

Etablierung eines *in-vitro* Modells zur Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyocyten und Neuronen

vorgelegt von

Mareike Dörrenberg

aus Recklinghausen

Die Arbeit wurde durchgeführt an der Fachhochschule Gelsenkirchen – Standort Recklinghausen unter der Anleitung von Prof. Dr. Frieder Schwenk und Dipl. Biol. Kirsten Wiethoff.

Embryonale Stammzellen stellen auf Grund ihrer vielfältigen Entwicklungsmöglichkeiten ein interessantes Gebiet der Grundlagenforschung dar. Vor allem murine Stammzellen bieten mittlerweile einen großen Spielraum an etablierten zellbiologischen und molekularbiologischen Methoden zur genetischen Modifikation. Mit ihrer Hilfe können verschiedenste Entwicklungsprozesse und intrazelluläre Vorgänge studiert werden. Die Erforschung dieser Entwicklungsprozesse dient jedoch nicht nur der Grundlagenforschung, sondern bringt auch weitreichende Fortschritte in der medizinischen Forschung mit sich. Vor allem der Informationsgewinn an spezifischen Differenzierungsvorgängen ist ein wichtiges Themengebiet für die regenerative Medizin, welche sich mit der Symptombekämpfung von zerstörtem Gewebe und Zellmaterial beschäftigt. Etablierte Differenzierungsmodelle bieten daher eine Grundlage für die weitere Untersuchung von Differenzierungsvorgängen in Stammzellen.

Dieses Projekt beschäftigt sich daher mit der Etablierung eines *in-vitro* Modells zur Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen zu Kardiomyocyten und Neuronen. Hierzu sollten Vektoren mit gewebespezifischen Promotoren und nachgeschalteten Reporter genen konstruiert werden, mit welchen embryonale Stammzellen über eine Lipofektion transfiziert werden sollten. Bei den eingesetzten Reporter genen handelt es sich um *GFP* und *LacZ*. Über einen Rekombinase vermittelten Kassettenaustausch (RMCE) sollen die Promotoren mit ihren nachgeschalteten Reporter genen ins Wirtsgenom der Zellen in den ubiquitären Rosa26-Locus integriert werden. Durch Anwendung spezifischer Differenzierungsprotokolle sollen die embryonalen Stammzellen in Embryoid Bodys (EBs) zu Kardiomyocyten bzw. Neuronen ausdifferenzieren. Im Anschluß sollte ein optischer Nachweis der Differenzierung über die exprimierten Reporter gene durch Lichtmikroskopie möglich sein. Zum Vergleich und zur Sicherstellung der Gewebespezifität soll der Vorgang mit Vektoren mit ubiquitären Promotor (CAGGS) und nachgeschalteten Reporter genen durchgeführt werden. Verwendet werden sollen zwei Neuronen-spezifische Promotoren (Synapsin, NSE/RU5'), ein Muskel-spezifischer Promotor (Desmin) sowie der ubiquitäre CAGGS-Promotor.

Die Konstruktion der Vektoren erfolgt über Ligation von PCR amplifizierten Promotoren und Reporter genen in das Ausgangsvektorerüst pRMCE. Bisher wurden drei *GFP*-Fragmente und Fragmente zweier Promotoren (Desmin, NSE/RU5') erstellt, die im weiteren Vorgehen in einer Overlap-PCR fusioniert werden sollen. Overlap-PCR und Einzelfragment-PCR zur Amplifikation des dritten Promotors (Synapsin) müssen noch optimiert werden.