Abschlussbericht zum Verbundvorhaben

Verbundprojekt:
Pluripotente gewebsregenerierende Zellen aus gynogenetischen Goldfischklonen als Modelle der regenerativen Medizin – PLUG –

Förderkennzeichen: ***031A263A***

Laufzeit: ***01.07.2013 – 30.06.2016***

gefördert durch:

vorgelegt von:

Firma:
GOBIO GmbH
Scheidertalstraße 69a
65326 Aarbergen

Projektleiter:
Frau Dr. Petra Stahlschmidt-Allner
Tel. +49 6120 9264-34
E-Mail stahlschmidt@gobio-gmbh.de

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Aufgabenstellung	3
2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben geführt wurde	4
3	Planung und Ablauf des Vorhabens	4
4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	5
5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	6
6	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse	7
7	Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	28
8	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	28
9	Voraussichtlicher Nutzen/Verwertbarkeit der Ergebnisse	29
	9.1 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten, wissenschaftlich-technische Erfolgsaussichten	*29*
	9.2 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit	*30*
10	Ergebnisse Dritter	31
11	Veröffentlichung der Ergebnisse	31
12	Literaturhinweise	32

Anlagen

-Erfolgskontrollbericht

-Berichtsblatt / Document Control Sheet

-Foliensatz Vortrag EUSAAT Linz, SETAC Orlando

1 Aufgabenstellung

Ziel des Vorhabens war die Entwicklung eines gekoppelten *in vitro/ in vivo* Tiermodells, das den Bedürfnissen/ Herausforderungen der Stammzell- und Tumorforschung gerecht wird. Dieses Modell soll weniger geeignete, auf genetische Forschung ausgerichtete Tiermodelle, wie den Zebrafisch oder die Maus, ergänzen. Grundlage des Modells sind gynogenetisch gezeugte Klonpopulationen des Goldfischs, die fortgesetzt (genetisch uniform) kultivierbar sind. Die Isolierung von PTR-SCs (Pluripotent Tissue Regenerating Stem Cells, PTR-SCs) und Stammzell regulierender Rodletzellen aus „Individuen" dieser Klone und deren genetische Transformation zur Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) soll die methodische Grundlage zur Entwicklung von Techniken der autologen regenerativen Medizin und der Tumorforschung werden. Das Modell bietet die Möglichkeit der extrakorporalen Expansion von Stammzellen, die *in vitro* Modifikation der Zellen und nachfolgende (quasi autologe) Implantation dieser Zellen sowohl in adulte also auch in juvenile „Individuen" des Klones. Die Entwicklung der implantierten Zellen im Empfängerorganismus soll anhand der GFP-Expression nachvollziehbar gemacht werden. Eine über die Grundlagenforschung hinausgehende Anwendung ist der Einsatz des Modells in der Toxikologie und der Pharmaforschung. Das Modell hat ein hohes Potential zur Reduktion von Tierversuchen. Die Relevanz von *in vitro* erfassten toxikologischen Endpunkten kann einer direkten Überprüfung im organismischen Modell unterzogen werden. Dadurch wird die Voraussagekraft des *in vitro* Systems deutlich erhöht. Die Möglichkeit der Trennung von Exposition (*in vitro*) und Risiko-, Effektanalyse *in vivo* eröffnet der Antragstellerin Zugang zu finanzstarken Märkten wie z.B. der Kosmetikindustrie. In mehrstufigen Verfahren der (öko) toxikologischen Bewertung sollen die transgenen Zellkultursysteme als Screening-Test-Kits im Bereich der Produktsicherheit eingesetzt werden. Bei kritischen Produkten besteht die Option des Outsourcing der weitergehenden Analyse der Eigenschaften exponierter Zellen im *in vivo* Modell. Der Lösungsansatz beinhaltet die Erarbeitung der folgenden anspruchsvollen F&E-Inhalte:

- Etablierung eines Wirbeltierklons (Goldfisch-Klons) mittels Gynogenese
- Molekularbiologische Charakterisierung der Klone zur Qualitätssicherung
- Isolierung und extrakorporale Proliferation adulter pluripotenter Stammzellen
- Spezifische eGFP-Markierung von Stammzelllinien aus Wirbeltierklonen
- Optimierung der Kultivierung adulter pluripotenter gewebsregenerierender Stammzellen (Pluripotent Tissue Regenerating Stem Cells, PTR-SCs) Erfassung der Normalentwicklung
- Screening von Oberflächenmarkern für die gezielte Isolierung und Reinigung von Rodletzellen
- Optimierung der Isolierung von stammzellkonditionierenden Immunzellen (Rodletzellen)
- Cokultivierung der PTR-SCs mit Rodletzellen
- Untersuchung der Expressionsmuster der Stammzellen nach Kontakt mit Rodletzellen/ Rodletzellfraktionen (auch in Transspeziesstudien)
- Identifikation morphogenetisch aktiver Sekretionsprodukte
- Techniken der Implantation von extrakorporal manipulierten Zellen in genetisch identische Empfängerorganismen (autologe Implantation)

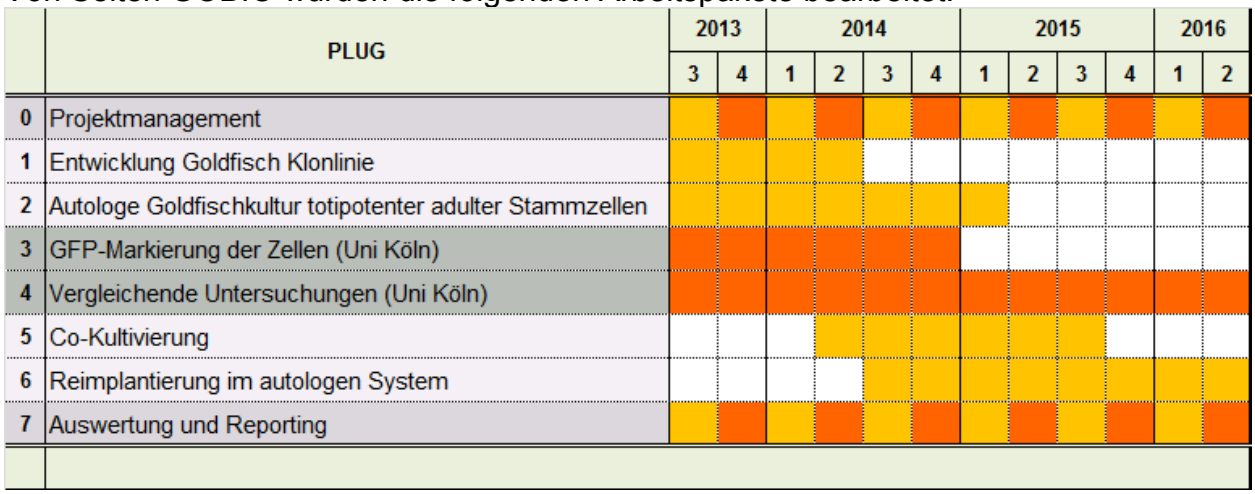
2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben geführt wurde

a) Allgemein
Als wichtigste Voraussetzung für die Durchführung des Projekts konnte die enge Verzahnung der Verbundpartner in allen Phasen des Projekts gesehen werden. Die Gesamtkoordination des Verbundvorhabens oblag Frau Dr. Stahlschmidt-Allner, die technische Projektleitung Dr. Kurt Pfannkuche von der Universität Köln. Darunter gliederte sich das Projekt in die zwei Teilprojekte der Verbundpartner. Jedes der Teilprojekte hatte einen verantwortlichen Teilprojektleiter, die für die inhaltliche Ausgestaltung des Teilprojekts und die Führung des zugeordneten Teilprojektteams verantwortlich waren. Eine weitere wichtige Voraussetzung für den nachhaltigen Erfolg des Projekts stellte die erhebliche finanzielle Eigenbeteiligung der beteiligten Industriepartner dar, die den Anspruch an das Projekt als Umsetzungsprojekt mit wirtschaftlich nachhaltig nutzbaren Ergebnissen für die Industriepartner untermauerte.

b) Schutzrechtsituation
Vor dem eigentlichen Beginn des Vorhabens wurden keine Patente recherchiert, welche gegen eine Durchführung des Projektes oder eine zukünftige Verwertung der Projektergebnisse sprechen. Sollten im Rahmen des Projektes Erkenntnisse erlangt werden, die patentierfähig sind, sollte eine Gebrauchsmuster- bzw. Patentanmeldung angestrebt werden. Seitens der GOBIO-GmbH wurden vor Projektbeginn grundlegende Verfahren im Hinblick auf die Gewinnung und Nutzung der Zellkultur zur Patentanmeldung eingereicht.

3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt wurde im Wesentlichen entsprechend der Planung durchgeführt. Einzig die abschließenden Experimente zur Transplantierbarkeit der Zellen konnten nur mit leichter zeitlicher Verzögerung von 3 Monaten nach Projektende durchgeführt werden.
Von Seiten GOBIO wurden die folgenden Arbeitspakete bearbeitet:



AP 0 – Projektmanagement
AP 1 – Entwicklung Goldfisch Klonlinie
AP 2 – Autologe Goldfischkultur totipotenter adulter Stammzellen
AP 5 – Co-Kultivierung
AP 6 – Reimplantierung im autologen System
AP 7 – Auswertung und Reporting

4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

a) Stammzellmodelle

Die Stammzellforschung ist in der Vergangenheit davon ausgegangen, dass absolute entwicklungsbiologische Potenz an das Zytoplasma der Zygote gebunden ist. In der Folge scheint eine Differenzierung von komplexen Geweben nur in Primärkulturen embryonaler Stammzellen möglich, da somatische (Körper-) und generative (Keim-) Zellen des Tierkörpers bereits in der Frühentwicklung getrennt werden und somatische Totipotenz nur bei Zellen in sehr frühen Stadien der Embryonalentwicklung vorliegt (Keimbahntheorie)[1]

Diese Theorie steht jedoch im Widerspruch zur Entwicklungsbiologie der saisonal laichenden Fische. Die jährliche Neubildung der Gonaden aus primordialen extra-gonadalen Keimzellen zeigt, dass pluripotente Stammzellen die Embryonalentwicklung eines Wirbeltieres überdauern können. Aufgrund erster zytogenetischer Analysen überdauernder pluripotenter Stammzellen ist absehbar, dass diese Zellen embryonalen Säugerzellen direkt homolog sind.

Für die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse sprechen neuere Befunde bei Säugern, die zeigen, dass das Herz der Maus in der ersten Woche nach der Geburt eine ausgeprägte Fähigkeit zu Regeneration hat, die jedoch nach dem siebten Tag verloren geht. Die Untersuchung solcher potenziell „ancestraler“ Regenerationsmechanismen hat große Bedeutung für das Verständnis von Regenerationsprozessen im Wirbeltier und letztlich im Menschen.

b) Regenerative Medizin

Regenerative Medizin zielt darauf, erkrankte Organe durch Zufuhr von extrakorporal vermehrten Zellen mit regenerativen Kapazitäten zu heilen. Während einige Gewebe wie Knochen und Knorpel offenbar aus adulten Stammzellen regeneriert werden können, weisen andere Gewebe, wie das Gehirn und das Herz, keine ausreichende Regenerationskapazität auf. Hier können (induziert) pluripotente Stammzellen einen wesentlichen Beitrag zu regenerativen Medizin liefern. Ideale Zellen, um dieses Ziel zu erreichen, sind bisher nicht identifiziert. Die Zellen müssen einerseits ausreichend vordifferenziert sein, um keine Tumore auszulösen, andererseits in das vorgesehene Zielgewebe integrierbar sein, um dort die gewebstypische terminale Differenzierung und damit Funktion zu übernehmen. Nach derzeitigem Stand der Forschung könnte dies in Zukunft durch vordifferenzierte embryonale und induziert pluripotente Stammzellen möglich werden, jedoch sind die Verfahren noch weit von der klinischen Anwendung entfernt. Das hier vorgeschlagene Modell wird es ermöglichen, effiziente Re-generierungsprozesse am Wirbeltier zu studieren, um die gewonnenen Erkenntnisse auf das Säugetier und zuletzt den Menschen zu übertragen.

c) Reprogrammierung von körpereigenen adulten Zellen

Induzierte pluripotente Stammzellen (sog. iPS-Zellen) sind pluripotente Zellen, die *in vitro* aus differenzierten (somatischen) Zellen gewonnen wurden. Diese Entdeckung wurde 2012 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt. Dabei werden somatische Zellen durch die Übertragung exogener Transkriptionsfaktoren, insbesondere von Oct4, in einen pluripotenten Zustand reprogrammiert (Rolf et al. 2012). Prinzipiell können auf diesem Wege Patienten-spezifische iPS-Zellen von jedem Individuum hergestellt werden. iPS-Zellen ähneln stark natürlichen pluripotenten Stammzellen und stellen eine ethisch wenig bedenkliche Alternative zu embryonalen Stamm- (ES) Zellen dar. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob iPS Zellen den ES-Zellen in allen Belangen

gleichzusetzen sind, jedoch kann festgehalten werden, dass die heute verfügbaren Techniken zu iPS- Zelllinien führen, die sich *in vitro* vermutlich in alle Typen von Körperzellen differenzieren lassen. Damit hat sich eine neue Perspektive für die regenerative Medizin eröffnet. Durch Herstellung von Vorläuferzellen und differenzierten Zellen in Kultur könnte es in Zukunft möglich werden, geschädigte Gewebe *in vivo* zu regenerieren. Vor der therapeutischen Anwendung sind jedoch noch zahlreiche Fragen zu beantworten. Es fehlt an Kenntnissen über einen geeigneten Applikationsweg der Zellen und die Frage, ob und wie iPS-Zell-abgeleitete organotypische Zellen in ein bestehendes Gewebe integriert werden können, bleibt bisher in den meisten Fällen unbeantwortet.

d) Modellorganismus

Ein dauerhaft verfügbarer Goldfischklon, in Kombination mit der Möglichkeit kontinuierlich markierte adulte Stammzellen aus diesem Klon zur Verfügung zu stellen, bietet ein innovatives Instrument der Stammzellforschung und der regenerativen Medizin. Dieses Modell ist einfach, kostengünstig und orientiert sich an den Notwendigkeiten der Stammzellforschung. Es ermöglicht, technische Grenzen der Stammzellforschung (intrauterine Entwicklung) zu überwinden und ist dadurch den derzeit genutzten Modellen zur Beantwortung entwicklungsbiologischer Fragestellungen überlegen.

Bisher wird vor allem der Zebrabärbling als Modellorganismus verwendet. Dieser ist jedoch für die Stammzellforschung nur bedingt geeignet. Exogen getriggerte, stammzellbasierte Regenerationsprozesse, wie der saisonale Aufbau von Gonaden, sind aufgrund der Biologie dieser Spezies nicht ausgeprägt und somit experimentell nicht zugänglich. Zebrafische laichen über einen Zeitraum von ca. 18 Monaten kontinuierlich und stellen die Reproduktion danach ein. Beim Zebrafisch sind während der reproduktiven Phase stets alle Stadien der Keimzell-Differenzierung vom Gonium bis zum reifen Gameten parallel vorhanden (asynchrone Keimzellentwicklung). Bei saisonal laichenden Karpfenartigen hingegen verläuft die Keimzellentwicklung synchron. So treten während der Normalentwicklung im Frühsommer ausschließlich frühe Stadien der Keimzellen z. B. Spermatogonien oder Eizellen im Praevitellogenesestadium auf. Diese Beobachtung erlaubt Rückschlüsse darauf, dass diesem Stadium eine Proliferation primordialer Keimzellen vorausgegangen sein muss. Es können „Entwicklungsstadien“ somatisch adulter Fische definiert werden, in denen pluripotente Stammzellen auftreten, die beim Säuger nur während der Embryonalentwicklung vorkommen.

