCs von 0,03% im adulten Testes (Tegelenbosch und De Rooij, 1993). Interessanter Weise verloren die Zellen in Kultur die EGFP- Expression innerhalb der ersten Tage und erlangten sie erst nach weiteren drei bis vier Wochen in Kultur unter ES- Zell- Bedingungen zurück. Dies spricht für eine Reprogrammierung der Zellen in einen pluripotenten Status. Einen weiteren Beweis für diese Hypothese lieferte die Arbeit von Kanatsu-Shinohara et al. (2008), die zeigen konnten, dass eine einzelne SSC- Zelle nicht pluripotent ist, aus ihr jedoch nach Kultur eine pluripotente Zelllinie hervorgehen kann.

Die Silva- Arbeitsgruppe wählte zusätzlich zur Oct4- Expression ein weiteres Kriterium zur Isolierung und Generierung von SSC- Zelllinien: die Expression von c-Kit. c-Kit kodiert für einen Tyrosin-Kinase- Rezeptor und ist zusammen mit seinem Liganden SCF (stem cell factor) für die Regulation von Wachstum und Überleben der primordialen Keimzellen verantwortlich (De Miguel et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass c-Kit im postnatalen Testis ein Marker für die Differenzierung von undifferenzierten und differenzierenden TypA- Spermato gonien ist (Schrans-Stassen et al., 1999). Interessanterweise konnten pluripotente Zelllinien nur aus der Population EGFP⁺/c-Kit⁺ generiert werden, die bis auf eine Ausnahme (keine Teratombildung) alle weiteren Kriterien für die Pluripotenz erfüllten. Während diese Population nach Transplantationsassay nicht in der Lage war, Spermatogenese neu zu initiieren, war das sehr wohl der Fall bei der EGFP⁺/c-Kit⁻ Zellpopulation, aus der im Gegenzug aber keine pluripotenten Zelllinien generiert werden konnten. Dies lässt den Schluss zu, dass es verschiedene Zellpopulationen innerhalb der Spermato gonien gibt, die in der Lage sind unter bestimmten Kulturbedingungen zu pluripotenten Zellen reprogrammiert zu werden. Tabelle 11 gibt noch einmal eine Zusammenfassung der wichtigsten Fakten der bisher veröffentlichten Arbeiten.

Tabelle 11: Übersicht über die wichtigsten Fakten der verschiedenen Arbeiten

	Kanatsu-Shinohara et al., 2004	Guan et al., 2006	Seandel et al., 2007	Kanatsu-Shinohara et al., 2008	Izadyar et al., 2008
Ausgangsmaterial	Testes neonataler Mäuse	Testes adulter Mäuse	Testes adulter Mäuse	Testes adulter Mäuse	Testes neo-nataler und adulter Mäuse
Selektion/ Marker	Morphologie	Straß-Expression ; Morphologie	GPR125	Morphologie	Oct4- und c-Kit-Expression ; Morphologie
Morphologie	ES- Zell-Morphologie	ES- Zell-Morphologie	ES- Zell-Morphologie	ES- Zell-Morphologie	ES- Zell-ähnlich
Kulturbedingungen	Standard ES- Zell-Bedingungen	Standard ES- Zell-Bedingungen	Standard ES- Zell-Bedingungen	Standard ES- Zell-Bedingungen	Standard ES- Zell-Bedingungen
Pluripotenzmarker	Oct4 Nanog Rex1 Utf1 Dppa5 (Esg1) AP- positiv SSEA1	Oct4 Nanog Sox2 Utf1 Rex1 Dppa5 (Esg1) AP- positiv SSEA1	Oct4 Nanog Sox2	Oct4 Sox2 Klf4 Myc	Oct4 Nanog Sox2 Rex1 Dppa5 SSEA-1 AP- positiv
Teratome	ja	ja	ja	ja	nein
Chimären	ja	ja	ja	ja	Sehr niedrig prozentige Chimären
EB		ja	ja	Nicht gezeigt	ja
Differenzierung	In Derivate aller drei Keimblätter sowohl <i>in vivo</i> als auch <i>in vitro</i>	In Derivate aller drei Keimblätter sowohl <i>in vivo</i> als auch <i>in vitro</i>	In Derivate aller drei Keimblätter sowohl <i>in vivo</i> als auch <i>in vitro</i>	Nicht gezeigt	In Derivate aller drei Keimblätter - nur <i>in vitro</i>

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass es über verschiedenste Ansätze gelungen ist, pluripotente Zelllinien aus Testes neugeborener und adulter Mäuse zu generieren und damit ein neues Feld für die entwicklungsbiologische und klinische Forschung entstanden ist (eine Übersicht gibt die Arbeit de Rooij und Mizrak, 2008).

4.1.3 Vergleich von ES- und SSC- Zelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollten die unterschiedlichen SSC- und ES-Zelllinien verschiedenen genetischen Hintergrundes detailliert miteinander verglichen werden. Als erstes wurde die Expression von Pluripotenzmarkern auf Proteinebene mittels Western Blot- Analysen untersucht. Es zeigte sich insgesamt ein einheitliches Expressionsprofil, wobei es innerhalb der einzelnen Zelllinien von Passage zu Passage bzw. von Proteinisolation zu Proteinisolation zu leichten Schwankungen kam. Dies ist ein häufig beobachtetes Phänomen, da pluripotente Stammzelllinien sehr empfindlich sind und so durch leichte Unterschiede während der Kultur ihr Expressionsprofil ändern. Da es trotz der Differenzierungs- hemmenden Bedingungen doch immer wieder zu einer partiellen spontanen Differenzierung kommt, lassen sich die Schwankungen in der Expression der Pluripotenzmarker erklären. Innerhalb dieses Versuchsabschnitts wurde auch eine Langzeitkultur der Zelllinie SSC FVB untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Pluripotenzmarker auch nach 70 Passagen (das entspricht etwa einem Jahr Dauerkultur) noch exprimiert werden.

Um über Transkriptom- bzw. Proteomuntersuchungen einen Hinweis auf bislang unbekannte Pluripotengene zu erhalten, sollten ES- und SSC- Zelllinien so lange einer ungerichteten Differenzierung ausgesetzt werden, bis sie Ihren pluripotenten Status verlieren. Dies wurde anhand der Expression der Pluripotenzmarker Oct4 und Sox2 auf Proteinebene mittels Western Blot- Analysen untersucht. Es stellte sich heraus, dass nach 20 Tagen Induktion mit Retinsäure die o.g. Pluripotenzmarker nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Für die folgenden Versuche innerhalb der Arbeitsgruppe wurden also immer Zellen genommen, die einer 20tägigen Behandlung mit Retinsäure ausgesetzt waren. Unsere Hypothese war, dass man bei einem Vergleich des Transkriptoms bzw. Proteoms von undifferenzierten und differenzierten Zellen einen Hinweis auf bis dato unbekannte Pluripotenzmarker erhalten kann. Deren Expression sollte dann in den differenzierten Zellen deutlich herunterreguliert sein.

4.1.3.1 Transkriptom- Analysen

Die Transkriptomanalysen werden zur Zeit im Rahmen der biologischen Doktorarbeit von Frau Sandra Meyer weiter durchgeführt. Beim Vergleich von undifferenzierten ES- und SSC- Zelllinien stellte sich heraus, dass sich die beiden pluripotenten Zelltypen nur

minimal voneinander unterscheiden. Von 44.000 Oligos, die auf dem verwendeten Chip vorhanden sind, werden nur ca. 1.000 unterschiedlich exprimiert, wenn man den CutOff von 2 (vierfacher Unterschied) zugrunde legt (Abb.87).



Abbildung 87: Ergebnis der Transkriptomuntersuchung von ES- und SSC-Zelllinien bei einem CutOff von 2

43.000 Oligos zeigen eine sehr ähnliche Expression in den beiden pluripotenten Zelltypen. 306 sind stärker in ES- Zelllinien exprimiert, 553 in SSC- Zelllinien.

Die Ergebnisse des Arrays konnten zwischenzeitlich von Frau Meyer mittels RealTime-PCR- Analysen bestätigt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erwartungen überein, da bereits bei dem Vergleich der pluripotenten EGCs (embryonic germ cells) mit ES- Zellen gezeigt wurde, dass es nur sehr geringe Unterschiede gibt, und diese mit den verschiedenen genetischen Hintergründen erklärt werden können (Sharova et al., 2007).

Als nächstes wurden undifferenzierte mit differenzierten ES- und SSC- Zelllinien verglichen. Dadurch konnten einige Gene identifiziert werden, deren Expression in den differenzierten Zellen deutlich herunterreguliert ist. Ein ähnlicher Ansatz wurde auch von Tanaka et al. (2002) genutzt, um neue, potentielle Pluripotenzmarker zu finden. Allerdings wurde in dieser Arbeit das Transkriptom von ES- Zellen mit dem von MEFs verglichen. Auch hier war man davon ausgegangen, dass Gene, die in ES- Zellen exprimiert werden, jedoch nicht in MEFs, putative Kandidaten für Pluripotenzgene sind. Die von uns durch den Vergleich von differenzierten und undifferenzierten ES- bzw. SSC- Zelllinien gefundenen Gene werden zur Zeit in der Arbeitsgruppe im Rahmen von biologischen Diplom- und Doktorarbeiten hinsichtlich ihrer Expression in pluripotenten Zellen und adulten Geweben untersucht. Sollte sich für diese Gene herausstellen, dass sie nur in pluripotenten Zelllinien, nicht aber in z.B. MEFs oder der Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 exprimiert sind, so ist es sehr wahrscheinlich, dass sie eine Rolle bezüglich der Pluripotenz spielen können. Ein weiterer guter Hinweis ist eine Expression ausschließlich im Testis, da bereits für andere Pluripotenzmarker, wie z.B. Zfp206

gezeigt wurde, dass sie im adulten Organismus nur im Testis exprimiert werden (Wang et al., 2007a).

4.1.3.2 Proteom- Analysen

Der gleiche Ansatz wie bei der Untersuchung des Transkriptom wurde auch bei der Untersuchung des Proteoms zugrunde gelegt. In einem ersten Versuchsansatz wurden undifferenzierte ES- und SSC- Zelllinien miteinander verglichen. Bei der Analyse des Proteoms werden wesentlich weniger Gene analysiert als beim Transkriptomarray, da nur die Proteine detektiert werden können, die eine relativ hohe Konzentration in den Zellen haben. Von den 193 detektierten Proteinen gab es allerdings nur in 20 einen Unterschied zwischen ES- und SSC- Zelllinien. Da bei diesem Ansatz das Gesamtprotein der Zellen eingesetzt wurde, konnten keine Pluripotenzgene, die Transkriptionsfaktoren sind, detektiert werden. Die Proteomanalysen sollen daher in Zukunft noch einmal mit angereicherten Kern- Proteinen durchgeführt werden. Bei diesem Versuchsansatz sollte es dann auch möglich sein, Kandidaten für neue Pluripotenzgene durch den Vergleich von undifferenzierten mit differenzierten Zellen zu erhalten.

Insgesamt wurden in den letzten Jahren mehrere Arbeiten veröffentlicht, die sich mit dem Proteom von ES- Zellen beschäftigen (z.B. Guo et al., 2001; Wang und Gao, 2005; Kurisaki et al., 2005; Van Hoof et al., 2006). Dies hat dazu geführt, dass es eine Vielzahl von Daten gibt, die untereinander nicht oder nur sehr schwer zu vergleichen sind. Zum größten Teil wurden in den verschiedenen undifferenzierten ES- Zelllinien völlig unterschiedliche Proteine detektiert. Das Problem aller dieser Arbeiten ist, dass sie immer nur eine pluripotente Zellart, nämlich ES- Zellen zur Verfügung hatten. Hier liegt möglicherweise der Vorteil unseres Ansatzes: Dadurch, dass wir zwei unabhängige pluripotente Zelllinien (ES- und SSC- Zelllinien) zur Verfügung haben, können eher Rückschlüsse auf Gene gezogen werden, die tatsächlich etwas mit Pluripotenz zu tun haben. Dass durch die Analyse des Kern- Proteoms die bisher bekannten Pluripotenzgene detektiert werden können, wurde kürzlich von Buhr et al. (2008) gezeigt. In dieser Arbeit wurden Kernproteine aus ES- Zelllinien und EG- Zelllinien miteinander verglichen. Dabei konnten einige der bereits bekannten Pluripotenzmarker, wie Oct4, Nanog und Dppa5 detektiert werden. Unser Ansatz geht da noch einen Schritt weiter, da wir nicht nur zwei pluripotente Zelllinien miteinander vergleichen, sondern

auch die jeweils differenzierten Zelllinien mit einbeziehen, in denen die putativen neuen Pluripotenzgene dann nicht oder in geringer Konzentration zu finden sein dürften.

4.1.3.3 Chimären und Teratombildung

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass pluripotente ES- und EG- Zellen in der Lage sind, nach Injektion in die Blastozyste Keimbahn- Chimären zu generieren (Robertson et al., 1986; Labosky et al., 1994; Stewart et al., 1994). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die SSC- Zelllinien bezüglich dieser Eigenschaft untersucht. Beim Vergleich von ES- und SSC- Zelllinien, zeigten sich deutliche Unterschiede. Während aus der ES- Zelllinie RI hochprozentige Chimären hervorgingen, die auch transmittierten (Keimbahn- Chimären), konnten aus den SSC- Zelllinien nur niedrigprozentige Chimären erhalten werden, die keine Transmission zeigten. Dies war ein unerwartetes Ergebnis, da in den ersten Versuchen zur Chimärenbildung, die auch in unserer Nature- Arbeit veröffentlicht sind, sehr hochprozentige Chimären erhalten wurden, die auch Transmission zeigten. Für dieses Phänomen kommt meines Erachtens nur die Erklärung in Frage, dass damals sehr frühe Passagen für die Blastozysteninjektion verwendet wurden und im Rahmen dieser Arbeit spätere Passagen.

Der Vergleich von ES- und SSC- Zelllinien bezüglich ihrer Fähigkeit Teratome hervorrufen zu können, brachte dagegen wieder die erwarteten Ergebnisse. Beide pluripotenten Zelllinien rufen in gleicher Weise Teratome in immundefizienten Mäusen hervor.

