

Charakterisierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen aus Nabelschnurblut und Expansion in skalierbarer Suspensionskultur

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biotech. Ruth Maria Olmer

Geboren 07. Dezember 1979 in Salzkotten

2010

Referent: Prof. Dr. Ulrich Martin

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Tag der Promotion : 06. Juli 2010

ZUSAMMENFASSUNG

Zell-basierte Therapien könnten in Zukunft völlig neue Behandlungsoptionen für verschiedenste Gewebeschäden und degenerative Erkrankungen bieten. Pluripotente humane embryonale Stammzellen (hESC) gelten durch ihr potentiell unbegrenztes Expansions – und Differenzierungspotential seit Jahren als aussichtsreiche Zellquelle für die regenerative Medizin. Mit den erstmals in 2007 von Takahashi et al. beschriebenen humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS) existiert nun erstmals eine ethisch unbedenkliche Alternative zu hESCs, die darüber hinaus auch autolog verfügbar wäre.

Ein kritischer Aspekt bei der Herstellung Patienten-spezifischer hiPS ist sicherlich die zu befürchtende erhöhte Zahl akkumulierter Mutationen in iPSC von älteren Individuen. Unter diesem Gesichtspunkt ist die Herstellung und Charakterisierung von hiPS-Zellen aus Nabelschnurblut, welche in unserer Arbeitsgruppe erstmals gelungen ist, von besonderer Bedeutung. Weitere gute Argumente für die Verwendung von Nabelschnurblut zur Herstellung von iPSC-Zellen ist sicherlich die Möglichkeit der nicht-invasiven Zellgewinnung sowie die Existenz großer öffentlicher und privater Nabelschnurbanken. Innerhalb dieser Arbeit konnten über Analyse der verwendeten Ausgangszellen sowie der generierten hiPS und deren Derivate wichtige Beiträge für die detaillierte Charakterisierung und den Nachweis der Pluripotenz von hiPS aus Nabelschnurblut geliefert werden.

Eines der größten Hindernisse für die Entwicklung zellbasierter Therapien stellen die bisher verwendeten Methoden zur Kultur pluripotenter Stammzellen dar. Realistisch betrachtet können Zellmengen in den klinisch benötigten Größenordnungen über die traditionell verwendete „Feederzell“-abhängige adhärente Kultur nicht bereit gestellt werden. Ein essentieller Schritt zur Massenproduktion pluripotenter Stammzellen ist daher die Entwicklung von Methoden, welche die Expansion in skalierbarer Suspensionskultur erlauben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein auf einem definierten Medium und auf Einzelzellinokulation beruhendes Suspensions-basiertes Kultursystem für humane iPSC-Zellen entwickelt werden. Die generelle Anwendbarkeit wurde unter Verwendung von ESC von Mensch und zwei Makakenspezies demonstriert. Für ein vereinfachtes Monitoring der Pluripotenz innerhalb der Suspensionskulturen wurden Reporterzelllinien generiert, die eGFP unter der Kontrolle des Pluripotenz-assoziierten OCT4 Promotors exprimierten. Vergleiche bezüglich der Proliferationsraten, Erhalt der Pluripotenz und des Differenzierungspotentials ergaben keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Kultursystemen. Die Analyse von Karyogrammen erbrachte auch nach bis zu 20 Passagen in Suspensionskultur keinerlei Hinweise auf genetische Veränderungen der kultivierten Zellen. Die generelle Skalierbarkeit des entwickelten Kultursystems durch Übertragung in dynamische Erlenmeyerkulturen repräsentierte einen weiteren essentiellen Schritt zur Massenexpansion der pluripotenten Zellen.

Zusammenfassend konnten innerhalb dieser Arbeit wichtige Beiträge zur erstmals beschriebenen Herstellung und detaillierten Charakterisierung von hiPS aus Nabelschnurblut geleistet werden. Darüber hinaus ist mit der Entwicklung eines definierten Kulturverfahrens für die Expansion von hiPS in Suspensionskultur die entscheidende Basis für die Bereitstellung klinisch und industriell relevanter Mengen an pluripotenten Stammzellen und deren Derivaten gelegt worden.

Pluripotente Stammzellen, skalierbare Suspensionskultur, eGFP Reporterzelllinien

ABSTRACT

Cell-based therapies promise to be a valuable tool for regenerative medicine. Due to their potential for unlimited proliferation and differentiation human embryonic stem cells (hESC) seem to be an applicable cell source. Particularly the in 2007 by Takahashi et al. introduced human induced pluripotent stem cells (hiPS) offer an ethical unproblematic alternative and the possibility to generate autologous cell sources.

Presumably, an increased number of accumulated mutations in hiPS from elderly individuals pose one critical aspect of hiPS generation. From this point of view, the generation and characterization of hiPS from cord blood, as first described by our group, seems to be of particular importance. Further arguments for the use of cord blood for generation of iPS are the non-invasive cell-collection as well as the existence of public or commercial cord blood banks. Within this thesis, important data on the source cells and the generated iPS and their derivatives have been contributed that were necessary for the detailed characterisation and the proof of pluripotency of cord blood iPS.

So far, culture techniques that are currently available represent one of the major hurdles for development of cell-based therapies. Actually, clinically required cell numbers cannot be produced via conventional adherent culture. Therefore, the development of culture techniques enabling expansion of pluripotent stem cells in scalable suspension culture represents an essential step towards mass production of pluripotent stem cells.

During this thesis a culture system based on a defined medium and single cell inoculated suspension cultures could be established. The system could be utilized to expand hESC, different lines of hiPS as well ESC lines as two different Macaca species. For direct control of the pluripotency reporter cell lines of the used pluripotent cell lines which express eGFP under control of the pluripotency associated OCT4 promotor were established via lentiviral gene transfer. Comparison of cells from the established suspension cultures and the conventional feeder-dependend culture system regarding proliferation, expression of pluripotency markers and differentiation capacity did not reveal obvious differences. A stable karyotype was observed for up to 20 passages of suspension culture by G-banding analysis. Pilot experiments in Erlenmeyer Flasks demonstrated the general scalability of the suspension culture protocol as another essential step for the mass expansion of the pluripotent cells.

In conclusion, important data could be contributed to the generation and detailed characterization of hiPS from cord blood. Moreover, the ability to expand undifferentiated hiPS and hES cells in suspension culture, avoids the limitations of adherent cell culture and represents an important step towards controlled bioprocessing and industrial manufacturing of these cells for clinical application and biopharmaceutical drug development.

Pluripotent stem cells, suspensions culture, eGFP reporter cell lines

1. EINLEITUNG	11
1.1. Strategien der regenerativen Therapie	11
1.2 Stammzellen	12
1.2.1 Embryonale Stammzellen	12
1.2.1.1 Differenzierung pluripotenter Zellen in verschiedene somatische Zelltypen	15
1.2.2 Induzierte pluripotente Stammzellen.....	16
1.3 Stammzellen und ihre Derivate in der kommerziellen und klinischen Anwendung	18
1.3.1 Wie viele Zellen sind nötig? – Eine Abschätzung	18
1.4 Kultursysteme für pluripotente Stammzellen	19
1.4.1 Erhalt der Pluripotenz – Signalwege in mESC und hESC	19
1.4.2 Adhärenz Modelle zur Expansion von humanen pluripotenten Zellen.....	20
1.4.3 Automatisierte Systeme zur Expansion pluripotenter Zellen	21
1.4.4 Suspensions-basierte Kultursysteme zur Massenexpansion pluripotenter Stammzellen	21
1.4.4.1 Microcarrier-basierte Expansionskulturen – ein Hilfsmittel zur Überführung adhärenz Kulturen in Suspension.....	22
1.4.4.2 Substrat unabhängige Suspensionskulturen	22
1.5 Zielsetzung	24
2. MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1. Material.....	25
2.1.1. Geräte	25
2.1.2. Verbrauchsmaterial	26
2.1.3. Medien.....	27
2.1.3.1. Basalmedien	27
2.1.3.2. Medienzusätze	27
2.1.3.3. Kulturmedium für embryonale murine Fibroblasten.....	27
2.1.3.4. Medium für die Kultur undifferenzierter Stammzellen.....	27
2.1.3.5. Medium für die Suspensionskultur undifferenzierter Stammzellen.....	27
2.1.3.6. Differenzierungsmedium	28
2.1.4. Chemikalien und Lösungen	28
2.1.5. Gebrauchsfertige Kits.....	30
2.2. Methoden	30
2.2.1. Zellkultur.....	30
2.2.1.1. Isolierung, Expansion und Inaktivierung von murinen embryonalen Fibroblasten	30
2.2.1.2. Expansionskulturen pluripotenter Stammzellen.....	31
2.2.1.3. In vitro Differenzierung	32
2.2.1.4. Induktion von Teratomen	32
2.2.1.5. G-Banden Karyogramme	32
2.2.1.6. Einzelzelldissoziation	32

2.2.1.7. Zellzahlbestimmung	32
2.2.1.8. Herstellung von transgenen Reporterzelllinien	33
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	34
2.2.2.1. Analyse der Genexpression auf mRNA Ebene.....	34
2.2.3 Analyse der Genexpression auf Proteinebene	43
3. <u>ERGEBNISSE</u>.....	46
3.1. Generierung und Charakterisierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen aus Nabelschnurblut	46
3.2. Stammzelllinien und deren Standardkultivierung	53
3.3. Überführung undifferenzierter Stammzellkolonien in Suspensionskultur	54
3.3.1. Zugabe von Transforming growth factor β 1.....	55
3.3.2. Zugabe von Hyper IL-6	55
3.4. Einzelzelldissoziation	57
3.5. Herstellung von Reporterzelllinien zur vereinfachten Pluripotenzkontrolle.....	59
3.6. Etablierung von Suspensionskulturen durch Einzelzellinokulation	64
3.6.1. Zugabe von 6-bromindirubin-3'-oxime.....	68
3.7. Charakterisierung der Suspensionskulturen.....	69
3.7.1. Wachstumskinetik und Aggregatgrößenbestimmung in Suspensionskulturen.....	71
3.7.2. Untersuchung des Differenzierungsstatus	72
3.7.2.1. Nachweis der Pluripotenz	72
3.7.2.2. Durchflusszytometrische Analysen	73
3.7.2.3. Nachweis von Pluripotenzmarkern über Immunzytologie.....	75
3.7.2.4. Expressionsanalysen mittels quantitativer Real Time PCR.....	76
3.7.2.5. Expressionsanalysen mittels StellArrays	76
3.7.3. Genetische Stabilität der Zellen aus Suspensionskulturen.....	86
3.7.4. <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Differenzierung pluripotenter Zellen aus Suspensionskulturen	87
3.7.4.1. <i>In vitro</i> Differenzierung pluripotenter Zellen aus Suspensionskulturen	87
3.7.4.2. <i>In vivo</i> Differenzierung pluripotenter Zellen aus Suspensionskulturen.....	90
3.8. Expansion von Primaten ES Zellen in Suspensionskultur	92
3.9. Übertragung der Suspensionskulturen in ein dynamisches System.....	94
4. <u>DISKUSSION</u>.....	96
4.1. Humane induzierte Stammzellen aus Nabelschnurblut.....	96
4.2 Entwicklung von Suspensions-basierten Expansionsprozessen für humane pluipotente Zellen	97
4.2.1 Erhalt der Pluripotenz durch periodische oder permanente Dissoziation	101
4.2.2 Qualität der hergestellten Zellen – Analyse von Stammzellmarkern, Karyostabilität und Differenzierungspotential.....	101

4.2.2.1	Expression von spezifischen Reporter genen als Qualitätskriterium.....	101
4.2.2.2	Beurteilung der Zellqualität anhand von molekularbiologischen Methoden	102
4.2.2.3	Das <i>in vitro</i> Differenzierungspotential als Beurteilungskriterium	104
4.2.2.4	Die Genetische Stabilität.....	105
5.	<u>AUSBLICK.....</u>	106
6.	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	109
7.	<u>LITERATUR.....</u>	112
8.	<u>ANHANG</u>	120
	<u>LEBENS LAUF</u>	135
	<u>DANKSAGUNG</u>	138

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Etablierung humaner embryonaler Stammzelllinien.	14
Abb. 2: Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS).	17
Abb. 3: Charakterisierung der für die Reprogrammierung verwendeten Ausgangszellen.	47
Abb. 4: Keine Expression des Endothelzell-spezifischen Markers CD31 in undifferenzierten Kulturen der generierten hiPS.	48
Abb. 5: Immunzytologische Untersuchungen von hiPS2 Differenzierungskulturen.	49
Abb. 6: Expression kardialer Marker in hiPS2 Differenzierungskulturen.	49
Abb. 7: Abnahme der Expression von NANOG, SOX2, LIN28 und OCT4 in hiPS2 im Verlauf der Differenzierung.	52
Abb. 8: Verwendete pluripotente Stammzellen unter Standardkulturbedingungen.	53
Abb. 9: Schematische Darstellung der Überführung undifferenzierter Stammzellkolonien in Suspension.	54
Abb. 10: Initiale Versuche zur Suspensionskultur undifferenzierter Primaten Stammzellen.	56
Abb. 11: Embryoid Bodies.	57
Abb. 12: Schematische Darstellung der Herstellung von Einzelzellsuspensionen mittels TrypLE.	58
Abb. 13: Einschichtiger Zellrasen embryonaler Primaten Stammzellen (R366.4).	58
Abb. 14: Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors zum Transfer des hOCT4Pr eGFP Reporterkonstrukts.	59
Abb. 15: Kolonien der undifferenzierten pluripotenten Stammzellen nach Transduktion.	60
Abb. 16: hiPS2 OCT4eGFP Reporterzellen.	60
Abb. 17: Expression von SSEA4 und eGFP in hiPS2OCT4eGFP5.	61
Abb. 18: Expression von OCT4-Promotor abhängigem eGFP und endogenem OCT4 während Differenzierung in EBs.	62
Abb. 19: hiPS2OCT4eGFP5 Differenzierungskulturen.	63
Abb. 20: Schematische Darstellung der Herstellung von Einzelzellsuspensionen mittels Kollagenase B.	64
Abb. 21 Einfluss des verwendeten Mediums auf Zellüberleben und Proliferation nach Einzelzelldissoziation.	66
Abb. 22: Vergleich der Aggregatbildung von hiPS2 nach Einzelzellinokulation in verschiedenen Medien.	67
Abb. 23: Einfluss der Zugabe von 5 μ M BIO.	68
Abb. 24: Lichtmikroskopische Darstellung der Zellaggregate nach Einzelzellinokulation im Kulturverlauf.	70
Abb. 25: Aggregatgrößen und Lebendzellzahl im Kulturverlauf.	70
Abb. 26: Wachstumskinetik der humanen iPS bzw. humanen ES Zellen im Kulturverlauf.	71
Abb. 27: Größenverteilung der Aggregate im Verlauf der Kultur.	72
Abb. 28: hiPS2OCT4eGFP5 in Suspensionskultur.	72
Abb. 29: Vergleich der Expression von SSEA4 und TRA 1-60 in Suspensionskulturen und Feederzellbasierten Kulturen.	73

Abb. 30: SSEA4 und OCT4 Expression in Suspensionskulturen im Kulturverlauf.	74
Abb. 31: Immunzytologische Analysen für SSEA4, TRA 1-60 und OCT4.	75
Abb. 32: Expressionsanalysen von Pluripotenz-assoziierten und Differenzierungs-assoziierten Markern.....	76
Abb. 33: qPCR Untersuchung von 96 Genen, assoziiert mit Pluripotenz oder Differenzierung mittels StellArrays.	78
Abb. 34: Scatterplot Darstellung ausgewählter Vergleiche aus Abb. 33 mit zugehörigen Korrelationskoeffizienten R^2	79
Abb. 35: Expressionsunterschiede in Suspensions- und Feederzell-basierten Kulturen.	82
Abb. 36: Scatterplotdarstellung der Genexpressionsvergleiche mittels 32 Gen StellArrays.	85
Abb. 37: G-Banden Karyogramme.	86
Abb. 38: Markergenexpression in undifferenzierten hiPS2 aus Suspensionskultur und an Tag 20 nach Einleitung der Differenzierung.	87
Abb. 39: Immunzytologische Untersuchungen von hiPS2 aus Suspensionskulturen 20 Tage nach Einleitung der Differenzierung.	88
Abb. 40: Expression kardialer Markergene in hiPS2 aus Suspensionskulturen 20 Tage nach Einleitung der Differenzierung.	88
Abb. 41: Quantitativer Vergleich des Differenzierungspotentials.	89
Abb. 42: Histologische Untersuchungen der aus Suspensions-basierten und Feederzell-basierten Kulturen entstandenen Teratome.	91
Abb. 43: Einzelzell-inokulierte Suspensionskulturen der Primaten ES Zelllinie MF12.....	92
Abb. 44: Rückführung von MF12 Suspensionsaggregaten in das Feederzell-basierte Kultursystem....	92
Abb. 45: Immunzytologische Analyse von MF12 Zellen aus Suspensionskultur 21 Tage nach Einleitung der Differenzierung..	93
Abb. 46: Suspensionskulturen eines OCT4eGFP transgenen Klons der Rhesus ES Zelllinie R366.4.93	
Abb. 47: Schematische Darstellung der Übertragung der statischen Suspensionskulturen in ein dynamisches Kultursystem.	94
Abb. 48: Übertragung der statischen Suspensionskulturen in ein dynamisches Kultursystem.	95
Abb. 49: Theoretische Abschätzung der erreichbaren Zellzahlen im entwickelten Suspensionskultursystem.....	100

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Standard PCR Programm	35
Tabelle 2: Für PCR verwendetet Oligonukleotide	36
Tabelle 3: Mastermix für PCR Reaktionen mit Go-Taq Polymerase	36
Tabelle 4: Für die quantitative Real Time PCR eingesetzte Oligonukleotide	38
Tabelle 5: Programm für die quantitative Real Time PCR, inklusive Schmelzkurvenanalyse	39
Tabelle 6: Mastermix für quantitative Real Time PCR mit ABSOLUTE™ QPCR SYBR® GREEN MIX (Thermo Scientific)	39
Tabelle 7: Im StellArray enthaltene Gene, * im 32 Gen Array vertretene Gene	40
Tabelle 8: Programm für StellArrays, inklusive Schmelzkurvenanalyse	42
Tabelle 9: Zusammensetzung StellArray Supermix	42
Tabelle 10: Für Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie verwendetet Antikörper	45
Tabelle 11: Vergleich der Lebendzellzahl 24 h nach Einzelzelldissoziation mit Trypsin/EDTA, Accutase und Kollagenase B. Lebendzellzahlbestimmung anhand Trypanblaufärbung	64
Tabelle 12: Expressionsanalysen mittels StellArrays (32) an Tag 2, Tag 4 und Tag 7 der Suspensionskulturen.	84

1. EINLEITUNG

1.1. Strategien der regenerativen Therapie

Ziel der regenerativen Therapie ist es durch Zelltransplantation, Implantation artifizierter Gewebe oder durch Induktion der Regeneration körpereigener Zellen geschädigte Gewebe zu rekonstruieren oder zu ersetzen.