5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Kooperationspartner tauschen kontinuierlich Informationen bzgl. Projektverlaufs, Ist-Status und den erzielten Zwischenergebnissen aus. Die Arbeitsteilung zwischen der UKK und GOBIO erfolgte weitgehend wie in der Beschreibung der Arbeitspakete detailliert dargestellt. Die zunächst geplante Zusammenarbeit mit der Tiermedizinischen Hochschule konnte nicht etabliert werden. Das zentrale Interesse an der Kooperation bestand in der Untersuchung, der in Vorarbeiten beobachteten Sensitivität der gewebsregenerierenden Zellen gegenüber dem KH-Virus (Cyp H3). Der molekularbiologische Nachweis des anzeigepflichtigen Virus mittels PCR wurde GOBIO im Vorfeld seitens der zuständigen Veterinärbehörden untersagt und als Ordnungswidrigkeit geahndet. Die gerichtliche Auseinandersetzung zu diesem Vorgang wurde erst im 3. Projektjahr zugunsten der GOBIO-GmbH entschieden. Die tiergesundheitsrechtliche Genehmigung zum Umgang mit dem Virus wurde erteilt und das Ordnungswidrigkeitsverfahren eingestellt.

6 Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse

Etablierung einer gynogenetischen Goldfischlinie und der korrespondierenden quasi autologen Zellkultur

Eine gynogenetische Goldfischlinie konnte etabliert werden. Die Kommunikation des Forschungsansatzes gegenüber den Tierschutzbehörden erwies sich jedoch als extrem schwierig. Die tierschutzrechtliche Genehmigung zur Durchführung von Implantationsversuchen, wurde zunächst unter Verweis auf die grundsätzliche Frage *„….ob und wie mittels eines nur im Fisch möglichen Verfahrens (Gynogenese) gewonnene Erkenntnisse, auf andere Spezies, insbesondere den Menschen, übertragen werden können“*, abgelehnt.
Wie in den Zwischenberichten ausgeführt, wurde der Fokus der Kommerzialisierung unserer Forschungserbnisse zunächst auf die Nutzung der Zelllinie zum Ersatz von Tierversuchen gelegt. Die Ergebnisse dieses Teils des Vorhabens wurde auf der EUSAAT Tagung im August 2016 in Linz und auf dem SETAC-World Congress im November 2016 in Orlando gemäß den beigefügten Foliensätzen präsentiert.
Die Technik der Nutzung gynogenetischer Klone im Rahmen von in vivo Regenerationsversuchen erwies sich im Projektverlauf als entbehrlich, da keine Immunabstoßung der Zellen erkennbar war. Nach der Implementierung des neuen Tierschutzgesetzes wurden dann im Folgenden Tierversuchsanträge gestellt, die jeweils nur Teilaspekte des Vorhabens beinhalteten. So konnten schließlich heterologe Implantationsversuche durchgeführt werden. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass bei Karpfenartigen nur im geringen Umfang und in begrenzten saisonalen Zeitfenstern eine Integration der Zellen in somatische Organe erfolgt. Anders verhielt es sich bei barschartigen konstitutiv kurzlebigen Fischspezies wie dem Reisfisch. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Versuche erbrachten im hohem Maße belastbare Ergebnisse nach denen die Zellen umfänglich in periphere Organe integriert werden und dabei organtypische Funktionen konstituiert oder aufrecht erhalten werden. Aufgrund dieses Projektverlaufs wurde die Produktion gynogenetischer Goldfische nicht im größeren Umfang etabliert. Stattdessen wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit mit TU Dresden der Reisfisch als Modellorganismus für Transplantationsversuche implementiert.
Die Gewinnung von Primärkulturen von gewebsregenerierenden Stammzellen (Pluripotent Tissue-Regenerating Stem Cells, PTR-SCs) neuronalen Ursprungs wurde an Goldfischen und Karpfen auf Reproduzierbarkeit geprüft und standardisiert. Aus beiden Spezies konnten Zelllinien abgeleitet werden. Versuche, homologe Zellen aus Laborfischen mit weniger ausgeprägten saisonalen Rhythmen wie dem Zebrafisch, dem Reisfisch oder der Dickkopfelritze zu isolieren, waren nicht erfolgreich.

Kryokonservierungstechniken

Die Entwicklung von Kryokonservierungsprotokollen zur Lagerung der Zellen bei -80°C war erfolgreich. Es zeigte sich, dass die Zellen ca. 6 Monate unter diesen Bedingungen lagerfähig sind, was unsere Erwartung für die Lagerung bei -80°C übertrifft. Zur Sicherung der verschiedenen Linien wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff an der Universität Köln in zwei unabhängigen Zellbanken (ZMMK und Physiologisches Institut) eingelagert. Ferner wurde in sehr enger Zusammenarbeit mit der UKK eine vollkommen neues Verfahren der Zellkonservierung, die wir „Hibernationstechnik“ nennen, entwickelt. Diese Technik basiert auf der Fähigkeit von wechselwarmen Organsimen, die Körpertemperatur auf 4 °C zu senken und den Stoffwechsel entsprechend zu

reduzieren. Die Zellen werden nach einem Verfahren, dass zur Patentierung ansteht, gekühlt und zum Schutz vor Verdunstung in ein Nährmedium von gelartiger Konsistenz eingebettet. In diesem Zustand ist eine Lagerung und Transport bei 4-7 °C möglich. Diese Art der Konservierung hat sich als sehr viel schonender als bei Säugerzellen gebräuchliche Techniken erwiesen. Die Standardisierung der Technik zum Versand/Vertrieb der Zellen erfolgte im Nachgang zum Projekt und steht vor dem erfolgreichen Abschluss.

GFP Markierung der PTR-SC

Zur Markierung der Zellen wurden unterschiedliche Verfahren der Transfektion im Labor des Projektpartners in Köln getestet. Dabei wurden unterschiedliche Methoden der chemischen Transfektion mit wechselndem Ergebnis erprobt und mit verschiedenen Elektroporationsroutinen verglichen. Letztlich wurde eine Methode auf der Basis der Nukleofektion der Zellen optimiert und für alle weiteren Versuche eingesetzt. Ein Transgen zur Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) wurde geplant und hergestellt um transgene Zelllinien zu generieren.

Bei der ersten Variante von GFP-transformierten Zellen (Abb. **1**. a, b) exprimierte nur eine Subpopulation der Zellen GFP im Zytoplasma. Diese Zellkulturen (Abb. 1. c, d, e, f), waren hilfreich bei der Etablierung der Fluoreszenztechnik im GOBIO Labor. Sie lieferten exzellente Darstellungen der mitunter mehr als 70µm langen „Tunneling-Nanotubes“ (TNTs), die die Zellen ausbilden. So entstehen Zellkontakte, bei denen keine unmittelbare Nachbarschaft vonnöten ist und direkt benachbarte Zellen von der Vernetzung ausgespart bleiben. Dies ist die zytologische Voraussetzung für die gezielte Vernetzung von Subpopulationen der Zellen. Wir sehen hierhin eine mögliche Ursache für unsere im Projektverlauf vertiefte Annahme, dass im Zuge der PTR-SC Kultur eine Differenzierung von zwei Varianten der Zellen mit unterschiedlicher Funktion erfolgt.

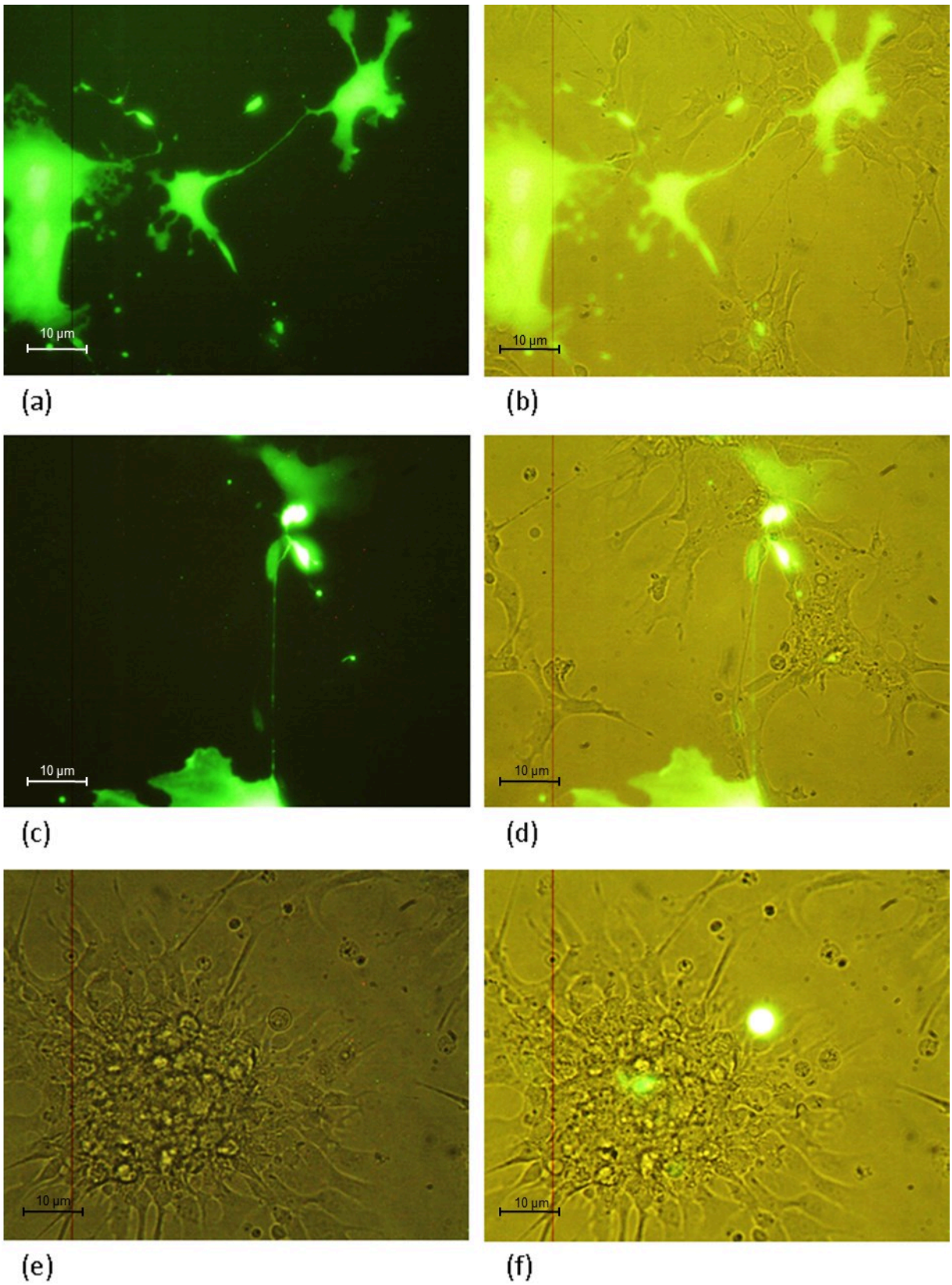


Abbildung 1. Zytoplasmatische GFP-Expression der ersten Variante der transgenen Zellen.

Eine weitere wichtige Eigenart der PTR-SC, die anhand der vorläufigen GFP-exprimierenden Kulturen sichtbar wurde, ist das Phänomen der Übertragung von Zytoplasmakomponenten auf andere Zellen, unabhängig von deren Zellteilungen. Dies, und die Beobachtung der selektiven Vernetzung, war Grundlage für unsere Arbeits-hypothese, nach der die Zellen Pluripotenzfaktoren übertagen. Ein vergleichbarer Prozess wurde bei saisonalen Differenzierungen von Säugern beobachtet. Demnach

entstehen neue Stammzellnischen durch einen der *in vitro* Reprogammierung vergleichbaren Prozess. Das experimentelle Design der unten näher beschriebenen Cokultur-Versuche mit transgenen Reisfischen, orientiert sich an dieser Hypothese. Primärzellen dieser Reisfische zeigen mit der Expression von Pluripotenzgenen, Co-expression von Reportergenen und den korrespondierenden Fluoreszenzproteinen.
Aufgrund der Eigenart der Zellen, Zytoplasma auf benachbarte Zellen via „Tunneling Nanotubes“ zu übertragen, entstanden falsch positive GFP-haltige Zellen (Abb. 1. a - f). Dadurch wurde die Anreicherung der Zellen auf der Grundlage des Fluoreszenzsignals erschwert. Dies war Anlass, eine Technik der GFP-Markierung zu erproben, bei der das Protein nicht mehr ins Zytoplasma, sondern ausschließlich im Bereich des Zellkerns eingelagert wird. Durch den Einsatz eines Plasmids, das für Histon2B-fusioniertes GFP (H2B-GFP) codiert, wurde dieser Ziel erreicht
Die visuelle Überprüfung der ersten Ansätze aus diesen Kulturen zeigte, dass die Mehrzahl der Zellen GFP exprimierte (Abb. **2**. a - d). Doch die Aussonderung von nicht GFP-markierten Zellen durch Neomycin-Resistenz, eingebaut im Plasmid (mit UTF1-Promotor), konnte den Anteil transformierter Stammzellen im Ansatz nicht erhöhen, da auch nicht-markierten PTR-SCs anscheinend unempfindlich gegenüber Neomycin sind.
Um diese Problematik zu überwinden, wurden verschiedene Antibiotika getestet, darunter die im Säugetiermodell hochwirksamen Antibiotika Hygromycin und Puromycin. Unerwartet zeigte sich dabei eine sehr geringe Empfindlichkeit der Zellen gegen diese Selektionsagenzien. Deshalb wurde im nächsten Schritt ein Vektor entworfen und hergestellt, der GFP in Kombination mit einem modifizierten Oberflächenrezeptor exprimiert. Die Erwartung bei diesem Konstrukt war, dass es möglich wäre, die transgenen Zellen auf der Basis des Oberflächenrezeptors (CD4) durch magnetische Zellsortierung anzureichern und homogen GFP-exprimierende Kulturen zu generieren. Dieser Ansatz führte zwar zu einer Anreicherung der transgenen Zellen, jedoch wurde über mehrere Passagen hinweg ein Verlust der GFP-exprimierenden Zellen bemerkt. Daraus haben wir die Notwendigkeit erkannt, eine klonale Selektion zu etablieren. Wir führen den Verlust des GFP in einigen Zellen auf ein „*Silencing*“ des Transgens zurück. Die klonale Selektion hat sich als sehr schwierig erwiesen, da die Zellen unter den uns bis dato bekannten Kulturbedingungen zu keinem klonalen Wachstum fähig waren. An der Universität Köln wurden daher in einer aufwändigen Optimierung Zellkulturbedingungen etabliert, die eine klonale Selektion der Zellen ermöglichten.
Für die Generierung klonaler Zelllinien wurde erneut ein Transgen entworfen und hergestellt, das eine Expression eines Chromatin-gebundenen Histon2B-GFP von einem Transposon basierten Vektor gewährleistet. Durch Anwendung der neu etablierten Bedingungen zur klonalen Expansion wurden schließlich Subklone mit stabiler H2B-GFP Expression gewonnen werden. Ein Subklon mit einer homogenen GFP Expression in 100% der Zellen wurde für die weiteren Versuche ausgewählt. Der Klon wurde expandiert und GOBIO für alle weiteren Experimente zur Verfügung gestellt. Das „*Cell-Banking*“ erfolgte an der Universität Köln, von wo aus qualitätskontrollierte Zellen an GOBIO verschickt wurden.