4.1.3.4 Methylierungsanalysen

Beim Vergleich der Methylierung der Promotorregionen der beiden Pluripotenzgene Oct4 und Nanog ist diese wie erwartet bei den undifferenzierten Zelllinien sehr niedrig (<15%). Dies spricht für eine hohe Aktivität der Promotoren und bestätigt den pluripotenten Status der Zelllinien (Hattori et al., 2004). Dies ist ebenfalls für die pluripotenten EGCs der Fall (Shim et al., 2008) und stimmt überein mit den Ergebnissen, die Kanatsu-Shinohara für die Zelllinien aus Testis neugeborener Mäus erhalten hat (Kanatsu-Shinohara et al., 2004). Da mit der Differenzierung der Zellen auch die Promotor- Aktivität der Pluripotenzgene abnehmen sollte, erwartet man eine ansteigende Methylierung (Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). Dies ist sowohl in

ES- als auch in SSC- Zellen nach 20 Tagen Induktion mit Retinsäure der Fall. Die Methylierung steigt in allen Zelllinien auf Werte zwischen 40% und 75% an und ist somit mit den Werten vergleichbar, die für den nicht- pluripotenten Feeder (MEFs) erhalten wurden (ca. 60%).

Beim Vergleich der geprägten Gene fällt auf, dass die paternal methylierten Gene H19 und Meg3 beim transgenen Stra8-EGFP- Hintergrund (SSC15 Nr.12 vs. ES Stra8) eine sehr ähnliche Methylierung aufweisen (30% bis 40%), während es beim 129SV- Hintergrund deutliche Unterschiede gibt. In der SSC- Zelllinie ist der Meg3- Locus zu 40% methyliert und der H19- Locus zu 10%, während es in der ES- Zelllinie umgekehrt ist. Hier ist der Meg3-Locus zu 20% methyliert, während der H19- Locus zu 60% methyliert ist. Die Ergebnisse des 129SV- Hintergrundes stimmen allerdings in etwa mit den Ergebnissen überein, die Kanatsu-Shinohara für seine Zelllinien erhalten hat. Die Analyse der maternal methylierten Gene Igf2r und Snrpn zeigt das gleiche Verhältnis: während im Stra8- Hintergrund beide Zelllinien ein ähnliches Ausmaß an Methylierung der beiden Loci zeigen (20% bis 30%), gibt es beim 129SV- Hintergrund wieder deutliche Unterschiede. In den SSC- Zelllinien sind beide Loci nahezu unmethyliert (<10% Methylierung), während in der ES- Zelllinie eine Methylierung von ca. 40% detektiert werden kann. Auch in diesem Fall stimmen die Daten für den 129SV- Hintergrund mit denen von Kanatsu-Shinohara überein. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Unterschiede generell auf den genetischen Hintergrund zurückzuführen sind, da in der Arbeit von Kanatsu-Shinohara zwar zwei Zelllinien getestet wurden, jedoch nicht angegeben wird, ob diese auch aus zwei verschiedenen genetischen Hintergründen isoliert wurden.

Die Analysen bei EGC- Zelllinien zeigten für den H19- Locus eine ca. 40%ige Methylierung und für den Igf2r- Locus nahezu keine Methylierung (Shim et al., 2008), was insgesamt mit den Ergebnissen aus unseren SSC- Zelllinien übereinstimmt.

Nach der Differenzierung der Zelllinien zeigen die paternal methylierten Gene H19 und Meg3 einen deutlichen Anstieg der Methylierung auf bis zu 60%. Nur bei der ES- Zelllinie des 129SV- Hintergrundes geht durch die Differenzierung bei H19 die Methylierung von 60% auf 40% zurück. Die Methylierung der maternal methylierten Gene zeigt nach der Differenzierung bei den Zelllinien des Stra8- Hintergrundes und der SSC- Zelllinie des 129SV- Hintergrundes keine nennenswerten Unterschiede, während bei der ES- Zelllinie des SSC129SV- Hintergrundes eine Reduktion der Methylierung

um 50% (von 40% auf 20%) zu beobachten ist. Leider sind aus der Literatur bis dato keine Vergleichswerte bekannt.

4.1.3.5 Expressionsanalyse von ES- Zell- spezifischen miRNAs

Mikro- RNAs (miRNAs) sind kleine, 17 - 24 bp lange, nicht- kodierende RNA- Moleküle, die als sequenzspezifische Repressoren der Genexpression fungieren. In eukaryotischen Zellen beeinflussen miRNAs die Translation oder die Stabilität ihrer Ziel- mRNAs (Bartel and Chen, 2004; Bartel, 2004). In den letzten Jahren wurden zwei Familien von miRNAs als ES- Zell- spezifisch beschrieben: die miR-290- Familie und die miR-302- Familie. Die Expression dieser Familien konnte ausschließlich in ES- Zellen detektiert werden und war nicht mehr nachweisbar in differenzierten Zellen (Houbaviy et al., 2003; Houbaviy et al., 2005; Strauss et al., 2006; Chen et al., 2007).

In Zusammenarbeit mit Herrn Athanasios Zovoilis wurden diese miRNA- Familien mittels RealTime- PCR auch in den verschiedenen SSC- Zelllinien untersucht (Abb.88). Die miRNAs der beiden Familien konnten in allen SSC- Zelllinien sowie in der ebenfalls pluripotenten Teratokarzinom- Zelllinie F9 detektiert werden, jedoch nicht in den Zelllinien NIH-3T3 und MEF sowie im adulten Testis (Abb.88a). Die Expression dieser miRNAs blieb über mehrere Passagen konstant (Abb.88b) und verschwand mit der Differenzierung der Zellen durch Induktion mit Retinsäure für 35 Tage (Abb.88c) (Zovoilis, Nolte et al., 2008).

Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass ES- und SSC- Zelllinien sich sehr ähnlich sind, eine nahezu identische molekulare Ausstattung besitzen, und es auch bezüglich ihrer Pluripotenz keine nennenswerten Unterschiede gibt.

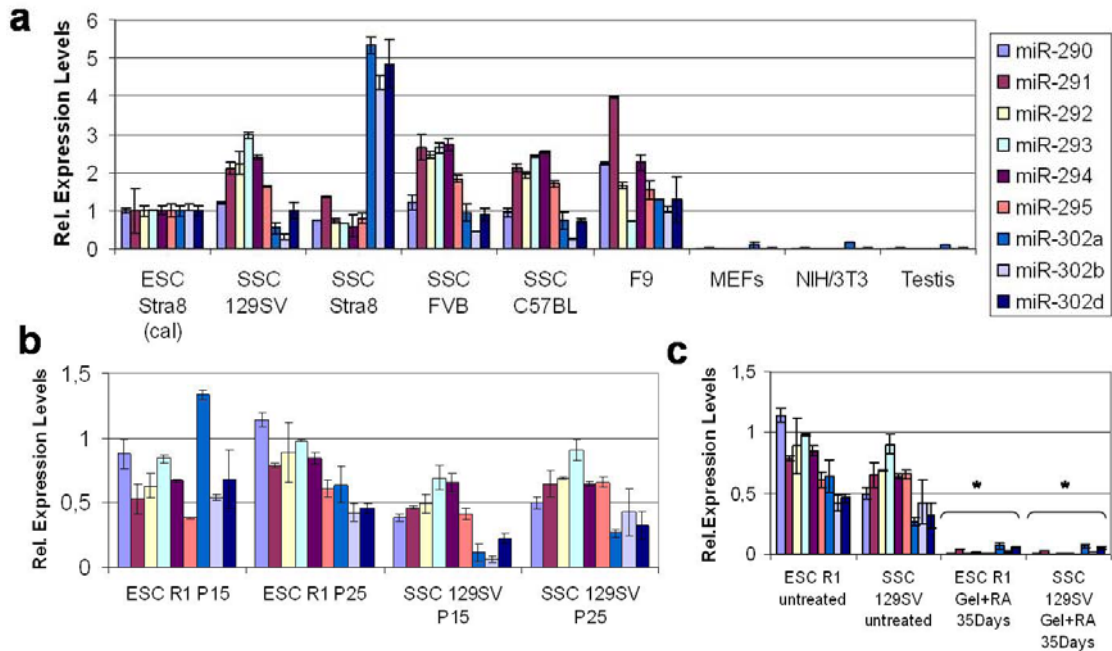


Abbildung 88: Expressionprofile für die ES- Zell- spezifischen miRNA- Familien miR-290 und miR- 302 in SSC- Zelllinien (angefertigt von A. Zovoilis)

- a:** miRNA- Expression in den verschiedenen SSC- Zelllinien sowie in den Zelllinien F9, NIH-3T3, MEFs und adultem Testis.
- b:** miRNA Expression in Zellen der Zelllinien ES- RI und SSC 129SV in den Passagen 15 und 25.
- c:** miRNA- Expression in undifferenzierten und differenzierten Zellen der Zelllinien ES- RI und SSC 129SV.

4.2 *In vitro* Spermatogenese

Die Differenzierung von Stammzellen zu männlichen bzw. weiblichen Stammzellen bildet einen Forschungszweig, der von vielen Arbeitgruppen untersucht wird. Als einen Ansatz konnte von unserer Arbeitsgruppe 2004 gezeigt werden, dass es möglich ist aus murinen pluripotenten embryonalen Teratokarzinomzellen nach Anreicherung auf Stra8-Expression männliche Keimzellen zu generieren (Nayernia et al., 2004a). Dazu wurde die Zelllinie F9 mit dem bereits mehrfach erwähnten Stra8-EGFP- Konstrukt transfiziert und EGFP⁺ Zellen nach Retinsäureinduktion mittels FACS sortiert und weiter kultiviert. Die so erhaltene „Spermatogonien“- Kultur, die auch SSCs enthielt, wurde dann nicht *in vitro* differenziert, sondern die Zellen wurden mittels Transplantationsassay in Testes von Empfänger-mäusen transplantiert, bei denen vorher durch Busulfan- Behandlung die endogene Spermatogenese zerstört worden war. Nach einigen Wochen konnte in diesen Mäusen wieder Spermatogenese nachgewiesen werden. Da die Mäuse auch nach

längerer Verpaarungszeit keine Nachkommen erzeugten, wurde eine Untersuchung der Spermien durchgeführt. Im Nebenhoden konnten keine reifen Spermien gefunden werden. Daraufhin wurden testikuläre Zellsuspensionen hergestellt, aus denen die haploiden Keimzellen ausgesucht und mittels ICSI zur Befruchtung von Oocyten verwendet wurden. Die Entwicklung der Embryonen konnte *in vitro* bis zur Blastozyste verfolgt werden. Leider wurde es versäumt, die Embryonen in scheinchwangere Mäuse zu retransferieren.

Die Differenzierung von ES- Zellen zu männlichen Keimzellen ist bis dato in drei nennenswerten Arbeiten beschrieben worden. Toyooka et al. (2003) selektierten aus ES- Zellen eine Population von Zellen, die positiv für den PGC- Marker VASA waren. Nach Kocultivierung dieser Zellen mit gonadalen Zellen aus fetalem Testis und anschließender Transplantation der erhaltenen Zellaggregate unter die Testis- Kapsel von *nude*- Mäusen entwickelten sich Spermien, deren Funktionalität bis dato jedoch nicht bewiesen wurde. In einer weiteren Arbeit zeigten Geijsen et al. (2004), dass sich nach 20 Tagen *in vitro*- Differenzierung von AP (Alkalische Phosphatase) positiven Zellen haploide Zellen mittels einer Antikörperfärbung mit einem Akrosom- spezifischen Antikörper sortieren lassen, die nach Injektion in Oocyten (ICSI) zur Entwicklung von Blastozysten führen. Leider wurde auch in dieser Arbeit versäumt, die Embryonen in scheinchwangere Mäuse zu retransferieren, so dass die Funktionalität der Zellen nicht eindeutig belegt werden konnte. Dieser Beweis gelang unserer Arbeitsgruppe 2006 (Nayernia, Nolte et al., 2006; Nolte et al., 2007). Unser Ansatz zur Differenzierung von ES- Zellen zu männlichen Keimzellen beruhte auf der bereits erwähnten Zwei- Schritt- Selektion. Nach Transfektion der ES- Zellen mit dem Stra8- EGFP- Konstrukt konnten über Retinsäureinduktion und FACSsortierung eine Spermatogonien- Ausgangspopulation generiert werden (dies ist der erste Unterschied zu den bereits genannten Arbeiten, bei denen von einer Kultur primordialer Keimzellen ausgegangen wurde). Diese Zellpopulation wurde mit dem zweiten Selektionskonstrukt (Prm1- DsRed) transfiziert und anschließend mittels Retinsäure differenziert. Die sich entwickelnden Embryoid- Body- (EB)- Strukturen enthielten sowohl „grüne“ (premeiotische) als auch „rote“ (postmeiotische) Zellen. Anhand der Expression bestimmter Markergene konnte die *in vitro* Spermatogenese verfolgt werden. Auch die Meiose konnte durch die Darstellung von synaptonemalen Komplexen und durch durchflusszytometrische Untersuchungen eindeutig belegt werden. Nach der Injektion der haploiden Zellen in Oocyten (ICSI) und anschließendem Retransfer der erhaltenen Zweizeller in scheinchwangere Weibchen,

wurden Mäuse geboren, die eindeutig aus den ICSI- Zweizellern entstanden waren. Diese Mäuse zeigten Unregelmäßigkeiten in der genomweiten Methylierung und starben 5 Tage bis 5 Monate nach der Geburt. Die Methylierungsprobleme ließen sich erklären, nachdem man festgestellt hatte, dass die Methylierung einzelner Gene, die dem Imprinting unterliegen (vergleiche Abschnitt 4.2.1) in den verwendeten Zellen nicht vollständig der Methylierung in „normalen“ Spermien entsprach.

Abbildung 89 gibt noch einmal einen Überblick über die bei der *in vitro*-Differenzierung von ES- Zellen zu haploiden männlichen Keimzellen verwendeten Strategien.