Adulte Stammzellen, vor allem Stammzellen des Knochenmarks werden bereits seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt um Patienten mit hematopoetischen Erkrankungen zu behandeln. Des Weiteren konnten Keratinozyten zur Behandlung von akuten oder chronischen Wunden eingesetzt werden [1]. Hornhautschädigungen konnten durch den Einsatz epithelialer Stammzellen behandelt werden [2]. Das Potential adulter Stammzellen ist in Bezug auf (Trans-) Differenzierung und Expansionsfähigkeit jedoch in der Regel auf den jeweiligen Gewebetyp begrenzt. Die erfolgreiche Etablierung pluripotenter, embryonaler Stammzelllinien zunächst aus nicht humanen Primaten [3, 4] - gefolgt von der Isolation stabiler pluripotenter Zelllinien aus humanen Blastozysten [5] - eröffnete die Möglichkeit, Stammzell-basierte Therapien für Parkinson, Diabetes oder Kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln unabhängig der Limitationen adulter Stammzellen. Durch Transplantation neuraler Vorläuferzellen generiert aus murinen embryonalen Stammzellen (mESC) konnten beispielsweise Symptome von Parkinson [6] im Nagermodell behandelt werden.

Ein wichtiger Meilenstein war auch die in 2007 von Takahashi et al. [7] entwickelte Induktion pluripotenter Zelllinien aus somatischen Zellen. Dadurch wurde es möglich Patienten-eigene, pluripotente Zelllinien zu generieren, die keine Abstoßung nach autologer Transplantation zurück in den Patienten zeigen sollten. Dies bedeutete einen wichtigen Fortschritt auf dem Gebiet der klinischen Anwendbarkeit der pluripotenten Zellen und ihrer Derivate. Die hohen Proliferationsraten und die Fähigkeit unter geeigneten Bedingungen alle somatischen Zelltypen hervorzubringen tragen zusätzlich zum großen therapeutischen Potential der pluripotenten Stammzellen bei.

Um eine klinische Anwendbarkeit zu ermöglichen, sind detaillierte Untersuchungen der Mechanismen, die der Proliferation und Differenzierung pluripotenter Stammzellen zu Grunde liegen, unerlässlich.

Des Weiteren ist die Bereitstellung ausreichender Zellmengen in gleichbleibender Qualität die im Fall der klinischen Anwendung unter Standards des „*Good manufacturing practice* (GMP)“ hergestellt werden müssen, ein wichtiger Aspekt. Um beispielsweise nach einem myokardialen Infarkt geschädigtes Gewebe vollständig ersetzen zu können, müssen etwa $1 - 2 \times 10^9$ Kardiomyozyten zur Verfügung gestellt werden [8]. Für die Behandlung von Typ 1

Diabetes, die mit dem Verlust funktioneller β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse einhergeht werden etwa 1×10^9 Insulin-produzierende β -Zellen pro Patient benötigt [9]. Kultursysteme, die eine Expansion von Stammzellen und deren Derivaten in diesen Dimensionen ermöglichen, sind daher von großem Interesse, aber für humane pluripotente Zellen nicht verfügbar.

1.2 Stammzellen

Zellen mit dem Potential zur Selbsterneuerung und der Fähigkeit, zu verschiedenen, somatischen Zelltypen eines Organismus zu differenzieren, werden als Stammzellen bezeichnet. Abhängig vom Differenzierungspotential der Zellen wird unterschieden in totipotente, pluripotente und multipotente Zellen. Totipotente Zellen haben das Potential, einen vollständigen Organismus einschließlich extraembryonaler Gewebe (z.B. Placenta) hervorzubringen. Während der Embryonalentwicklung kommt es zu Spezialisierung der Zellen, zunächst in extraembryonales Endoderm und die Innere Zellmasse (ICM). Zellen der ICM werden als pluripotente Zellen bezeichnet, da sie Zellen aller 3 Keimblätter, Endoderm, Ectoderm und Mesoderm hervorbringen können. Mit jedem folgenden Entwicklungsschritt verringert sich das Differenzierungspotential von Stammzellen hin zu multipotenten Zellen, die in der Lage sind verschiedene Organ-spezifische Zelltypen hervorzubringen, oder unipotenten Stammzellen, welche ausschließlich Zellen eines einzelnen Zelltyps hervorbringen können [10]. Des Weiteren wird abhängig vom zeitlichen Auftreten während der Entwicklung und dem Zeitpunkt ihrer Isolierung in embryonale, fetale und adulte Stammzellen unterschieden [11]. Adulte oder somatische Stammzellen sind für die kontinuierliche Regeneration des entsprechenden Gewebes verantwortlich [10]. Adulte Stammzellen befinden sich in einer pre-terminalen Differenzierungsphase ihres Entwicklungsprozesses. Durch die nur teilweise untersuchten Mechanismen, die zur Aktivierung adulter Stammzellen führen, die zumeist schwierige Isolation und *in vitro* Expansion eignen sich unterschiedliche adulte Stammzellen nur eingeschränkt für die Entwicklung neuer Zell-basierter Therapien.

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESC) werden aus der ICM präimplantierter Blastozysten gewonnen und *in vitro* als Zelllinien etabliert. Die ersten embryonalen Stammzelllinien konnten 1981 von Evans et al. aus Mausblastozysten etabliert werden (murine embryonale Stammzellen (mESC)) [12]. Thomson et al. konnten 1995 embryonale Stammzellen aus Rhesusaffen [3] und 1998 auch aus humanen Blastozysten (humane embryonale Stammzellen (hESC)) generieren [5] (Abb. 1). Charakteristisch für pluripotente embryonale Stammzellen sind die Expression spezifischer Oberflächemarker wie SSEA3, SSEA4 (Stage

specific embryonic antigen (human)) und SSEA1 (murin), oder TRA 1-60, TRA 1-81 (Trafalger). Entscheidendes Merkmal ist die Expression Pluripotenz-assoziiierter Transkriptionsfaktoren wie OCT4 (Octamer binding), NANOG, REX1 und SOX2 (SRY box containing gene 2) sowie eine hohe Telomerase-Aktivität. Das Differenzierungspotential der pluripotenten Zellen kann *in vivo* durch Teratombildung nach Injektion in immundefiziente Mäuse und *in vitro* durch gerichtete oder spontane Differenzierung in Zelltypen aller drei Keimblätter gezeigt werden [13]. Im Gegensatz zur Embryonalentwicklung, bei der die pluripotenten Zellen nur in einem sehr begrenzten Zeitraum auftreten, kann der pluripotente Phänotyp der Zellen unter geeigneten *in vitro* Kulturbedingungen erhalten werden. Die für den Erhalt der Pluripotenz notwendigen Bedingungen sind dabei Spezies-abhängig [14]. Während für mESC eine Kultur auf mitotisch inaktivierten Fibroblasten unter Zugabe des Zytokins LIF (Leukemia Inhibitory Factor) ausreichend ist um die Pluripotenz zu erhalten, sind humane pluripotente Zellen abhängig von der Zugabe des Wachstumsfaktors bFGF (basic fibroblast growth factors) [13, 15].

Aufgrund ethischer Fragen, die mit der Isolation und Anwendung einhergehen, ist die Forschung an hESC in vielen Ländern gesetzlich reglementiert und wird in Deutschland durch das Robert Koch Institut überwacht. Anfang 2008 standen laut dem „*Dritten Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes*“ (http://www.bmg.bund.de/cln_171/nn_1168258/SharedDocs/Downloads/DE/Presse/Presse-2009/Dritter-Erfahrungsbericht-Stammzellgesetzes.html) weltweit ca. 500 humane ES-Zelllinien zur Verfügung von denen etwa die Hälfte bereits wissenschaftlich beschrieben wurde. In Deutschland wurden bis zum Februar 2010 51 Anträge zur Forschung mit hESC genehmigt (<http://www.rki.de/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register>).

Durch ihren allogenen Charakter würden ESC und aus ihnen abgeleitete Zellen nach Transplantation eine Immunantwort hervorrufen [16]. Theoretisch kann die Abstoßungsreaktion durch die Verwendung autologer Linien, die durch den sogenannten Somatischen Kern Transfer entstehen, vermieden werden. Die prinzipielle Machbarkeit konnte im Tiermodell gezeigt werden [17]. Im humanen System wurde diese Methode nicht angewendet und ist ethisch umstritten. Alternative Wege zur Generierung autologer Zelllinien wurden daher verfolgt. Zum Beispiel konnte durch Fusion adulter muriner Fibroblasten mit ESC eine Reprogrammierung erreicht werden [18]. Eine weitere Möglichkeit ist die Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen durch Transfektion der somatischen Zellen mit den Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, c-MYC und KLF4 [19].

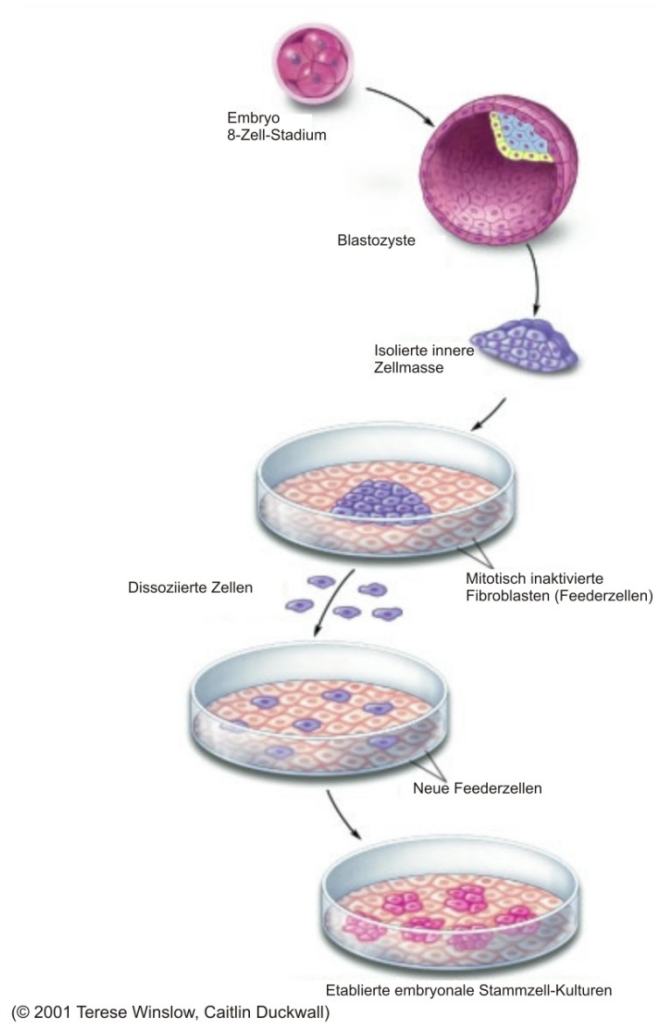


Abb. 1: Etablierung humaner embryonaler Stammzelllinien. Zur Gewinnung embryonaler Stammzellen wird die innere Zellmasse einer präimplantierten Blastozyste isoliert und auf einer Unterlage von mitotisch inaktivierten Fibroblasten kultiviert. Stabile Zelllinien entstehen durch Dissoziation und erneutes Plattieren auf mitotisch inaktivierten Fibroblasten.

1.2.1.1 Differenzierung pluripotenter Zellen in verschiedene somatische Zelltypen

Zur Initiierung von Differenzierungsprozessen werden die Stammzellkolonien typischerweise in Suspensionskulturen überführt. In Suspension bilden die abgelösten Zellkolonien Aggregate, die sogenannten Embryoid Bodies (EBs). Innerhalb der EBs durchlaufen die Stammzellen einen Prozess, der zumindest teilweise die Zelldifferenzierung während der Embryogenese nachbildet. Es kommt zur Entstehung einer äußeren endodermalen Schicht, gefolgt von Zellen mit ectodermalem Charakter, bis hin zu mesodermalen Zellen im Innern des EBs [20-23].

Bereits in 2001 gelang die Differenzierung von hESC in neuronale Zelltypen [24-26], Insulinproduzierenden Zellen [27], hematopoetischen Zellen [28] und Kardiomyozyten [29]. Das therapeutische Potential der generierten Stammzellderivate konnte in Tiermodellen gezeigt werden, wie z. B. eine funktionelle Verbesserung des Sehvermögens erblindeter Mäuse durch den Einsatz von hESC-abgeleiteter retinaler Photorezeptoren [30]. In Studien von Kim et al. und Yang et al. konnte die Anwendung von dopaminergen Neuronen in Parkinson Modellen der Ratte gezeigt werden [6, 31]. In 2009 wurde durch die FDA (Food and Drug Administration) in den USA die erste klinische Studie basierend auf hESC genehmigt. In der Studie der Firma Geron sollen hESC-abgeleitete Oligodendrozyten Vorläuferzellen verwendet werden, um Verletzungen des Rückenmarks zu behandeln (<http://www.geron.com>).

1.2.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Die Überexpression bestimmter Pluripotenz-assoziiierter Transkriptionsfaktoren führt zur Reprogrammierung somatischen Zellen und somit zur Erzeugung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), die in ihren Eigenschaften ESC sehr ähnlich sind.

Die Reprogrammierung muriner embryonaler Fibroblasten konnte durch die Virus-vermittelte Überexpression der Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, c-MYC und KLF4 zum ersten Mal in 2006 von Takahashi et al. gezeigt werden [19] (Abb. 2). Die entstandenen Zellen zeigten unter den geeigneten Kulturbedingungen Charakteristika von ESC wie unbegrenzte Selbsterneuerung und ein *in vitro* Differenzierungspotential in Zellen aller 3 Keimblätter. Weiterhin konnten die Expression von Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarkern, eine hohe Telomerase-Aktivität und die Fähigkeit zur Teratombildung nach Injektion in immundefiziente Mäuse gezeigt werden. Durch die in 2007 von Takahashi et al. [7] gezeigte Reprogrammierung humaner somatischer Zellen durch Überexpression von OCT4, SOX2, c-MYC und KLF4, wurde erstmals eine ethisch unbedenkliche Methode zur Generierung autologer pluripotenter Stammzellen im humanen System entwickelt. Aufbauend auf der entwickelten Methode gibt es zahlreiche Studien, die sich mit der Generierung humaner iPS Zellen beschäftigen.

Vor allem durch die Verwendung von retroviralen Vektoren zur Überexpression bekannter Onkogene wie c-MYC für die Reprogrammierung und das damit verbundene Risiko der Insertionsmutagenese, eignen sich die ersten erzeugten iPS-Zelllinien jedoch nicht für therapeutische Anwendungen.

Die erfolgreiche iPS-Generierung mit einer anderen Kombination aus Faktoren - OCT4, SOX2, LIN28 und NANOG -, die ohne die Verwendung von c-MYC auskommt, konnte bereits im gleichen Jahr gezeigt werden [32, 33]. In folgenden Studien konnte - abhängig von der für die Reprogrammierung verwendeten Zellquelle - die Anzahl der benötigten Faktoren reduziert werden [34-36]. Beispielsweise war für neuronale Zellen lediglich die Überexpression von OCT4 ausreichend, um pluripotente iPS Linien zu etablieren [35]. Durch die Verwendung episomaler oder Transposon-basierter Vektoren [37-39] sowie eine direkte Transduktion mit Proteinen [40] konnten bereits hiPS ohne genomische Integration eines Transgens erzeugt werden. Weitere Studien beschäftigten sich mit geeigneten somatischen Zellquellen bezüglich deren Verfügbarkeit und Qualität. Aasen et al. [41] verwendeten als Zellquelle primäre humane Keratinozyten und waren in der Lage, hiPS aus einem einzelnen, menschlichen Haar zu generieren. Die *in vitro* Differenzierung von hiPS in klinisch-relevante Zelltypen - wie hämatopoetische und Hepatozyten-ähnliche Zelltypen sowie Kardiomyozyten - konnte bereits gezeigt werden. [42, 43] [44]. Die Generierung patienteneigener iPS Zellen [45-48] und deren *in vitro* Differenzierung zu klinisch relevanten Zelltypen und somit die

Bereitstellung autologer Zellen für die therapeutische Anwendung, stellt, neben der ethischen Fragestellung, einen weiteren Vorteil der humanen iPS dar.