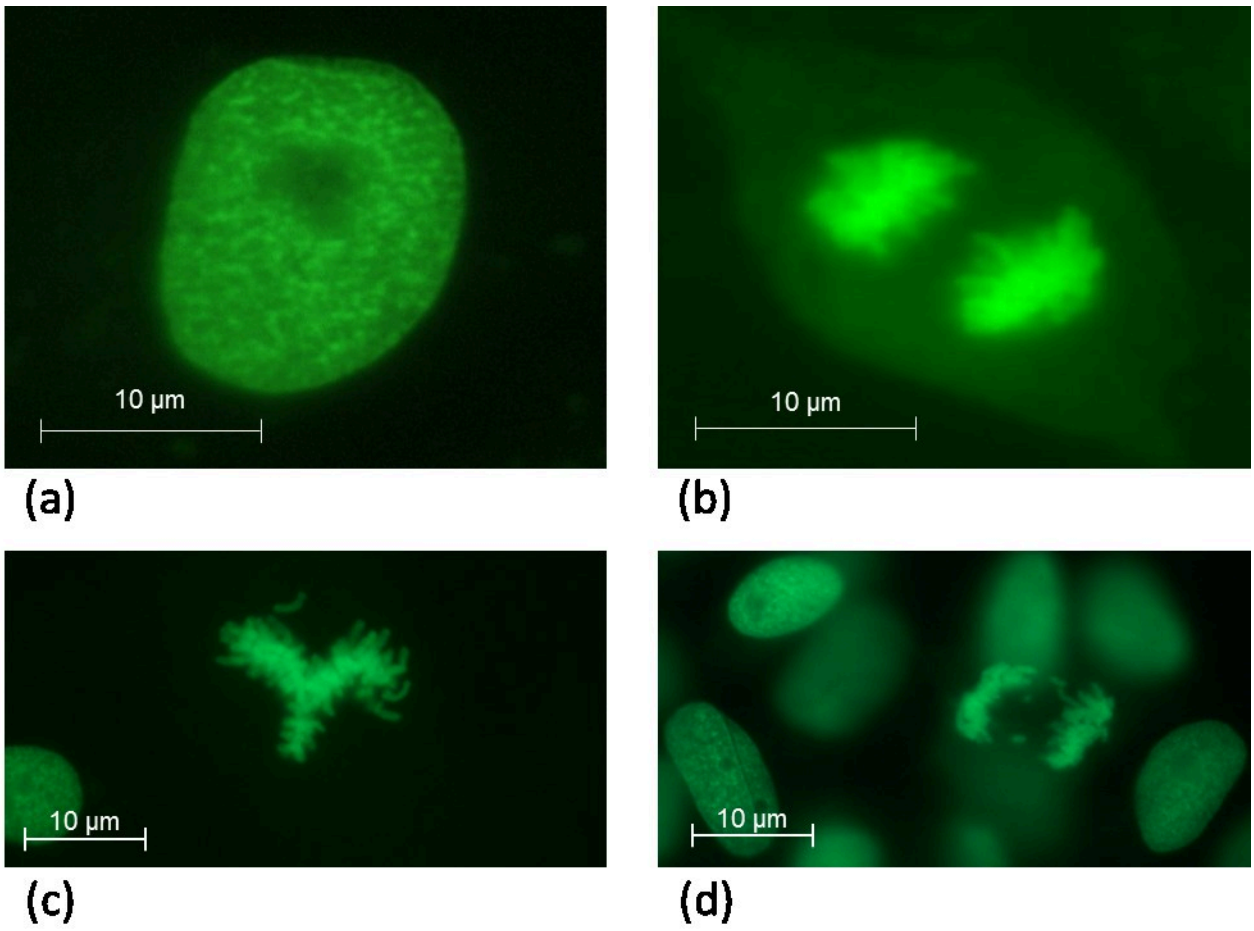


Abbildung 2. H2B-GFP Markierung in PTR-SC zeigt konstitutive Kernfluoreszenz assoziiert mit Chromatin / Chromosomen.

Die neue Technik der Zellkern gebundenen Markierung durch Histon2B-GFP führt zu einer Visualisierung von nuklearen Strukturen mit einer Auflösung die bislang mit noch keinem anderen Verfahren erreicht wurde. So sind Nukleoli als fluoreszenz-freie Bereiche zu erkennen. Die Anordnung der Chromosomen in den gegenüberliegen prospektiven Tochterkernen ist deutlich sichtbar. Schadstoff-induzierte Störungen der Verteilung der Chromosomen auf Tochterzellen oder Schädigungen der Chromosomen führen zu Mikrokernen. Diese können ohne weitere Färbetechniken in der lebenden Zelle sichtbar gemacht werden (Abb. **3**). Damit war eine neue Technologieplattform geschaffen, die bisher nicht vorstellbare Analysen der Funktion und des Zustandes von Zellen anhand einfacher mikroskopischer Untersuchung ermöglichte. Hier werden nur die in unserem technischen Umfeld direkt nutzbaren Anwendungen genannt:

Mikrokernassay

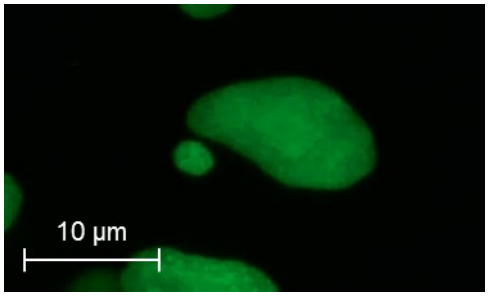


Abbildung 3. Mikrokern in PTR-SC GFP-markierten Zellen.

Der Einfluss von Schadstoffen, mit gentoxischer Wirkung wird derzeit noch mittels eines aufwändigen Verfahrens konventioneller Mikrokernfärbung standardisiert erfasst. Die Nutzung unserer Zelllinie hat eine hervorragendes Potential die bisher im Rahmen der OECD TG 487 genutzten Linien zu ersetzen und den Aufwand des Verfahrens in der Größenordnung von 80% zu reduzieren.

Zelltransformationsassay

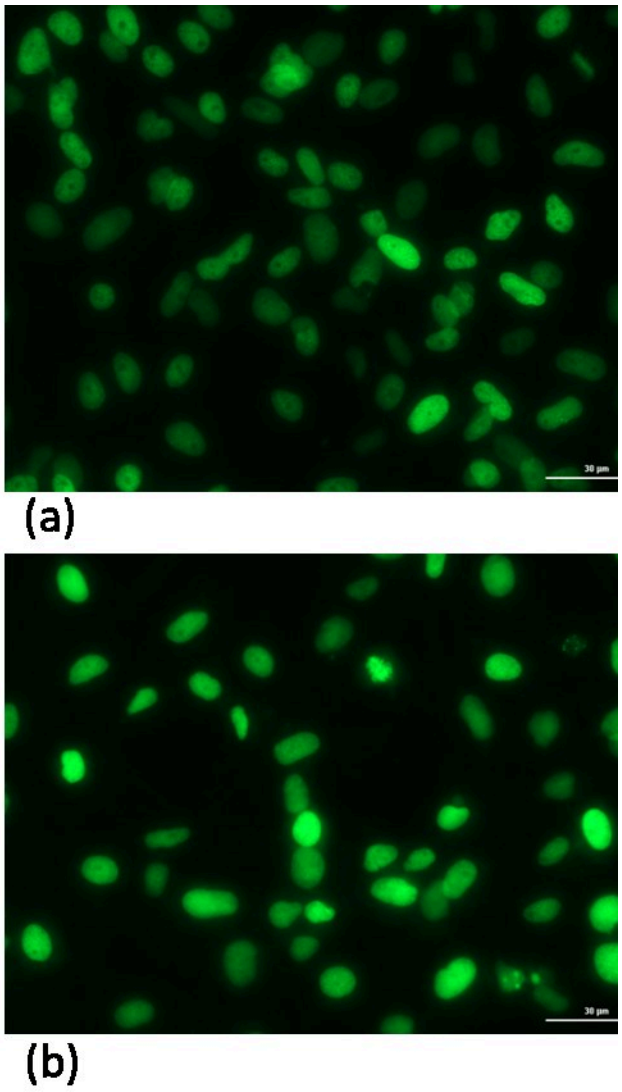


Abbildung 4. GFP-markierte PTR-SC Kerne in einer Downstream Analyse. (a) Kontrolle mit einigen stark-fluoreszierenden Kernen; (b) Glyphosat-exponierten Ansatz mit einer erhöhten Zahl von stark-fluoreszierenden Kernen.

Da die neue Technik der Erfassung von Gentoxinen nicht destruktiv ist und PTR-SC Linie weder von einem Tumor abgeleitet oder anderweitig immortalisiert wurde, ist eine sogenannte „Downstream Analyse“ möglich. Das heißt, man kann die Zellen nach der Erfassung der gentoxischen Wirkung weiter kultivieren und im Hinblick auf eine kanzerogene Transformation der Tochterzellen untersuchen. In der Histopathologie bekannte Veränderungen der Kernstrukturen, die mit der kanzerogenen Transformation einhergehen, werden durch die Kernmarkierung in hohem Maße adäquat wiedergegeben. Abb. **4** zeigt Bilder einer Downstream Analyse nach Exposition gegenüber dem Herbizid Glyphosat. Die Zahl der Kerne mit einem deutlich stärkerem Fluoreszenzsignal ist gegenüber den Kontrollen stark erhöht (Abb. **5**). Diese Veränderung der Kernmorphologie entspricht dem histopathologischen Bild der Pyknotisierung, die mit der kanzerogenen Transformation von Stammzellen in Verbindung gebracht wird .

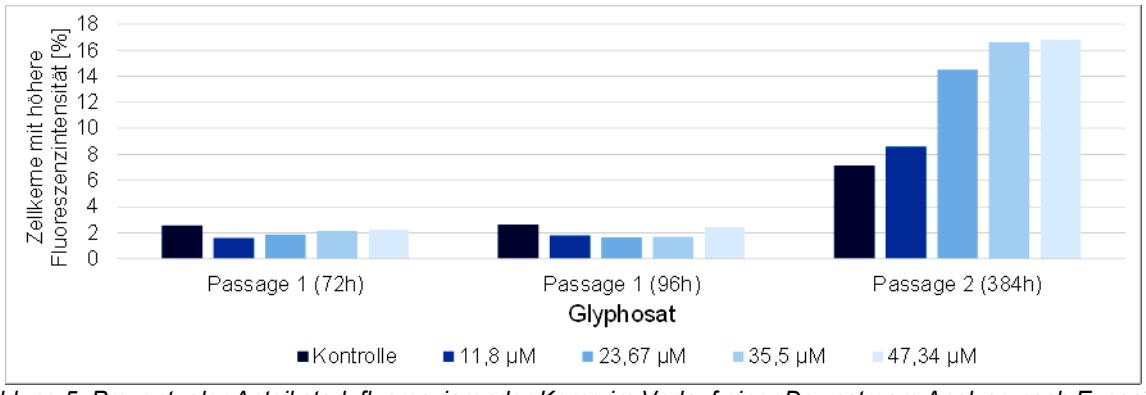


Abbildung 5. Prozentualer Anteil stark fluoreszierender Kerne im Verlauf einer Downstream Analyse nach Exposition gegenüber Glyphosat.

Cytotoxassay

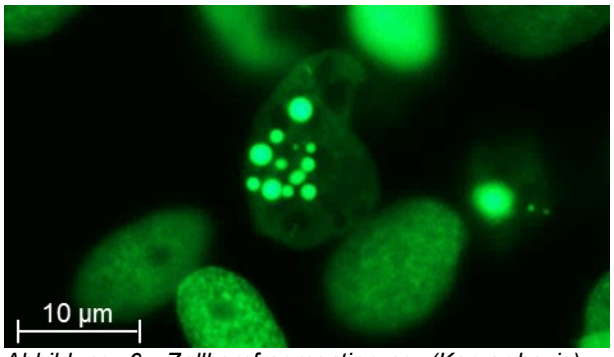


Abbildung 6. Zellkernfragmentierung (Karyorrhexis) von PTR-SC Zellen.

Die Fragmentierung der Zellkerne, die mit dem Absterben der Zelle nach Einwirkung einer zytotoxischen Substanz einhergeht, ist eindeutig sichtbar (Abb. **6**). Zytotoxische Wirkungen können viel früher erkannt werden als bisher möglich. Hellfeldmikroskopische erfassbare Veränderungen der Zytologie treten erst sehr viel später auf.

Zelldifferenzierungsassay

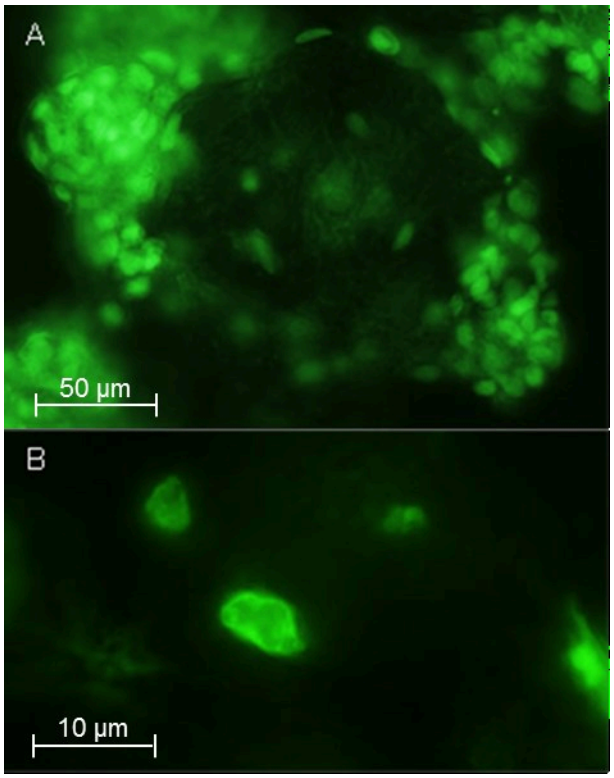


Abbildung 7. GFP-markierte Kerne von differenzierten Zellen an der Oberfläche von suspendiertem Trägermaterial.

Die Kerne der selbsterneuernden pluripotenten Kultur unterscheiden sich in ihrer Morphologie deutlich von denen, die im Rahmen von Transplantations oder Cokulturversuchen im Kontakt mit differenzierten Zellen standen. Zelldifferenzierungsprozesse gehen mit starken Veränderungen der Zellmorphologie einher. So differenzieren sich einschichtige Epithelien an der Oberfläche von suspendierten Kultursubstraten, deren Kerne sich deutlich von den feingranulierten Kernen der Monolayerkultur unterscheiden.
Gleichzeitig treten in die Epithelien eingebundene Sphäroide auf. Die Kerne innerhalb der Sphäroide sind stark abgerundet und zeichnen sich durch stark kondensiertes Chromatin aus. Somit hat die H2BGFP transgene Variante der PTR-SC ein hohes Potential die Wirkung von morphogenetisch aktiven Substanzen zu reflektieren. Abb. **7** zeigt *in vitro* differenzierte Zellen nach 7 Tagen Kultivierung auf suspendiertem Trägermaterial.

Zellproliferationsassay

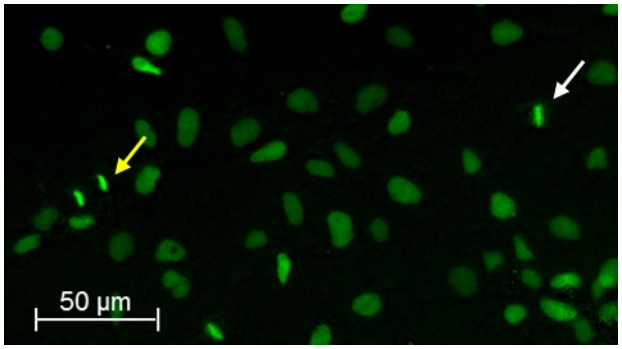


Abbildung 8. Proliferierende Kultur Metaphase weißer Pfeil Anaphase gelber Pfeil

Zellzählungen sind anhand des Kernsignals automatisiert möglich. Hinzu kommt, dass zwischen Interphase, Metaphase und Anaphase und dem Absterben der Zelle (Karyorrhexis) unterschieden werden kann. Aus einer Zusammenschau dieser Daten ergibt sich ein wesentlich differenziertes Bild der Zellproliferation als dies bislang möglich ist (Abb. **8**).