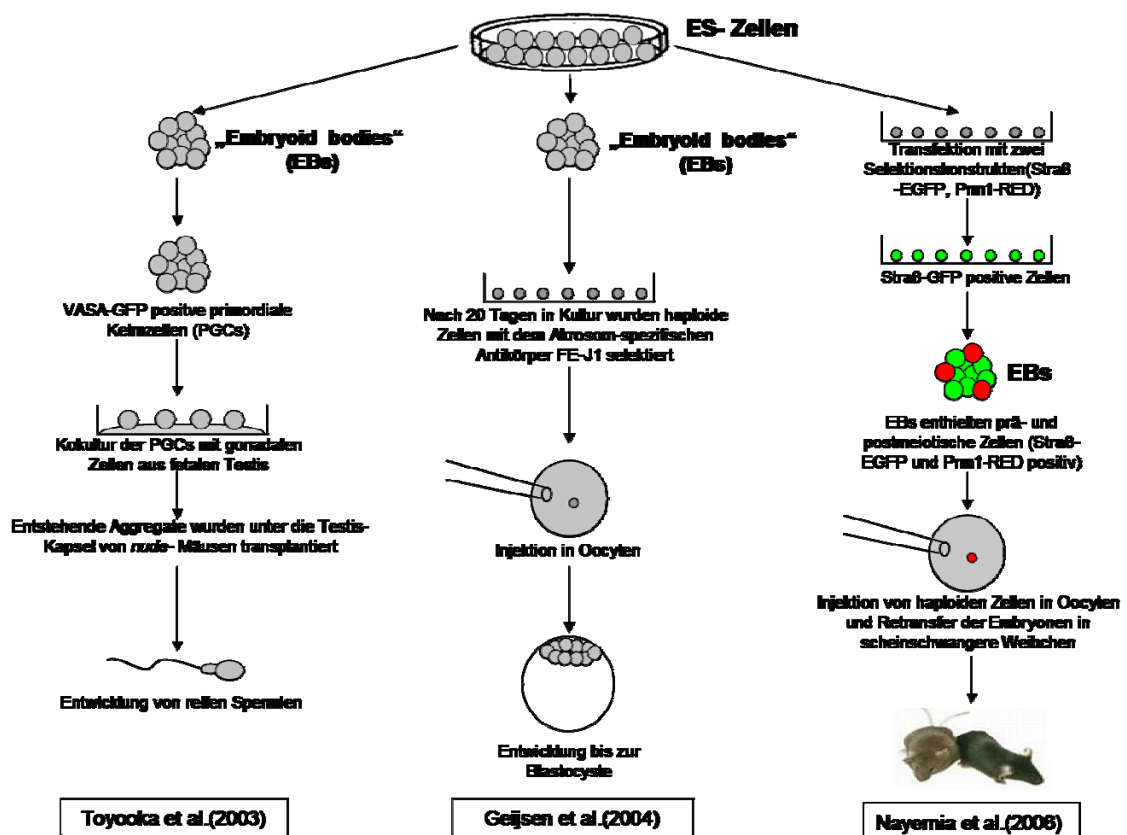


Abbildung 89: Überblick über die Differenzierungsstrategien von ES- Zellen zu haploiden männlichen Keimzellen.

Es gibt eine Publikation, die die Differenzierung von ES- Zellen zu weiblichen Keimzellen beschreibt (Hübner et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Hans Schöler wählte nicht den Weg über die EBs, sondern ließ die ES- Zellen unter Differenzierungsbedingungen über einen längeren Zeitraum ausdifferenzieren. Auch hier konnten aus diesem heterogenen Gemisch von Zelltypen PGCs über spezifische Marker detektiert und isoliert werden. Die Arbeitsgruppe wählte hierfür ein Fusionsprotein von Oct4 mit GFP und konnte die gewünschten Zellen so über die GFP- Expression sortieren. Nach

erneuter Kultivierung der PGCs konnten aus den sich bildenden EBs Oozyten- ähnliche Strukturen isoliert werden, die allerdings nicht, wie zu erwarten, bis zur Befruchtung oder bis zu einer Aktivierung von außen in diesem Stadium arretierten, sondern sich weiterentwickelten bis zum Blastozystenstadium. Es scheint sich hier also um Parthenogenese zu handeln. Es wurde nicht untersucht, ob sich die gewonnenen Oozyten auf normalem Weg befruchten lassen und dann ebenfalls das Blastozystenstadium erreichen. Was dieser Arbeit fehlt ist zum einen die Generierung einer lebensfähigen Maus, zum anderen wurde aber auch keine echte Meiose, z.B. über die Detektion Meiose- spezifischer Strukturen, nachgewiesen.

Ein weiterer Ansatz zur Gewinnung von männlichen Keimzellen *in vitro* ist die Differenzierung von multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSCs), die neben den hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) aus dem Knochenmark isoliert werden können. In zwei Arbeiten, ausgehend von murinen bzw. humanen MSCs konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es möglich ist, Zellpopulationen zu gewinnen, die den Spermatogonien- Marker Stra8 exprimieren (Nayernia,..., Nolte et al., 2006; Drusenheimer,..., Nolte et al., 2007). Expressionsanalysen der Zellen zeigten, dass es zwar möglich ist, premeiotische Stadien zu differenzieren, es ist jedoch nicht gelungen, Meiose zu induzieren. Somit war es auch nicht möglich, haploide Keimzellen zu generieren. Dies ist evtl. auf die eingeschränkte Potenz der verwendeten MSCs zurückzuführen. Auch *in vitro* sind MSCs nicht in der Lage, Spermatogenese zu vollziehen. So wurden 2007 von Lue et al. MSCs für einen Transplantationsassay verwendet. Es konnte eine Entwicklung der Zellen zu Spermatogonien und frühen Spermatozyten beobachtet werden, jedoch erfolgte auch hier keine Meiose. Dies lässt vermuten, dass bis dato nur pluripotente Zelllinien in der Lage sind, unter bestimmten Kulturbedingungen *in vitro* Spermatogenese zu durchlaufen. Mit diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob es möglich ist, *in vitro* Spermatogenese ausgehend von den pluripotenten SSC- Zelllinien zu erhalten.

Die Versuche zur *in vitro* Spermatogenese von SSC- Zelllinien basieren auf der bereits erfolgreich bei ES- Zellen angewandten Strategie. Zuerst erfolgte eine Anreicherung der Zellpopulation, die Stra8 als Spermatogonienmarker exprimieren. Im Fall der Zelllinie SSC15 Nr.12 konnte so eine zu 90% reine Spermatogonien- Zellpopulation gewonnen werden. Diese Zellen wurden stabil mit dem postmeiotischen Promotorkonstrukt Prm1-DsRed transfiziert und dem Differenzierungsprotokoll mit Retinsäure unterzogen. Während der Differenzierung wurde der Fortgang über die Spermatogenese- spezifische

Marker- Expression verfolgt. Es konnten meiotische Stadien über den Nachweis des synaptonemalen Komplexes und mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen dargestellt werden. Der Nachweis von haploiden Zellen konnte außerdem über die DsRed- Fluoreszenz erbracht werden. Der funktionelle Beweis, dass es sich bei den generierten Zellen um befruchtungsfähige, haploide Keimzellen handelte, wurde über ICSI und anschließendem Retransfer der Zweizeller in scheinchwangere Mäuse erbracht. Zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit waren mehrere Mäuse über Genotypisierungs- PCR als ICSI- Nachkommen identifiziert worden. Die Bestätigung durch Southern Blot- Analyse steht noch aus.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die *in vitro* Spermatogenese ausgehend von pluripotenten SSC- Zelllinien sich nicht wesentlich von der aus ES- Zellen unterscheidet. Ein Punkt ist die unterschiedliche Expression der Marker- Gene in den Ausgangszellen. Während bei den ES- Zellen nur die premeiotischen Marker bereits vor der Induktion der Differenzierung zu detektieren waren, konnten in den SSC- Zelllinien auch schon meiotische Marker detektiert werden. Alle anderen Untersuchungen zeigten ein nahezu identisches Muster bei beiden Zelltypen. Auch aufgrund der *in vitro* Spermatogenese lässt sich also sagen, dass ES- und SSC- Zelllinien sich sehr ähnlich sind.

4.2.1 Genomische Prägung (genomic imprinting)

Die genomische Prägung (engl.: genomic imprinting) ist charakterisiert durch die Expression nur eines Allels, entweder dem paternalen oder dem maternalen. Das jeweils andere Allel ist „abgeschaltet“. Da aber beide Eltern grundsätzlich die gleiche genomische Ausstattung vererben, kann diese Prägung nicht durch unterschiedliche DNA- Sequenzen erklärt werden. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass die Vererbung eines bestimmten Allels in einer Generation maternal erfolgen kann, während es in der nächsten Generation paternal vererbt wird. Für dieses Phänomen der vererbaren Änderung der Genexpression ohne Änderung der DNA- Sequenz wird der Begriff „Epigenetik“ verwendet. Welche Faktoren genau die Regulierung des Imprintings bewirken, ist bis heute nicht komplett verstanden. Bekannt ist, dass auf jeden Fall die DNA- Methylierung eine notwendige Komponente ist. Die Modifikation der DNA erfolgt während der Keimzellentwicklung (Spermatogenese und Oogenese). Die DNA- Methylierung wird beim Durchgang durch die Keimbahn (Meiose) zuerst gelöscht,

später jedoch geschlechtsspezifisch entweder nur maternal oder paternal wieder reprogrammiert (Reik und Walter, 2001). Männliche und weibliche Gameten besitzen DNA-Regionen, die unterschiedlich methyliert sind (Monk et al., 1987; Sanford et al., 1987; Howlett und Reik, 1991). Die Methylierung erfolgt an der Cytosin-Base an Position 5 in CpG-Dinukleotiden. Dabei überträgt die Methyltransferase eine Methylgruppe aus S-Adenosyl-methionin.

Im Genom gibt es so genannte CpG-Inseln, in denen dieses Dinukleotid gehäuft vorkommt. Diese Inseln sind meist mit Transkriptionsstartpunkten und/oder Promotorenbereichen assoziiert. Eine Methylierung dieser Inseln bewirkt meist die Abschaltung der Genexpression, so dass eine Korrelation zwischen Methylierungsmuster und Expressionsmuster besteht (Baylin, 1997).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ulrich Zechner (Institut für Humangenetik, Mainz) die geprägten Gene *H19*, *Snrpn* und *Igf2r* mittels Bisulfit-Sequenzierung untersucht. Von diesen Genen ist bekannt, dass sich *in vivo* ihre Methylierung während der Spermatogenese ändert (Lucifero et al., 2002). Bei *Igf2r*, welches für den Insulin-like-growth-factor-2-Rezeptor kodiert, handelt es sich um ein maternal exprimiertes Gen. Während die Methylierung der DMR1 (differentiell methylierte Region I), eine der beiden differentiell methylierten Regionen von *Igf2r*, welche auch den Transkriptionsstartpunkt beinhaltet, erst nach der Befruchtung etabliert wird, wird die Methylierung der hier untersuchten DMR2 bereits von den weiblichen Keimzellen vererbt und scheint als Imprinting-Signal zu fungieren (Stöger et al., 1993). In Oocyten liegt die DMR2 vollständig methyliert vor, während sie in Spermien komplett demethyliert ist (Lucifero et al., 2002). Bei *H19* handelt es sich um ein maternal exprimiertes und paternal methyliertes Gen, wodurch die ICR (imprinting control region) in Spermien komplette Methylierung aufweist (Lucifero et al., 2002). Bei *Snrpn*, dem small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N, handelt es sich um ein paternal exprimiertes Gen, welches maternal methyliert ist. Die untersuchte DMR ist also in Spermien komplett demethyliert (Lucifero et al., 2002).

Bei der Untersuchung der Methylierung der genannten Gene in den Zellen der verschiedenen Differenzierungsstadien der *in vitro* Spermatogenese zeigte sich, dass die Demethylierung der Gene *Igf2r* und *Snrpn* bereits zum Anfang der Differenzierung nahezu vollständig war. Probleme bereitete die Methylierung des *H19* Locus, dessen Methylierung in allen untersuchten Zellstadien nicht vollständig war. Es ist also davon auszugehen, dass die genomische Prägung während der *in vitro* Spermatogenese nicht

vollständig erfolgt, und es somit auch bei den erhaltenen Nachkommen zu Methylierungsproblemen kommen kann.

4.2.2 *In vivo* Spermatogenese und ausgewählte Marker- Gene

Als Spermatogenese bezeichnet man den hochkomplexen Differenzierungsvorgang, in dessen Verlauf spermatogoniale Stammzellen morphologische und funktionelle Veränderungen durchlaufen und am Ende reife Spermatozoen entstehen. Diese sind dann in der Lage Oozyten zu befruchten und neue Individuen hervorzubringen.

Bei der Maus erfolgt dieser Prozess innerhalb von etwa 34,5 Tagen, wobei die mitotischen Teilungen der Spermatogonien acht Tage, die Meiose 13 Tage und die Differenzierung der Spermatiden zu Spermien 13,5 Tage in Anspruch nehmen. Die Spermatogenese lässt sich in drei Phasen gliedern (s. Abbildung 90): (I) Proliferationsphase: Hier vermehren sich die Spermatogonien durch mehrere mitotische Teilungen und differenzieren anschließend zu primären Spermatozyten. (II) meiotische Phase: Hier wird das genetische Material der Spermatozyten durch *crossing over* rekombiniert und dann halbiert. (III) postmeiotische Phase: Die haploiden Spermatiden differenzieren zu befruchtungsfähigen Spermatozoen.

Der Verlauf der Keimzellendifferenzierung kann mit Hilfe verschiedener Marker verfolgt werden. Die Auswahl der untersuchten Marker für die *in vitro* Spermatogenese orientierte sich an dem Bestreben, die gesamte Spermatogenese abzudecken. Es wurden also Marker gewählt, deren Expression *in vivo* spezifisch für bestimmte Stadien der Spermatogenese ist.

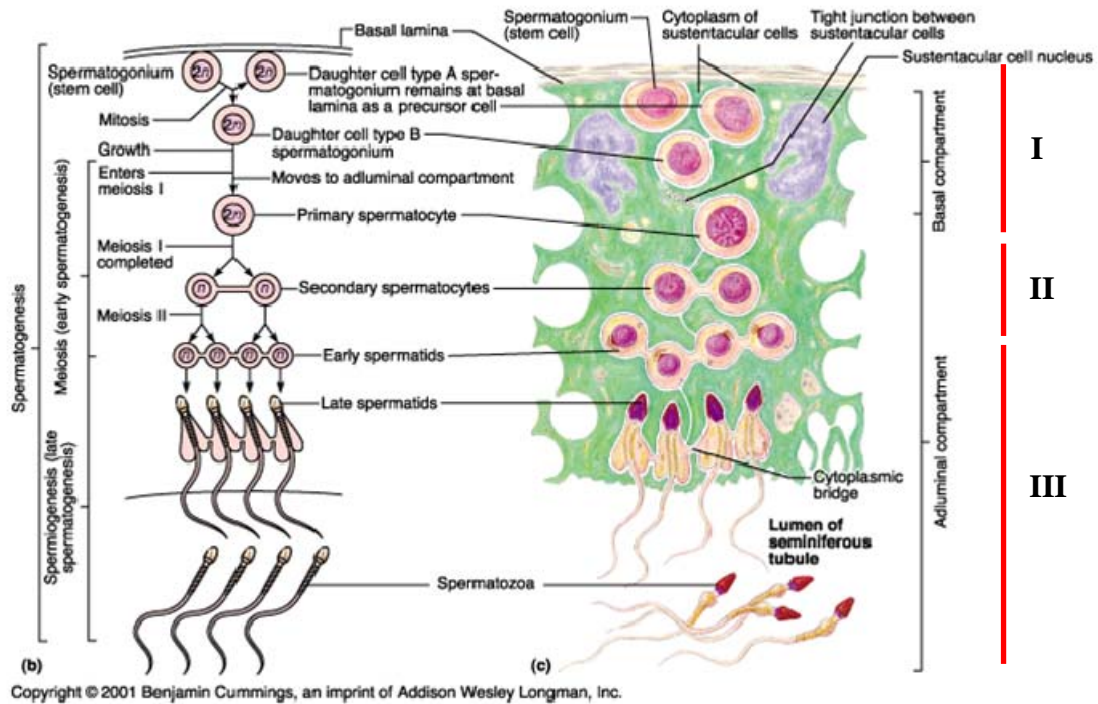


Abbildung 90: *In vivo* Spermatogenese mit Angaben über die Expression der ausgewählten Marker (modifiziert nach Campbell et al., 2001)

I: Proliferationsphase (mitotische Vermehrung)

II: Meiotische Phase

III: Postmeiotische Phase (Spermiogenese; Differenzierung von haploiden Spermatiden zu Spermien)

4.2.2.1 Marker- Gene für die Proliferationsphase (I)

Als Marker- Gene für die Proliferationsphase der Spermatogenese wurden *Oct4*, *Stella* und *Fragilis* ausgewählt. Sie sind beschrieben als Keimzellmarker, die sowohl in primordialen Keimzellen (PGCs) als auch in den frühen Stadien der Spermatogenese (Spermatogonien) exprimiert sind (Pesce et al., 1998; Sato et al., 2002; Saitou et al., 2002). Auch *VASA* wird schon in PGCs exprimiert (Toyooka et al., 2000) während die anderen verwendeten Marker erst in Spermatogonien exprimiert werden. Dies sind *c-Kit* (Sorrentina et al., 1991), *Rnf17* (Wang et al., 2001), *Rnh2* (Miyamoto et al., 2002), *Stra8* (Oulad-Abdelghani et al., 1996), *Piwil2* (Kuramochi-Miyagawa et al., 2001), *DAZL* (Cooke et al., 1996) und *Rbm* (Mahadevaiah et al., 1998).