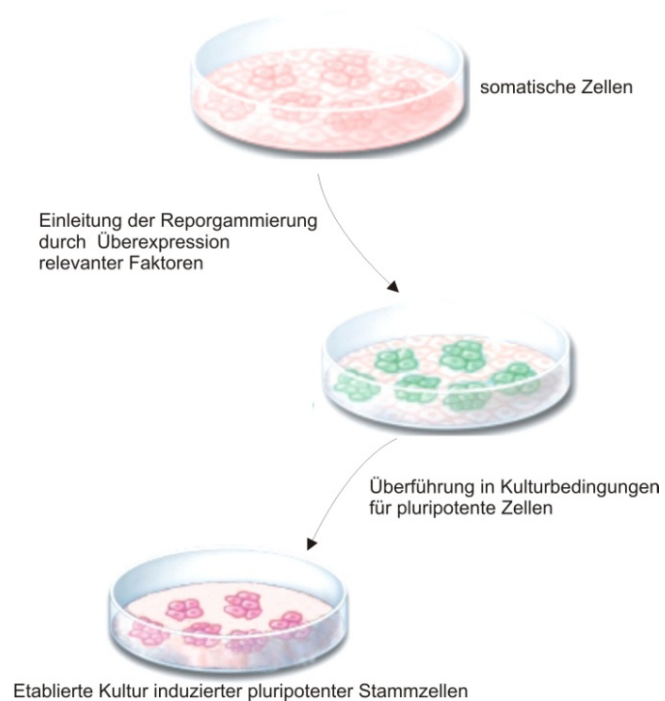


Abb. 2: Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS). Durch die Überexpression relevanter Faktoren und die Expansion unter geeigneten Kulturbedingungen können pluripotente Zellen erzeugt so genannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) werden

1.3 Stammzellen und ihre Derivate in der kommerziellen und klinischen Anwendung

Durch ihre (theoretisch) unbegrenzte Teilungsfähigkeit und relativ hohe Proliferationsrate stellen pluripotente Stammzellen eine nahezu unerschöpfliche Zellquelle dar. Die Differenzierung in verschiedene Derivate der 3 Keimblätter eröffnet die Möglichkeit zur breiten Anwendung in der regenerativen Medizin. Neben Anwendungen in Zell-basierten Therapien könnten Derivate humaner pluripotenter Stammzellen, wie Kardiomyozyten oder Hepatozyten die bisher in *in vitro* Toxizitätstests, verwendeten, Primärzellen bzw. Zelllinien, ersetzen. Durch den Einsatz von pluripotenten induzierten Stammzellen bzw. ihrer Derivate könnte eine theoretisch unerschöpfliche Zellquelle in immer vergleichbarer Qualität bereitgestellt werden [49-52].

Einen weiteren Schwerpunkt der Forschung an hiPS Zellen stellt die Untersuchung genetischer Defekte in Zellkultur dar. Hier sind iPS Zelllinien, die aus betroffenen Patienten isoliert werden können von höchster Bedeutung [53].

1.3.1 Wie viele Zellen sind nötig? – Eine Abschätzung

Klinische Anwendungen pluripotenter Zellen oder ihrer Derivate sind eine große Hoffnung im Bereich der regenerativen Medizin. Kritische Aspekte betreffen z.B. die notwendige Generierung spezifischer, reiner Zellpopulationen [54] oder Immunreaktionen nach Transplantation [55, 56]. Ein weiterer kritischer Punkt ist bisher die Herstellung ausreichender Zellmengen und –Qualitäten. Voraussichtlich werden für die meisten klinischen Anwendungen große Zellmengen benötigt. Für die angestrebten therapeutischen Anwendungen wie etwa Stammzell-abgeleiteter Kardiomyozyten zur Therapie nach myokardialen Infarkt oder die Bereitstellung Insulin produzierender Zellen zur Behandlung von Diabetes bewegen sich die Abschätzungen im Bereich von einer bis mehreren Milliarden Vorläufer- oder terminal differenzierter Zellen [8, 9] pro Patient. Diese Überlegungen lassen zudem noch außer Acht, dass die derzeit verfügbaren Protokolle zur Generierung der gewünschten Zelltypen in der Regel keine effiziente Differenzierung ermöglichen. Die Differenzierung kardialer Zelltypen aus humanen pluripotenten Zellen wurde nach Optimierung der Protokolle mit maximalen Effizienzen zwischen 10 % - 25 % beschrieben [57, 58]. Protokolle für die Generierung von Insulin produzierenden Zellen erreichen Effizienzen von 2 % - 8 % [59]. Bezieht man diese Zahlen in die Abschätzung der benötigten Gesamtzellzahl mit ein, erreicht man Ausgangsmengen von über 10^{10} Zellen. Für die Bereitstellung von 10 Milliarden Zellen stößt man sehr schnell an Grenzen der Standardlaborbedingungen. Kulturen undifferenzierter Stammzellen erreichen Zelldichten von ~ 2 Millionen Zellen / 10 cm^2 Zellkulturschale dies entspricht einer Fläche von 57 cm^2 .

Um in diesem Kultursystem 10 Milliarden Zellen produzieren zu können, wäre daher eine Fläche von $\sim 28,5 \text{ m}^2$ bzw. 5000 10 cm^2 Zellkulturschalen nötig.

In der biopharmazeutischen Industrie werden mit ähnlichem Hintergrund für die Impfstoffproduktion und als Genexpressionssystem für rekombinante Proteine tierische Zelllinien wie Chinese Hamster Ovary (CHO) oder Baby Hamster Kidney (BHK) in Suspensionskultur hergestellt [60]. Die Massenkulturen dieser Zelllinien werden in gerührten Bioreaktoren mit Arbeitsvolumen von über 1000 L durchgeführt. Erste Studien zur Expansion von Stammzellen in gerührten Bioreaktoren, die an mES durchgeführt wurden, erreichten maximale Volumen von 2 L und Zelldichten von ~ 10 Milliarden Zellen [61]. Die Massenkultur von humanen pluripotenten Zellen konnte in diesem Maßstab bisher noch nicht durchgeführt werden. Um aber die für die therapeutischen Anwendungen benötigten Zellmengen und Qualitäten bereitstellen zu können, sind kontrollierte, skalierbare Prozesse zur Expansion dieser Zellen eine vielversprechende Alternative

1.4 Kultursysteme für pluripotente Stammzellen

1.4.1 Erhalt der Pluripotenz – Signalwege in mESC und hESC

In vitro wurden die ersten pluripotenten Stammzellen der Maus (mESC) auf mitotisch inaktivierten Fibroblasten, den sogenannten Feederzellen oder in Feederzell-konditioniertem Medium kultiviert [62]. Sezernierte oder Membran-gebundene Faktoren sowie extrazelluläre Matrix Komponenten der Feederzellen könnten zum Erhalt der Pluripotenz beitragen, sind aber auch bis heute noch nicht vollständig charakterisiert [63]. Verschiedene Signalwege konnten identifiziert werden, die beim Erhalt der Pluripotenz eine Rolle spielen. Der STAT3 Signalweg wird in mESC durch *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) aktiviert und spielt eine wichtige Rolle für den Erhalt der Pluripotenz in mESC [64]. Transgene mESC, die das antiapoptotische Protein Bcl-2 überexprimieren, konnten in Gegenwart von LIF undifferenziert unter Serum- und Feeder-freien Bedingungen expandiert werden [65]. In Kombination mit BMP4 ist LIF ausreichend um die Pluripotenz in mESC unter Serum- und Feeder- freien Bedingungen zu erhalten [66]. In undifferenzierten hESC ist STAT3 nicht aktiviert und scheint keine Rolle für die Pluripotenz zu spielen [67].

Wnt, FGF (*fibroblast growth factor*), TGF β /Activin/Nodal und BMP (*bone morphogenetic protein*) Signalwege regulieren ebenfalls die Pluripotenz mit unterschiedlichen Effekten in mESC und hESC. FGF Signale über den MAPK (*mitogen activated protein kinase*) Signalweg erhalten in hESC die Pluripotenz [68] während in mESC die Differenzierung gefördert wird [69]. BMP Signale fördern in hESC die Differenzierung [70], können aber in mESC den Erhalt der Pluripotenz unterstützen [66]. Signale über den kanonischen Wnt

Signalweg können sowohl in mESC als auch in hESC zum Erhalt der Pluripotenz beitragen [71].

1.4.2 Adhärenzte Kulturmodelle zur Expansion von humanen pluripotenten Zellen

Die traditionelle Methode zur adhärenzten Kultur humaner pluripotenter Stammzellen beruhte auf der Verwendung mitotisch-inaktivierter murinen Fibroblasten als Kulturunterlage und einem mit 20 % fetalem Kälberserum (FCS) supplementierten Medium [5]. Für die klinische Anwendung wären Zellen aus diesem Kultursystem aus verschiedenen Gründen nicht geeignet. Die Verwendung von murinen Fibroblasten birgt das Risiko von xenogenen Kontaminationen und kann durch Batch-zu-Batch Variationen zu schlecht reproduzierbaren Kulturbedingungen führen [72]. Gleiches gilt für die Verwendung von FCS als Medienzusatz. Um diese Limitationen zu beseitigen gab es verschiedene Bemühungen definiertere Kulturbedingungen zu etablieren. Der Ersatz von FCS durch einen kommerziell erhältlichen Serumersatz (KO-SR) führte zu standardisierteren Kulturbedingungen. Das Produkt kann aber durch den Zusatz von AlbuMAX, einer Lipid-reichen Albuminfraktion aus bovinem Serum und bovinem Transferrin nicht als frei von tierischen Komponenten betrachtet werden. Als Alternative zu den murinen Fibroblasten wurden humane fetale oder adulte Fibroblasten verwendet [73, 74]. In Feederzell-freien Systemen [75] wurden die Zellen auf Matrigel kultiviert. Matrigel, das größtenteils aus Laminin, Kollagen IV und Heparan Sulfat Proteoglykan besteht, fungiert in diesem System als extrazelluläre Matrix [76]. Zusätzlich enthält Matrigel eine nicht voll definierte Mischung aus Wachstumsfaktoren, die Produktschwankungen unterliegen. In Kombination mit von murinen Fibroblasten-konditioniertem Medium konnte die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes der ES-Zellkulturen gezeigt werden. Da Matrigel aus murinem Englebreth-Holm-Swarm Sarkomen gewonnen wird, unterliegt es Chargen-abhängigen Qualitätsschwankungen und das Kultursystem muss als xenogen betrachtet werden. Außerdem wurde Matrigel mit konditioniertem und daher nicht definiertem Medium verwendet.

In 2005 konnten Li et al. zeigen, dass undifferenzierte hESC in einem definierten, serumfreien Medium ohne tierische Zusätze kultivierbar sind. Hierbei wurden die Zellen auf einer Beschichtung von humanem Laminin kultiviert [77]. Stojkovic et al. konnten in 2005 durch Verwendung von spontan aus hESC differenzierten Fibroblasten und mit humanem Serum ein komplett „humanisiertes“ Kultursystem etablieren [78, 79]. Die Expansion der undifferenzierten Zellen in einem definiertem Medium wurde von Ludwig et al. 2006 beschrieben. Bei dem entwickelten Medium mTeSR1 handelt es sich um ein voll definiertes, serumfreies Medium, welches zunächst ohne tierische Zusätze entwickelt wurde. Durch den Zusatz von bovinem Serum Albumin (BSA) kam im zweiten Schritt eine tierische

Komponente in das Medium zurück, dies ermöglichte allerdings eine erhebliche Kostenersparnis und somit eine breitere Anwendbarkeit [80].

Die Bestrebungen, ein definiertes Kultursystem für die Kultur der undifferenzierten Zellen zu etablieren, sind ein essentieller Schritt für die klinische Anwendbarkeit der Zellen und ihrer Derivate. Da aber alle bisherigen Kultursysteme auf der adhären, 2-dimensionalen (2D) Kultur im Labormaßstab basieren, sind sie für die benötigten Massenkulturen pluripotenter Zellen kaum geeignet. Die Expansion großer Zellmengen als 2D Kultur bringt einen erheblichen Flächenbedarf mit sich. Des Weiteren ist der mit der adhären Kultur verbundene Arbeitsaufwand für die Massenexpansion der pluripotenten Zellen auch über Automatisierung nicht realisierbar.

1.4.3 Automatisierte Systeme zur Expansion pluripotenter Zellen

Durch den Einsatz automatisierter Systeme sollten die 2D-Kulturen aus dem Labormaßstab in einen für die Massenproduktion der undifferenzierten ESCs geeigneten Maßstab übertragen werden. Als ersten Schritt zur Automatisierung konnten Johannides et al. [81] ein automatisches, mechanisches Verfahren zum Passagieren von hESC zeigen. Durch den Einsatz eines mechanischen Gewebezerkleinerers konnten reproduzierbar sehr gleichmäßige Koloniefragmente und somit homogene Kulturen erzeugt werden.

Kultursysteme zur Automatisierung von Zellinokulation, Mediumwechsel, Zugabe von Wachstumsfaktoren und Ernte der ESC, wurden von Terstegge et al. [82] und Thomas et al. [83] beschrieben. Die verwendeten Roboter-gestützten Systeme Cell^{host} und Compact SelectT erlaubten eine reproduzierbare Expansion der undifferenzierten ESC. Obwohl durch die Automatisierung die Reproduzierbarkeit und die Qualitätsstandards der Expansionskulturen erhöht werden konnten, eignen sich die Systeme durch die eingeschränkte Skalierbarkeit und den enormen apparativen Aufwand kaum für die Massenexpansion der undifferenzierten Zellen.

1.4.4 Suspensions-basierte Kultursysteme zur Massenexpansion pluripotenter Stammzellen

Eine wichtige Voraussetzung für die Massenexpansion pluripotenter Stammzellen, die unter Standardlaborbedingungen adhären wachsen, in kontrollierbaren skalierbaren Prozessen, ist die Überführung in ein Suspensionskultur-basiertes System. In den bereits etablierten Verfahren für mES wurden verschiedene Systeme verwendet. Die Kultur von Zellaggregaten in gerührten Systemen oder auch die Verwendung von Microcarriern (MC) als Trägermaterial ist in diesem Zusammenhang bereits beschrieben worden.

1.4.4.1 Microcarrier-basierte Expansionskulturen – ein Hilfsmittel zur Überführung adhärenter Kulturen in Suspension

MC-basierte Suspensionskulturen zur Expansion von pluripotenten Zellen konnten beispielsweise von Fok et al. [84] und Fernandes et al. [85] entwickelt werden. In diesen Studien konnten die verwendeten undifferenzierten mES Zellen in gerührten Systemen expandiert werden - ohne Verlust der Expression von Pluripotenzmarkern. Ähnliche Systeme wurden für die Expansion von hES Zellen beschrieben [86, 87]. In der Studie von Oh et al. [87] wurden die Zellen auf Matrigel-beschichtete MC aufgebracht und in 2 verschiedenen definierten kommerziell erhältlichen Medien (StemPro und mTeSR1) expandiert. Die Verwendung der Matrigelbeschichtung führt hier zu undefinierten Kulturbedingungen und würde sich nicht für die Expansion klinisch relevanter Zellen eignen. Phillips et al. konnten in ihrer Studie das Aufbringen der hES Zellen auf Trimethylammonium-beschichtete Polystyrene MC zeigen. Eine Expansion konnte in diesem System allerdings nicht länger als 6 Passagen aufrechterhalten werden. Prinzipiell konnte daher zwar die Verwendung der MC unterstützter Suspensionskultur gezeigt werden, neben der Möglichkeit zur Überführung der adhärenter Kulturen in Suspensions-basierte Kultursysteme birgt die Verwendung von MC allerdings auch erhebliche Nachteile. Fok et al. konnten Zelllinien- abhängige Effekte bei der Anheftung und Expansion der verwendeten mESC Linien beobachten, gegenteilige Effekte beschrieben ebenfalls Nie et al. [88] und Phillips et al. [86] für den Einsatz von MCs in der hES Kultur, was einen universellen Einsatz der MC Technologie fragwürdig macht. Die angestrebte klinische Anwendung der generierten Zellen würde eine vollständige Entfernung der verwendeten MC aus dem System und somit einen weiteren Prozessschritt mit eventuellen Zellmassenverlusten voraussetzen.

1.4.4.2 Substrat unabhängige Suspensionskulturen

Ohne den Zusatz von MC als Adhäsionsoberflächen bilden sich aus den undifferenzierten Stammzellen in Suspensionskulturen Zellaggregate. Die entstehenden drei dimensional Strukturen, Embryoid Bodies (EBs) werden typischerweise zur Einleitung von Differenzierungsprozessen eingesetzt [23]. Zell-Zell Kontakte, entstehende extrazelluläre Matrix in den EBs sowie die Größe der Aggregate [89] beeinflussen die Effizienz der Differenzierung.

Die Kultur von mESC Zellaggregaten wie sie beispielsweise von zur Nieden et al. [90] und Cormier et al. [91] durchgeführt wurde, ist angelehnt an die in Suspension durchgeführten Differenzierungskulturen. Cromier et al. konnten zeigen, dass die Größe der entstehenden Zellaggregate ein kritischer Punkt ist um Differenzierungsprozesse in den Expansionskulturen zu verhindern. Die Inokulation der Prozesse mit mechanisch zerkleinerten Zellverbänden führte zu einer ungleichmäßigen Größenverteilung der

Aggregate und erschwerte die Kontrolle der Differenzierungsprozesse im Inneren der Zellverbände [91]. Durch Anpassung der Rührgeschwindigkeit, d.h. durch die auftretenden Scherkräfte im System und das periodische Dissoziieren der Aggregate zu Einzelzellsuspensionen konnte die Größe reguliert werden und somit der Erhalt der Pluripotenz in Langzeitkulturen erreicht werden [90].