Zellmotilitäts-/Infiltrationsassay

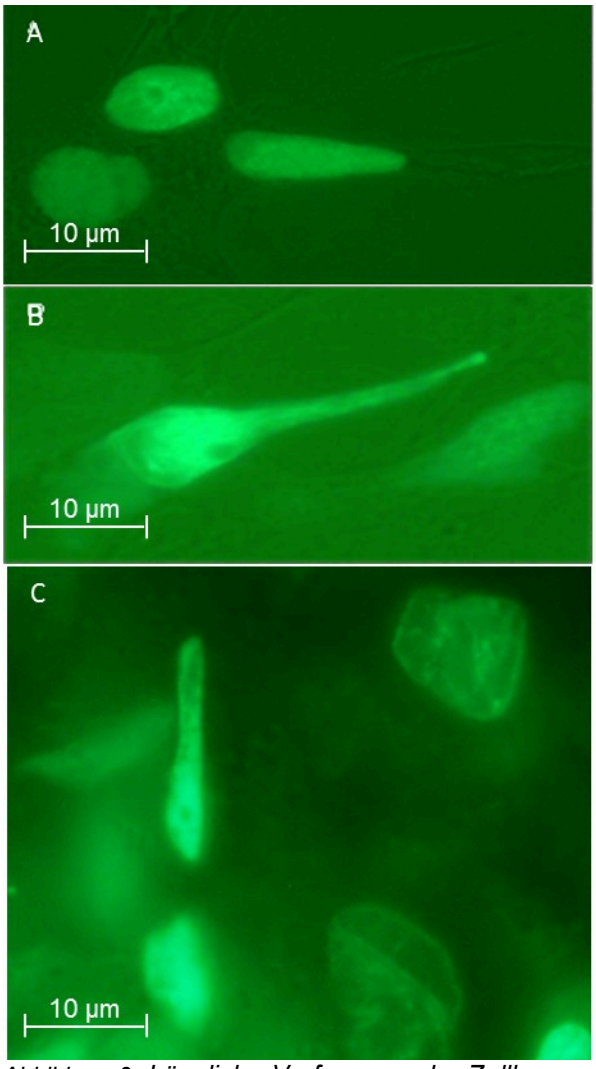


Abbildung 9. Längliche Verformung der Zellkerne in PTR-SC Kulturen (a, b) und in Leberkulturen 7 Tage nach der Transplantation von PTR-SCs im Japanischen Reisfisch Oryzias latipes (c).

Die Rolle von Zellbewegungen wird in der *in vitro* Toxikologie ebenso wie in der Zytopathologie aus technischen Gründen häufig ausgeblendet, da immer nur „Momentaufnahmen“ analysiert werden. Die Zellgrenzen von beweglichen Zellen sind sowohl in der Kultur als auch im Gewebsverband kaum darstellbar. Die längliche Verformung von Zellkernen, die mit der Motilität einhergeht, kann anhand des Fluoreszenzsignals nachvollzogen werden. Abb. **9** a bis c zeigen deformierte Zellkerne von wandernden Zellen *in vitro* (a, b) und infiltrierende Zellen von *ex vivo* Präparationen der Leber 7 Tage nach der Transplantation (c). Für einige Schadstoffe konnte eine dosisabhängige Erhöhung der Zahl der länglich deformierten Zellkerne nachgewiesen werden (Abb. **10**).

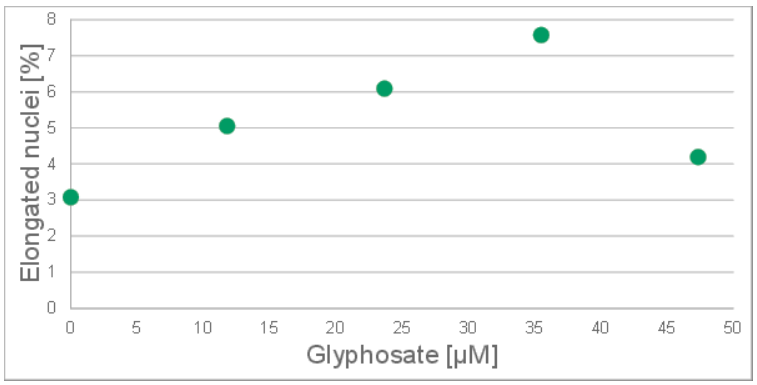


Abbildung 10. Dosisabhängige Erhöhung der Anzahl länglicher Kerne in der Downstream Analysis nach Glyphosat-Exposition.

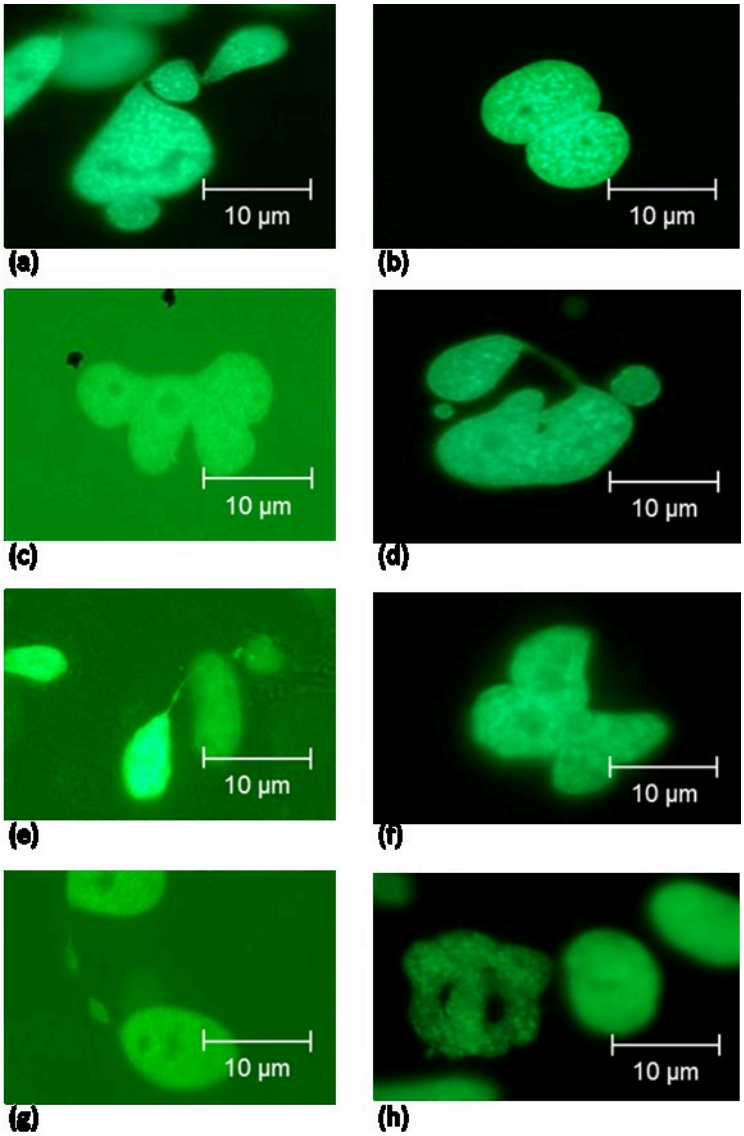


Abbildung 11. GFP-markierte PTR-SC Kernaggregate von unbehandelten Zellen (a, b) und von Tochterzellen nach Behandlung mit kanzerogenen Stoffen (c – h).

Gegen Ende der Projektlaufzeit wurde an unserem Institut automatisierte Life-Imaging Technik eingeführt. Die ersten Videos zeigen ein bislang nicht beschriebenes Bewegungsmuster der Zellen im Verlauf der Kultur. Die Zellen aggregieren und bilden dabei sehr großflächige Aggregate von Kernmaterial, in denen keine Grenzen zwischen den individuellen Kernen mehr erkennbar sind. Teils werden in der Umgebung dieser Aggregate histonhaltige, filigrane Verbindungen zwischen Kernen ausgebildet. Die Aggregate lösen sich nach ca. 3-4 Stunden wieder auf und die Zellen dispergieren mit scheinbar unveränderten Kernen wieder. Ein vergleichbarer Prozess ist in der Grundlagenbiologie nicht beschrieben.

Abb. **11** (a – h) zeigt Zellkernaggregate von unbehandelten Zellen (a, b) und von Tochterzellen nach Behandlung mit kanzerogenen Stoffen (c – h).

Cokulturversuche

Mit Unterstützung der Universität Köln wurden weitere Techniken der Zellmarkierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen CellTracker^{TM} Green CMFDA und Red CMTPX etabliert. Mit fluoreszenzmarkierten Zellen konnten Vorversuche zur technischen Absicherung der Identifikation fluoreszierender Zellen insbesondere der Unterdrückung von Autofluoreszenz durchgeführt werden. Zudem war es wichtig, Schlüsselergebnisse mit einer Referenzmethode zu überprüfen. Abb. **12** zeigt die selektive Einlagerung von Fluoreszenz gefärbten Wildtypzellen in ovarielles Gewebe in Cokulturversuchen

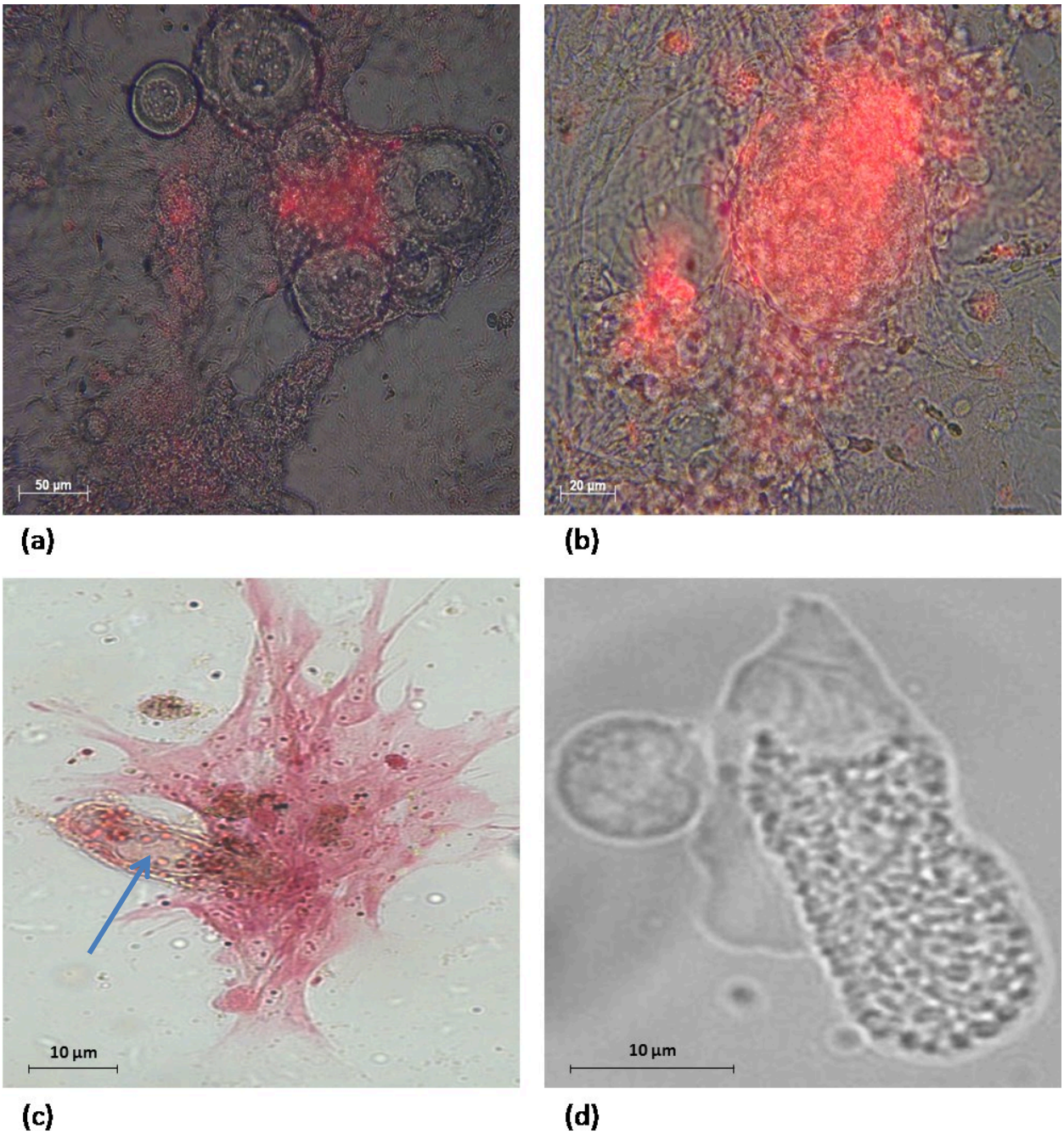


*Abbildung **12**: Cokultur von rotgefärbten PTR-SCs mit Ovar. Adhärente Oozyten mit markierten PTR-SCs im Interstitium (a). Adhärente Eizelle im reaggregierten Gewebsverband mit starker Einbindung von PTR-SCs an der Oberfläche der Eizelle (b) Rodletzelle (Pfeil) an der Oberfläche eines adhärenten Zellclusters Azan-Färbung (c) Rodletzelle im Kontakt mit einer suspendierten PTR-SC Lebendbeobachtung (d)*

Die Cokultur von GFP-markierten PTR-SC mit ovariellem Gewebe von karpfenartigen Fischen zeigte gleichfalls, dass die Zellen selektiv an der Oberfläche von Oozyten im Prävitellogenesestadium und im gonadalen Interstitium chimäriges Gewebe bilden.
In Cokulturen konnten wir zeigen, dass Rodletzellen aus ovariellem Gewebe in Kontakt mit den PTR-SC treten. Weitere Hinweise auf die Rolle von Rotletzellen, war ein überdauern von grünfluoreszierenden rodletähnlichen subzellulären Strukturen in juvenilen Karpfen 6 Monate nach der Transplantation im Bereich des Peritoneums. Die Einordnung dieser Befunde war innerhalb des Projektzeitraums nicht möglich. Im Rahmen des SETAC World Kongress in Orlando hatten wir Gelegenheit Kontakt zu einem der wenigen Histopathologen mit Erfahrungen zu diesen Zelltypus aufnehmen.
Wir gehen davon aus, dass wir anhand des Vergleichs mit Rodletzellisolaten der amerikanischen Kollegen Aufschluss über die Natur dieser Strukturen erhalten werden.

An der Oberfläche der Eizellen erfahren die Zellen eine Differenzierung, die sich grundlegend von den interstitiellen Zellen unterscheidet. Die Zellen bilden ein Zweischichtiges Epithel, das aufgrund der Kernmorphologie der Zellen eindeutig als Follikelepithel anzusprechen ist (Abb. **13**). Von diesem Differenzierungsprozess wurde schon in vorausgegangenen Studien angenommen, dass er auf bewegliche ektopische Zellen zurückzuführen ist (Stahlschmidt 1991, Abb. 13 b, d) Auch bei karpfenartigen Fischen konnte gezeigt werden, dass der saisonal wiederkehrende Aufbau eines zweischichtigen Follikelepithels auf bewegliche Zellen zurückzuführen ist (Allner et al. 2010).