4.2.2.2 Marker- Gene für die meiotische Phase (II)

Ovll wird im Pachytän der Prophase von Meiose I exprimiert (Li et al., 2005), *Boll*-Expression lässt sich mit Eintritt in die Meiose bis hin zu sekundären Spermatozyten detektieren (Luetjens et al., 2004). *DMC1* und *SCP3* sind spezifisch nur während der Meiose exprimiert, wobei *DMC1* an der homologen Rekombination während des Crossing over beteiligt ist (Bannister et al., 2007) und *SCP3* an der Ausbildung der synaptonemalen Komplexe (Di Carlo et al., 2000). Die Expression von *Pgk2* ist erstmalig im späten Stadium der Meiose detektierbar und wird während der postmeiotischen Phase stärker (Robinson et al., 1989).

4.2.2.3 Marker- Gene für die postmeiotische Phase (III)

Creb3/4 wird in geringen Mengen auch in anderen Organen exprimiert, eine sehr hohe Expression ist aber im Testis und hier speziell in haploiden Stadien nachweisbar (Adham et al., 2005). *Theg* ist in haploiden Stadien der Spermatogenese exprimiert und hier für die Spermatischen- Sertolizell- Interaktion von Bedeutung (Nayernia et al., 1999). *TP2*, *Haprin* und *Acrosin* werden ebenfalls schon in frühen haploiden Stadien exprimiert (Mali et al., 1989; Kitamura et al., 2003; Kallajoki et al., 1986), während *Gpx4* (PHGPx), *Protamin1* und *Cylc1* erst in elongierten Spermatischen und reifen Spermien exprimiert werden (Nayernia et al., 2004b; Hecht et al., 1989; Xie et al., 2001).

4.2.3 Bedeutung und Perspektiven

Mit der *in vitro*- Differenzierung von Zellen Spermatoγονialer- Stammzell- Linien zu männlichen haploiden Keimzellen ist es in Zukunft möglich, bislang noch fehlende Erkenntnisse über verschiedene Stadien der Meiose zu erhalten. Dies umfasst nicht nur Vorgänge auf Genexpressionsebene, sondern auch in Hinblick auf strukturelle Vorgänge wie z.B. das Crossing over. Es ist also eine umfassende Charakterisierung der Meiose durch eine Anreicherung der entsprechenden Zelltypen mittels eigens dafür generierten Promotorkonstrukten auf allen erdenklichen Ebenen möglich. Des Weiteren ist mit den Erkenntnissen der vorliegenden Doktorarbeit ein Vorstoß zur Therapie von Infertilität gelungen. Ist man erst einmal in der Lage auch beim Menschen SSC- Zelllinien aus SSCs zu generieren, könnte man z.B. bei Patienten mit einem Spermatogenese-arrest, der

aufgrund von Problemen in den Sertolizellen herrscht, die noch vorhandenen SSCs isolieren und kultivieren. Auch bei Patienten, die sich einer Bestrahlung oder Zytostatika- Therapie unterziehen müssen, könnte man vorher SSCs isolieren und kultivieren. Nach erfolgreicher *in vitro* Spermatogenese ausgehend von diesen Zellen könnte es möglich werden, diesen Patienten doch noch einen evtl. bestehenden Kinderwunsch zu erfüllen.

Ist bei Patienten der Grund eines Spermatogenese-arrestes nicht bekannt, sind aber intakte SSCs erhalten, so könnte man durch Kultur und *in vitro* Spermatogenese evtl. die Ursache des Problems herausfinden, indem man z.B. Expressionsprofile erstellt und mit dem von gesunden Patienten vergleicht.

4.3 Expressionsanalysen von *Stra8*

Stra8 (Stimulated by retinoic acid gene 8) wurde erstmals 1995 von Bouillet et al. beschrieben. Die Gruppe identifizierte 50 Gene, deren Expression durch Retinsäurebehandlung in P19 embryonalen Karzinom- Zellen induziert bzw. erhöht wurde. Die *Stra8* cDNA ist 1455 bp lang und kodiert für ein Protein aus 393 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 45 kDa. Das Gen besteht aus 9 Exons und ist bei der Maus auf dem Chromosom 6 lokalisiert. 1996 wurde *Stra8* von Oulad-Abdelghani et al. als Testis- spezifisch beschrieben, wobei die Expression auf prämeiotische Stadien der Spermatogenese beschränkt ist. *Stra8* wurde als cytoplasmatisches Protein beschrieben. Die Ergebnisse von Oulad-Abdelghani et al. wurden in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Doktorarbeit bestätigt (Jaroszynski, 2005). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine transgene Maus generiert, die EGFP unter der Kontrolle der 1,4 kb Promotorregion von *Stra8* exprimiert. Die EGFP-Expression in dieser Mauslinie stimmt überein mit der von Oulad- Abdelghani beschriebenen *Stra8*- Expression: Sie ist Testis- spezifisch und auf prämeiotische Stadien der Spermatogenese beschränkt. 2003 zeigten Menke et al., dass *Stra8*-Expression auch in sich entwickelnden Ovarien in den Embryonalstadien 12.5 dpc (days post coitum) bis 14.5 dpc detektiert werden kann. Die Expression in Ovarien adulter Mäuse ist bis dato nicht eingehender untersucht worden. Da aber *Stra8*- Knock-out Mäuse beider Geschlechter infertil sind und die Charakterisierung dieser Mäuse zeigte, dass es in beiden Geschlechtern zu einem Meiosearrest in den Keimzellen kommt (Baltus et al., 2006), muss davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse von Oulad-

Abdelghani et al. und L. Jaroszynski nicht vollständig sind. Kürzlich wurde durch Microarray- Analysen gezeigt, dass Stra8-Expression in Ovarien der Embryonalstadien 11.5 dpc und 12.5 dpc nicht detektiert werden kann, wohl aber im Stadium 14.5 dpc (Zhou et al., 2008). Dies stimmt nur teilweise mit den von Menke et al. (2003) publizierten Daten überein. Im Testis wurde Stra8- Expression durch die Microarray-Daten in den Stadien 11.5 dpc bis 18.5 dpc nicht detektiert, wohl aber eine hohe Expression in Testes postnataler Mäuse an den Tagen 6 bis 14 dpp (days post partum). Die Expression blieb während der weiteren Entwicklung auf einem Level, der auf eine Expression nur in premeiotischen Stadien hindeutet. Dieses Ergebnis stimmt mit den bereits publizierten Daten überein. Es wurde beschrieben, dass *Stra8* in TypA und TypB Spermatogonien sowie in präleptotänen und frühen leptotänen Spermatocyten exprimiert wird (Oulad- Abdelghani et al., 1996; Baltus et al., 2006). Dieses Expressionsprofil konnte auch im Rahmen dieser Arbeit durch Antikörperfärbung nachgewiesen werden, was gleichzeitig ein Beweis dafür ist, dass der verwendete Antikörper spezifisch das Stra8- Protein detektiert.

Da die spezifische Stra8- Expression in premeiotischen Stadien der Spermatogenese als Grundlage für die Isolierung von SSCs und die Generierung von SSC- Zelllinien genutzt werden konnte, sollte die Stra8- Expression in den generierten SSC- Zelllinien sowie in den ES- Zelllinien des gleichen genetischen Hintergrundes untersucht werden. Durch Antikörperfärbung konnte gezeigt werden, dass das Stra8- Protein in allen untersuchten SSC- und ES- Zelllinien detektierbar ist. Interessanterweise konnte neben der bereits beschriebenen cytoplasmatischen Lokalisation des Stra8- Proteins (Oulad- Abdelghani et al., 1996) auch eine Kernlokalisierung beobachtet werden (Abb.47). Betrachtet man die Proteinstruktur von Stra8, fällt auf, dass das Protein eine Helix-Loop-Helix- Domäne und eine Glutamin- reiche Domäne besitzt (Abb.91).

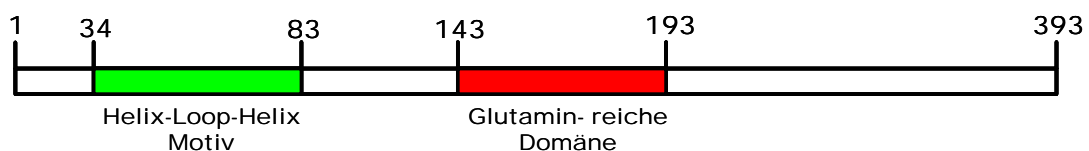


Abbildung 91: Struktur des Stra8- Proteins

(Proteinvorhersage: <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>)

In Ziffern ist die Anzahl der Aminosäuren angegeben.

Helix-Loop-Helix- Domänen sind charakteristisch für Proteine, die an DNA binden können (z.B. Transkriptionsfaktoren). Glutamin-reiche Domänen sind häufig

charakteristisch für Gene, die die Transkription anderer Gene durch Protein-Protein-Interaktion aktivieren können. Da alle bisher bekannten Pluripotenzgene wie z.B. Oct4, Sox2 und Nanog Transkriptionsfaktoren sind, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Stra8 zwei Funktionen haben könnte: Zum einen die bereits beschriebene Funktion für den Eintritt von Keimzellen in die Meiose (Baltus et al., 2006), wobei es im Testis immer nur als cytoplasmatisches Protein detektiert werden kann, und zum anderen könnte es im Pluripotenznetzwerk als Transkriptionsfaktor eine Rolle spielen, da das Protein in pluripotenten Stammzellen überwiegend im Kern lokalisiert ist. Um diese Hypothese in einer ersten Annäherung zu untermauern, wurde *Stra8*- Expression mittels RT-PCR in Präimplantationsembryonen untersucht. Von den anderen Pluripotenzgenen ist bekannt, dass diese teilweise in frühen Embryonen, spätestens jedoch im Stadium der Blastozyste exprimiert werden. *Stra8*- Expression konnte auf RNA- Ebene in allen untersuchten Embryonalstadien nachgewiesen werden. Um diese Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurden Antikörperfärbungen an den verschiedenen Embryonalstadien durchgeführt und bestätigt, dass auch das Stra8- Protein vorhanden ist. Auffällig hierbei war, dass das Protein bis einschließlich Morula- Stadium im Cytoplasma lokalisiert zu sein scheint, während in der Blastocyste überwiegend Cytoplasma- aber auch Kernlokalisierung zu finden ist. Dies könnte bedeuten, dass Stra8 keine Rolle als Transkriptionsfaktor in totipotenten Zellen besitzt (Zygote bis 8-Zeller), sondern erst in der Blastozyste, aus denen pluripotente Embryonale Stammzellen isoliert werden können. Stra8 scheint während der Differenzierung von totipotenten zu pluripotenten Zellen in den Kern zu wandern und während der weiteren Entwicklung zu differenzierten Zellen des Testis wieder zurück ins Cytoplasma. Dies könnte auf eine spezifische Rolle von Stra8 als Transkriptionsfaktor ausschließlich in pluripotenten Zellen hindeuten.

Um eine eventuelle Rolle von Stra8 bezüglich der Pluripotenz von ES- und SSC-Zelllinien zu bestätigen, soll in einem nächsten Versuch Stra8 stabil überexprimiert werden. Dieser Versuchsaufbau wurde auch von Wang et al. (2007a) verwendet, um zu beweisen, dass *Zfp206* einen Einfluss auf die Pluripotenz von ES- Zellen hat. Bei der Differenzierung der *Zfp206* stabil überexprimierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass diese wesentlich langsamer differenzieren, d.h. den pluripotenten Status später verlieren, als nicht transfizierte Vergleichszellen. Beim umgekehrten Experiment, der spezifischen Herunterregulierung von *Zfp206* durch siRNA konnte gezeigt werden, dass die transfizierten Zellen schneller ihre Pluripotenz verlieren als die nicht transfizierten

Vergleichszellen. Dieser Versuchsaufbau soll nun auch Aufschluss über eine mögliche Rolle von Stra8 bezüglich der Pluripotenz von ES- und SSC- Zelllinien geben. Sollten sich die stabil Stra8 überexprimierenden Zellen ähnlich verhalten, wie für Zfp206 beschrieben, kann man davon ausgehen, dass Stra8 tatsächlich einen Einfluss auf das Pluripotenznetzwerk hat.

Ein weiterer Ansatz, um unsere Hypothese zu bestätigen, ist die Suche nach Interaktionspartnern von Stra8. Da dies aufgrund der o.g. Unterschiede zwischen der Stra8- Expression im Testis und in den pluripotenten Zelllinien nicht auf kommerziell erwerblichen Testis cDNA- Banken sinnvoll ist und es bis dato noch keine cDNA- Banken aus pluripotenten Zelllinien gibt, wurden in unserer Arbeitsgruppe zwei cDNA- Banken, aus je einer ES- und SSC- Zelllinien des gleichen genetischen Hintergrundes, generiert. Mit Hilfe dieser cDNA- Banken soll nun nach Interaktionspartnern von Stra8 über das Yeast-Two-Hybrid-System gesucht werden. Die Analyse der Interaktionspartner soll Aufschluss darüber geben, in welchem Netzwerk (der Pluripotenz) Stra8 tatsächlich eine Rolle spielt. Im Idealfall werden schon bekannte Pluripotenzgene als Interaktionspartner für Stra8 identifiziert.