Erste Studien zur Kultivierung von hES Zellen in einem Suspensionskultur-basierten System 2004 von Gerecht-Nir et al. [92] und 2008 von Yirme et al. [93] beruhten auf der Kultur von EBs in Suspension. Neben der Zellexpansion konnte in den Studien gezeigt werden, dass die kultivierten EBs Zellen aller drei Keimblätter enthielten und somit das generelle Differenzierungspotential erhalten geblieben war. Cameron et al. konnten 2006 [94] die Expansion von Differenzierungskulturen in einem Suspensions-basierten System mit vorwiegend hematopoetischer Differenzierung zeigen. Die Inokulation der Prozesse mit Zellverbänden erschwert, wie auch bei mESC, die Kontrolle der Aggregatgrößen. Durch die Inokulation der Prozesse zur Expansion humaner pluripotenter Zellen mit Einzelzellsuspensionen könnten definierte, reproduzierbare Zelldichten und somit eine Kontrolle der Aggregatgröße erreicht werden.

1.5 Zielsetzung

- I. Eine neue, vielversprechende Zellquelle für klinische Anwendungen stellen die 2007 erstmals beschriebenen hiPS Zellen dar. Durch die Generierung von hiPS aus Nabelschnurblut (CB) konnte in unserer Arbeitsgruppe eine besonders junge Zellquelle mit einem geringen Risiko für somatische Mutationen für die Reprogrammierung eingesetzt werden. Um weitere Anwendungen dieser CBhiPS zu ermöglichen, soll zunächst eine detaillierte Charakterisierung vorhandener Klone im Hinblick auf die Expression spezifischer Markergene sowie das *in vitro* Differenzierungspotential erfolgen.
- II. Um hiPS Zellen in Zukunft für klinische Anwendungen verfügbar zu machen, müssen die benötigten Zellen in höchster Qualität und ausreichender Menge bereitgestellt werden können. Neben verschiedenen Kultursystemen scheint der in der biopharmazeutischen Industrie gut etablierte gerührte Tankreaktor für ein *up scaling* der Stammzellkulturen ein potentiell geeignetes System zu sein. Voraussetzung zur Nutzung solcher Reaktoren für die Kultur der adhärent wachsenden pluripotenten Stammzellen, ist die Überführung in Suspensionskultur, was eine Kernaufgabe dieser Arbeit darstellt.

Es sollen daher Suspensionskulturen der pluripotenten Zellen, die eine Langzeitexpansion ohne Verlust der Pluripotenz erlauben, als Basis für eine skalierbare Massenkultur entwickelt werden. Neben der Etablierung und Optimierung der Suspensionskulturen sollen die expandierten Zellen anhand der Expression von Pluripotenzmarkern, der Karyostabilität und des *in vitro* bzw. *in vivo* Differenzierungspotentials beurteilt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	(Agilent, Böblingen)
Axiovert A1 Mikroskop	(Zeiss, Göttingen)
Biophotometer	(Eppendorf, Hamburg)
Biofuge fresco	(Heraeus, Osterode)
Elektrische Pipettierhilfe Pipetus®	(Hirschmann, Eberstadt)
Elektrophorese Kammer, Sub Cell GT	(Bio Rad, München)
Eppendorf mastercycler	(Eppendorf, Hamburg)
Eppendorf realplex	(Eppendorf, Hamburg)
Einfrierbox, Cryo 1°C freezing container	(Nalgene, Neerjise, Belgien)
FACS Calibur	(Becton Dickinson, USA)
Geldoc	(Bio-Rad, München)
Olympus Zellkultur Mikroskop CK 40	(Olympus, Hamburg)
Orbitalshaker S-3.02.10M	(LTF, Wasserburg)
pH Meter, pH539	(WTW, Weilheim)
Pipetten	
BIOHIT	
1-10µl	
20-200µl	
100-1000µl	(BIOHIT, Helsinki, Finnland)
Pipetman	
1-10µl	
2-20µl	
50-200µl	
200-1000µl	(Gilson, Middletown, USA)
Sanyo CO₂ Inkubator MCO-20AIC	(Sanyo, Bad Nenndorf)
Spannungsgerät Power Pac 300	(Bio-Rad, München)
Sterilwerkbank Herasafe	(Heraeus, Osterode)

Sterilwerkbank Heraeus LaminAir	(Heraeus, Osterode)
Trio Thermoblock	(Biometra, Göttingen)
Vortexer	(Ika-Works, Wilmington, USA)
Wasserbad GFL 1083	(Heraeus, Osterode)

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Einwegspritzen 10 ml	(Braun, Melsungen)
Einfrierröhrchen PP 1ml -12,5,42	(Greiner, Frickenhausen)
FACS Probenröhrchen 0,5 ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Gewebekulturschalen	
100 mm	(Greiner, Frickenhausen)
60 mm ultra low attachment	(Corning, New York, USA)
Gewebekulturplatten	
6, 12, 24 und 96 Well	(Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts)
6 Well Suspensionskulturplatten	(Greiner, Frickenhausen)
Pipettenspitzen	
TIP-ONE (1-20µl, 20-200µl, 100-1000µl)	(Star Lab, Ahrensburg)
200µl, 1000µl	(Sarstedt, Nümbrecht)
0,1-10µl	(Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße	
0,5ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
1ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
2ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
15ml Falconröhrchen	(Greiner, Frickenhausen)
50ml Falconröhrchen	(Greiner, Frickenhausen)
Serologische Pipetten 1ml – 50 ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Sterilfilter	
Bottle Top 500 ml	(Nalgene, Neerjise, Belgien)
Spritzenfilter 0,22 µm	(Roth Karlsruhe)
Spritzenfilter 0,45 µm	(Nalgene, Neerijse, Belgien)
Zellsiebe 100µm	(VWR, Darmstadt)

2.1.3. Medien

2.1.3.1. Basalmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Kat. 21969-035	(Invitrogen,	Karlsruhe)
KnockOut DMEM Kat. 10829-018	(Invitrogen,	Karlsruhe)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) Kat. 21980-032	(Invitrogen,	Karlsruhe)
mTeSR1 Kat. 05850	(StemCell Technologies,	Vancouver, Kanada)

2.1.3.2. Medienzusätze

MEM nicht essentielle Aminosäuren Kat. 11140-035	(Invitrogen,	Karlsruhe)
L-Glutamin Kat. 25030-024	(Invitrogen,	Karlsruhe)
Serumersatz (KnockOut Serumreplacement) Kat.10828-028	(Invitrogen,	Karlsruhe)
β -Mercaptoethanol Kat. 31350-010	(Invitrogen,	Karlsruhe)

Basic fibroblast growth factor (bFGF) (bereitgestellt vom Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, siehe Anhang)

Rho Kinase Inhibitor (Y27632) (RI) (bereitgestellt vom Institut für organische Chemie, Leibniz Universität Hannover, siehe Anhang)

2.1.3.3. Kulturmedium für embryonale murine Fibroblasten

- 90 % Dulbecco's Modified Eagle Medium
- 10 % Fötale Kälberserum (PAA, Laboratories)
- 1 % nicht essentielle Aminosäuren
- 1 % L-Glutamin (2mM)

2.1.3.4. Medium für die Kultur undifferenzierter Stammzellen

- 80 % KnockOut DMEM
- 20 % Serumersatz
- 1% nicht essentielle Aminosäuren
- 0,1 % L-Glutamin (1mM)
- 0,025 % β Mercaptoethanol (0,1mM)
- 8 ng / ml basic fibroblast growth factor (bfgf)

2.1.3.5. Medium für die Suspensionskultur undifferenzierter Stammzellen

- mTeSR1
- 10 mM Rho Kinase Inhibitor (Y27632)

2.1.3.6. Differenzierungsmedium

80 % IMDM

20 % Fötale Kälberserum (Perbio, Kat.CH30160.03 LOT CPB0054)

1 % nicht essentielle Aminosäuren

0,1 % L-Glutamin (1mM)

0,025 % β Mercaptoethanol (0,1 mM)

2.1.4. Chemikalien und Lösungen

Agasorse NEEO Ultra Qualität	(Roth, Karlsruhe)
Aqua ad iniectabilia	(Braun, Melsungen)
Bovines Serum Albumin (BSA)	(Sigma, Deisenhofen)
Calciumchlorid (CaCl_2)	(Sigma, Deisenhofen)
Chloroform	(Sigma, Deisenhofen)
4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	(Sigma, Deisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, Deisenhofen)
Ethidiumbromid (10mg/ml)	(Sigma, Deisenhofen)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Sigma, Deisenhofen)
Gelatine Typ A (porcine)	(Sigma, Deisenhofen)
Glucose	(Merck, Darmstadt)
HEPES minimum 99,5%	(Sigma, Deisenhofen)
Hydroxymethylaminomethan (Tris-Base)	(Sigma, Deisenhofen)
Kaliumchlorid KCl	(Merck, Darmstadt)
Kollagenase IV 0,2%, Kat. 17104-019	(Invitrogen, Karlsruhe)
in DMEM, Kat. 41965-039	(Invitrogen, Karlsruhe)
Kollagenase B 1%, Kat. 11088815001	(Roche, Grenzach)
in Low Ca^{2+} Lösung	
NaCl 120mM	
KCl 5.4mM	
MgSO_4 5mM	
NaPyruvat 5mM	
Glucose 20mM	
Taurine 20 mM	
Hepes 10mM	

CaCl ₂ 30µM pH6,9	
Magnesiumchlorid MgCl ₂	(Sigma, Deisenhofen)
Magnesiumsulfat MgSO ₄	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumchlorid NaCl	(Merck, Darmstadt)
Phosphat gepufferte Salzlösungen (Phosphat buffered Saline, PBS)	
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (PBS w/o) Tabletten	(Sigma, Deisenhofen)
PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (1X) Kat. 14040-174	(Invitrogen, Karlsruhe)
Färbepuffer für Immunfluoreszenz 1% BSA in PBS w/o	
Puffer für Durchflusszytometrie PBS w/o 20% FCS 10% Natriumazid	
Paraformaldehyd	(Sigma, Deisenhofen)
Penicillin/Streptomycin (100x)	(PAA,Cölbe)
Polybrene	(Sigma, St. Louis, USA)
TAE Puffer 25x 1M Tris-Acetat 25mM Essigsäure, 25mM EDTA pH 8,0	
Taurin	(Merck, Darmstadt)
TBS 10x 0,5M Tris(hydroxymethyl)aminomethan 1,6256 M NaCl auf 4,0L auffüllen pH7,6	(Serva, Heidelberg) (Merck, Darmstadt)
TBS⁺ 1x 95% 1x TBS 0,025% Triton-X-100 5% Tiereserum entsprechend dem verwendeten Sekundärantikörper	
Triton-X-100	(Merck, Darmstadt)
TRizol® Kat.15596-018	(Invitrogen, Karlsruhe,)
Trypsin/EDTA (0,5%/0,2%) Lösung (10x)	(Biochrom AG, Berlin)

TrypLE Select	(Invitrogen, Karlsruhe)
Trypanblau (0,4%)	(Sigma, Deisenhofen)

2.1.5. Gebrauchsfertige Kits

NucleoSpin® RNA II Kat. 740955.250	(Macherey Nagel, Düren)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Kat.K1632	(Fermentas, St.Leon-Rot)
Go-Taq Polymerase	(Promega, Mannheim)
ABSOLUTE™ QPCR SYBR® GREEN MIX	(Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts)
StellARray™ qPCR Arrays Kat. 00191389	(Lonza, Basel, Schweiz)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Alle in der Arbeit verwendeten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank bearbeitet. Zur Bereitstellung einer angemessenen Atmosphäre wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in entsprechenden Medien kultiviert (Sanyo CO₂ Inkubator MCO-20AIC).

2.2.1.1. Isolierung, Expansion und Inaktivierung von murinen embryonalen Fibroblasten

Die als Kultivierungsgrundlage benötigten murinen embryonalen Fibroblasten wurden aus Mäuseembryonen (d13 p.c.) isoliert. Hierzu wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert und die Anlagen des Herzkreislaufsystems, der Kopf und die Gliedmaßen entfernt. Anschließend wurden die erhaltenen Gewebestücke zweimal in PBS w/o gewaschen und mechanisch in 2ml einer 0,05%/0,2% Trypsin/EDTA Lösung auf Eis zerkleinert. Der weitere enzymatische Verdau des zerkleinerten Gewebes erfolgte unter Rühren in einem Erlenmeyerkolben (37°C, 15 min.) in einem Gesamtvolumen von 17ml 0,05%/0,2% Trypsin/EDTA Lösung. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 51ml DMEM+20% FCS wurden unverdaute Gewebestücke durch Filtration (100 µm Zellsiebe) aus der Suspension entfernt. Die erhaltenen Einzelzellen wurden auf 10 cm Zellkulturschalen (5 x 10⁶ Zellen/Schale) in Kulturmedium ausgesät, bei erreichter Konfluenz in 90% FCS+10% DMSO eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Bevor die MEFs als Kultivierungsgrundlage verwendet werden konnten, wurden sie über drei Passagen auf 100mm Zellkulturschalen expandiert und anschließend durch Bestrahlung inaktiviert. Zum Passagieren wurden die konfluenten Zellen einmal mit PBS w/o gewaschen

und mit 0,05% / 0,2% Trypsin/EDTA Lösung (5 min 37°C) von der Zellkulturschale abgelöst. Die Reaktion wurde mit Kulturmedium gestoppt und die Zellen nach Zentrifugation (5 min 500 x g 4°C) auf neue Zellkulturschalen ausgesät. Zur Inaktivierung wurden die Zellen abgelöst, mit γ Strahlung behandelt und in definierten Zellzahlen in 90%FCS+10%DMSO eingefroren. Zur Verwendung als Feederzellen, wurden die inaktivierten Fibroblasten aufgetaut und in einer Dichte von ca. 30.000 Zellen / cm² (0,28 - 0,3 x 10⁶ Zellen pro Well einer 6 Well Platte) auf mit 1% Gelatine beschichteten Zellkulturplatten ausgesät. Die inaktivierten Fibroblasten wurden für höchstens 7 Tage als Feederzellen verwendet.

2.2.1.2. Expansionskulturen pluripotenter Stammzellen

2.2.1.2.1. *Feederzell-basierte Standardkultur*

Die undifferenzierten Stammzellen wurden auf inaktivierten murinen Fibroblasten (Feederzellen) in Multiwell-Zellkulturschalen kultiviert. Durch Verwendung des Standardkulturmediums und regelmäßiger Passagierung (4-5 Tage) auf frische Feederzellen konnte der pluripotente Zustand der Kulturen erhalten werden.

Das Passagieren erfolgte durch eine kombinierte enzymatische und mechanische Behandlung. Dazu wurden die Kolonien für 10-15min mit 0,2% Kollagenase IV Lösung bei 37°C inkubiert und anschließend durch leichtes Klopfen an die Multiwell Platte oder durch vorsichtiges Spülen mit Kulturmedium von den Feederzellen gelöst. Nach Zentrifugation für 3 min. bei 100xg wurden die Stammzellkolonien vorsichtig resuspendiert und auf frische Feederzellen ausgesät. Alle 24 – 48 Stunden fand ein Austausch des Kulturmediums statt.

2.2.1.2.2. *Suspensionskulturen*

Die Kultivierung der Stammzellen in Suspension erfolgte in Suspensionskultur-6 Well-Platten in mTeSR1 Medium supplementiert mit 10 μ M Rho Kinase Inhibitor (Y 27632). Dabei wurde ein Kulturvolumen von 3 ml Medium pro Well verwendet.

Zum Einleiten der Suspensionskulturen wurden die undifferenzierten Stammzellkolonien wie bereits beschrieben (2.2.1.2.1) von den Feederzellen abgelöst. Nach Zentrifugation (3 min, 100 x g) wurden die Zellen einmal mit PBS w/o gewaschen, zur enzymatischen Dissoziation 10 -15 min in 1% Kollagenase B Lösung im Wasserbad (37°C) inkubiert und anschließend mit Kulturmedium abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und als Einzelzellsuspension mit 0,3 x 10⁵ Zellen/ml auf einer 6 Well Platte ausgesät. Im Verlauf der Suspensionskulturen wurden die entstandenen Zellaggregate jeden vierten Tag enzymatisch zu Einzelzellen dissoziiert. Hierzu wurden die Aggregate einmal mit PBS w/o gewaschen und für 15 min mit 1 % Kollagenase B Lösung inkubiert. Nach der Einzelzelldissoziation wurden 0,3 x 10⁵ Zellen/ml in frisches Kulturmedium überführt

2.2.1.3. In vitro Differenzierung

Zur Induktion der Differenzierungen wurden die undifferenzierten Stammzellen aus den Expansionskulturen auf 60 mm (ultra low attachment, Corning) Schalen in Differenzierungsmedium überführt. Die Stammzellkolonien aus den Feederzell-basierten Kulturen wurden dafür vorsichtig wie beschrieben (2.2.1.2.1) von den Feederzellen abgelöst. Die Zellaggregate aus den Suspensionskulturen wurden dafür an Tag 4 nach Zentrifugation (3 min 100 x g) überführt. In den folgenden Tagen der Differenzierung bilden sich in der Suspensionskultur EBs, die an Tag 7 nach Einleitung der Differenzierung auf 0,1% Gelatine beschichtete 6 Well Zellkultur Platten überführt wurden.