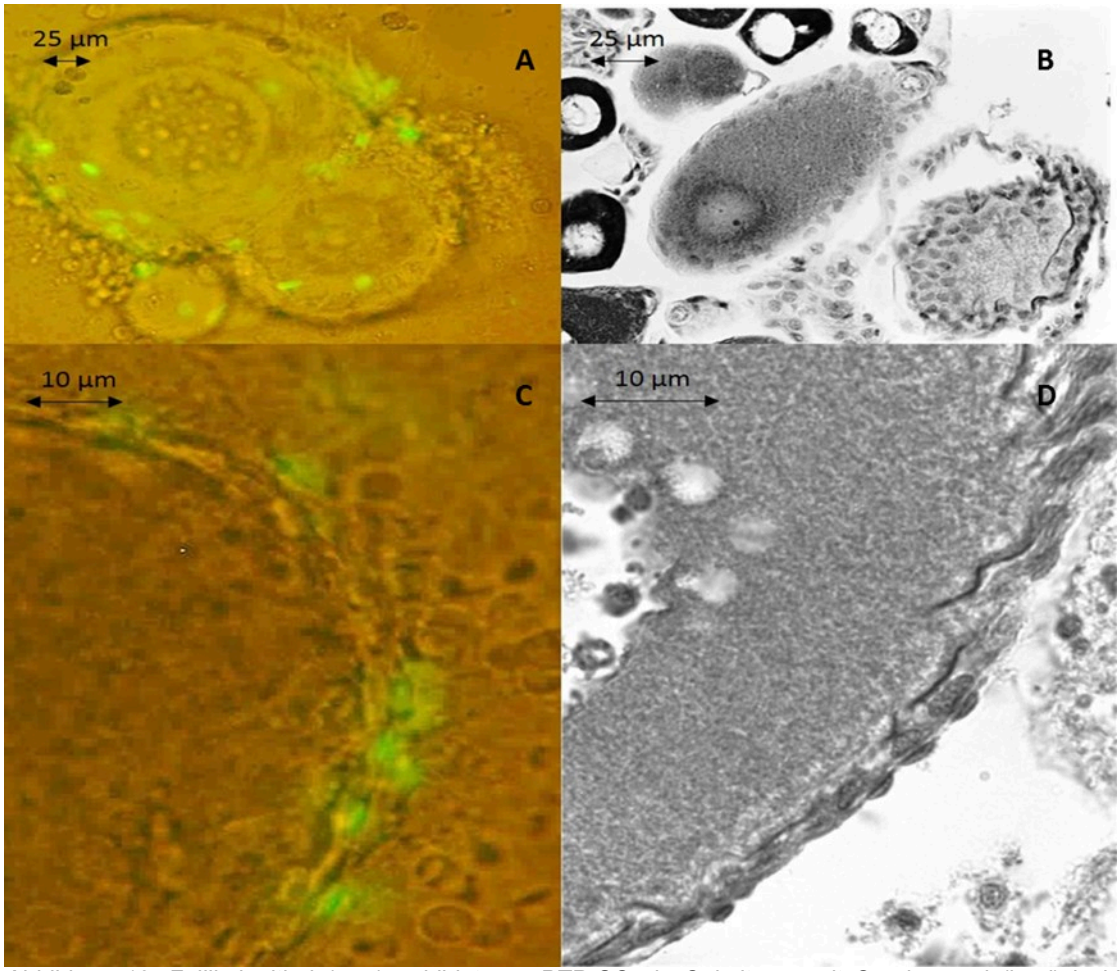


Abbildung 13. Follikelepithel (a, c) gebildet aus PTR-SCs in Cokulturen mit Ovarien und (b, d) in histologischen Präparaten.

Der ovarielle Follikel ist der Ort der Östradiolbiosynthese, bei der die äußere Theca-, androgene Vorstufen bildet, die dann in der inneren Granulosa Schicht zu Östradiol konvertiert werden.

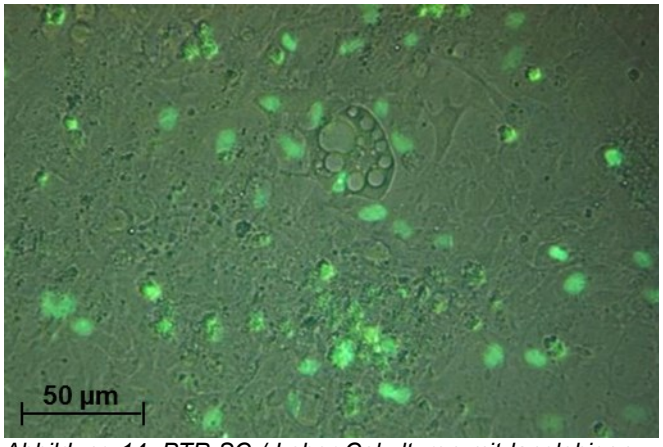


Abbildung 14. PTR-SC / Leber Cokulturen mit langlebigen Primärzellen und differenzierten (granulierten) PTR-SC.

In Cokulturversuchen mit Leber konnte gezeigt werden, dass von der Leber morphogenetische Signale ausgehen. Diese induzieren die Differenzierung einer Granulation in den PTR-SC (Abb. **14**). Die Leberchimären sind im Unterschied zu Leber -Primärzellen langlebig. Sie verfügen über ausgeprägte Stoffwechselkompetenzen im Hinblick auf Fremdstoff-/Entgiftungsmetabolismus.

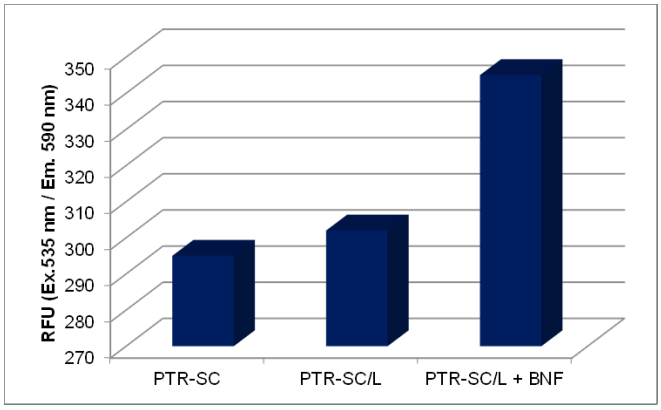


Abbildung 15. EROD-Aktivität von PTR-SC und PTR-SC/Leber Cokulturen, diese mit und ohne Exposition zum CYP450 induzierendem Schadstoff ß- Naphthoflavon.

Abbildung **15** zeigt einen deutlichen Anstieg der EROD Aktivität der Cokulturen nach Induktion der mischfunktionellen Oxygenasen mit ß-Naphthoflavon. Diese Enzym-aktivität wird als toxikologischer Endpunkt bestimmt. Eine erhöhte Aktivität reflektiert eine Exposition des Organismus gegenüber Fremdstoffen, die „Entgiftungsenzyme“ induzieren. Die Gewebschimären aus Leber und PTR-SC zeigten weitere Enzymaktivitäten, die dafür sprechen, dass eine metabolische Aktivierung von Fremdstoffen erfolgt. Dies bildete den Ausgangspunkt für die Entwicklung einer *in vitro* Technologie zum Ersatz von Rattenleber Lysosomenfraktionen. Diese werden durch sehr belastende Behandlungen von Ratten gewonnen und sind in der *in vitro* Toxikologie unentbehrlich zu säugertypischen Aktivierung von Fremdstoffen Systemen mit verminderter metabolischer Kapazität.

Sehr viel weitreichendere Regenerationsprozesse wurden bei Cokulturversuchen mit Geweben ordnungsfremder Fische, wie dem Medaka (*Oryzias latipes*) beobachtet. Für diese Versuche wurden teils transgene Fische genutzt, bei denen die Expression von Stammzell / Keimbahnmarkergenen (*oct4, sox2* und *vasa*) mit der Coexpression von Reportergenen einhergeht. Abbildung **16** (a – c) zeigt die *sox2* gekoppelte Expression eines rotfluoreszierenden Proteins (mCherry) im Zytoplasma des Empfängergewebes. Die Spitze des Kiemenfilamentes wurde durch GFP-markierte PTR-SC in der Cokultur regeneriert. Ähnliche Beobachtungen wurden in der Cokultur von Herzen mit PTR-SC gemacht (Abb. 16. d, e). Ein bis 2 Stunden nach der Entnahme der Herzen war eine sporadische Besiedlung des Herzgewebes erkennbar und der Herzschlag setzte wieder

ein. Nach 2 Tagen war eine komplette Ummantelung der Herzkammer mit einem Perikard ähnlichem Epithel zu verzeichnen. Vergleichbare Beobachtungen liegen auch für Lebercokulturen vor.
Da die Cokulturversuche teils in den letzten Wochen der Projektlaufzeit und im Nachgang zum Projekt durchgeführt wurden, konnten keine weitergehenden Untersuchungen zur Beantwortung der Frage durchgeführt werden, inwieweit die Zellen eine Differenzierung zu Kardiomyozyten, im sinutrialen Knoten oder respiratorischen Epithelien durchlaufen haben.

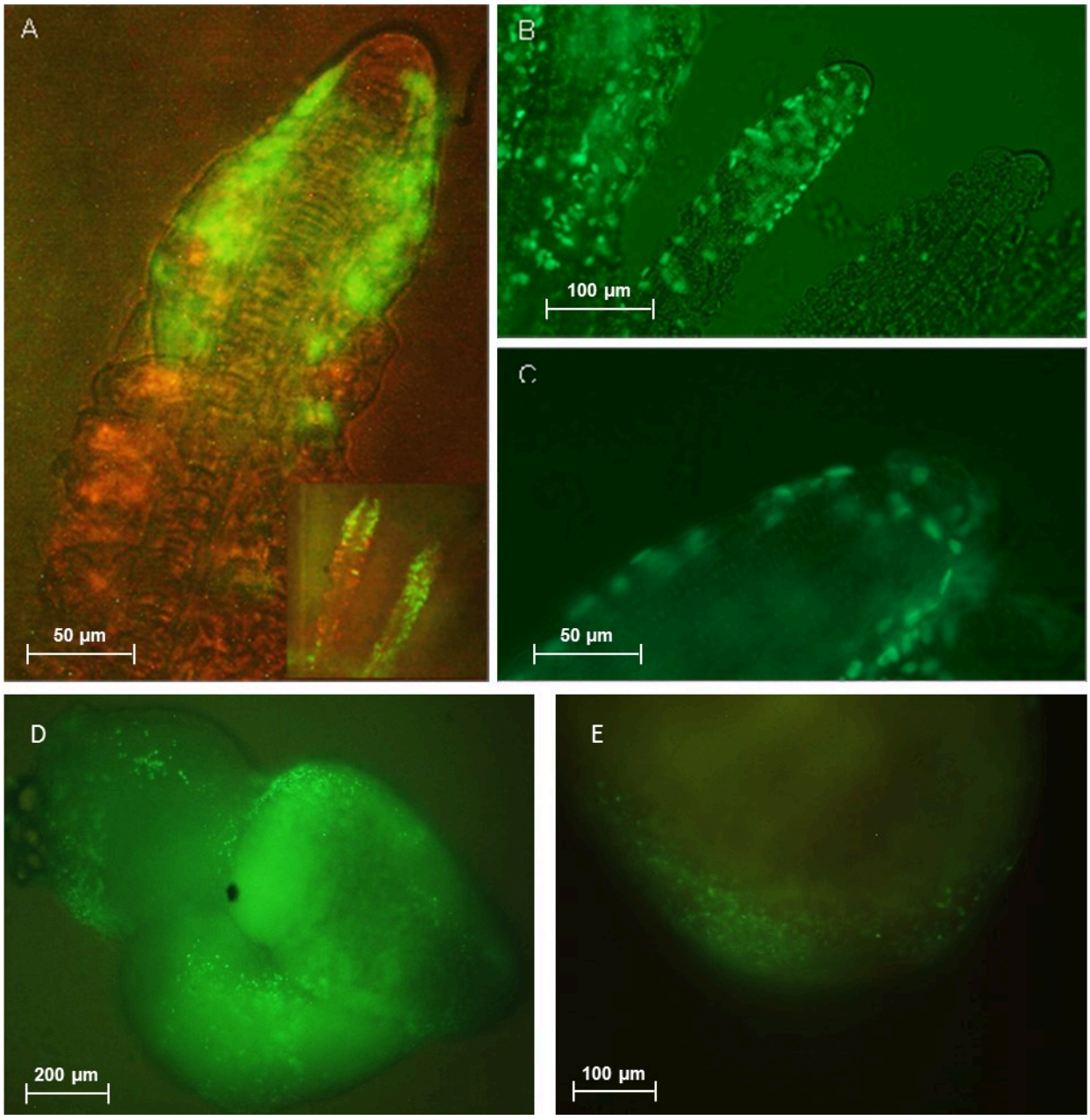


Abbildung 16. Cokulturen von GFP-PTR-SC mit Kiemen (a – c) und Herz (d, e) des Japanischen Reisfisches (O. latipes), mit Integration von der Stammzellen im apikalen Bereich der Kieme und im Herz.

Transplantationsversuche mit Embryonen

Versuche zur homologen Transplantation in Karpfen-Embryonen 2-8 Stunden nach der Fertilisation haben gezeigt, dass GFP-markierte Zellen in der postanalen ventralen Körperregion integriert werden (Abb. **17**). Für den Karpfen stehen derzeit noch keine

Reporterfischlinien zur Verfügung, die eine keimbahn-spezifische Expression von Reportergenen aufweisen. Daher konnte bislang nicht beurteilt werden, ob die PTR-SC mit primordialen Keimzellen co-lokalisiert vorkommen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde im Projektnachgang die Kooperation mit der TU Dresden weiter ausgebaut. Aufgrund der hohen Kompatibilität der Zellen mit Geweben vom Reisfisch ist davon auszugehen, dass die Zellen auch in deren Embryonen integriert werden. Hierfür stehen in Dresden mehrere transgene Linien zur Verfügung, deren Keimzellen linienspezifische Reportergene exprimieren. So kann im heterologen System ggf. eine Co-Lokalisation von PTR-SC und primordialen Keimzellen sichtbar gemacht werden.

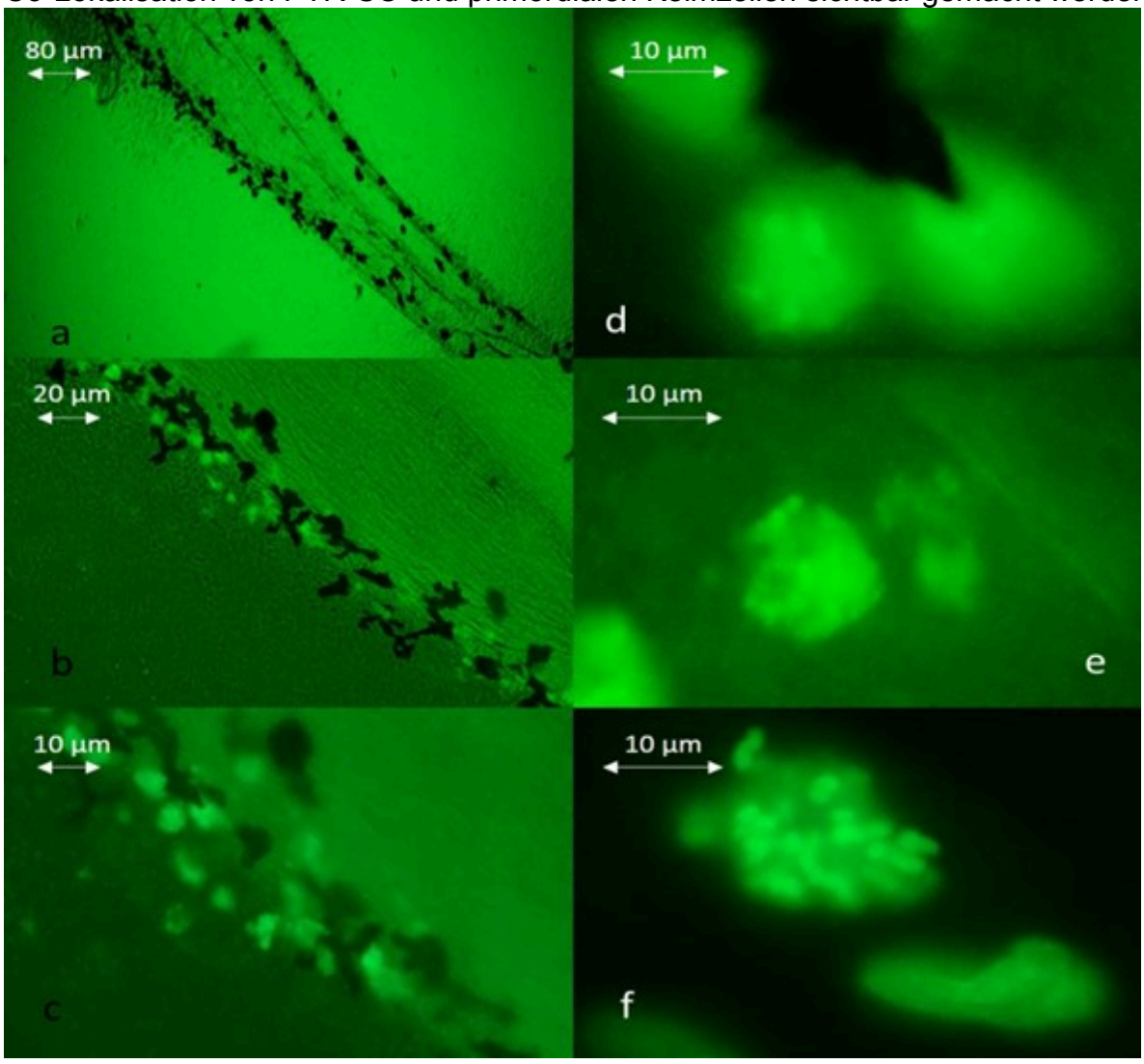


Abbildung 17. Integration von GFP-markierten PTR-SCs im postanalen caudoventralen Bereich im Larvenstadium nach Transplantation in frühe Entwicklungsstadien (Morula) von Karpfenembryonen.