4.4 Isolierung und Kultivierung humaner SSCs

Die Möglichkeit, pluripotente Stammzelllinien auch aus humanem Testis zu generieren, würde einen großen Fortschritt im Hinblick auf Therapieansätze für eine Vielzahl von Krankheiten bedeuten. So könnte man z.B. aus SSC- Zelllinien, die aus dem Testis eines Diabetes- Patienten generiert wurden, Insulin- produzierende β - Zellen differenzieren und die Patienten- spezifischen Zellen transplantieren. Zumindest bei männlichen Patienten könnten so die immunologischen und auch ethischen Probleme, die von humanen ES- Zellen ausgehen, umgangen werden. Ein weiterer Ansatz wäre natürlich auch die Therapie der Infertilität. Durch die *in vitro* Differenzierung von Zellen aus humanen SSC- Zelllinien zu Spermien könnte z.B. ein bestehender Kinderwunsch eines Spermatogenese-arrest- Patienten erfüllt werden.

Bislang ist es noch nicht gelungen, SSC- Zelllinien aus humanem Testis zu generieren. Ein Grund könnte sein, dass es – zumindest in Deutschland – sehr schwer ist, an geeignetes Material heranzukommen. Testis- Biopsien, die routinemäßig aus Patienten gewonnen werden, deren Spermientransport in die ableitenden Samenwege blockiert ist und somit keine Spermien in der Samenflüssigkeit vorhanden sind, stellen aufgrund der

sehr geringen Anzahl an Zellen kein geeignetes Material dar. Da man davon ausgehen muss, dass auch beim Menschen der Anteil an SSCs im Testis gering ist (bei der Maus sind es 0,03%), ist es sehr schwer, ausgehend von so wenig Material die richtigen Bedingungen für die Isolierung und Kultivierung dieser Zellen zu etablieren. Ebenso sind auch die Testes von transsexuellen Männern kein geeignetes Material. Hier spielt zwar der Mengenfaktor keine Rolle, da man den ganzen Testis zur Verfügung hat, jedoch sind die Patienten vor ihrer Geschlechtsumwandlung über eine lange Zeit mit Hormonen behandelt worden, was natürlich auch die Spermatogenese und somit die Qualität der SSCs stark beeinflusst. Ein wichtiger limitierender Faktor auf dem Weg, erfolgreich SSCs aus humanem Testis isolieren und kultivieren zu können, ist also der Mangel an geeignetem Gewebe.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, SSCs zu isolieren und auch über einen kurzen Zeitraum zu kultivieren. Die sich bildenden Zellcluster sind teilweise AP- positiv, was ein erster Marker auf dem Weg zur Pluripotenz ist, und zeigen auch teilweise Expression von Oct4, welches als zweiter Marker während der Reprogrammierungsphase bekannt ist (Wernig et al., 2007; Brambrink et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008). Es war jedoch auch durch den Einsatz der verschiedensten Isolationsstrategien und Kulturbedingungen nicht möglich, eine proliferierende Zelllinie zu generieren. Auch anderen Gruppen ist das bisher nicht gelungen. So konnte z.B. von der Arbeitsgruppe um Thomas Skutella (Tübingen) gezeigt werden, dass aus dem humanen Testis isolierte Zellen alle Pluripotenzmarker exprimieren und sowohl *in vivo* (Teratome) als auch *in vitro* zu Derivaten aller drei Keimblätter differenzieren können. Diese Ergebnisse werden auch von den Arbeitsgruppen um Francisco Silva (USA) und Martin Dym (USA) bestätigt (Vorträge und persönliche Gespräche), jedoch ist es bisher niemandem gelungen, pluripotente, proliferierende Zelllinien zu generieren. Dies wird auch der Grund sein, warum bis dato hierzu noch keine Arbeiten veröffentlicht sind.

Einen weiteren Grund für die Schwierigkeiten, SSCs aus humanem Testis zu isolieren und zu kultivieren sind die Unterschiede in der Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung von SSCs und Spermatogonien zwischen Maus und Mensch (Ehmcke et al., 2006). Bei der Maus durchlaufen die spermatogonialen Vorläuferzellen vier mitotische Teilungen, bevor sie in die weitere Differenzierung zu Spermatogonien eintreten, während es beim Menschen nur eine Teilung ist. So ist die Anzahl der SSCs zwar in etwa dieselbe, die Anzahl der undifferenzierten Spermatogonien ist aber deutlich geringer. Insgesamt ist also die Spermatogenese bei der Maus wesentlich

effizienter als beim Menschen, was auf eine höhere Selbsterneuerungsrate der SSCs zurückzuführen ist. SSCs sind also bei der Maus „aktiver“. Das könnte natürlich ein Grund dafür sein, dass sie sich auch *in vitro* leichter kultivieren und umprogrammieren lassen.

Dass pluripotente Zellen zumindest im fetalen Testis existieren, konnte 2008 von der Arbeitsgruppe um John Gearhart gezeigt werden (Kerr et al., 2008). Sie konnten zeigen, dass im fetalen Testis (7-15 Wochen nach Befruchtung) Pluripotenzmarker exprimiert werden. So konnten gerade in den Wochen 7-9 nach Befruchtung Zellen im Testis detektiert werden, die positiv waren für Oct4, SSEA1 und 4 (stage specific embryonic antigen). Während der weiteren Entwicklung (Wochen 9-15 nach Befruchtung) nahm die Expression der Pluripotenzmarker ab. Die Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass die starke Expression der Pluripotenzmarker in den früheren Entwicklungsstufen noch von den PGCs herrührt und später, wenn die Expression abnimmt, nur noch von spermatogonialen Vorläuferzellen. Dies stimmt überein mit der Tatsache, dass EGC-Zelllinien beim Menschen erfolgreich aus fetalen Gonaden 5-12 Wochen nach Befruchtung isoliert werden konnten (Shablott et al., 1998; Park et al., 2004).

Insgesamt lässt sich sagen, dass es noch weiterer intensiver Forschung bedarf, bis man in der Lage sein wird, SSC- Zelllinien aus humanem Testes zu isolieren. Insbesondere wird es von großer Bedeutung sein, die richtigen Kulturbedingungen herauszufinden. Dass SSC- Zelllinien der Maus nicht die gleichen Kulturbedingungen erfordern, wie SSC- Zelllinien des Menschen lässt sich alleine aus der Tatsache erahnen, dass sich auch die Kultur humaner ES- Zellen deutlich von der muriner ES- Zellen unterscheidet. Nicht umsonst hat es nach der ersten Isolierung muriner ES- Zellen (Martin, 1981; Evans and Kaufmann, 1981) noch weitere 17 Jahre gedauert, bis das auch beim Menschen geglückt ist (Thomson et al., 1998).

Die jüngsten Entwicklungen in der Stammzellforschung lassen jedoch die berechtigte Frage aufkommen, ob es im Hinblick auf Therapieansätze überhaupt noch nötig ist, pluripotente Zelllinien aus adultem humanen Testis zu gewinnen. Erstmals berichteten Takahashi und Yamanaka (2006), dass es ihnen gelungen ist, aus embryonalen und adulten Fibroblasten pluripotente Zelllinien zu generieren. Diese sog. iPS- Zellen (induced pluripotent stem) sind seitdem im Fokus der weltweiten Forschung (siehe Abschnitt 4.5).

4.5 iPS- Zellen

Die erfolgreiche Reprogrammierung von Fibroblasten zu iPS (induced pluripotent stem)- Zellen wurde von Takahashi und Yamanaka durch eine retrovirale Transduktion der vier Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, c-myc und Klf4 erreicht (Takahashi und Yamanaka, 2006). Über die Selektion auf Zellen, die das Oct4- Target- Gen *Fbx15* exprimierten, konnten Zellen isoliert werden, die nicht nur morphologisch den ES-Zellen sehr ähnlich waren. Die Pluripotenz dieser Zellen wurde in dieser Arbeit über die endogene Expression der Pluripotenzgene sowie ihrer Fähigkeit, Teratome hervorzurufen, bewiesen. Ein entscheidendes Kriterium, die Fähigkeit Keimbahnchimären zu produzieren, konnte von den Zellen allerdings nicht erfüllt werden. Dieses Problem wurde ein Jahr später gleich von mehreren Arbeitsgruppen gelöst, in dem sie zeigten, dass iPS- Zellen, deren Selektion direkt auf die Expression von Oct4 bzw. Nanog erfolgte, alle erforderlichen Kriterien für Pluripotenz, inklusive der Bildung von Keimbahnchimären, erfüllten (Wernig et al., 2007, Okita et al., 2007; Maherali et al., 2007). Allerdings entwickelten die iPS- Chimären c-myc- induzierte Tumore (Okita et al., 2007). Dieses Problem wurde wenig später gelöst, indem gezeigt wurde, dass eine Reprogrammierung der Zellen auch ohne c-myc stattfindet, wenn auch mit geringerer Effizienz (Yu et al., 2007, Wernig et al., 2008; Nakagawa et al., 2008) (Abb.92).

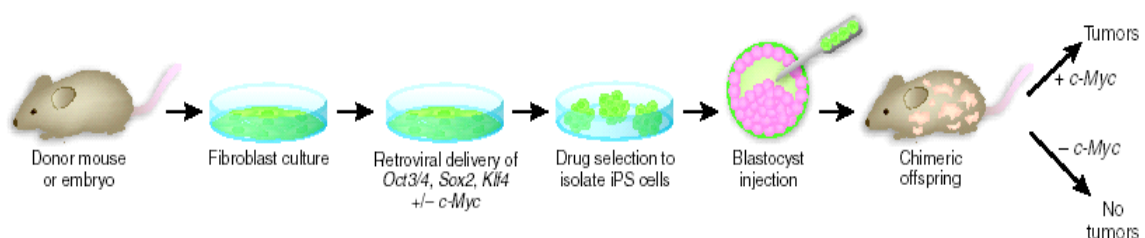


Abbildung 92: iPS- Zellen, die ohne die Transduktion von c-myc entstanden sind, rufen in den Chimären keine Tumorbildung hervor (aus: Wernig et al., 2008)

Die aus diesen Zellen erhaltenen Chimären entwickelten jedoch noch sehr selten Tumore, was auch nach der Injektion anderer pluripotenter Zellen der Fall ist.

Für eine Übertragung auf den Menschen müsste ein Weg gefunden werden, der die Gewinnung von iPS- Zellen auch ohne genetische Selektion erlaubt. In zwei Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Reprogrammierung einhergeht mit einer Veränderung des Phänotyps der Zellen. So konnten die reprogrammierten Zellen einer

Fibroblastenkultur nur aufgrund ihrer Morphologie selektiert werden (Meissner et al., 2007; Blelloch et al., 2007). Die so generierten iPS- Zellen hatten das gleiche Potenzial wie die nach genetischer Selektion entstandenen. So wurde dann auch zeitnah die Generierung humaner iPS- Zellen durch die retrovirale Transduktion der o.g. vier Transkriptionsfaktoren beschrieben, die, wie bereits ihre murinen Vorgänger, alle Kriterien für Pluripotenz erfüllten (Takahashi et al., 2007; Park et al., 2008). Auch die Generierung humaner iPS- Zellen ohne c-myc wurde bereits gezeigt (Yu et al., 2007). Diese Arbeitsgruppe transduzierte Oct4, Sox2 und Lin28, ein RNA bindendes Protein, und konnte so zeigen, dass es alternative Kombinationen an Faktoren gibt.

Weitere Analysen der iPS- Zellen brachten zudem die Erkenntnis, dass während der Reprogrammierung eine bestimmte Reihenfolge in der Expression der Pluripotenzmarker herrscht: Als erstes werden die Zellen AP- positiv, wenig später exprimieren sie dann auch SSEA1. Dann wird die Expression von Oct4 und Nanog angeschaltet, woraufhin die Zellen vollständig umprogrammiert sind (Wernig et al., 2007; Brambrink et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008). Ebenso wurde gezeigt, dass die vier Transkriptionsfaktoren für mehr als 12 Tage in den Fibroblasten retroviral exprimiert werden müssen, um eine vollständige Reprogrammierung zu erhalten (Brambrink et al., 2008) (vergleiche auch Abb.93).

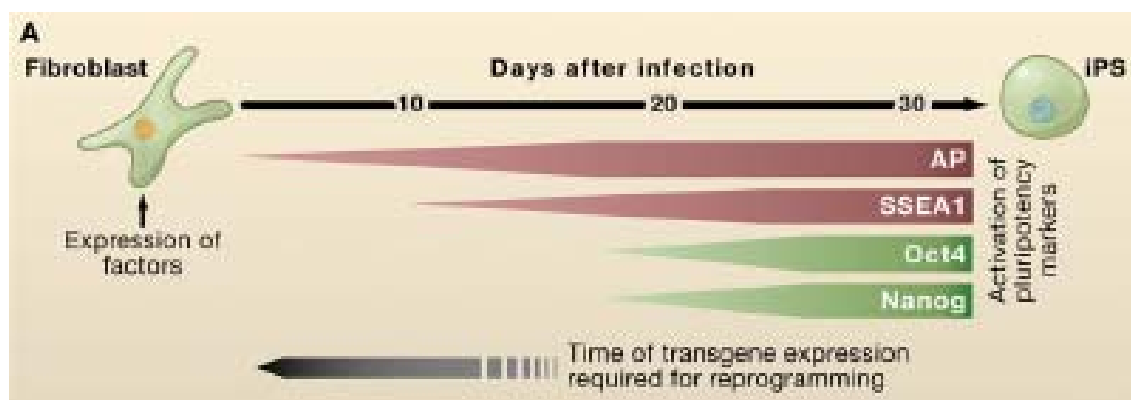


Abbildung 93: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Reprogrammierung von Fibroblasten zu iPS- Zellen (aus: Jaenisch und Young, 2008)

Dass die iPS- Zellen auch für therapeutische Zwecke nutzbar sind, konnte bereits 2007 von der Arbeitsgruppe um Rudolph Jaenisch gezeigt werden (Hanna et al., 2007). Sie generierten iPS- Zellen aus Fibroblasten einer Maus mit Sichelzell- Anämie, korrigierten den Gendefekt über homologe Rekombination, differenzierten die modifizierten iPS- Zellen *in vitro* zu hämatopoetischen Vorläuferzellen und transplantierten diese in eine Maus mit Sichelzell- Anämie. Es konnte gezeigt werden, dass der pathologische Phänotyp der Maus therapiert werden konnte.