2.2.1.4. Induktion von Teratomen

Zur Induktion von Teratomen wurden $\sim 2 \times 10^6$ Zellen in einem Volumen von 40 μl (20 μl PBS + 20 μl Matrigel) aufgenommen. Jeweils 20 μl der Suspension wurden in den Oberschenkel und in die Nierenkapsel immundefizienter Mäuse (NOD/SCID) bzw. (SCID/beige) injiziert. Nach ~ 8 Wochen wurden die entstandenen Teratome explantiert und histologisch aufgearbeitet. Die Arbeiten wurden im Institut für Versuchstierkunde der MH-Hannover durchgeführt.

2.2.1.5. G-Banden Karyogramme

Die Überprüfung des Karyotyps fand anhand von G-Banden Karyogrammen statt. Hierfür wurden die adhärenenten Zellen 30 min mit 0,025, 0,05 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Colcemid behandelt und mit 0,83 % Trypsin – EDTA dissoziiert, gefolgt von einer Behandlung mit 60 nM oder 75 nM Kaliumchlorid für 20 min bei 37°C. Die G-Banden Karyogramme wurden hergestellt und beurteilt in der Abteilung für Humangenetik der MH-Hannover, Prof. K. Miller.

2.2.1.6. Einzelzelldissoziation

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die Stammzellkolonien aus dem Feederzell-basierten Kultursystem zunächst von den Feederzellen gelöst (2.2.1.2.1) und einmal mit PBS w/o gewaschen. Die enzymatische Dissoziation erfolgte im Anschluss mit TrypLE für 1 min schüttelnd im Wasserbad (37°C). Nach Abstoppen der Reaktion und Zentrifugation (3 min, 100 x g) wurden die Zellen in mit 10 μM Rho Kinase Inhibitor (Y 27632) supplementiertem Kulturmedium resuspendiert und ausgesät oder in PBS w/o aufgenommen um eine Zellzahlbestimmung durchzuführen.

2.2.1.7. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahlen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Um lebende und tote Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension vor der Zellzahlbestimmung mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 versetzt. Da bei toten Zellen die äußere Zellmembran nicht mehr intakt ist, dringt der Farbstoff in die Zellen ein und färbt das

Cytoplasma blau. So können diese von den hellen lebenden Zellen unterschieden werden. Nach dem Auszählen der lebenden Zellen in jeweils 4 Großquadraten wurde die Zellzahl anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{N}{Q \cdot V_K} \cdot \frac{V_G}{V_Z} = x$$

N = Anzahl gezählte Zellen [Zellen]

Q = Anzahl gezählte Quadrate

V_G = eingesetztes Gesamtvolumen (Trypanblau + Zellsuspension) [ml]

V_Z = Volumen der eingesetzten Zellsuspension [ml]

V_K = Kammervolumen über einem Großquadrat ($= 10^{-4}$ ml)

x = Zellzahl [Zellen/ml]

2.2.1.8. Herstellung von transgenen Reporterzelllinien

hiPS, MF12 und RESC 366.4 aus Feederzell-basierter Kultur wurden vereinzelt (2.2.1.6) und auf mit 0,1% Gelatine beschichtete 24 Well-Zellkultur Platten ausgesät. 24 – 48 Stunden nach der Dissoziation wurde der entstanden einschichtige Zellrasen mit einer MOI (multiplicity of infection) von 25 – 50 unter Zugabe von 8 µg/µl Polybrene transduziert. 24 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen mit Kollagenase IV abgelöst und auf frische Feederzellen überführt. Die entstandenen Kulturen wurden über 3 – 5 Passagen nach dem Standardprotokoll expandiert.

Zur Selektion von Zellklonen wurden die Stammzellkolonien enzymatisch von den Feederzellen gelöst (2.2.1.2.1) und zu Einzelzellen dissoziiert (2.2.1.6). Mittels „fluorescence activated cell sorting (FACS)“ wurden GFP-positive Einzelzellen auf Feederzell-beschichtete 96 Well-Platten ausgesät. Das „Sorting“ erfolgte mit einem FACSaria™ der Firma BD Biosciences. Entstandene Kolonien wurden aus den 96 Well-Platten auf Standardkulturbedingungen überführt und anschließend expandiert.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Analyse der Genexpression auf mRNA Ebene

Zur Beurteilung der generierten Zellkulturen sollte die Expression von spezifischen Genen in den verschiedenen Expansionskulturen analysiert werden. Des Weiteren sollten Differenzierungskulturen anhand von Genexpressionsanalysen beurteilt werden.

Für die Analysen wurde die Gesamt-RNA der Proben isoliert und eine cDNA Synthese durchgeführt. Ausgehend von der synthetisierten cDNA wurden verschiedene Untersuchungen basierend auf der Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase chain reaction (PCR)) durchgeführt.

2.2.2.1.1. *RNA Isolierung*

Die Gesamt RNA aus Zellkulturproben wurde mit Hilfe eines kombinierten Protokolls aus TRIzol® und dem RNA Isolationskit NucleoSpin® RNA II durchgeführt. Die Zellkulturproben wurden in TRIzol® aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Chloroform versetzt und 15 min bei 11.000xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde zur Isolierung laut Herstellerangaben des RNA Isolations Kits eingesetzt.

2.2.2.1.2. *Bestimmung der Quantität und Qualität der isolierten Gesamt RNA*

Die isolierte Gesamt RNA wurde mit Hilfe von RNA 600 nano Chips (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) analysiert. Die eingesetzte RNA wird dabei kapillarelektrophoretisch auf dem Chip aufgetrennt und die Konzentration durch den Bezug auf einen internen Standard bestimmt. Des Weiteren ermöglicht die Darstellung der enthaltenen 18s und 28s rRNA eine Aussage zur Qualität der isolierten RNA.

2.2.2.1.3. *cDNA Synthese*

Durch den Einsatz der viralen Reversen Transkriptase ist es möglich die isolierte Gesamt RNA in komplementäre DNA (complementary DNA (cDNA)) umzuschreiben, welche als Template in eine PCR eingesetzt werden kann.

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit laut Herstellerangaben. Es wurden Random Primer für die Synthese verwendet.

2.2.2.1.4. *Polymerase Ketten Reaktion (PCR)*

Bei der PCR wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen, DNA zu duplizieren, genutzt, um die Template DNA zu amplifizieren. Voraussetzung ist dabei ein doppelsträngiger DNA-Bereich mit einem freien 3'OH-Ende, der durch die Bindung spezifischer Primer erzeugt wird. Davon ausgehend generiert die DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang

(Extension). Die entstandenen Doppelstränge werden anschließend durch Temperaturerhöhung denaturiert, wodurch eine erneute Anlagerung (Annealing) der Primer, auch an die neu synthetisierten DNA-Stränge, ermöglicht wird. Durch zyklische Wiederholung der Annealings – Extensions – und Denaturierungs – Schritte kommt es zu einer exponentiellen Zunahme der zu amplifizierenden DNA.

Das verwendete PCR Programm ist in Tabelle 1 dargestellt, wobei $T_{\text{Annealing}}$ jeweils vom verwendeten Primerpaar abhängig war. Die spezifischen Oligonukleotide wurden anhand der GI –Sequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit Hilfe der Software von Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) entwickelt. Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch MWG Biotech AG. Die verwendeten Primer und die zugehörigen $T_{\text{Annealing}}$ sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die PCR-Reaktionen wurden nach dem in Tabelle 3 dargestellten Schema mit der Go-Taq Polymerase durchgeführt.

Tabelle 1: Standard PCR Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	60 Sek.	1
94°C	60 Sek.	30
$T_{\text{Annealing}}$	60 Sek.	
72°C	90 Sek.	
72°C	300 Sek.	1
4°C	∞	

Tabelle 2: Für PCR verwendetet Oligonukleotide

Primer	Zielgen	Position	T _{Annealing}	Produktgröße	Sequenz
β-actin sense	GI 168480144	238	55°C	785bp	GACGAGGCCAGAGCAAGAG
β-actin ras		1022			ATCTCCTTCTGCATCCTGTC
Brachyury sense	GI 19743811	1382	55°C	357bp	CGGAACAATTCTCCAACCTATT
Brachyury ras		1738			GTACTIONGCTGTCCACGATGTCT
NKX2-5 sense	GI 4038730	184	55°C	168bp	CCAGCCCTGCTCTCACG
NKX2-5 ras		351			GCCCAGCGTAGGCCTCT
FOG2 sense	GI 10862688	2371	55°C	203bp	TGCTACCACCCAAGATGTGAT
FOG2 ras		2573			AGCCTTTTGGGAGACGTG
TBX5 sense	GI 31652233	1303	55°C	108bp	AGCAGTGACTTCTACCAGAAC
TBX5 ras		1411			TGACATTCTGTGCAGCTCCAT
TBX20 sense	GI 31652229	486	50°C	470bp	AGGTACCGCTACGCCTAC
TBX20 ras		893			GTCAGTGAGCCTGGAGGA
MLC2a sense	GI 20380769	4	60°C	446bp	GAGGAGAATGGCCAGCAGGAA
MLC2a ras		451			GCGAACATCTGCTCCACCTCA
αMHC sense	GI 27764860	1796	50°C	469bp	AGGATCCTCTCAACGAGACT
αMHC ras		2265			GTGATCAATGTCCAGAGAGC
SPARC sense	GI 338312	55	65°C	923bp	CTGCAGGGAGTGGATTTAGATCAC
SPARC ras		978			CTGCAGACCATGAGGGCCTGGATC
AFP sense	GI 20379786	1518	55°C	255bp	ACTCCAGTAAACCCTGGTGTGG
AFP ras		1772			GAAATCTGCAATGACAGCCTCA
TTR sense	GI 18089144	228	55°C	153bp	AAAACCAGTGAGTCTGGAGAGC
TTR ras		380			GTTGGCTGTGAATACCACCTCT
FOXA2 sense	GI 194363755	676	60°C	730bp	GCTTGGTTCTCGTTGAGTGG
FOXA2 ras		1406			CAGGAGCTTATAGGGCTCAGA
WNT1 sense	GI 16936523	306	55°C	190bp	TATTGTGAACGTAGCCTCCT
WNT1 ras		495			ATTCCGGAAGTCCACTTG
FGF5 sense	GI 73486654	570	55°C	253bp	ATCCCACGAAGCCAATATGTTA
FGF5 ras		822			GTGAAAGAAAGTTCTGGCTGCT
Nestin sense	GI 38176299	852	62°C	388bp	CAGCGTTGGAACAGAGGTTGG
Nestin ras		1240			TGGCACAGGTGTCTCAAGGGTAG
β3Tubulin sense	GI 50592995	1173	66°C	242bp	CAACAGCACGGCCATCCAGG
β3Tubulin ras		1415			CTTGGGGCCCTGGGCCTCCGA

Tabelle 3: Mastermix für PCR Reaktionen mit Go-Taq Polymerase

Mastermix	μl
H ₂ O	15,75
5x PCR-Puffer	5
10 μmol Primer	1
10 μmol Primer	1
10 mM dNTP	1
Go Taq Polymerase (1,25 U/μL)	0,25
Gesamt	24 μL+1μL cDNA

2.2.2.1.5. *Agarosegelelektrophorese*

Mittels Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente auf Grund ihrer Ladung im Spannungsfeld auftrennen, wobei die Größe der Fragmente und die Konzentration des Agarosegels Einfluss auf die Auftrennung hat. Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen werden Längenstandards zusammen mit den Proben auf ein Agarosegel aufgetragen. Durch die Zugabe des organischen Farbstoffs Ethidiumbromid), der aufgrund seiner planaren Struktur in die DNA interkalieren kann, werden die Fragmente im UV Licht (254 nm-366 nm) sichtbar.

Für die Auftrennung der PCR Fragmente wurden 1,5 %ige Agarosegele mit 0,5 µg / ml Ethidiumbromid verwendet. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 130 V für etwa 60 min. Die Dokumentation wurde im Anschluss mit dem GelDoc System durchgeführt.

2.2.2.1.6. *Quantitative Real Time PCR*

Um quantitative Aussagen zu Veränderungen der Genexpression in Zellpopulationen aus verschiedenen Expansionssystemen oder im Differenzierungsverlauf treffen zu können, wurde die Methode der quantitativen Real Time PCR (qPCR) verwendet. Zur Quantifizierung wurde der nicht spezifische Farbstoff SYBR® Green eingesetzt. Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA, wobei der aus Farbstoff und DNA resultierende Komplex Licht der Wellenlänge 520 nm emittiert. Die Menge des aufgenommenen Farbstoffs ist proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produkts und wird als Fluoreszenzintensität nach jedem PCR Zyklus gemessen. Um sicherzustellen, dass ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde und somit das Fluoreszenzsignal die Menge des gewünschten Produkts repräsentiert, ist eine Schmelzkurvenanalyse am Ende des PCR Prozesses notwendig. Hierbei wird die Temperatur schrittweise von 60°C auf 95°C erhöht und die Abnahme der Fluoreszenzintensität verfolgt. Abhängig von Länge und GC-Gehalt des PCR Produkts kommt es bei einer spezifischen Temperatur zur vollständigen Dissoziation der Doppelstränge, was zur Freisetzung des SYBR® Green Farbstoffs und so zur Abnahme des Fluoreszenzsignals führt.

Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgt über den sogenannten Ct-Wert. Der Ct-Wert einer Probe ist der PCR-Zyklus in dem das Fluoreszenzsignal den Wert der Hintergrundfluoreszenz überschreitet und sich der Prozess in der exponentiellen Phase befindet.

Zur Quantifizierung der Veränderungen in den Expressionshöhen der untersuchten Gene wurde zunächst die genaue Kopienzahl des Zielgens mit Hilfe einer Standardreihe berechnet. Die Berechnung erfolgte mit der Software ep realplex. Zur relativen Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens auf die Expression eines internen Standards bezogen. Als interner Standard wurden die sogenannten Housekeeping-Gene

verwendet. Hierbei handelt es sich um Gene, deren Expressionshöhe von den untersuchten Versuchsbedingungen oder des Entwicklungszustandes unbeeinflusst sein sollte.

Die für die qPCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Das verwendete PCR Programm ist in Tabelle 5 dargestellt, wobei $T_{\text{Annealing}}$ vom jeweils verwendeten Primerpaar abhängig war. Die Oligonukleotide wurden anhand der GI – Sequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit Hilfe der Software von Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) entwickelt. Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch MWG Biotech AG. Die PCR Ansätze wurden nach dem in Tabelle 6 dargestellten Schema mit dem ABSOLUTE™ QPCR SYBR® GREEN MIX pipettiert.

Tabelle 4: Für die quantitative Real Time PCR eingesetzte Oligonukleotide

Primer	Ziel	Position	$T_{\text{Annealing}}$	Produktgröße	Sequenz
hOCT4-F4	GI 116235483	3'UTR	60°C	104bp	TCCCATGCATTCAAACCTGAGG
hOCT4-R4		1119,1266			CCTTTGTGTTCCCAATTCCTTCC
hNANOG-F6	GI 153945815	3'UTR	60°C	143bp	GGACACTGGCTGAATCCT TCC
hNANOG-R6		1190,1292			CTCGCTGATTAGGCTCCAACC
Ronin sense	GI 40354196	1470	60°C	240bp	AAGCAGAGGCTTCAGAACCA
Ronin ras		1671			TAGGAGGCAGAGGCACAGAT
SOX17 sense	GI 145275218	488	60°C	102bp	CAGAAATCCAGACCTGCACAA
SOX17 ras		553			CTCTGCCTCCTCCACGAA
BRY sense	GI 19743811	1559	60°C	196bp	CCTGTGCTGTGTGAGCAACG
BRY ras		1716			CTGGCTGTCCACCATGTCTG
SOX1 sense	GI 30179899	301	60°C	145bp	CAAGATGCACAACCTCGGAGA
SOX1 ras		408			CGGCCGGTACTTGTAATCC
eGFP sense	piShShOCT4	10169	60°C	187bp	ACGTAAACGGCCACAAGTTC
eGFP ras	eGFPW	10317			AAGTCGTGCTGCTTCATGTG
NUBP1 sense	GI 118572610	569	60°C	106bp	CGTCGGATGAACACCTCTCG
NUBP1 ras		636			TTCCGGACATCCTGGAGTGA
β -Actin sense	GI 5016088	23	60°C	176bp	AGCCTCGCCTTTGCCGA
β -Actin ras		196			CTGGTGCCTGGGGCG

Tabelle 5: Programm für die quantitative Real Time PCR, inklusive Schmelzkurvenanalyse

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	15 min.	1
95°C	15 Sek.	40
T _{Annealing}	60 Sek.	
72°C	60 Sek.	
95°C	15 Sek.	1
50°C - 98°C	0,5°C Schritte (10 sek.)	
4°C	∞	

Tabelle 6: Mastermix für quantitative Real Time PCR mit ABSOLUTE™ QPCR SYBR® GREEN MIX (Thermo Scientific)

Mastermix	µl
SYBR® Green Supermix	12,5
10 µmol Primer	1
10 µmol Primer	1
H ₂ O	5,5
Gesamt	20 µL+5µL cDNA (1:5 verdünnt)

2.2.2.1.7. *StellArrays*

Eine umfassendere Methode der Expressionsanalyse bietet das System der StellArrays (LONZA). Hierbei handelt es sich um ein qPCR basiertes System bei dem im 96 Well beziehungsweise 384 Well Maßstab Expressionsanalysen durchgeführt werden können. Für die zu untersuchenden Bedingungen stehen vorgefertigte 96 Well Platten mit spezifischen Primerpaaren für die relevanten Gene zur Verfügung. Um die Expressionsmuster der verschiedenen Expansionsbedingungen zu vergleichen, wurden Systeme für die Expressionsanalyse von humanen pluripotenten Stammzellen verwendet. Als Template wurde cDNA eingesetzt, die mit dem ABSOLUTE™ QPCR SYBR® GREEN MIX nach dem Schema in Tabelle 8 verwendet wurde.