Transplantationsversuche mit juvenilen karpfenartigen Fischen

In Transplantationsversuchen mit juvenilen Karpfenartigen, konnte molekularbiologisch nachgewiesen werden, dass PTR-SC im Körper verteilt werden und eine Proliferation der Zellen stattfindet. Bei Transplantationsversuchen waren sieben Tage nach der Transplantation stets das GFP-Gen und die korrespondierende mRNA in Gonade und Gehirn nachweisbar. Für andere Organe wie Leber, Niere und Seitenlinienorgan liegen nur Einzelbefunde vor. Die Zellen waren meist jedoch nicht eindeutig in *ex vivo* Gewebspräparationen mikroskopisch ansprechbar. Lediglich in den letzten Tests, die mit der zuletzt generierten -Variante der PTR-SC durchgeführt wurde war nach drei

Tagen eine Integration der Zellen in mehrere Gewebe nachweisbar. Bei der Durchführung dieser Versuche kam es bedingt durch die Wahl der Einstichstelle zu einer Verletzung der inneren Organe aufgrund einer Reflexbewegung während der Injektion. Wir gehen davon aus, dass durch die Verletzung ein physiologischer Regenerationsprozess eingeleitet und die Chemotaxis der Zellen beeinflusst wurde.
Die Einlagerung von morphologisch undifferenzierten PTR-SC im Interstitium des Fettgewebes (Abb. **18**. a, b) konnte in mehreren Versuchen beobachtet werden. Eine Differenzierung zu gewebstypischen Zellen scheint im Ovar (Follikelepithel Abb. 18.c, Gonien Abb. 18.d) und in der Haut (Becherzellen Abb.18. e, f) zu erfolgen.

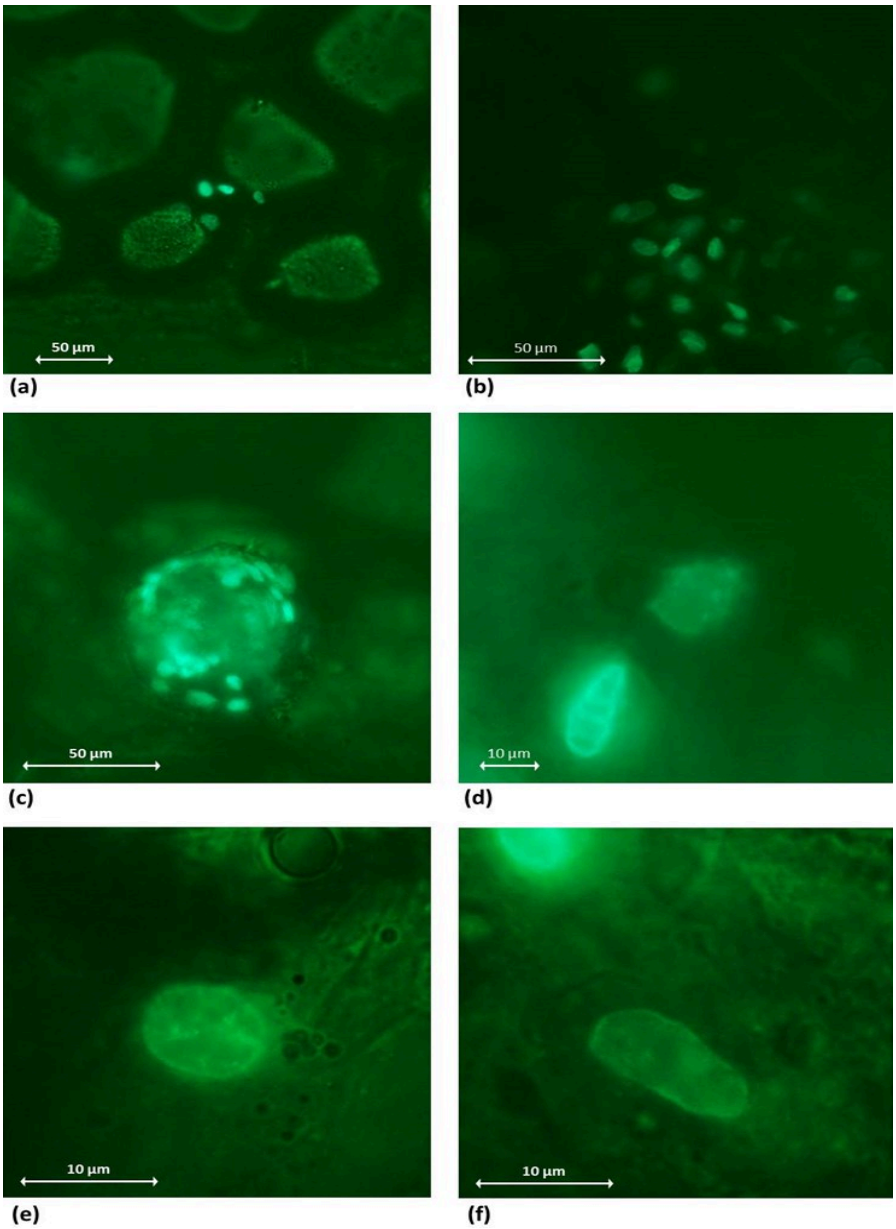


Abbildung 18. PTR-SCs nach Transplantation im Fettgewebe (a, b), im Ovar (c), im Hoden (d) und in der Haut (e, f) von juvenilen Karpfen

Transplantationsversuche mit seneszenten, percomorphen Fischen

Eine sehr viel weitreichendere Integration der Zellen wurde auch in vivo bei Versuchen mit kleinwüchsigen seneszenten Fischen aus dem Formenkreis der Percomorpha, dem Reisfisch, beobachtet. Nach intraperitonealer Injektion waren die transplantierten Zellen sicher in Leber, Haut, Fettgewebe, Herz und Ovar nachweisbar (Abb. **19**). Im Hinblick auf die Einlagerung der Zellen in Lebergewebe des Reisfisches können wir derzeit nicht entscheiden, ob der histologisch deutlich abgegrenzte Bereich der transplantierten Zellen auf einen anderen Funktionszustand normal differenzierter Leberzellen (z.B. Einlagerung von Glykogen) oder ein Teratom hinweist. Abb. 19. c zeigt die Infiltration der transplantierten Zellen in das Empfängergewebe. Die länglich verformten Zellkerne, die Zellbewegungen reflektieren, sind gut erkennbar. In der Haut (Abb. 19. d) scheinen die transplantierten Zellen sich zu Epithelzellen zu differenzieren. Im Fettgewebe werden die PTR-SC anscheinend undifferenziert eingelagert (Abb. 19. e), wie es z. B. für mesenchymale Stammzellen typisch ist. .Die transplantierten PTR-SC, die im Herz beobachtet wurden, haben sich zwischen Sinus venosus und Atrium integriert. Sie waren zum Zeitpunkt der Organentnahme als ein kompakter Gewebsbereich eindeutig ansprechbar. Nach 24 h Organkultur war eine Proliferation der Zellen zu verzeichnen. Auch hier war eine Infiltration der Zellen in das gesamte Organ, ähnlich wie in den durch Cokultur erzeugten Chimären, zu erkennen. (Abb. 19. f).

Im Ovar haben die PTR-SC sich zu meiotischen Keimzellen differenziert, wie ein Vergleich mit einem histologisches Präparat eines juvenilen Ovars illustriert (Abb. 19. g, h). Dabei entsprechen Anatomie und Zytologie der Zellen den histologischen Befunden vorausgegangener Studien, die die folgende Arbeitshypothese des Vorhabens begründet: Die periodische Proliferation von Oozyten bei Knochenfischen basiert auf einer wiederkehrenden Besiedlung des Ovars mit pluripotenten Zellen. Diese differenzieren zu einer zweiten Follikelschicht an der Oberfläche der vorhandenen Oozyten und lösen damit die Reifung der Eizellen aus. Aus dem gleichen „*Zellpool*“ differenzieren sich an der dem Ovariallumen zugewandten Seite, der „Basis“ die Oozyten / Oogonien. Diese gehen sofort in die Prophase der Meiose über und begründen die Oozytenpopulation des übernächsten Reproduktionszyklus.

Abb. **20** zeigt zwei aufeinanderfolgende Entwicklungszustände eines periodisch reifenden Ovars mit angrenzendem Fettgewebe. Zunächst ist im Ovar nur eine Generation von Keimzellen erkennbar, gleichzeitig treten im Interstitium des Fettgewebes undifferenzierte Zellen auf. Im darauf folgenden Stadium ist das Interstitium des Fettgewebes zellfrei, stattdessen werden an der Peripherie der jungen Oozyten Zellen angelagert und an der dem Lumen zugewandten Seite des Ovars differenziert sich die folgende Oozytengeneration.

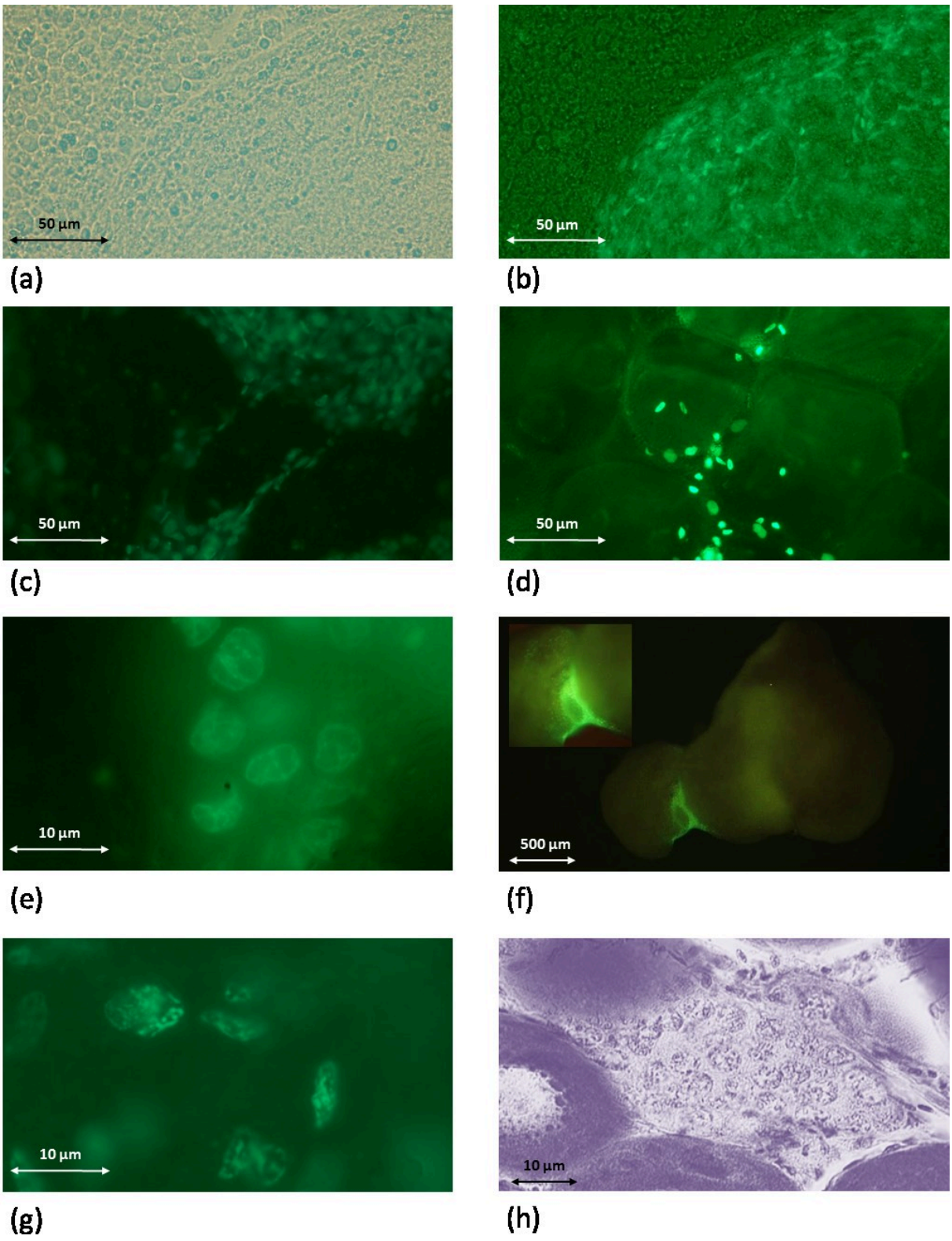


Abbildung 19. (a-c) Einlagerung und Differenzierung der Zellen in Lebergewebe des Reisfisches 7 Tage nach der Transplantation, (a, b) Hellfeld und Fluoreszenzaufnahme desselben Gewebsbereiches; (c) Infiltration der transplantierten Zellen in Empfängergewebe; (d) Einlagerung von transplantierten Zellen im Fettgewebe; (e) Differenzierung zu Epithelzellen, (f)Integration der PTR-SC im Herz; (g) Differenzierung der PTR-SC zu meiotischen Keimzellen wie in (h) histologisches Präparat eines juvenilen Ovars mit meiotischen Keimzellen

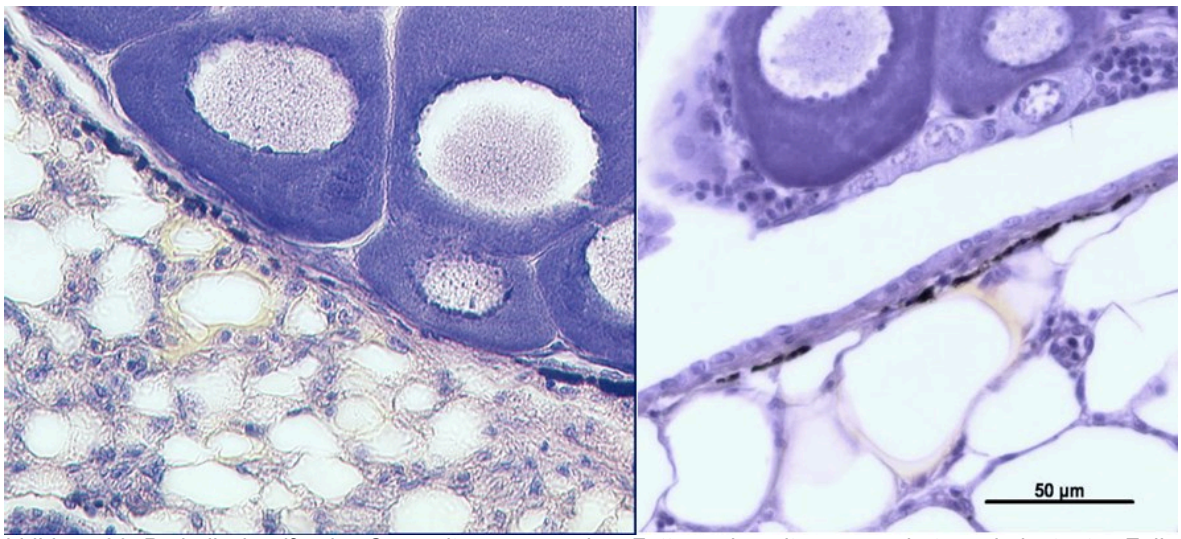


Abbildung 20. Periodisch reifendes Ovar mit angrenzendem Fettgewebe mit zugewanderten pluripotenten Zellen.