Um solch einen Therapieansatz auch auf den Menschen übertragen zu können, müssen in Zukunft Methoden entwickelt werden, die eine Reprogrammierung von Fibroblasten ohne den Einsatz von Retroviren ermöglichen. Denkbar wäre eine transiente Expression der Faktoren oder eine direkte Zugabe der Proteine. Sollte es möglich sein, auf einem dieser Wege humane iPS- Zellen zu generieren, so stellen diese Zellen ein wichtiges Instrument bei der Entwicklung von Therapien für verschiedenste Erkrankungen dar. Da aus jedem individuellen Patienten iPS- Zellen gewonnen werden könnten, würde es bei einer Transplantation nicht zu immunologischen Abstoßungsreaktionen des Körpers kommen (siehe auch Abb.94).

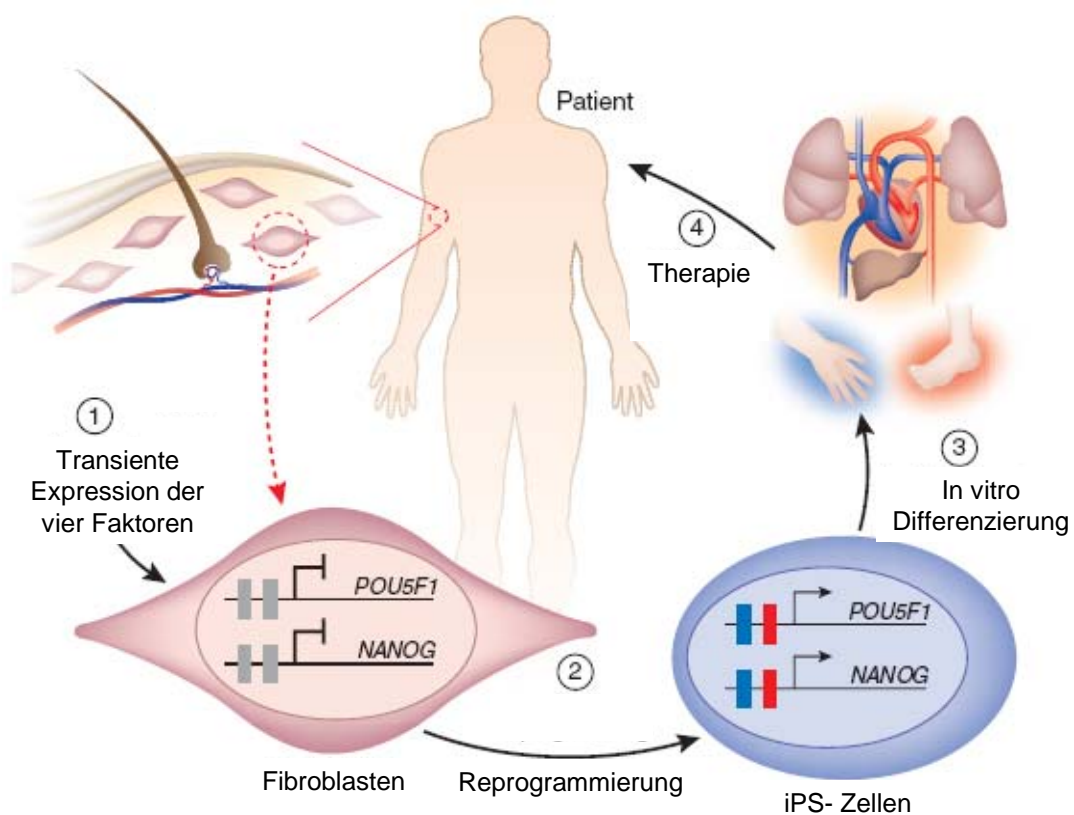


Abbildung 94: Ansatz zur Therapie mit iPS- Zellen (modifiziert nach Chang und Cotsarelis, 2007)

- 1: Transiente Expression der Transkriptionsfaktoren in Patientenspezifischen Fibroblasten
- 2: Reprogrammierung der Zellen zu iPS- Zellen
- 3: Modifikation und/ oder *in vitro* Differenzierung zu dem entsprechenden Zelltyp
- 4: Therapie des Patienten durch Transplantation der Zellen

Es bleibt also abzuwarten, ob eine geeignete Methode gefunden wird, um iPS- Zellen ohne den Einsatz von Viren zu gewinnen. Sollte das eines Tages der Fall sein, wird die Diskussion über den Einsatz von ES- Zellen gegenstandslos sein und auch die

Generierung von pluripotenten Zelllinien aus dem adulten Testis wird zumindest im Hinblick auf Therapieansätze nicht mehr von Bedeutung sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Spermatogoniale Stammzellen (SSCs) können durch Kultivierung zu pluripotenten Zelllinien umprogrammiert werden (Guan,..., Nolte et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Pluripotenz dieser Zelllinien näher untersucht, indem sie mit pluripotenten ES- Zelllinien des gleichen genetischen Hintergrundes verglichen wurden. Die eigens dafür isolierten und etablierten ES- Zelllinien wurden dafür im Vorfeld auf die Expression sog. Pluripotenzmarker mittels Western Blot- Analysen untersucht. Alle verwendeten SSC- und ES- Zelllinien exprimieren die Pluripotenzmarker Oct4, Sox2, Nanog, Zfp206 und Sall4 in vergleichbaren Verhältnissen. Schwankungen im Expressionsprofil sind auf den genetischen Hintergrund zurückzuführen und tauchen sowohl innerhalb der verschiedenen ES- Zelllinien als auch zwischen den verschiedenen SSC- Zelllinien auf. Eine Langzeitkultur einer SSC- Zelllinie (SSC FVB) zeigte, dass diese Pluripotenzmarker auch noch in Zellen der Passage 70 exprimiert werden, was auf eine sehr hohe Stabilität der Zellen in Kultur hindeutet.

Die Analyse der Promotor- Methylierung der Pluripotenzgene Oct4 und Nanog zeigte ebenfalls einen ähnlichen Zustand bei ES- und SSC- Zellen. Nach Differenzierung der jeweiligen Zellen für 20 Tage mit Retinsäure nahm die Methylierung erwartungsgemäß bei beiden Zelltypen zu. Die Untersuchung der Methylierung einiger Gene, die dem Imprinting unterliegen, zeigte auch ähnliche Methylierungsmuster zwischen ES- und SSC- Zelllinien. Die hier auftretenden Schwankungen können ebenfalls den verschiedenen genetischen Hintergründen zugeordnet werden.

Bei dem Vergleich von ES- und SSC- Zelllinien bezüglich ihrer Fähigkeit, Teratome zu verursachen, kann angenommen werden, dass die ES- Zellen schneller Teratombildung hervorrufen als SSC- Zellen. Dies muss jedoch noch durch weitere Versuche bestätigt werden, da bis dato nur eine ES- Zelllinie für die Injektion verwendet wurde und daher nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch dieses Phänomen auf den genetischen Hintergrund zurückzuführen ist.

Bei der Injektion von Zellen der verschiedenen ES- und SSC- Zelllinien in Blastozysten konnten zwar aus allen Zellen Chimären gewonnen werden, jedoch gibt es hier einen sehr deutlichen Unterschied zwischen ES- und SSC- Zelllinien. Die Chimären aus ES-

Zellen waren deutlich höherprozentiger und zeigten auch Keimbahntransmission, während aus der Injektion von Zellen der SSC- Zelllinien nur niedrigprozentige Chimären hervorgingen, die auch nicht transmittierten.

Die Analyse der Chromosomen der verschiedenen ES- und SSC- Zelllinien zeigte, dass SSC- Zelllinien häufig eine Aneuploidie der Chromosomen 8 und 11 aufweisen. Zwar ist dieses Phänomen auch bei ES- Zelllinien bekannt, tritt jedoch in der Regel nicht so häufig auf, wie das bei den vorliegenden Analysen der Fall war.

Transplantiert man Zellen aus SSC- Zelllinien (kultivierte SSCs) in Testis von Mäusen, bei denen vorher die endogene Spermatogenese zerstört wurde, so entwickeln sich nach kurzer Zeit Tumore. Dies steht im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Daten, wo eine Repopulation des Testis beschrieben wurde. Zu erklären ist dieser Unterschied, da im Rahmen dieser Arbeit kultivierte SSCs (Zellen aus SSC- Zelllinien) transplantiert wurden und nicht, wie in der bereits publizierten Arbeit, frisch isolierte SSCs. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass SSCs in Kultur zu pluripotenten Zellen reprogrammiert werden und nicht schon *in vivo* pluripotente Stammzellen sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass reprogrammierte SSCs (SSC- Zelllinien) *in vitro* in der Lage sind, Spermatogenese zu durchlaufen. Indem die gleiche Strategie angewendet wurde, die bereits bei der *in vitro* Spermatogenese von ES- Zellen zum Erfolg führte, konnte gezeigt werden, dass Zellen der SSC- Zelllinien bereits alle prämeiotischen Marker exprimieren und nach Induktion mit Retinsäure die Meiose durchlaufen und haploide männliche Keimzellen bilden. Nach Injektion dieser Zellen in Oocyten (ICSI) konnten 2-Zeller generiert werden, die aus den injizierten Zellen hervorgegangen waren. Der Retransfer dieser 2-Zeller in scheinchwangere Weibchen führte zur Geburt einiger Mäuse, die aufgrund der Ergebnisse der Genotypisierungs- PCR aus den *in vitro* generierten haploiden Zellen hervorgegangen sind.

In einem weiteren Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stra8 nicht nur ein Marker für prämeiotische Stadien der Spermatogenese ist, sondern auch von allen pluripotenten Zelllinien, und hier sowohl im Cytoplasma als auch im Kern, exprimiert wird. Das Stra8- Protein konnte außerdem in den verschiedenen Stadien der frühen Embryonalentwicklung (Präimplantationsembryonen) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass Stra8 ein Helix-Loop-Helix- Motiv besitzt, lassen vermuten, dass Stra8 eine Rolle bezüglich der Pluripotenz von Stammzellen spielt und hier eventuell sogar als Transkriptionsfaktor in das Netzwerk eingreift.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adham, I.M., Eck, T.J., Mierau, K., Müller, N., Sallam, M.A., Paprotta, I., Schubert, S., Hoyer-Fender, S., Engel, W. (2005). Reduction of spermatogenesis but not fertility in *Creb3l4*-deficient mice. *Mol Cell Biol.* **25**(17): 7657-7664.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**(3): 403-410.

Bagutti, C., Wobus, A.M., Fässler, R., Watt, F. (1996). Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: Comparison of wild-type and $\beta 1$ integrin-deficient cells. *Dev Biol.* **179**: 184–196.

Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol.* **168**: 342–357.

Baltus, A.E., Menke, D.B., Hu, Y.C., Goodheart, M.L., Carpenter, A.E., de Rooij, D.G., Page, D.C. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet.* **38**(12): 1430-1434.

Bannister, L.A., Pezza, R.J., Donaldson, J.R., de Rooij, D.G., Schimenti, K.J., Camerini-Otero, R.D., Schimenti, J.C. (2007). A dominant, recombination-defective allele of *Dmc1* causing male-specific sterility. *PLoS Biol.* **5**(5): e105.

Bartel, D.P., Chen, C.Z. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet.* **5**(5): 396-400.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* **116**(2): 281-297.

Baylin, S.B. (1997). Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science.* **277**(5334): 1948-1949.

Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**(6): 1513-1523.

Blelloch, R., Venere, M., Yen, J., Ramalho-Santos, M. (2007). Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell.* **1**(3): 245-247.

Bouillet, P., Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Dollé, P., Chambon, P. (1995). Sequence and expression pattern of the *Stra7* (*Gbx-2*) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dyn.* **204**(4): 372-382.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell.* **2**(2): 151-159.

Brinster, R.L., Avarbock, M.R. (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci.* **91**(24): 11303-11307.

Brinster, R.L., Zimmermann, J.W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci.* **91**(24): 11298-11302.

Brüstle, O., Jones, N.K., Learish, R.D., Karrami, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D., McKay, R.D.G. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* **285**: 754-765.

Buhr, N., Carapito, C., Schaeffer, C., Kieffer, E., Van Dorsselaer, A., Viville, S. (2008). Nuclear proteome analysis of undifferentiated mouse embryonic stem and germ cells. *Electrophoresis.* **29**(11): 2381-2390.

Buttery, L.D., Bourne, S., Xynos, J.D., Wood, H., Hughes, F.J., Hughes, S.P., Episkopou, V., Polak, J.M. (2001). Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* **7**: 89-99.

Campbell, N.A., Reece, J.B., Mitchell, L.G. (2001). *Biology*. 6th ed: Pearson Benjamin Cummings. San Francisco.

Chang, H.Y., Cotsarelis, G. (2007). Turning skin into embryonic stem cells. *Nat Med*. **13**(7): 783-784.

Chen, C., Ridzon, D., Lee, C.T., Blake, J., Sun, Y., Strauss, W.M. (2007). Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets. *Mamm Genome*. **18**(5): 316-327.

Cheng, J., Dutra, A., Takesono, A., Garrett-Beal, L., Schwartzberg, P.L. (2004). Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media. *Genesis*. **39**(2): 100-104.

Clark, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. **16** (20): 9677-9686.

Cooke, H.J., Lee, M., Kerr, S., Ruggiu, M.A. (1996). A murine homolog of the human DAZ gene is autosomal an expressed only in male and female gonads. *Hum Mol Genet*. **5**: 513-516.

Creemers, L.B., Meng, X., den Ouden, K., van Pelt, A.M., Izadyar, F., Santoro, M., Sariola, H., de Rooij, D.G. (2002). Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biol Reprod*. **66**(6): 1579-1584.

Cui, L., Johkura, K., Yue, F., Ogiwara, N., Okouchi, Y., Asanuma, K., Sasaki, K. (2004). Spatial distribution and initial changes of SSEA-1 and other cell adhesion-related molecules on mouse embryonic stem cells before and during differentiation. *J Histochem Cytochem*. **52**(11): 1447-1457.

Dani, C., Smith, A.G., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C., Ailhaud, G. (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* **110**: 1279-1285.