Tabelle 7: Im StellArray enthaltene Gene, * im 32 Gen Array vertretene Gene

18s*	18S ribosomal 1
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
ACTC	Alpha cardiac muscle 1
AFP	Alpha feto protein
AKAP13	A-kinase anchor protein 13
ATL1	Atlastin GTPase 1
BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein
CCNA2	Cyclin A2;
CCND1	Cyclin D1
CD9*	CD9 antigen
CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
CDX2*	Caudal type homeobox 2
CER1*	Common eliminated region 1
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1;
COL2A1*	Collagen, type II, alpha 1
COL3A1	Collagen, type III, alpha 1
COMMD3	COMM_Domain containing protein 3
CRABP2	Cellular retinoic acid binding protein 2
CXCR4*	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
CYLD	Cylindromatosis
DCN	Decorin
DNMT3B*	DNA (cytosine-5-) methyltransferase 3 beta
DPPA2	Developmental pluripotency associated 2
DPPA4	Developmental pluripotency associated 4
DPPA5	Developmental pluripotency associated 5
EOMES*	Eomesodermin homolog
FBXO15	F-box protein 15
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FGF4	Fibroblast growth factor 4
FLT1*	Fms-related tyrosine kinase 1
FN1*	Fibronectin 1
FOXA2*	Forkhead box A2
FOXD3	Forkhead box D3
FOXH1	Forkhead box H1
GABRB3	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3; GAL galanin prepropeptide
GAL	Galanin prepropeptide
GATA4*	GATA binding protein 4
GATA6*	GATA binding protein 6
GBX2	Gastrulation brain homeobox 2
GDF3*	Growth differentiation factor 3
Genomic3*	Control
GJA1	Gap junction protein, alpha 1
GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7
GSC*	Gooseoid homeobox
H19	Imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1

IGF2	Insulin-like growth factor 2
IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer
KLF4	Kruppel-like factor 4
LAMA1	Laminin, alpha 1
LEFTB	Left-right determination, factor B
LEFTY2	Left-right determination factor 2
LIFR*	Leukemia inhibitory factor receptor alpha
Lin28	RNA-binding protein LIN-28
LOX	Lysyl oxidase
MED17	Mediator complex subunit 17
MME	Membrane metallo-endopeptidase
MYC	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
MYST2	MYST histone acetyltransferase 2
NANOG*	Homeobox transcription factor Nanog
NAT1	N-acetyltransferase 1
NCAM	Neural cell adhesion molecule 1
NES	Nestin
NEUROD1	Neurogenic differentiation 1
NODAL	Nodal homolog (mouse)
NOTCH1	Neurogenic locus notch homolog protein 1
PARD6A	Par-6 partitioning defective 6 homolog alpha
PAX6*	Paired box 6
Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PIM2	Pim-2 oncogene
PIPOX	Pipecolic acid oxidase
PODXL*	Podocalyxin-like
Pou5F1*	Pou5F1, POU class 5 homeobox 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
REST*	RE1-silencing transcription factor
Runx1	Runt-related transcription factor 1
SHH*	Sonic hedgehog homolog
SLC16A1	Solute carrier family 16, member 1
SOX17*	SRY (sex determining region Y)-box 17
SOX2*	SRY (sex determining region Y)-box 2
Stella	Developmental pluripotency associated 3 (DPPA3)
SYP	Synaptophysin
T*	Brachyury
TDGF1*	Teratocarcinoma-derived growth factor 1
TERT*	Telomerase
TRIM71	Tripartite motif-containing 71
TRP53	Tumor protein p53
TTR	Transthyretin
TUBB3	Tubulin, beta 3
UTF1*	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
VASH2	Vasohibin 2
WNT5A*	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
ZFP42*	Zinc finger protein 42
ZNF206	Zinc finger protein 206

Tabelle 8: Programm für StellArrays, inklusive Schmelzkurvenanalyse

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	15 min.	1
95°C	15 Sek.	
T _{Annealing} (60°C)	60 Sek.	40
95°C	15 Sek.	1
50°C - 98°C	0,5°C Schritte (10 Sek.)	
4°C	∞	

Tabelle 9: Zusammensetzung StellArray Supermix

1056µl SYBR® GREEN MIX

+

998µl H₂O

2054µl Supermix → 2006µl (Supermix)

+

106µl (cDNA 1:20 verdünnt)

2012µl



20µl/Well (96 Well)

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte über folgende Methoden.

1. Direkter Vergleich der resultierenden Ct Werte.
2. Analyse mit Hilfe des Global Pattern Recognition (GPR) data analysis tool (Bar Harbor Biotechnology, USA).

Die direkte Analyse der Ct-Werte erlaubt einen allgemeinen Vergleich der eingesetzten Proben. Dabei werden die Ct-Werte aller eingesetzten Proben untereinander verglichen und anhand der linearen Regression beurteilt. Als Kriterium der Ähnlichkeit wurde der Korrelationskoeffizient R_2 aus den verschiedenen Analysen verwendet.

Die Auswertung der erhaltenen Daten mit Hilfe des Global Pattern Recognition (GPR) data analysis tool (Bar Harbor Biotechnology, USA) erlaubt eine detailliertere Betrachtung der Expressionshöhen der untersuchten Gene. Der dem GPR zugrunde liegende Algorithmus vergleicht die Werte eines jeden Gens mit allen anderen Genen innerhalb eines Experiments und kann daher auf die Verwendung eines internen Standards verzichten.

2.2.3 Analyse der Genexpression auf Proteinebene

Neben der Analyse auf mRNA Ebene durch PCR basierte Verfahren, ist eine Charakterisierung der Zellen aus verschiedenen Expansionssystemen oder zu verschiedenen Zeitpunkten während des Differenzierungsprozesses durch Analyse der Genexpression auf Proteinebene möglich.

2.2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung

Der Nachweis relevanter Proteine wird bei der Immunfluoreszenzfärbung durch die Bindung spezifischer Antikörper erreicht, die wiederum durch die Bindung fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper detektiert werden können.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Proben mit 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert und anschließend dreimal mit PBS w/o gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper zu verhindern, wurden die Proben im nächsten Schritt mit 1 x TBS⁺ für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS w/o wurden die Proben mit - in Färbepuffer verdünntem - spezifischen Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen mit PBS w/o entfernt. Die Inkubation mit dem entsprechendem, in Färbepuffer verdünnten, Sekundärantikörper erfolgte 30 min bei Raumtemperatur. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Proben nach erneutem Waschen mit PBS w/o, 15 min bei Raumtemperatur mit DAPI (1,7 µg / ml Färbepuffer) gefärbt.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde entweder direkt in den verwendeten Kulturgefäßen (Multiwellplatten) und oder auf Cytospots durchgeführt. Für die Cytospots wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und je 2×10^4 Zellen / 100µl durch Zentrifugation auf Objektträger aufgebracht.

Die für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mit Hilfe eines Axiovert Mikroskops (Zeiss) und Axiovision Rel 4.6.

2.2.3.2 Durchflusszytometrische Analysen

Eine weitere Methode zur Analyse der Proteinexpression verschiedener Zellpopulationen ist die Durchflusszytometrie oder das FACS (Fluoreszenz Activated Cell Sorting) Diese beruht ebenfalls auf der spezifischen Anfärbung von Proteinen durch fluoreszenzmarkierte Antikörper.

Bei der Methode der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften analysiert werden. Einzelzellsuspensionen werden durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Die verursachte Streuung des Lichts lässt Rückschlüsse auf Größe und Beschaffenheit der

Zellen zu. Des Weiteren ist die Detektion spezifischer Fluoreszenzsignale möglich.

Die zu analysierenden Zellen wurden zu Einzelzellsuspensionen dissoziiert. Es wurden $1 - 1,5 \times 10^5$ Zellen in ein Well einer 96 Well V- Bottom - Platte überführt und pelletiert (2 min. bei $300 \times g$). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit dem spezifischen Antikörper, in entsprechender Verdünnung in FACS-Puffer, für 45 min bei 4°C inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen wurde anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte im Dunkeln für 30 min bei 4°C . Vor der Messung wurde überschüssiger Sekundärantikörper durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt und die Proben in FACS Probenröhrchen überführt. Die für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Um tote Zellen von den Analysen ausschließen zu können, wurde zusätzlich zu den spezifischen Antikörperfärbungen eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) vorgenommen. PI kann nur die nicht intakte Zellmembran von geschädigten Zellen passieren. Geschädigte beziehungsweise tote Zellen zeigen daher ein Fluoreszenzsignal bei einer Wellenlänge von 590 nm. PI positive Zellen konnten so bei der anschließenden Auswertung ausgeschlossen werden.

Die Messung der Proben erfolgte mit dem FACS Calibur (Becton Dickinson, USA). Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Software WinMDI2.9 ausgewertet.

Tabelle 10: Für Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie verwendetet Antikörper

Spezies	Klasse	Name	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
Maus	IgG2b	Anti-OCT4	Monoklonal	Santa Cruz Biotechnologie, CA,USA	1:100
Maus	IgM	Anti-TRA1-60	Monoklonal	Abcam, Cambridge, USA	1:100
Maus	IgG3	Anti-SSEA-4	Monoklonal	Hybridoma Bank, Iowa City, IA	1:70
Maus	IgG1	Anti-Sarcomeric- α -Actinin	Monoklonal	Sigma, Missouri, USA	1:800
Maus	IgG1	Anti- α -Fetoprotein	Monoklonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:300
Maus	IgG2a	Anti- β -Tubulin	Monoklonal	Upstate, NY, USA	1:400
Maus	IgG1	Anti-Desmin	Monoklonal	Progen Biotechnik, Heidelberg,	1:20
Maus	IgG1	Anti-Cytoceratin 18	Monoklonal	Dako, Glostrup, Dänemark	1:25
Kaninchen	IgG	Anti-Nkx2.5	Polyklonal	Santa Cruz Biotechnologie, CA,USA	1:200
Ziege	Ziege IgG	Anti-Sox17	Monoklonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:200
Maus	IgG2a	Anti-Troponin T	Monoklonal	Thermo Scientific, Karlsruhe	1:100
Maus	IgG2a	Anti-CD14-FITC	Monoklonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	1:11
Maus	IgG2a	Anti-CD34-FITC	Monoklonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	1:11
Maus	IgG2a	Anti-CD45-FITC	Monoklonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	1:11
Maus	IgG1	Anti-CD146-FITC	Monoklonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	1:11
Maus	IgG1	Anti-CD31-FITC	Monoklonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	1:11
Maus	IgG1	Anti-CD133-FITC	Monoklonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	1:11

3. ERGEBNISSE

Neben der Charakterisierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen, welche in der Arbeitsgruppe generiert worden waren, war Ziel der Arbeit, ein Kultursystem für die Expansion von pluripotenten Primaten Stammzellen zu erarbeiten, welches die Entwicklung eines kontrollierbaren und automatisierbaren Prozesses zur Massenproduktion dieser Zellen ermöglicht. In Anlehnung an beschriebene Kultursysteme für murine embryonale Stammzellen [61, 90] sollte ein auf Suspensionskultur basierendes Protokoll für die Kultivierung pluripotenter Zellen entwickelt werden.

3.1. Generierung und Charakterisierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen aus Nabelschnurblut

Parallel zu den initialen Experimenten zur Suspensionskultur undifferenzierter Primaten embryonaler Stammzellen wurden in unserer Arbeitsgruppe von Frau Alexandra Haase durch die lentivirale Überexpression von NANOG, OCT4, SOX2 und LIN28 hiPS generiert. Als Zellquelle dienten aus Nabelschnurblut isolierte Endothelzellen. Die Isolation und Charakterisierung der Endothelzellen wurde von Dr. Christian Hess, AG Bioartifizielle Lunge, HHTG, MH- Hannover durchgeführt. Zur weiteren Charakterisierung der Ausgangszellen wurden FACS Analysen für Endothelzell-spezifische bzw. Monozyten-spezifische Marker durchgeführt. Die, für die Reprogrammierung verwendete Zellpopulation, zeigte die Expression der Endothelzellmarker CD31 und CD146, während keine Expression für die Monozyten-spezifischen Marker CD14 und CD45 gefunden werden konnte. Das Expressionsprofil für CD34 und CD133 unterstreicht den Progenitorstatus der isolierten Zellen. Für Endothelzellen ist die Expression von CD34 bekannt, während Vorläuferzellen noch keine CD34 Expression zeigen.

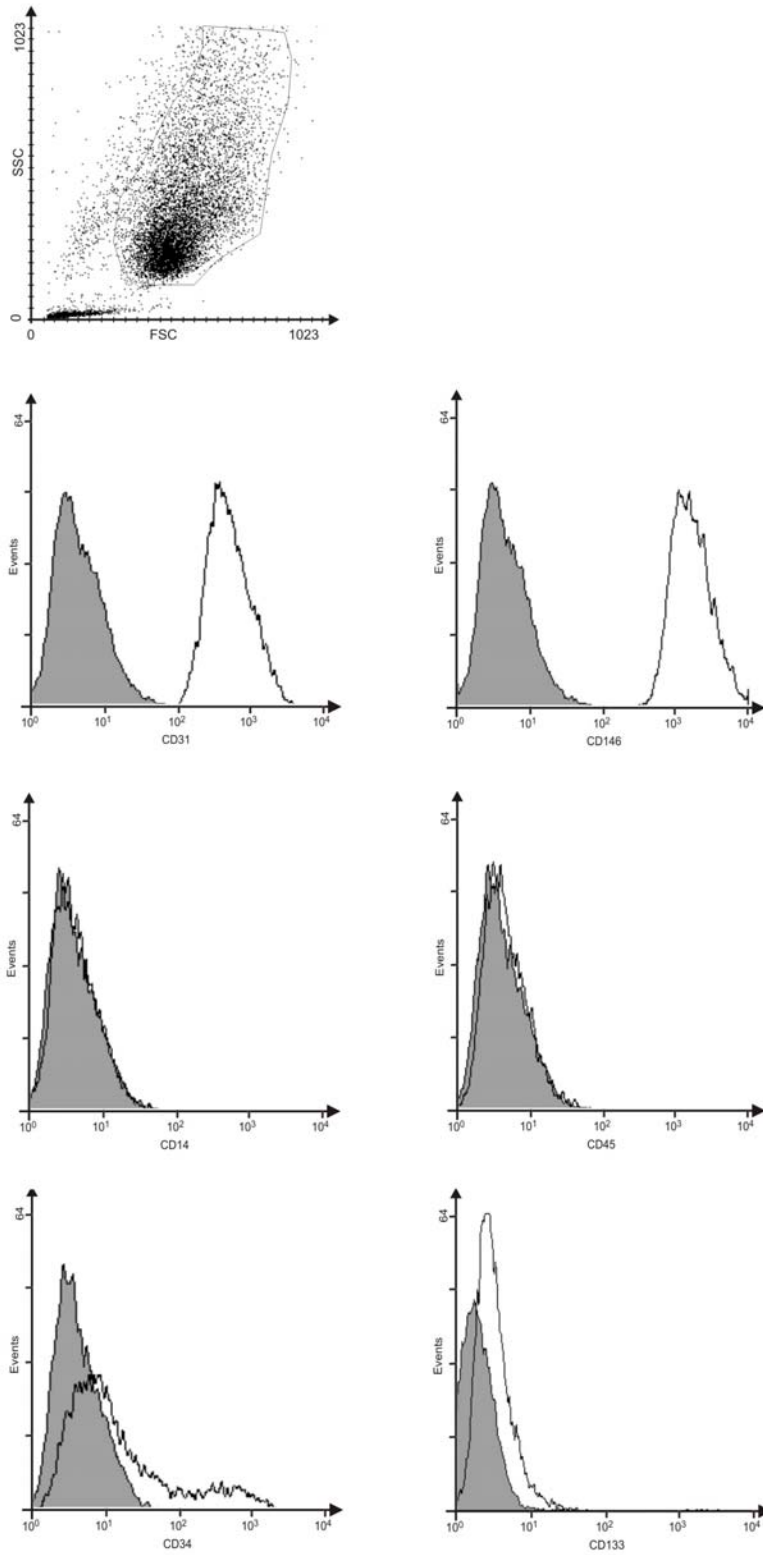


Abb. 3: Charakterisierung der für die Reprogrammierung verwendeten Ausgangszellen. Mittels FACS konnte die Expression der Endothelzell-spezifischen Marker CD31 und CD146 gezeigt werden, während keine Expression der Monozyten-spezifischen Marker CD14 und CD45 gefunden wurde. Das gefundene Expressionsprofil für CD34 und CD133 unterstreicht den Progenitorstatus der isolierten Endothelzellen. Dargestellt in grau sind die korrespondierenden Isotypenkontrollen.

Im Vergleich zu den Ausgangszellen zeigten die, aus den Reprogrammierungen hervorgegangen, hiPS Linien keine Expression des Endothelzell-spezifischen Markers CD31(Abb. 4).