Molekularbiologische Charakterisierung der PTR-SC

Zur molekularbiologischen Charakterisierung insbesondere der Pluripotenz wurde die Genexpression der PTR-SC im Vergleich mit Markergenen von embryonalen Stammzellen und differenzierten Zellen aus *ex vivo* Präparationen von Karpfen und Goldfischen untersucht. Dabei wurde zunächst auf der Grundlage von bioinformatischen Vorgaben der Projektpartner Universität Köln die Technik der Endpunkt PCR etabliert. Nach der Einarbeitung von Dr. Cristiano Lerche konnten dann die weiterführenden Untersuchungen im eigenen Labor konzipiert und durchgeführt werden. Für ausgewählte Fragestellungen der Quantifizierung der Genexpression wurden RT-qPCR Untersuchungen in Laboren der HS Fresenius im benachbarten Idstein durchgeführt.
Bei diesen Untersuchungen stand insbesondere die Analyse der Gensequenz des *pou2* im Mittelpunkt. Das Pou2-Protein fungiert als Transkriptionsfaktor und ihm wird eine zentrale Rolle bei der so genannten Reprogrammierung von differenzierten Zellen zu undifferenzierten Zellen mit embryonalen Eigenschaften (induziert pluripotente Stammzellen, iPSCs) zugeschrieben (z.B. Pfannkuche *et al.*, 2010). Dazu wurde zunächst die Expression des *pou2* mit bereits bekannten Primern untersucht. Diese Versuchsreihe hat gezeigt, dass sowohl in PTR-SC *in vitro* als auch in verschiedenen Geweben von Karpfen und Goldfisch *pou2* exprimiert wird. Die an der Universität Köln durchgeführte Analyse der Sequenz des 445 bp-langen PCR Produktes enthalten mit Primer für eine Karpfen cDNA library (Genbank no. CF661606.2) zeigte 83% Homologie zum *pou2* Gen des Zebrafisches und 92% Homologie zum *pou5f1* Gen von *Labeo rohita* (Genbank no. GU443948.1), sowie 74 % zu dem *pou5f1* Gen des Menschen, das für das Oct4-Protein des Menschen codiert.
Darüber hinaus war zur Absicherung des Modells zu prüfen, ob es sich bei der beobachteten Expression von Bereichen des *pou2* um Pseudogene handelt, die bei der *pou*-Genfamilie zahlreich exprimiert werden, oder ob es sich um funktionelle Pluripotenzgene handelt. Zu diesem Zweck wurden dann weitere Primer für die Sequenz von *pou5f1* von *L. rohita* generiert, zur Herstellung längerer *pou2* PCR Produkte. Es konnten Produkte mit der erwarteten Länge amplifiziert werden. Dieses Ergebnis ist insofern von besonderer Bedeutung als sich zwischenzeitlich herausgestellt hat, dass das orthologe Protein des Zebrafischs in Reprogrammierungsexperimenten mit embryonalen Fibroblasten der Maus als unwirksam im Hinblick auf die Induktion der Pluripotenz erwiesen hat (Tapia et al. 2012)

Bei der Analyse der Expression von Stammzellmarkergenen scheint nicht nur die absolute Zahl der Transkripte, sondern auch das Verhältnis der Expression des *pou2* im Vergleich mit der Expression eines zweiten Stammzellmarkergens - dem *sox2* - von Interesse zu sein. Die Pou2-und Sox2-Proteine bilden Heterodimere, wobei überschüssiges (ungebundenes) Sox2 die Expression von *pou2*, *sox2*, *nanog* und andere Transkriptionsfaktoren die mit Pluripotenz in Verbindung gebracht werden herabregulieren. Dieser Prozess der Genregulierung ist mit der Induktion der Differenzierung korreliert (Boer *et al.*, 2007; Tompkins *et al.*, 2011). Die in Abbildung 2 dargestellte quantitative Analyse der Genexpression von *sox2* und *pou2* zeigt deutliche Unterschiede zwischen der Expression beider Gene in *ex-vivo* Gewebspräparationen und in Kulturen von PTR-SC. In den somatischen Geweben und im differenzierten Ovar wird das *sox2* deutlich stärker exprimiert (relativ zur *pou2*-Expression) als in juvenilen Gonaden und in der PTR-SC Kultur. Die Expression von *pou2* in allen Geweben weist auf die Präsenz von Stammzellen mit embryonalem Charakter (PTR-SC) im gesamten Organismus hin. Die geringe Zahl an *sox2*-Transkripten in der PTR-SC Kultur sowie in der unreifen Gonade (Abb. **21**, Go[J]) werten wir als Indiz dafür, dass diese Zellen keinem Differenzierung auslösenden Einfluss unterliegen.

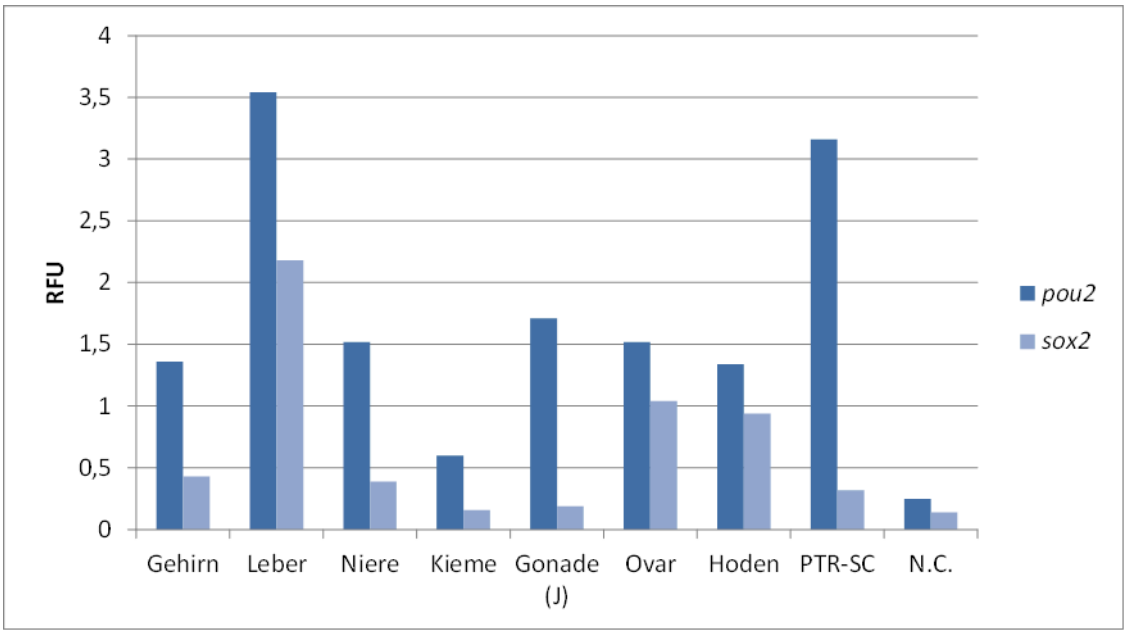


*Abbildung **21**: Quantitative Expression der Puripotenzgene OCT3/4 (pou2, dunkelblau) und SOX2 (sox2, hellblau) in verschiedenen Geweben und in PTR-SC.*

Ein weiterer Fokus der molekularbiologischen Untersuchungen war die Erfassung von Genen des Östrogenstoffwechsels. Bei Fischen wird das östradiolabhängige Dotterprotein nicht wie allgemein angenommen nur in der Leber synthetisiert und dann in Eizellen abgelagert. Wir konnten im Rahmen von teils parallel durchgeführten Studien eine ektopische Vitellogeninsynthese in mehreren Organen wie Leber, Kieme und Haut nachweisen. In diesen Organen vermuten wir eine ausgeprägte Gewebserneuerung, von der wir annehmen, dass dies auf die Proliferation von PTR-SC zurückzuführen ist. Im Gehirn, wo wir die (Master)-Stammzellnische vermuten, ist gleichfalls eine ausgeprägte VTG Synthese zu verzeichnen. Zur molekularbiologischen Erfassung des Östrogenstoffwechsels wurden folgende Gene untersucht:

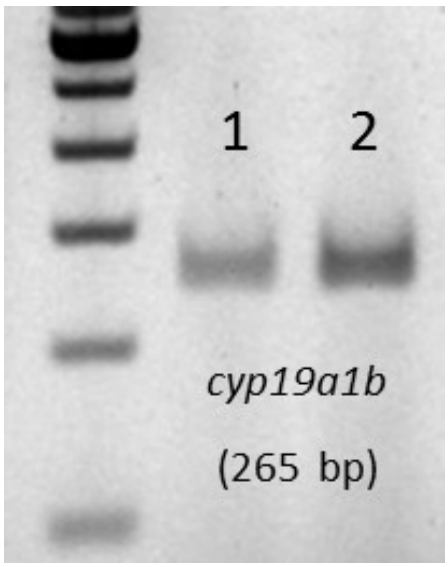


Abbildung 22. Agarose-gelelektrophorese des cyp19a1b Produkts (265 bp) in (1) PTR-SC Zellen und (2) im Gehirn.

- **AroB / *cyp19a1b*** (Abb. **22**): das Gen codiert die neuronale Aromatase. Das Enzym, dass bei Fischen zeitlebens außerhalb des eigentlichen Produktionsorts von Östrogenen, dem Ovar, Östradiol synthetisiert. Bei Säugern ist dieses Gen z.B. im Gehirn nur während eines kurzen perinatalen Zeitraums aktiv.
- **Östrogenrezeptoren α und ß** codieren Gene für Östrogenrezeptoren. Diese wiederum induzieren die Transkription von östrogenabhängigen Proteinen
- **Vitellogenin** gilt bisher als östrogenabhängiges Dotterprotein

PTR-SC exprimieren diese Schlüsselgene des Östrogenstoffwechsels konstitutiv (Abb. **23**). In Versuchen bei denen die Zellen gegenüber Östrogenen und dem Morphogen Retinsäure exponiert wurden, zeigte sich, dass Östradiol und das synthetische Östrogen Diethylstilbestrol die Expression beider Östrogenrezeptoren verstärken. 18-stündige Exposition zu Retinsäure hemmt zunächst die Induktion der Rezeptoren, während nach 36 Stunden auch in Kontrollen eine strake Expression zu verzeichnen ist.

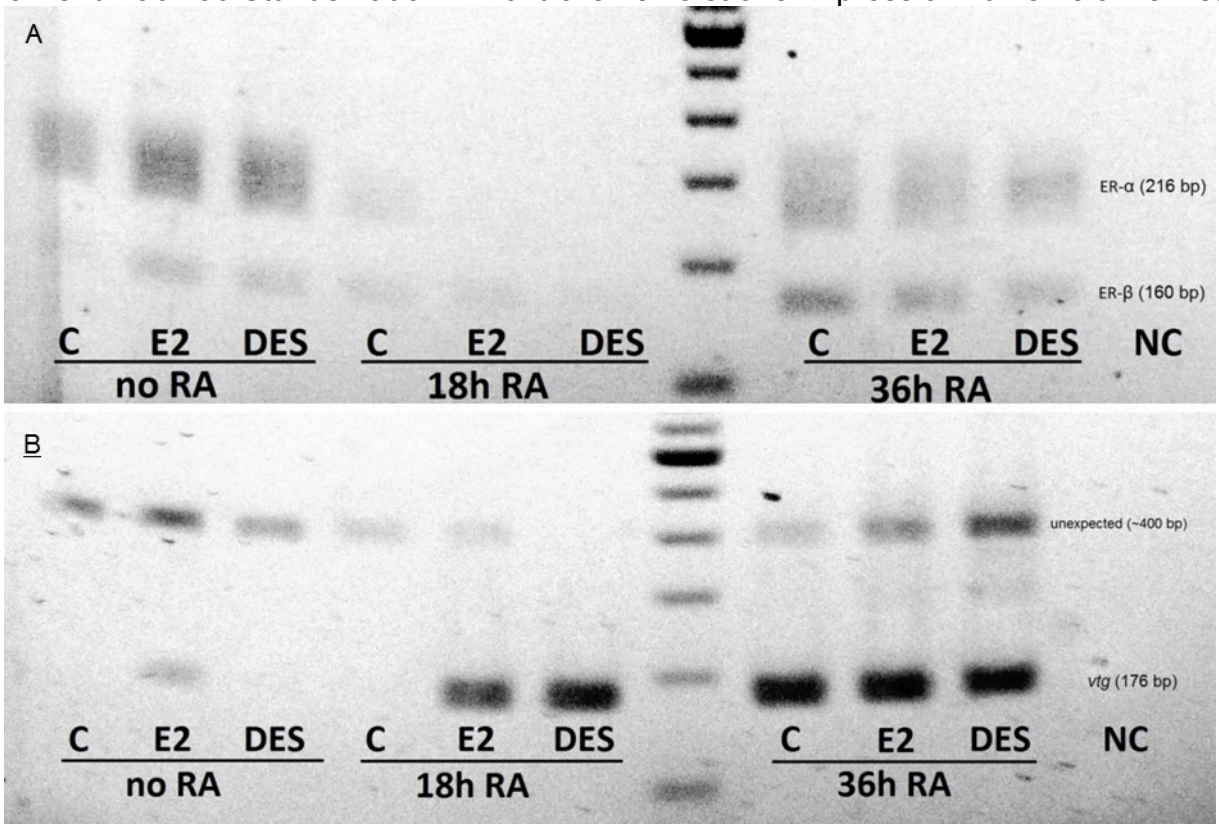


Abbildung 23. Expression der Genen für die Östrogenrezeptoren α und ß (a) und für Vitellogenin (b) mit und ohne Vorexposition zu Retinsäure („retinoic acid", RA) in Kontrollen (C), Zellen exponiert zu Estradiol (E2) oder zum Xenoöstrogen diethylstilbestrol (DES).

Nach Behandlung mit Östrogenen wird die konstitutiv sehr schwache Expression des Dotterproteins Vitellogenin verstärkt. Durch 18-stündige RA Exposition wird die Sensitivität der Zellen gegenüber Östrogenen erhöht und nach 36h-Vorbehandlung wird das Gen-unabhängig von Östrogenexposition (über) exprimiert. Ein Befund den wir bislang nicht erklären können ist die Expression eines zweiten Gens, das die doppelte Anzahl an Basenpaaren aufweist wie das VTG Gen.
Auf der Proteinebene wurde die Bildung von Vitellogenin gleichfalls mittels eines hochsensitiven ELISA untersucht.

Wie in Abb. **24** gezeigt, sind die mit Retinsäure vorbehandelten Zellen östrogensensitiv. Ausgehend von diesen Ergebnissen soll im Nachgang zum Projekt ein Verfahren zur Erfassung von Östrogenwirkungen *in vitro* entwickelt werden. Bisher steht kein wirbeltierbasiertes *in vitro* Verfahren zur Erfassung von Östrogenwirkungen mittels Quantifizierung eines östrogenabhängigen Proteins zur Verfügung.