- De Miguel, M.P., Cheng, L., Holland, E.C., Federspiel, M.J., Donovan, P.J.** (2002). Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci.* **99**(16): 10458-10463.
- de Rooij, D.G., Mizrak, S.C.** (2008). Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development.* **135**(13): 2207-2213.
- Denhardt, D. T.** (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* **23** (5): 641-646.
- Di Carlo, A.D., Travia, G., De Felici, M.** (2000). The meiotic specific synaptonemal complex protein SCP3 is expressed by female and male PGCs in the mouse embryo. *Int J Dev Biol.* **44**(2): 241-244.
- Dinsmore, J., Ratcliff, J., Deacon, T., Pakazaban, P., Jacoby, D., Galpern, D.** (1996). Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant.* **5**: 131-143.
- Doetschman, T., Eistetter, H., Katz, M., Schmitt, W., Kemler, R.** (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morph.* **87**: 27-45.
- Drab, M., Haller, H., Bychkov, R., Erdmann, B., Lindschau, C., Haase, H., Morano, I., Luft, F.C., Wobus, A.M.** (1997). From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting vascular smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB J.* **11**: 905-915.
- Drusenheimer, N., Wulf, G., Nolte, J., Lee, J.H., Dev, A., Dressel, R., Gromoll, J., Schmidtke, J., Engel, W., Nayernia, K.** (2007). Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. *Soc Reprod Fertil Suppl.* **63**: 69-76.
- Ehmcke, J., Wistuba, J., Schlatt, S.** (2006). Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update* **12**(3): 275-282.

Evans, M. J. und Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. **292**: 154-156.

Fairchild, P.J., Brook, F.A., Gardner, R.L., Graça, L., Strong, V., Tone, Y., Tone, M., Nolan, K.F., Waldmann, H. (2000). Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells. *Curr Biol*. **10**: 1515–1518.

Feng, L., Chen, Y., Dettin, L. et al. (2002). Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science*. **297**: 392- 395.

Fraichard, A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P., Samarut, J. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci*. **108**: 3181–3188.

Geijsen, N., M. Horoschak, K. Kim, J. Gribnau, K. Eggan & G. Q. Daley (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*. **427**: 148 -154.

Gerrard, L., Zhao, D., Clark, A.J., Cui, W. (2005). Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency. *Stem Cells*. **23**(1): 124-133.

Gershoni, J.M. und Palade, G.E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*. **131**(1): 1-15.

Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J.H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., Hasenfuss, G. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*. **440**(7088): 1199-1203.

Guo, X., Ying, W., Wan, J., Hu, Z., Qian, X., Zhang, H., He, F. (2001). Proteomic characterization of early-stage differentiation of mouse embryonic stem cells into neural cells induced by all-trans retinoic acid in vitro. *Electrophoresis*. **22**(14): 3067-3075.

Hahnel, A.C., Rappolee, D.A., Millan, J.L., Manes, T., Ziomek, C.A., Theodosiou, N.G., Werb, Z., Pedersen, R.A., Schultz, G.A. (1990). Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo. *Development*. **110**(2): 555-564.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. **166**(4): 557-580.

Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., Jaenisch, R. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. **318**(5858): 1920-1923.

Hattori, N., Nishino, K., Ko, Y.G., Hattori, N., Ohgane, J., Tanaka, S., Shiota, K. (2004). Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem*. **279**(17): 17063-17069.

Hecht, N.B. (1989). Mammalian protamines and their expression. In: L., Stein, G., Stein, J. *Histones and Other Basic Nuclear Proteins*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 347- 373.

Hiura, H., Komiyama, J., Shirai, M., Obata, Y., Ogawa, H., Kono, T. (2007). DNA methylation imprints on the IG-DMR of the Dlk1-Gtl2 domain in mouse male germline. *FEBS Lett*. **581**(7): 1255-1260.

Hofmann, M.C., Braydich-Stolle, L., Dym, M. (2005). Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol*. **279**: 114-124.

Houbaviy, H.B., Dennis, L., Jaenisch, R., Sharp, P.A. (2005). Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene. *RNA*. **11**(8): 1245-1257.

Houbaviy, H.B., Murray, M.F., Sharp, P.A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*. **5**(2): 351-358.

Howlett, S.K. und Reik, W. (1991). Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development*. **113**(1): 119-127.

Hübner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L. K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J. F., 3rd, Boiani, M. und Schöler, H. R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*. **300**: 1251-1256.

Izadyar, F., Pau, F., Marh, J., Slepko, N., Wang, T., Gonzalez, R., Ramos, T., Howerton, K., Sayre, C., Silva, F. (2008). Generation of multipotent cell lines from a distinct population of male germ line stem cells. *Reproduction*. **135**(6): 771-784.

Jaenisch, R. und Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. **132**(4): 567-582.

Jaroszynski, L. (2005). Expression and functional analysis of *Tex18* and *Stra8* genes in male germ cells. Doktorarbeit.

John, H.A., Birnstiel, M.L., Jones, K.W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*. **223**(5206): 582-587.

Kallajoki, M., Parvinen, M., Suominen, J.J. (1986). Expression of acrosin during mouse spermatogenesis: a biochemical and immunocytochemical analysis by a monoclonal antibody C11H. *Biol Reprod*. **35**(1): 157-165.

Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Toyoshima, M., Niwa, O., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A., Shinohara, T. (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*. **119**(7): 1001-1012.

Kanatsu-Shinohara, M., Lee, J., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., Ikawa, M., Nakamura, T., Ogura, A., Shinohara, T. (2008). Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol Reprod*. **78**(4): 681-687.

Kerr, C.L., Hill, C.M., Blumenthal, P.D., Gearhart, J.D. (2008). Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal testis. *Stem Cells*. **26**(2): 412-421.

Kitamura, K., Tanaka, H., Nishimue, Y. (2003). Haprin, a Novel Haploid Germ Cell-specific RING Finger Protein Involved in the Acrosome Reaction. *J Biol Chem.* **278**(45): 44417-44423.

Kramer, J., Hegert, C., Guan, K., Wobus, A.M., Müller, P.K., Rohwedel, J. (2000). Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev.* **92**:193–205

Kubota, H., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* **101**(47): 16489-16494.

Kuntz, S., Kieffer, E., Bianchetti, L., Lamoureux, N., Fuhrmann, G., Viville, S. (2008). Tex19, a mammalian-specific protein with a restricted expression in pluripotent stem cells and germ line. *Stem Cells.* **26**(3): 734-744.

Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Yomogida, K., Kuroiwa, A., Tadokoro, Y., Fujita, Y., Sato, M., Matsuda, Y., Nakano, T. (2001). Two mouse piwi- related genes: miwi and mili. *Mech Dev.* **108**: 121-133.

Kurisaki, A., Hamazaki, T.S., Okabayashi, K., Iida, T., Nishine, T., Chonan, R., Kido, H., Tsunasawa, S., Nishimura, O., Asashima, M., Sugino, H. (2005). Chromatin-related proteins in pluripotent mouse embryonic stem cells are downregulated after removal of leukemia inhibitory factor. *Biochem Biophys Res Commun.* **335**(3): 667-675.

Labosky, P.A., Barlow, D.P., Hogan, B.L. (1994). Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development.* **120**(11): 3197-3204.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**(5259): 680-685.

Laird, P. W., A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch und A. Berns (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* **19** (15): 4293.

Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., McKay, R.D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* **18**: 675–679.

Leitch, A.R., Schwarzacher, T., Leitch, I.J. (1994). The use of fluorochromes in the cytogenetics of the small-grained cereals (Triticeae). *Histochem J.* **26**(6): 471-479.

Li, B., Nair, M., Mackay, D.R., Bilanchone, V., Hu, M., Fallahi, M., Song, H., Dai, Q., Cohen, P.E., Dai, X. (2005). *Ovo11* regulates meiotic pachytene progression during spermatogenesis by repressing *Id2* expression. *Development.* **132**(6): 1463-1473.

Liu, S., Qu, Y., Stewart, T.J., Howard, M.J., Chakraborty, S., Holekamp, T.F., McDonald, J.W. (2000). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci.* **97**: 6126–6131.

Lucifero, D., Mertineit, C., Clarke, H.J., Bestor, T.H., Trasler, J.M. (2002). Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics.* **79**(4): 530-538.

Lue, Y., Erkkila, K., Liu, P.Y., Ma, K., Wang, C., Hikim, A.S., Swerdloff, R.S. (2007). Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. *Am J Pathol.* **170**(3): 899-908.

Luetjens, C.M., Xu, E.Y., Rejo Pera, R.A., Kamischke, A., Nieschlag, E., Gromoll, J. (2004). Association of meiotic arrest with lack of *BOULE* protein expression in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab.* **89**(4): 1926-1933.

Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., McKay, R. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* **292**: 1389–1394.

Mahadevaiah, S.K., Odoriso ,T., Elliott, D.J., Rattigan, A., Szot, M., Laval, S.H., Washburn, L.L., McCarrey, J.R., Cattanach, B.M., Lovell-Badge, R., Burgoyne, P.S. (1998). Mouse homologues of the human AZF candidate gene RBM are expressed in spermatogonia and spermatids, and map to a Y chromosome deletion interval associated with a high incidence of sperm abnormalities. *Hum Mol Genet.* **7**: 715-727.

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

Mali, P., Kaipia, A., Kngasniemi, M., Toppari, J., Sandberg, M., Hecht, N.B., Parvinen, M. (1989). Stage- specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis. *Reprod Fertil Dev.* **1**: 369-382.

Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Hescheler, J., Wobus, A.M. (1993). Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev.* **44**: 41–50.

Maltsev, V.A., Wobus, A.M., Rohwedel, J., Bader, M., Hescheler, J. (1994). Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res.* **75**: 233–244.

Martin, G.R. (1981). Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* **78**: 7634-7638.

Martin, G.R., Evans, M.J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* **72**(4): 1441–1445.

Matsui, Y., Zsebo, K., Hogan, B.L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell.* **70**(5): 841-847.

Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R. (2007). Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* **25**(10): 1177-1181.

Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M., Sariola, H. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* **287**(5457): 1489-1493.

Menke, D.B., Koubova, J., Page, D.C. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol.* **262**(2): 303-312.

Miyamoto, T., Hasuike, S. (2002). Isolation and expression analysis of the human RNH2 gene encoding ribonuclease inhibitor 2. *J Assist Reprod Genet.* **19**(8): 394-397.

Monk, M., Boubelik, M., Lehnert, S. (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development.* **99**(3): 371-382.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly W. und Roder J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* **90**: 8424-8428.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* **26**(1): 101-106.

Nakano, T., Kodama, H., Honjo, T. (1996). In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science.* **272**: 722-724.

Nayernia, K., Nolte, J., Michelmann, H.W., Lee, J.H., Rathsack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Wulf, G., Ehrmann, I.E., Elliott, D.J., Okpanyi, V., Zechner, U., Haaf, T., Meinhardt, A., Engel, W. (2006). In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell.* **11**(1): 125-132.

Nayernia, K., von Mering, M.H., Kraszucka, K., Burfeind, P., Wehrend, A., Köhler, M., Schmid, M., Engel, W. (1999). A novel testicular haploid expressed gene (THEG) involved in mouse spermatid-sertoli cell interaction. *Biol Reprod.* **60**(6):1488-1495.

Nayernia, K., Li, M., Jaroszynski, L., Khusainov, R., Wulf, G., Schwandt, I., Korabiowska, M., Michelmann, H.W., Meinhardt, A. and Engel, W. (2004a). Stem cell-based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells. *Hum Mol Genet.* **13**: 1451-1460.

Nayernia, K., Diaconu, M., Aumüller, G., Wennemuth, G., Schwandt, I., Kleene, K., Kühn, H. and Engel, W. (2004b). Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase: Expression Pattern During Testicular Development in Mouse and Evolutionary Conservation in Spermatozoa. *Mol Rep Dev.* **67**: 458-464.

Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., Kodama, H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1(+)/VE-cadherin(+) cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development.* **125**: 1747-1757.

Nolte, J. (2005). Versuche zur Differenzierung von Embryonalen Stammzellen und Tumorzellen zu männlichen Keimzellen. Diplomarbeit.

Nolte, J., Rathsack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Zechner, U., Haaf, T., Meinhardt, A., Michelmann, H.W., Nayernia, K., Engel, W. (2007). Male germ cells from embryonic stem cells. *Med Genetik.* **19**: 10-17.

Oatley, J.M., Avarbock, M.R., Talaranta, A.I., Fearon, D.T., Brinster, R.L. (2006). Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci.* **103**(25): 9524-9529.

Ogawa, T., Arechaga, J.M., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. (1997). Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol.* **41**: 111-122.

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

Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Décimo, D., Gansmuller, A., Heyberger, S., Dollé, P., Bronner, S., Lutz, Y., Chambon, P. (1996). Characterization of a Premeiotic Germ Cell-specific Cytoplasmic Protein Encoded by *Stra8*, a Novel Retinoic Acid-responsive Gene. *J Cell Biol.* **135**(2): 469-477.

Page, S.L. und Hawley, R.S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **20**: 525-558.

Pardue, M.L. und Gall, J.G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci.* **64**(2): 600-604.

Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., Daley, G.Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. **451**(7175): 141-146.

Park, J.H., Kim, S.J., Lee, J.B., Song, J.M., Kim, C.G., Roh, S. 2nd, Yoon, H.S. (2004). Establishment of a human embryonic germ cell line and comparison with mouse and human embryonic stem cells. *Mol Cells.* **17**(2): 309-315.

Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D., Williams, R.L. (1990). Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol.* **141**(2): 344-352.

Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D., Schöler, H. (1998). Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev.* **71**: 89-98.

Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci.* **83**(9): 2934-2938.

Potocnik, A., Nielsen, P.J., Eichmann, K. (1994). In vitro generation of lymphoid precursors from embryonic stem cells. *EMBO J.* **13**: 5274–5283.

Ravindranath, N., Dalal, R., Soloman, B., Djakiew, D., Dym, M. (1997). Loss of telomerase activity during male germ cell differentiation. *Endocrinology.* **138**(9): 4026-4029.

Reijo, R.A., Dorfman, D.M., Slee, R., Renshaw, A.A., Loughlin, K.R., Cooke, H., Page, D.C. (2000). DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. *Biol Reprod.* **63**(5): 1490-1496.

Reik, W. und Walter, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet.* **2**(1): 21-32.

Resnick, J.L., Bixler, L.S., Cheng, L., Donovan, P.J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature.* **359**(6395): 550-551.

Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H.G., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R., Doetschman, T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic- stem-cell-derived embryoid bodies. *Development.* **102**: 471-478.

Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature.* **323**(6087): 445-448.

Robinson, M.O., McCarrey, J.R., Simon, M.I. (1989). Transcriptional regulatory regions of testis- specific P_{gk2} defined in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci.* **86**: 8437-8441.

Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H.H., Hescheler, J., Wobus, A.M. (1994). Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: Developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol.* **164**: 87–101.