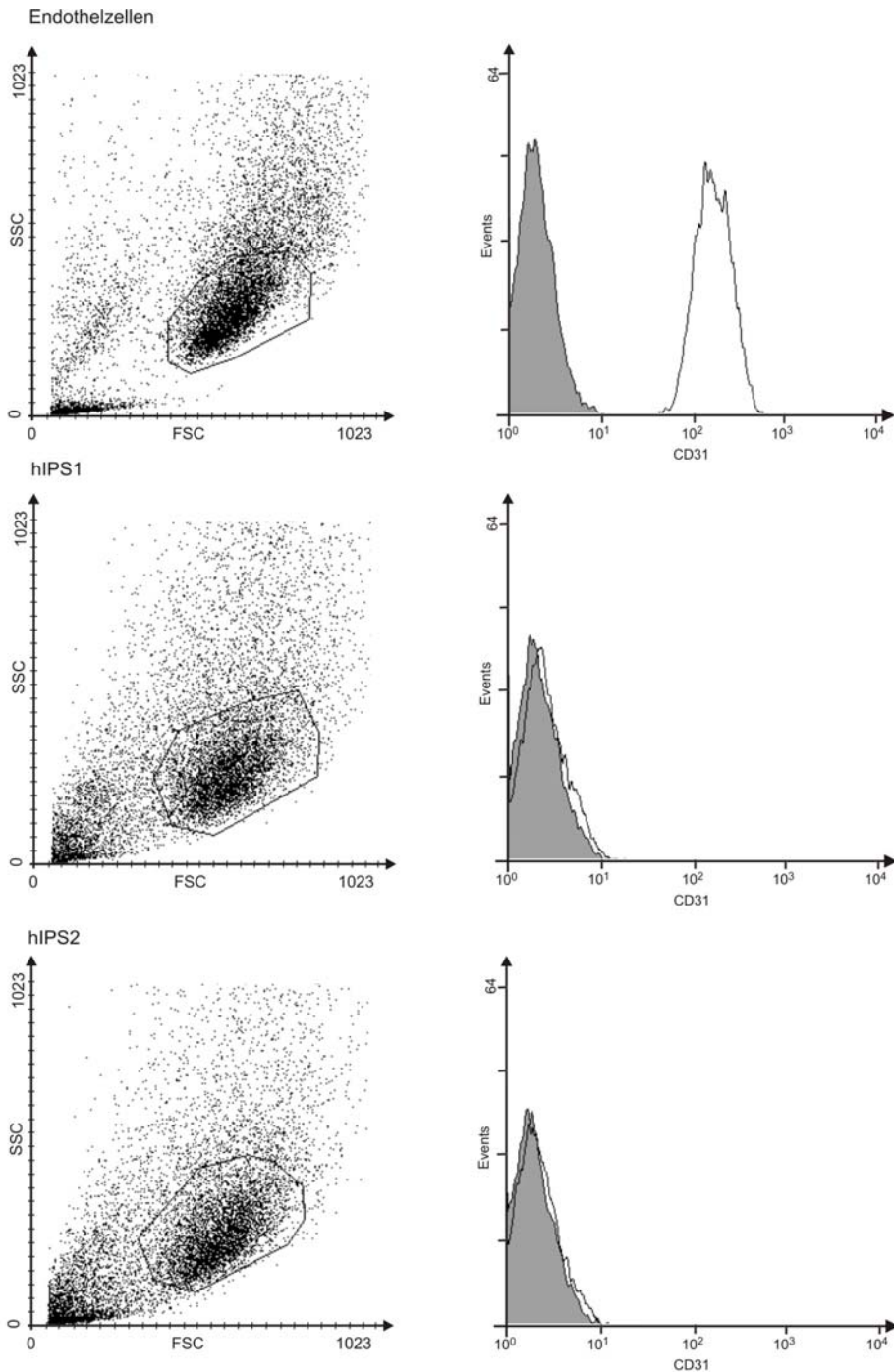


Abb. 4: Keine Expression des Endothelzell-spezifischen Markers CD31 in undifferenzierten Kulturen der generierten hiPS. FACS Analysen zeigen die Expression des Endothelzell-spezifischen Markers CD31 auf den für die Reprogrammierung verwendeten Ausgangszellen, während die generierten hiPS Linien keine Expression des Markers zeigen. Dargestellt in grau korrespondierende Isotypenkontrollen.

Zur weiteren Charakterisierung der generierten hiPS Linien wurden *in vitro* Differenzierungen von Frau Dr. Kristin Schwanke durchgeführt. Durch immunzytologische Untersuchungen konnten Zellen aller 3 Keimblätter nachgewiesen werden. β -Tubulin, Cytokeratin 18 für das Ectoderm, AFP, SOX17 und HNF4 für das Endoderm sowie Desmin und CD31 für die mesodermale Entwicklungsrichtung.

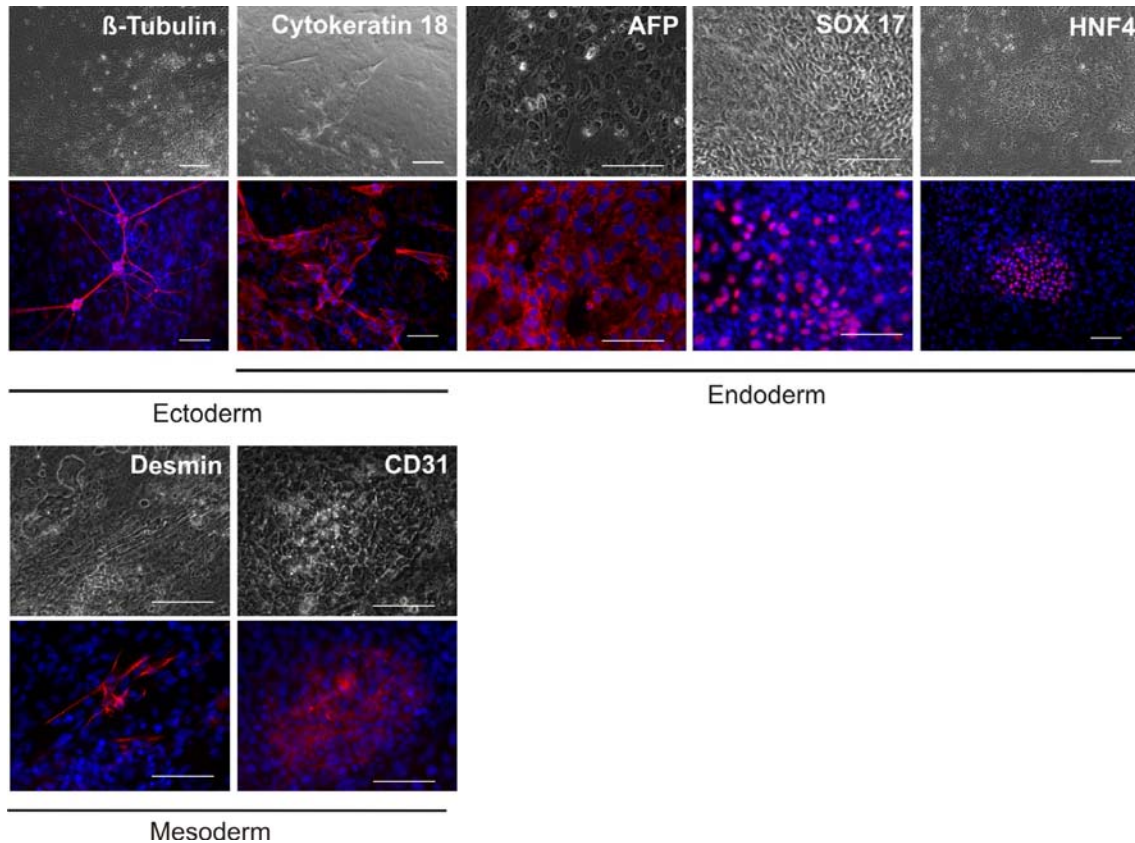


Abb. 5: Immunzytologische Untersuchungen von hiPS2 Differenzierungskulturen. Marker für Zellen aller 3 Keimblätter konnten an Tag 21 der Differenzierung nachgewiesen werden. β -Tubulin (Ectoderm), Cytokeratin18 (Ecto-, Endoderm), AFP, SOX17, HNF (Endoderm), Desmin, CD31 (Mesoderm). Spezifische Antikörperfärbung rot, Zellkerndarstellung DAPI (blau). Skalierung 100 μ m.

Insbesondere wurde die Differenzierung der generierten hiPS in kardiale Zelltypen untersucht. Durch immunzytologische Untersuchungen konnte die Expression kardialer Marker wie sarkomeres Actinin, Troponin T und des *Gap junctions* Proteins Connexin 43 gezeigt werden.

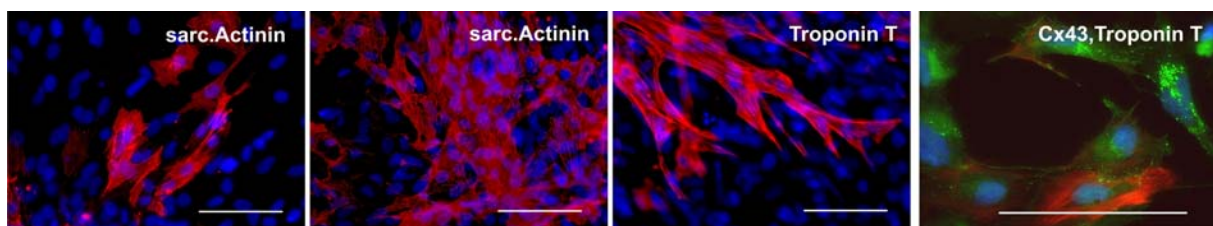
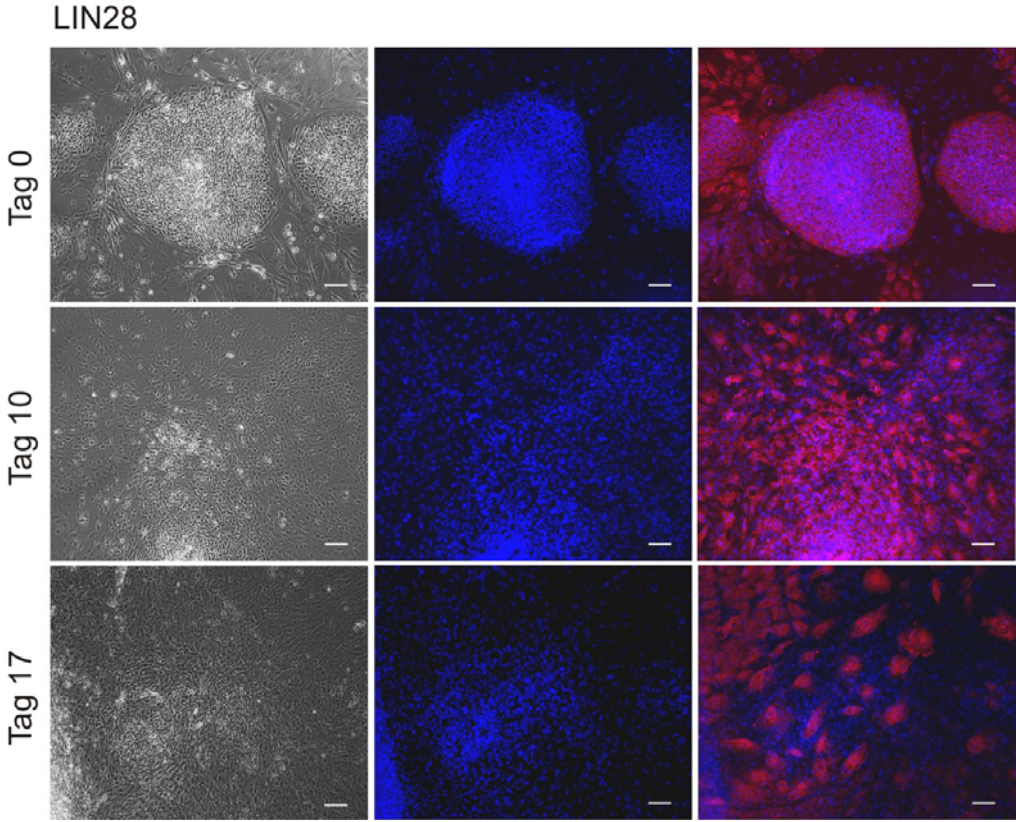
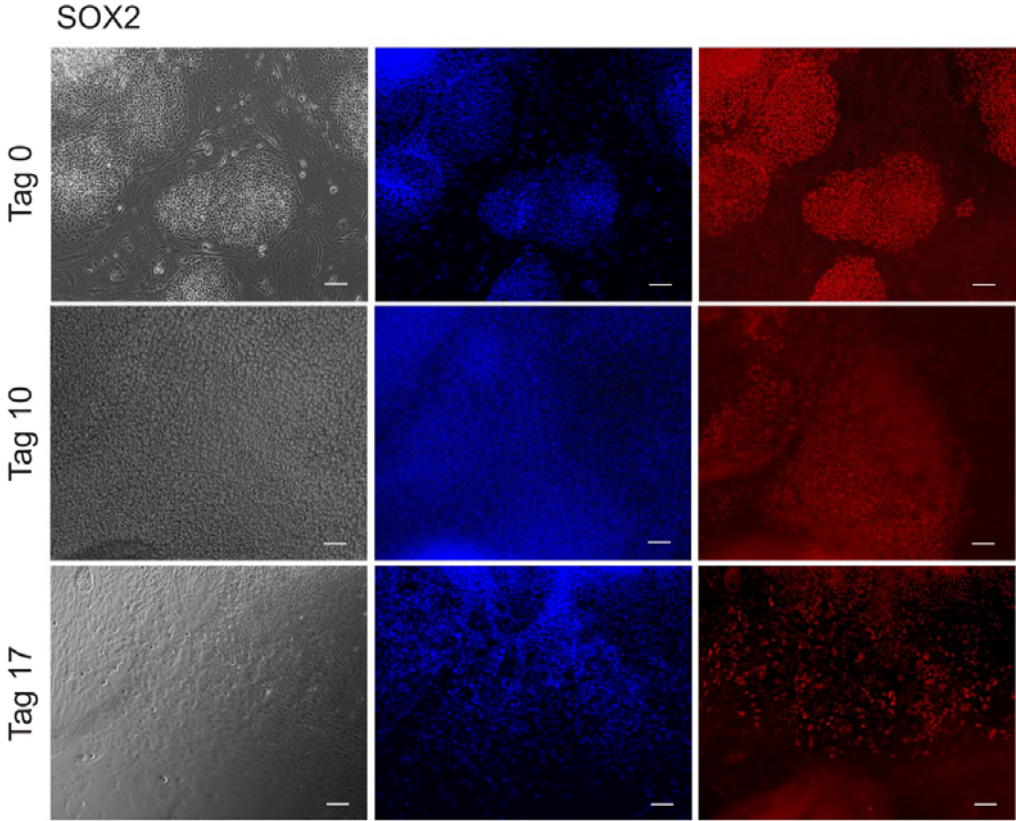


Abb. 6: Expression kardialer Marker in hiPS2 Differenzierungskulturen. Kardiomyozyten-spezifische Antikörperfärbung an Tag 21 der Differenzierung für sarkomeres Actinin, Troponin T, (rot), Connexin 43 (Cx43) (grün), Zellkerndarstellung DAPI (blau). Skalierung: 100 μ m.

Um Aussagen zur Transgenexpression in den generierten hiPS Linien treffen zu können, wurden weitere immunzytologische Untersuchungen durchgeführt. Es wurde sowohl in undifferenzierten hiPS als auch im Verlauf der Differenzierung an Tag 10 und Tag 17 die Expression von OCT4, LIN28, NANOG und SOX2 untersucht. Für den Transkriptionsfaktor NANOG konnte im Verlauf der Differenzierung eine Abnahme gezeigt werden. An Tag 17 der Differenzierung konnten nahezu keine NANOG-positiven Zellen mehr nachgewiesen werden. Für SOX2 und LIN28 konnte ebenfalls eine deutliche Abnahme der Expression im zeitlichen Verlauf gezeigt werden. Da die Expression von SOX2 und LIN28 nicht auf undifferenzierte Zellen beschränkt ist, konnten auch an Tag 17 nach Einleitung der Differenzierung noch SOX2 und LIN28 positive Zellen gefunden werden. Für den Transkriptionsfaktor OCT4 konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten eine Expression gezeigt werden, obwohl eine OCT4 Expression auf pluripotente Zellen beschränkt sein sollte (Abb. 7). Anhand von qPCR Analysen, durchgeführt von Frau Alexandra Haase (hier nicht gezeigt) [95], konnte die verbleibende OCT4 Expression dem, für die Reprogrammierung verwendeten, Transgen zugeordnet werden. Die bestehende Transgenexpression hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung der hiPS.

Die Daten zur Generierung von hiPS aus Nabelschnurblut sowie deren Charakterisierung wurden in Cell Stem Cell. 2009 Oct 2;5(4):434-41 veröffentlicht.