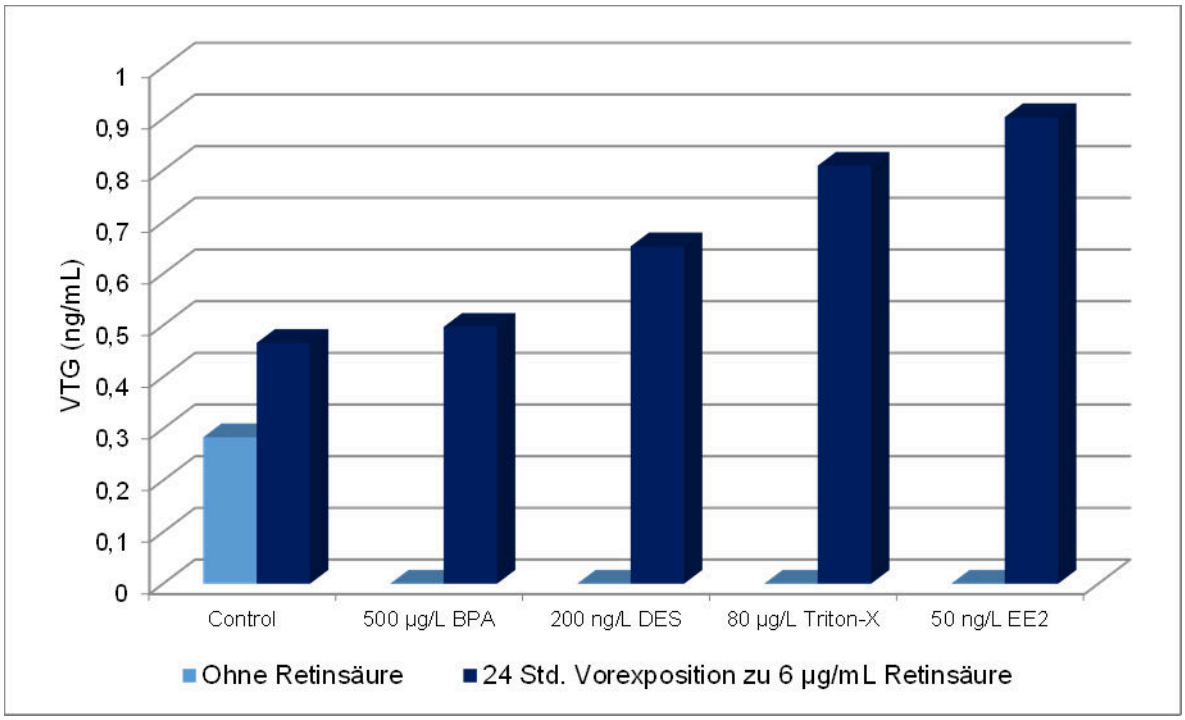


Abbildung 24. Vitellogenin (VTG) Werte in PTR-SC Kulturen mit und ohne Vorexposition zu Retinsäure (24 Std.) in Kontrollen und exponiert zu die Xenoöstrogene bisphenol A (BPA), diethylstilbestrol (DES), ein -Octylphenol-Derivat (Triton-X) und Ethinylestradiol (EE2).

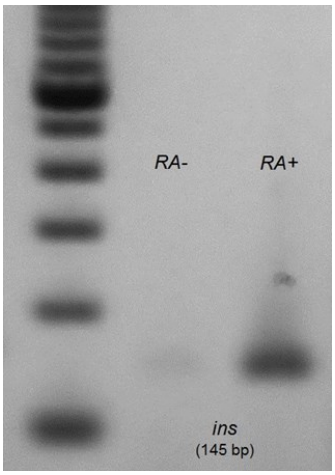


Abbildung 25. Expression von Preproinsulin (ins) vor (RA-) und nach (RA+) Exposition zu Retinsäure.

PTR-SC zeigen eine schwache konstitutive Expression des Insulingens, die durch Retinsäureexposition deutlich verstärkt wird (Abb. **25**).
Zur sicheren molekularbiologischen Identifikation der GFP markierten Zellen in Transplantationsversuchen wurde eine nested-PCR etabliert. Damit konnte in Transplantationsversuchen gezeigt werden, dass die Zellen in das Zentralnervensystem und in die Gonaden wandern. Der molekularbiologische Nachweis war sicher, sowohl für die genomische Variante des Gens auf der DNA Ebene als auch auf der mRNA Ebene. Damit ist davon auszugehen, dass die Zellen in diesen Nischen proliferieren, da Histone nur im Zuge der Zellteilung gebildet werden.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass die PTR-SC-Kulturen Schlüsselgene der Kontrolle von pluripotenten Stammzellen und des Östrogenstoffwechsels exprimieren. D.h. es werden zugleich typisch maternelle und embryonale Gene transkribiert. Im Rahmen des PLUG Projektes konnte nicht geklärt werden, ob diese sehr unterschiedlichen Funktionen den oben postulierten unterschiedlichen Zelltypen zuzuordnen sind.

7 Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Entsprechend dem zahlenmäßigen Nachweis kann konstatiert werden, dass die Projektkosten über den geplanten Kosten liegen (geplante Ausgaben: 671.549,00 €, tatsächlich verausgabte Mittel: 682.341,29 €). Die wesentlichen Abweichungen ergeben sich aus den im Folgenden aufgelisteten Positionen:

Personalkosten: Mehrkosten ergaben sich bei den Personalkosten in Höhe von 26.290,80 € (geplant: 555.470,00 €; angefallen: 581.760,80 €).

Materialkosten: Die Materialkosten sind um 1.043,57 € höher ausgefallen als vorgesehen (74.205,00 € geplant; 75.248,57 € verausgabt).

Reisekosten: Ebenfalls leicht über der geplanten Kostensumme blieben die Reisekosten (geplant: 11.460,00 €; verausgabt: 11.548,99 €).

Vorhabensspez. Afa: Die anteiligen Abschreibungen für projektspezifische Investitionen sind um 2.134,56 € etwas geringer ausgefallen als geplant (geplant: 14.814,00 €; angefallen: 12.679,44 €).

Sonstige unmittelbare Vorhabenskosten: Minderkosten ergaben sich bei den sonstigen unmittelbaren Vorhabenskosten (15.600,00 € geplant; 1.103,49 € verausgabt).

8 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Im Rahmen des Vorhabens wurden von beiden Partnern personelle Kapazitäten des eigenen Forschungs- und Entwicklungspersonals in erheblichem Umfang bereitgestellt. Da das technische und das damit verbundene finanzielle Risiko von dem industriellen Antragsteller, welcher zur Kategorie der kleinen und mittleren Unternehmen (KMU) gehört, nicht alleine getragen werden konnte, waren die Kooperationspartner auf eine öffentliche Unterstützung im Rahmen der Förderausschreibung KMU-innovativ: BioChance angewiesen.
Im Rahmen des PLUG-Vorhabens ist die GOBIO GmbH ihrem Anspruch als innovationsorientiertes Unternehmen moderner Prägung mit konsequenter Ausrichtung auf die Entwicklung innovativer Produkte und Dienstleistungen gerecht geworden. Die erzielten Projektergebnisse haben zu einem gewissen Umfang die weitere Entwicklung der Unternehmen beeinflusst und werden dies auch nach Ende des Projekts weiterhin tun, da sie an vielen Stellen bereits während der Projektlaufzeit Einzug in weitere Kooperationen und Entwicklungsprojekte gehalten haben. Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit wird dadurch eindrucksvoll untermauert.

9 Voraussichtlicher Nutzen/Verwertbarkeit der Ergebnisse

9.1 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten, wissenschaftlich-technische Erfolgsaussichten

Wirtschaftliche Verwertungsmöglichkeiten/Erfolgsaussichten

Seitens der Unternehmensberatung BCNP-consultants wurde im Rahmen eines vom RKW geförderten Projektes der Innovationsberatung eine direkte Vermarktung des gekoppelten in vitro in vivo Fischmodels im Bereich der Chemikalientestung empfohlen. Dies soll in Zusammenarbeit mit der Tecomedical AG erfolgen. Tecomedical vertreibt komplexe *in vitro* Testsysteme, die neben den für Einzelstudien portionierten Zellen, Kulturmedien, Reagenzien, ELISAS zur Erfassung spezifischer Endpunkte umfassen. Derart konfigurierte Dienstleistungen ersparen den Kunden die aufwändige Vorhaltung der Stammhaltung der Wirbeltierzell-, Hefen-, Bakterienkulturen. Der Personalaufwand zur Qualitätssicherung derartiger Verfahren nach GLP wird weitgehend durch den Lieferanten der Test-Kits abgedeckt. Die von uns isolierten Stammzelllinien haben sich als ausgesprochen robust erwiesen. Die neue Technik der Hibernationskonservierung vereinfacht den Einsatz von Zellkultursystemen in Routinelaboren erheblich. Für viele Labore die bislang noch mit Säugerzellen arbeiten wird ein Wechsel daher in hohem Maße attraktiv. Voraussetzung unsere Produkte in diesem Sinne zu etablieren sind Veröffentlichungen mit dem Kooperationspartner aus dem Medizinbereich, die PTR-SC als Modelle von adulten pluripotententen Stammzellen des Wirbeltierstammes ausweisen. Diese Arbeiten konnten im Nachgang auf den Weg gebracht werden. Erste Laborvergleiche im In-und Ausland sind im Gange. Ein zeitnaher Markteintritt auf der Grundlage des Alleinstellungsmerkmals der im hohen Maße vereinfachten Handhabbarkeit ist realisierbar.

Im Hinblick auf die Vermarktung der Produkte als Alternativen zu Tierversuchen wurden die ersten Veröffentlichungen im Rahmen der EUSAAT Tagung in Linz und des SETAC World Kongress in Orlando sehr positiv aufgenommen. Hier arbeiten wir an Dienstleitungsprodukten bei denen die Labore die in vitro Analysen selbst durchführen und wir exponierte Zellen im Hinblick auf ihre Integrationsfähigkeit in Gewebe bzw in Organsimen zu testen. Der hierzu erforderliche Aufwand an interdisziplinärer Kommunikation kann nur durch einen gut strukturierten Vertrieb geleistet werden. Dazu bedienen wir uns zunächst des Netzwerkes der Teco Medical Group die bereits ein von uns entwickeltes fischbasiertes Testsystem zu Erfassung von Östrogenwirkungen vertreiben.

Hier erwarten wir darüber hinaus Zugang zur onkologischen Grundlagenforschung. Erste Institute wie die Universitätskliniken Graz haben Interesse bekundet. Es soll getestet werden ob ein Exosomen vermittelter Einfluss von Cordomzellen zur cancerognen Transformation von PTR-SC führt.

In den verblüffenden Befunden zur Integration der Karpfenzellen in Gewebe, des zu den percomorphen gehörenden Reisfisch sehen wir eine Anschlussfähigkeit im Bereich der Alterforschung. Hier wird ein Verwandter des Reisfisch der Killifisch (Nothobranchius furzeri) eingesetzt. Dieser gilt als das Wirbeltier mit der kürzesten Lebenserwartung (Polačik et al. 2016). Wir bemühen uns derzeit um Kooperationsprojekte die darauf zielen, unsere Zellen zur Substitution der bei dieser Spezies vermuteten Regenerationsinsuffizienz zu erproben.

Nr.	Verwertungsergebnis	Kategorie	Instrument	Ausrichtung	Zeitpunkt
1	Selbstsignalgebende Kernmarkierung nicht immortalisierter spontan selbsterneuerender pluripotenter Stammzellen	Wirtschaftliche Erfolgsaussicht	Produkt	Grundlagen-forschung	Ab sofort
2	Vertrieb einzelner *in vitro* Assays	Wirtschaftliche & technische Erfolgsaussicht	Produkt	Laboratorien	Ab sofort
3	Cokultur & Transplan-tation fremdexponierter Zellen	Wirtschaftliche Erfolgsaussicht	Dienst-leistung	Pharma-&Bio-tech-Unter-nehmen	Ab sofort
4	Downstream Analysen fremdexponierte Zellen	Wirtschaftliche Erfolgsaussicht	Dienst-leistung	Pharma Forschung, Chemikalien-testung	Ab sofort
5	Einsatz der Zellen in der Altersforschung	Strategische Erfolgsaussicht	F&E Projekte	Industrie und Hochschule	Ab 2018
6	Etablierung automati-sierter Life Imaging Techniken	Wirtschaftliche Erfolgsaussicht	Dienst-leistung	Chemikalien Pharmatestung	Ab sofort

Wissenschaftlich-technische Verwertungsmöglichkeiten/Erfolgsaussichten
Es wurden keine Patente recherchiert, welche gegen eine Durchführung des Projektes oder eine zukünftige Verwertung der Projektergebnisse sprechen. Der Einsatz von Tiermodellen zur Erfassung toxikologischer Endpunkte, Expositions- und Risiko-/Effektoranalysen ist der aktuelle Stand der Technik. Es wird weiterhin eine konsequente Patentstrategie verfolgt, die GOBIO eine aussichtsreiche Marktposition sichern wird. Eine permanente Patent- und Technologiebeobachtung sowie eine Überwachung von Schutzverletzungen sind weiterhin Teil dieser Strategie.
Die wissenschaftlichen Ergebnisse wurden und werden vorwiegend auf Konferenzen und Ausstellungen präsentiert, aber auch bei Lehrveranstaltungen dargestellt. Vorträge auf Fachveranstaltungen wurden bereits gehalten als auch Fachartikel veröffentlicht. In die Verwertung der Ergebnisse sind 2 Promotionsstudenten eingebunden, so dass eine akademisch ansprechende Veröffentlichung gewährleistet ist.
Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die vorliegenden Ergebnisse sowohl in geeigneter Weise weiter verwertet werden, als auch als Entwicklungskern im Rahmen von bewährten Netzwerkkooperationen dienen werden.

9.2 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit
Aufgrund der sich abzeichnenden Unbrauchbarkeit von Zebrafischproteinen für Reprogrammierungsexperimente werden Karpfen und Goldfische als kostgünstige Quelle für diese Proteine zum Einsatz in der Grundlagenforschung interessant. In der biotechnischen Produktion gut charakterisierter Proteine mittels Fischmodell sehen wir ein hohes Potential für weitere Verwertung der bisher erzielten Resultate.

10 Ergebnisse Dritter

Ergebnisse von Tapia et al. 2012 wurden geprüft. Sie haben keine Auswirkungen auf die Durchführung des Vorhabens aber auf die Anschlussfähigkeit siehe 9.2.

11 Veröffentlichung der Ergebnisse

Die Projektergebnisse wurden während der Projektlaufzeit folgendermaßen veröffentlicht:

- SETAC Nantes Posterbeiträge und Ausstellung seitens TECO Medical
- EUSAAT Konferenz Linz 3 Vorträge und Ausstellung durch GOBIO gemeinsam mit BioTek (Hersteller von Life Imaging Reader Cytation)
- SETAC Orlando Vortrag und Ausstellung durch Diapharma (US Distributor TecoMedical)

Seitens des Partners UKK wird eine Veröffentlichung der Ergebnisse in „Nature“ angestrebt GOBIO wird darüber hinaus Teilergebnisse als methodische Fachartikel in der Zeitschrift der SETAC ET&C veröffentlichen.

Aarbergen den 28.11.2016

_____

Dr. P. Stahlschmidt-Allner

CEO GOBIO GmbH

12 Literaturhinweise

Allner B, von der Gönna S, Griebeler EM, Nikutowski N, Weltin A, Stahlschmidt-Allner P, 2010. Reproductive functions of wild fish as bioindicators of reproductive toxicants in the aquatic environment. Environ Sci Pollut Res Int. 17(2):505-18.

Boer B, Kopp J, Mallanna S, Desler M, Chakravarthy H, Wilder PJ, Bernadt C, Rizzino A, 2007. Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. Nucleic Acids Res. 35(6):1773-86.

Pfannkuche K, Spitkovsky D, Wunderlich FT, Abd El Aziz OM, Saric T, Hescheler J, Sachinidis A, 2010. A Cre-based double fluorescence indicator system for monitoring cell fusion events and selection of fused cells. Biotechniques 48(2):113-20.

Polačik M, Blažek R, Reichard M, 2016. Laboratory breeding of the short-lived annual killifish Nothobranchius furzeri. Nat Protoc. 11(8):1396-413.

Rolf HJ, Niebert S, Niebert M, Gaus L, Schliephake H, Wiese KG, 2012. Intercellular Transport of Oct4 in Mammalian Cells: A Basic Principle to Expand a Stem Cell Niche? PLoS One. 2012; 7(2): e32287.

Stahlschmidt P, 1991. Experimentelle Untersuchungen zur Gonadenentwicklung des protandrischen Anemonenfisches Amphiprion frenatus (Brevoort). Thesis (doctoral)--Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1991.

Tapia N, Reinhardt P, Duemmler A, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Esch D, Greber B, Cojocaru V, Rascon CA, Tazaki A, Kump K, Voss R, Tanaka EM, Schöler HR, 2012. Reprogramming to pluripotency is an ancient trait of vertebrate Oct4 and Pou2 proteins. Nat Commun. 3:1279.

Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Keiser AR, Wert SE, Bruno MD, Whitsett JA, 2011. Sox2 activates cell proliferation and differentiation in the respiratory epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol. 45(1):101-10.