- Rolletschek, A., Chang, H., Guan, K., Czyz, J., Meyer, M., Wobus, A.M.** (2001). Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. *Mech Dev.* **105**: 93–104.
- Ryu, B.Y., Kubota, H., Avarbock, M.R., Brinster, R.L.** (2005). Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci.* **102**(40): 14302-14307.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239** (4839): 487-491.
- Saitou, M., Barton, S.C., Surani, M.A.** (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature.* **418**: 293-300.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A Laboratorial manual. Zweite Auflage. *Cold Spring Harbour, New York, USA.*
- Sanford, J.P., Clark, H.J., Chapman, V.M., Rossant, J.** (1987). Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. *Genes Dev.* **1**(10): 1039-1046.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* **74** (12): 5463-5467.
- Sato, M., Kimura, T., Kurohawa, K., Fujita, Y., Abe, K., Masuhara, M., Yasunaga, T., Ryo, A., Yamamoto, M., Nakano, T.** (2002). Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech Dev.* **113**: 91-94.
- Schmitt, R.M., Bruyns, E., Snodgrass, H.R.** (1991). Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes Dev.* **5**: 728–740.

Schrans-Stassen, B.H., van de Kant, H.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M. (1999). Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology*. **140**(12): 5894-5900.

Schröck, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M.A., Ning, Y., Ledbetter, D.H., Bar-Am, I., Soenksen, D., Garini, Y., Ried, T. (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*. **273**(5274): 494-497.

Schumm, M., Lang, P., Taylor, G., Kuçi, S., Klingebiel, T., Bühring, H.J., Geiselhart, A., Niethammer, D., Handgretinger, R. (1999). Isolation of highly purified autologous and allogeneic peripheral CD34+ cells using the CliniMACS device. *J Hematother*. **8**(2): 209-218.

Seandel, M., James, D., Shmelkov, S.V., Falciatori, I., Kim, J., Chavala, S., Scherr, D.S., Zhang, F., Torres, R., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., Murphy, A., Valenzuela, D.M., Hobbs, R.M., Pandolfi, P.P., Rafii, S. (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature*. **449**(7160): 346-350.

Shablott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci*. **95**(23): 13726-13731.

Sharova, L.V., Sharov, A.A., Piao, Y., Shaik, N., Sullivan, T., Stewart, C.L., Hogan, B.L., Ko, M.S. (2007). Global gene expression profiling reveals similarities and differences among mouse pluripotent stem cells of different origins and strains. *Dev Biol*. **307**(2): 446-459.

Shim, S.W., Han, D.W., Yang, J.H., Lee, B.Y., Kim, S.B., Shim, H., Lee, H.T. (2008). Derivation of embryonic germ cells from post migratory primordial germ cells, and methylation analysis of their imprinted genes by bisulfite genomic sequencing. *Mol Cells*. **25**(3): 358-367.

- Shinohara, T., Avarbock, M.R., Brinster, R.L.** (1999). beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* **96**(10): 5504-5509.
- Shinohara, T., Orwig, K.E., Avarbock, M.R., Brinster, R.L.** (2000). Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci.* **97**(15): 8346-8351.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D.** (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature.* **336**(6200): 688-690.
- Smith, A.G.** (1992). Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation. *Semin Cell Biol.* **3**(6): 385-399.
- Smith, A. G.** (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **17**: 435-462.
- Sofikitis, N., Pappas, E., Kawatani, A.** (2005). Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Hum Rep Update.* **11**(3): 229-259.
- Solter, D. und Knowles, B.B.** (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci.* **75**(11): 5565-5569.
- Soria, B., Roche, E., Berna, E., Leon-Quinto, T., Reig, J.A., Martin, F.** (2000). Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes.* **49**: 1-6.
- Sorrentina, V., Giorgi, M., Geremia, R., Besmer, P., Rossi, P.** (1991). Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. *Oncogene.* **6**: 149-151.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**(3): 503-517.

Speicher, M.R., Gwyn Ballard, S., Ward, D.C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* **12**(4): 368-375.

Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., Hochedlinger, K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell.* **2**(3): 230-240.

Stewart, C.L., Gadi, I., Bhatt, H. (1994). Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol.* **161**(2): 626-628.

Stöger, R., Kubicka, P., Liu, C.G., Kafri, T., Razin, A., Cedar, H., Barlow, D.P. (1993). Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell.* **73**(1): 61-71.

Strauss, W.M., Chen, C., Lee, C.T., Ridzon, D. (2006). Nonrestrictive developmental regulation of microRNA gene expression. *Mamm Genome.* **17**(8): 833-840.

Strübing, C., Ahnert-Hilger, G., Jin, S., Wiedenmann, B., Hescheler, J., Wobus, A.M. (1995). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev.* **53**: 275-287.

Swiger, R.R. und Tucker, J.D. (1996). Fluorescence in situ hybridization: a brief review. *Environ Mol Mutagen.* **27**(4): 245-254.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* **131**(5): 861-872.

Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* **126**(4): 663-676.

Takehashi, M., Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Lee, J., Kazuki, Y., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Oshimura, M., Ogura, A., Shinohara, T. (2007). Production of knockout mice by gene targeting in multipotent germline stem cells. *Dev Biol.* **312**(1): 344-352.

Tanaka, T.S., Kunath, T., Kimber, W.L., Jaradat, S.A., Stagg, C.A., Usuda, M., Yokota, T., Niwa, H., Rossant, J., Ko, M.S. (2002). Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res.* **12**(12): 1921-1928.

Tegelenbosch, R.A., de Rooij, D.G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res.* **290**(2): 193-200.

Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci.* **92**(17): 7844-7848.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* **282**: 1145-1147.

Toumadje, A., Kusumoto, K., Parton, A., Mericko, P., Dowell, L., Ma, G., Chen, L., Barnes, D.W., Sato, J.D. (2003). Pluripotent differentiation in vitro of murine ES-D3 embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **39**(10): 449-453.

Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Takahashi, Y., Matsui, Y., Satoh, M., Noce, T. (2000). Expression and intracellular localisation of mouse Vasa- homologue protein during germ cell development. *Mech Dev.* **93**: 139-149.

Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R., Noce, T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* **100**(2): 11457-11462.

Tsai, M., Wedemeyer, J., Ganiatsas, S., Tam, S.Y., Zon, L.I., Galli, S.J. (2000). In vivo immunological function of mast cells derived from embryonic stem cells: an approach for the rapid analysis of even embryonic lethal mutations in adult mice in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* **97**: 9186–9190.

Van Hoof, D., Passier, R., Ward-Van Oostwaard, D., Pinkse, M.W., Heck, A.J., Mummery, C.L., Krijgsveld, J. (2006). A quest for human and mouse embryonic stem cell-specific proteins. *Mol Cell Proteomics.* **5**(7): 1261-1273.

Wang, D. und Gao, L. (2005). Proteomic analysis of neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Proteomics.* **5**(17):4414-4426.

Wang, Z.X., Kueh, J.L., Teh, C.H., Rossbach, M., Lim, L., Li, P., Wong, K.Y., Lufkin, T., Robson, P., Stanton, L.W. (2007a). Zfp206 is a transcription factor that controls pluripotency of embryonic stem cells. *Stem Cells.* **25**(9): 2173-2182.

Wang, Z.X., Teh, C.H., Kueh, J.L., Lufkin, T., Robson, P., Stanton, L.W. (2007b). Oct4 and Sox2 directly regulate expression of another pluripotency transcription factor, Zfp206, in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* **282**(17): 12822-12830.

Wang, P.J., McCarrey, J.R., Yang, F., Page, D.C. (2001). An abundance of X-linked genes wexpressed in spermatogonia. *Nat Genet.* **27**: 422-426.

Ware, L.M. und Axelrad, A.A. (1972). Inherited resistance to N- and B-tropic murine leukemia viruses in vitro: evidence that congenic mouse strains SIM and SIMR differ at the Fv locus. *Virology.* **50**: 339–348.

Wartenberg, M., Günther, J., Hescheler, J., Sauer, H. (1998). The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest.* **78**: 1301.

Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* **2**(1):10-12.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. **448**(7151): 318-324.

Wiles, M.V. und Keller, G. (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*. **111**: 259–267.

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., Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. **336**(6200): 684-687.

Wobus, A.M., Guan, K., Jin, S., Wellner, M.C., Rohwedel, J., Ji, G., Fleischmann, B., Katus, H.A., Hescheler, J., Franz, W.M. (1997). Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. **29**: 1525–1539.

Wobus, A.M., Wallukat, G., Hescheler, J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation*. **48**: 173–182.

Wobus, A.M. (2001). Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med*. **22**(3): 149-164.

Xie, X., Schmits, R., Renner, C., Preuss, D., Kubuschok, B., Pfreundschuh, M. (2001). Systematic search and molecular characterization of the antigenic targets of myeloma immunoglobulins: a monoclonal IgA from a female patient targeting sperm-specific cylicin II. *Cancer Immun*. **1**: 11.

Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K., Nishikawa, S. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*. **408**: 92–96.

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., Slukvin, I.I., Thomson, J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. **318**(5858): 1917-1920.

Zhang, W., Walker, E., Tamplin, O.J., Rossant, J., Stanford, W.L., Hughes, T.R. (2006a). Zfp206 regulates ES cell gene expression and differentiation. *Nucleic Acids Res*. **34**(17): 4780-4790.

Zhang, J., Tam, W.L., Tong, G.Q., Wu, Q., Chan, H.Y., Soh, B.S., Lou, Y., Yang, J., Ma, Y., Chai, L., Ng, H.H., Lufkin, T., Robson, P., Lim, B. (2006b). Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol*. **8**(10): 1114-1123.

Zhou, Q., Li, Y., Nie, R., Friel, P., Mitchell, D., Evanoff, R.M., Pouchnik, D., Banasik, B., McCarrey, J.R., Small, C., Griswold, M.D. (2008a). Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biol Reprod*. **78**(3): 537-545.

Zhou, Q., Nie, R., Li, Y., Friel, P., Mitchell, D., Hess, R.A., Small, C., Griswold, M.D. (2008b). Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) in spermatogenic cells induced by retinoic acid: an in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testes. *Biol Reprod*. **79**(1): 35-42.

Zovoilis, A., Nolte, J., Drusenheimer, N., Zechner, U., Hada, H., Guan, K., Hasenfuss, G., Nayernia, K., Engel, W. (2008). Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells have similar microRNA profiles. *Mol Hum Reprod*. [Epub ahead of print].

7 ANHANG

Publikationen:

Drusenheimer, N., Wulf, G., **Nolte, J.**, Lee, J.H., Dev, A., Dressel, R., Gromoll, J., Schmidtke, J., Engel, W., Nayernia, K. (2007). Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. *Soc Reprod Fertil Suppl.* **63**: 69-76.

Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J.H., **Nolte, J.**, Wolf, F., Li, M., Engel, W., Hasenfuss, G. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature.* **440**(7088): 1199-1203.

Hennecke, G., **Nolte, J.**, Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., Behrens, S. (2005). The periplasmic chaperone SurA exploits two features characteristic of integral outer membrane proteins for selective substrate recognition. *J Biol Chem.* **280**(25): 23540-23548.

Mardanpour, P., Guan, K., **Nolte, J.**, Lee, J.H., Hasenfuss, G., Engel, W., Nayernia, K. (2008). Potency of germ cells and its relevance for regenerative medicine. *J Anat.* **213**(1): 26-29.

Nayernia, K., **Nolte, J.**, Michelmann, H.W., Lee, J.H., Rathsack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Wulf, G., Ehrmann, I.E., Elliott, D.J., Okpanyi, V., Zechner, U., Haaf, T., Meinhardt, A., Engel, W. (2006). In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell.* **11**(1): 125-132.

Nolte, J., Rathsack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Zechner, U., Haaf, T., Meinhardt, A., Michelmann, H.W., Nayernia, K., Engel, W. (2007). Male germ cells from embryonic stem cells. *Med Genetik.* **19**: 10-17.

Zovoilis, A., **Nolte, J.**, Drusenheimer, N., Zechner, U., Hada, H., Guan, K., Hasenfuss, G., Nayernia, K., Engel, W. (2008). Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells have similar microRNA profiles. *Mol Hum Reprod.* [Epub ahead of print].

Tagungen:

- 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik
08. – 11.03.2006, Heidelberg
Vortrag: Differentiation of stem cells to male germ cells

- 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik
07. – 10.03.2007, Bonn
Übersichtsartikel: Männliche Keimzellen aus embryonalen Stammzellen
Poster: Differentiation of pluripotent spermatogonial stem cells to haploid male germ cells

- 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik
08. – 10.04.2008, Hannover

- 2nd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation
06. – 09.07.2008, Dresden
Poster: *In vitro* spermatogenesis of mouse pluripotent stem cells

8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. W. Engel für die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen, seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken. Die Möglichkeit, selbständig und weitgehend unabhängig arbeiten zu können hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke ihm für die vielen Anregungen und Ideen, für das Vertrauen und jegliche Unterstützung, die zu meiner Motivation und zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen haben.

Bei Frau Prof. Dr. S. Hoyer-Fender bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Weiterhin möchte ich mich natürlich bei meinen Kollegen aus den Laboren 105, 107 und 115 bedanken; nicht nur für die tatkräftige Unterstützung bei meinen Versuchen, sondern auch für die super Atmosphäre. Es macht Spaß mit Euch zu arbeiten!

Mein besonderer Dank geht an Britta und Janine, die einen großen Anteil an dieser Arbeit haben.

Mein Dank gilt natürlich auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik.

Bei Prof. Dr. Michelmann bedanke ich mich für die vielen Stunden und die Flexibilität, mit der er sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Danke an die zahlreichen Kooperationspartner, denen einige Teile dieser Arbeit zu verdanken sind.

Mein größter Dank geht natürlich an **meine Eltern**, die mir mein Biologiestudium ermöglicht haben und mich auch in kritischen Phasen immer wieder ermutigt haben.

Danke auch an meinen Bruder Christoph, der mich durch diverse Fahrdienste, Hilfe bei Umzügen und auch finanziell unterstützt hat.

Und „last but not least“: Danke an Florian, der schon seit dem Abitur meine Launen vor Prüfungen ertragen muss und nie daran gezweifelt hat, dass ich auch bestehe.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Jessica Nolte
Geburtsdatum: 23.10.1977
Geburtsort: Northeim/ Niedersachsen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg:

1984 – 1988 Besuch der Grundschule Westerhof in Kalefeld- Westerhof/
Niedersachsen
1988 – 1990 Besuch der Orientierungsstufe Düderode in Kalefeld- Düderode/
Niedersachsen
1990 – 1997 Besuch des Roswitha- Gymnasiums in Bad Gandersheim/
Niedersachsen
1997 – 1999 Ausbildung zur landwirtschaftlich- technischen Assistentin bei
der KWS Saat AG in Einbeck/ Niedersachsen
1999 – 2004 Biologiestudium an der Georg-August-Universität in Göttingen/
Niedersachsen
2004 – 2005 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der Georg-August-
Universität in Göttingen/ Niedersachsen
2005 – 2008 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Institut für
Humangenetik der Georg-August-Universität in Göttingen/
Niedersachsen