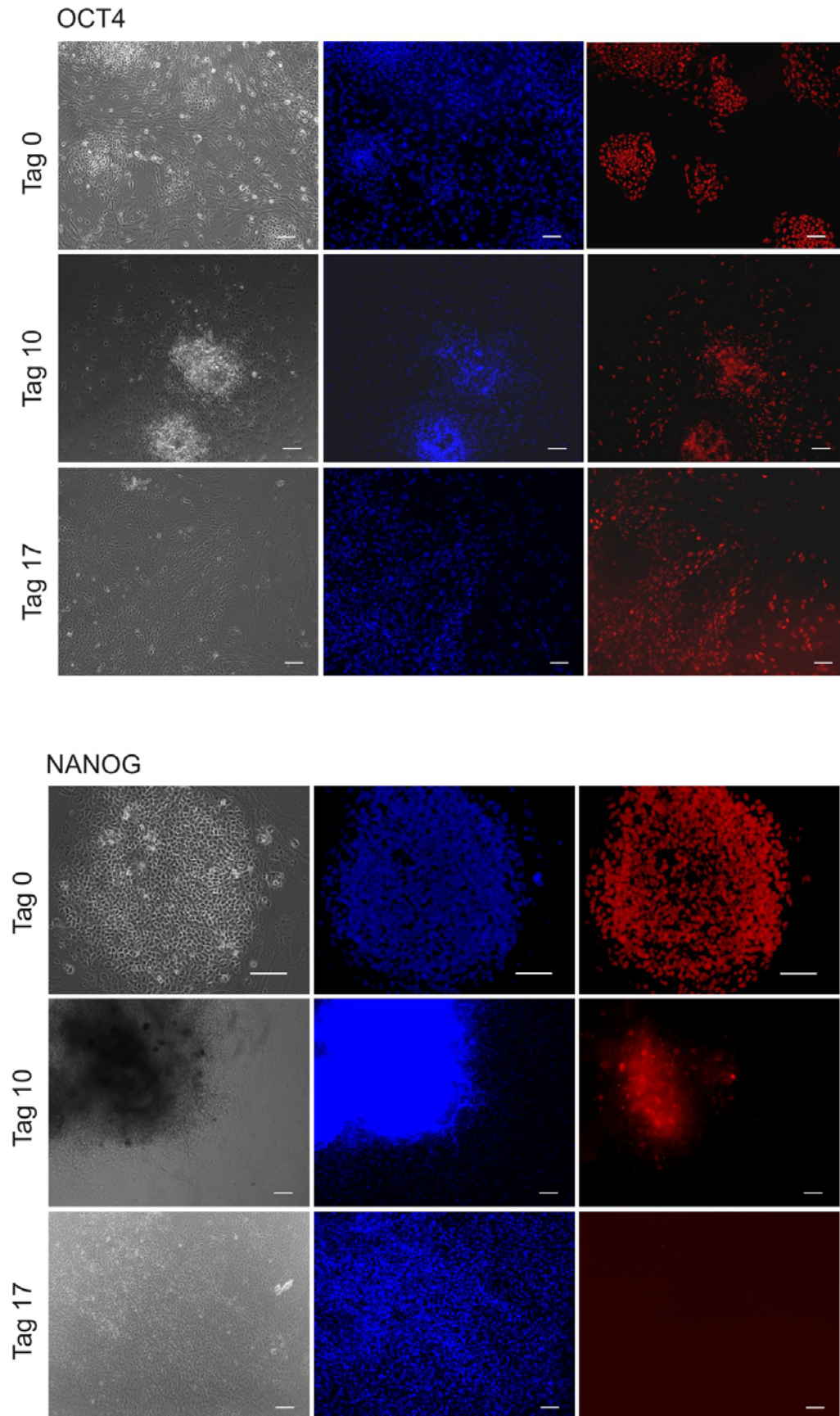


Abb. 7: Abnahme der Expression von NANOG, SOX2, LIN28 und OCT4 in hiPS2 im Verlauf der Differenzierung. Immunzytologische Untersuchungen wurden an undifferenzierten hiPS2 und an Tag10 bzw. 17 nach Einleitung der Differenzierung durchgeführt. Spezifische Antikörperfärbungen rot, Zellkerndarstellung DAPI (blau). Skalierung 100 µm.

3.2. Stammzelllinien und deren Standardkultivierung

Im ersten Teil der Arbeit wurden zunächst embryonale Stammzellen der Primatenspezies *Macaca mulatta* (Rhesusaffe) verwendet. Stammzelllinien dieser Spezies wurden erstmals im Jahr 1995 von James Thomson beschrieben [3]. Die verwendete Linie R366.4 wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe charakterisiert [22]. Zusätzlich wurde eine Stammzelllinie der Primatenspezies *Macaca fascicularis* (Javaneraffe) verwendet. Die Isolierung von ES Zellen dieser Spezies wurde erstmals von Suemori in 2001[4] beschrieben. Die hier verwendete Linie MF12 wurde von Dr. Eric Hayes (Nationales Primaten Forschungszentrum, Universität Washington) zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Stammzelllinien der Primatenspezies unterscheiden sich in bezüglich der Kultivierung generell nicht von hESC [5] und stellen somit eine geeignete, ethisch unbedenkliche Alternative zu hESC für die Prozessentwicklung dar [96].

Nachdem 2007 erstmals die Generierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen hiPS beschrieben worden war [7], standen im Verlauf dieser Arbeit eigene hiPS zu Verfügung. Nach der detaillierten Charakterisierung der in der eigenen Arbeitsgruppe hergestellten hiPS [95], konnten die generierten Linien hiPS1 und hiPS2 im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit für die Entwicklung einer Suspensionskultur eingesetzt werden. Als direkte Kontrolle standen zu diesem Zeitpunkt auch hESC der Linie HES-3 (<http://stemcells.nih.gov/StaticResources/research/registry/pdfs/Registry.pdf>) zur Verfügung, die ebenfalls in die Experimente einbezogen wurden.

Unter typischen Standardbedingungen im Labormaßstab wuchsen alle verwendeten pluripotenten Stammzelllinien adhärent auf Zellkulturschalen in Zellverbänden, sogenannten Kolonien, und waren von mitotisch inaktivierten murinen oder humanen Fibroblasten auch als Feederzellen bezeichnet, abhängig. Kolonien undifferenzierter Stammzellen grenzten sich durch einen klaren Rand von den umgebenden Feederzellen ab (Abb. 8).

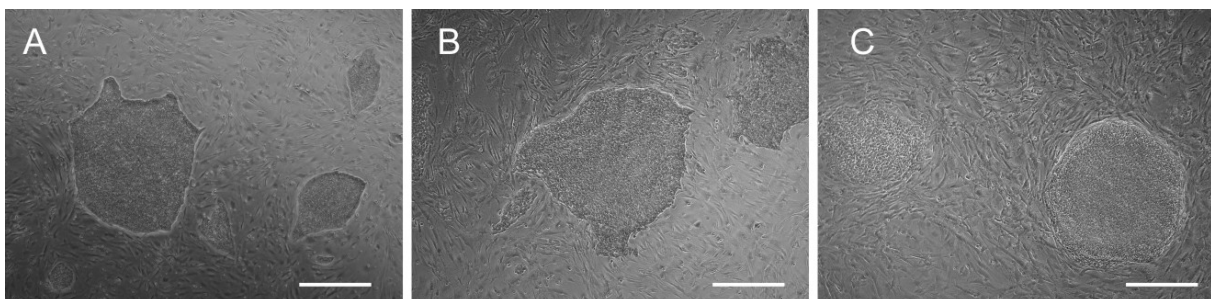


Abb. 8: Verwendete pluripotente Stammzellen unter Standardkulturbedingungen. Undifferenzierte embryonale Stammzellen von *Macaca mulatta* (R366.4) (A), *Macaca fascicularis* (MF12) und humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPS2) (C). Die undifferenzierten Zellen bilden Kolonien, die sich durch einen klaren Rand von den umgebenden Feederzellen abgrenzen. Skalierung: 500µm

3.3. Überführung undifferenzierter Stammzellkolonien in Suspensionskultur

Die initialen Versuche zur Suspensionskultur pluripotenter Zellen wurden mit den embryonalen Primaten Stammzelllinien R366.4 und MF12 durchgeführt.

Kolonien wurden durch die Behandlung mit Kollagenase IV, enzymatisch von den Zellkulturschalen gelöst, wobei die Unterlage aus Feederzellen weitestgehend zurückblieb. Die Kolonien wurden in Zellkulturschalen, die eine Anheftung verhindern sollten, überführt.

Die Überführung von Stammzellkolonien in Suspensionskulturen unter Zusatz geeigneter Differenzierungsmedien ist eine Methode, die typischerweise zur Initiierung der Differenzierung verwendet wird. In Suspension bilden die abgelösten Zellkolonien Aggregate, die in Differenzierungsexperimenten als Embryoid Bodies (EBs) bezeichnet werden. Innerhalb der EBs durchlaufen die Stammzellen einen Prozess, der zumindest teilweise die Zelldifferenzierung während der Embryogenese nachbildet. Es kommt zur Entstehung einer äußeren endodermalen Schicht, gefolgt von Zellen mit ectodermalem Charakter, bis hin zu mesodermalen Zellen im Innern des EBs [20-23].

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob in Suspensionskultur durch den Zusatz geeigneter Faktoren die Einleitung der Differenzierung in Aggregaten unterdrückt werden kann.

Als Basismedium für diese Suspensionsversuche diente das, für die Feederzell-basierten Kulturen verwendete Medium, bestehend aus KnockOut DMEM (KO) Serumersatz (SR), Aminosäuren, β -Mercaptoethanol und dem basic fibroblast growth factor (bFGF), welcher als ein essentieller Faktor für den Erhalt der Pluripotenz von hESC identifiziert wurde [97-99]. Im Folgenden wird dieses Medium als Standardkulturmedium bezeichnet.



Abb. 9: Schematische Darstellung der Überführung undifferenzierter Stammzellkolonien in Suspension. Die Kolonien der undifferenzierten Stammzellen werden enzymatisch durch Kollagenase IV Behandlung von den Feederzellen getrennt und in Suspensionskultur überführt.

3.3.1. Zugabe von Transforming growth factor β 1

TGF β 1 wurde bereits als Zusatz für Feederzell-freie Kulturen beschrieben [100]. Das Vorkommen des Zytokins in Matrigel [75] und die Hypothese von Schuldiner et al. [101], wonach TGF β 1 zur Unterdrückung der Differenzierung von hES beiträgt, ließ erwarten dass, die Zugabe dieses Faktors einen positiven Einfluss auf den Erhalt der Pluripotenz haben könnte. Der Literatur folgend wurde die Zugabe von 0,1 ng / ml TGF β 1 zum Standardmedium getestet.

3.3.2. Zugabe von Hyper IL-6

In murinen embryonalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass durch die effektive Aktivierung des STAT3 Signalwegs über das Signaltransduktionsprotein gp130 ein pluripotenter Phänotyp erhalten werden kann [102]. Eine effektive Quervernetzung des Signaltransduktionsproteins gp130 kann durch die Zugabe des synthetischen Zytokins Hyper IL6, bestehend aus Interleukin 6 kovalent gebunden an die lösliche Untereinheit des Interleukin 6 Rezeptors, erreicht werden. Trotz publizierter Berichte, wonach eine STAT3 Aktivierung in pluripotenten Stammzellen von Mensch und Makakken keine Rolle für den Erhalt der Pluripotenz spielt [67, 103, 104], wurden basierend auf Informationen der kooperierenden Arbeitsgruppe von Prof. Itzkovitz-Eldor (Rambam Medical Center, Haifa, Israel) entsprechende Kulturexperimente durchgeführt. Experimente im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Itzkovitz-Eldor hatten nach diesen Informationen gezeigt, dass eine Zugabe von 100 pg / ml des synthetischen Zytokins zum Kulturmedium die Expansion undifferenzierter hESC in Suspension ermöglichte.

In den folgenden Versuchen wurde die Zugabe von 100 pg / ml zum Standardkulturmedium getestet.

Nach dem enzymatischen Ablösen der Zellkolonien mit Kollagenase IV wurden diese durch pipettieren mechanisch in kleinere Verbände aufgebrochen und in Suspension mit TGF β 1 oder HIL-6 supplementiertem Medium beziehungsweise in Kontrollen, d.h. in Standardkulturmedium ohne weitere Zusätze kultiviert. Die Beurteilung der Kulturen fand in diesen Experimenten ausschließlich lichtmikroskopisch statt.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Kulturen zeigten Aggregate von heterogener Größe und Struktur, die bereits nach 24 h in allen Medien größer als 200 μ m waren (Abb. 10). Die Struktur dieser Aggregate lässt vermuten, dass es zur Fusion mehrere Kolonien gekommen war. 96h nach Inokulation waren die Verbände in Aggregate verschiedener Größen zerfallen. Innerhalb der Aggregate konnte das Entstehen epithelialer bzw zystischer Strukturen beobachtet werden (Abb. 10). Zum Vergleich wurden Kolonien der undifferenzierten Zellen in Differenzierungsbedingungen überführt (2.2.1.3). Die entstandenen EBs zeigten 48 h nach

Einleitung der Differenzierung eine vergleichbare Morphologie (Abb. 11). Die beginnende Strukturbildung wurde als Zeichen der einsetzenden Differenzierung gewertet. Die Zugabe der Zytokine hatte bei lichtmikroskopischer Analyse keinen offensichtlichen Einfluss auf den Erhalt der Pluripotenz im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 10). Weitere Untersuchungen zur Zellproliferation oder Markergenexpression wurden daher nicht durchgeführt.

Neben der beginnenden Differenzierung in den entstandenen Aggregaten zeigte sich in diesen Experimenten, dass durch die Inokulation der Suspensionskulturen mit ganzen oder teilweise mechanisch zerkleinerten Zellaggregaten keine hinreichend kontrollierbaren und reproduzierbaren Bedingungen erreichbar waren. Die mechanische Zerkleinerung der abgelösten Kolonien ist schwer zu reproduzieren, was zu unterschiedlichen Startbedingungen führt. Eine Inokulation der Kulturen mit einer definierten Zellzahl und somit quantitative Aussagen zur eventuellen Zellproliferation waren auf diese Weise nicht möglich.

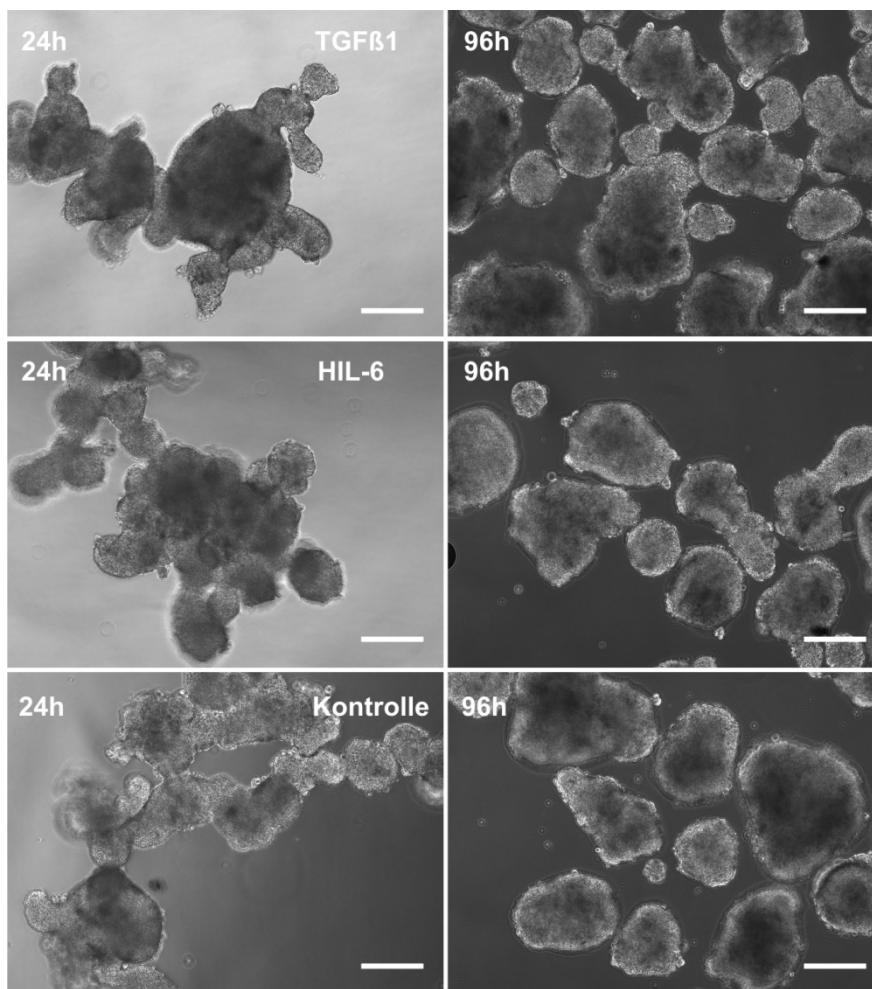


Abb. 10: Initiale Versuche zur Suspensionskultur undifferenzierter Primaten Stammzellen. Undifferenzierte MF12 Zellen wurden enzymatisch von den umgebenden Feederzellen abgelöst. Die erhaltenen Zellverbände wurden in Standardkulturmedium supplementiert mit TGFβ1, HIL-6 und Standardkulturmedium ohne Zusätze (Kontrolle) überführt. Skalierung 200µm.

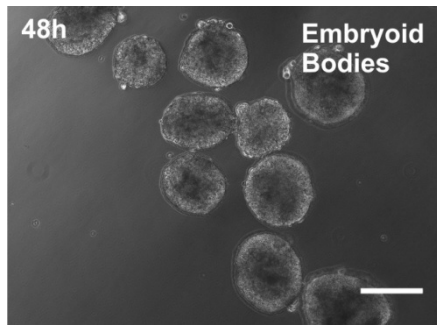


Abb. 11: Embryoid Bodies. MF12 Zellen 48 h nach Einleitung der Differenzierung über ein EB-basiertes Protokoll in serumhaltigem Medium. Skalierung 200µm.

3.4. Einzelzelldissoziation

Um eine reproduzierbare Inokulation von Prozessen zu erreichen, wurde neben den Experimenten zur Übertragung ganzer Kolonien in Suspensionskulturen an der Entwicklung einer Methode zur Einzelzelldissoziation vitaler pluripotenter Zellen gearbeitet.

Die Herausforderung bestand darin, dass hESC ausgesprochen sensitiv gegenüber der Dissoziation zu Einzelzellen sind. Die komplette Dissoziation führt zur Induktion von Apoptose und daher zu massivem Zelltod [105, 106]. Wie erwartet, konnte dieses Phänomen bei den hier verwendeten Primaten Zelllinien sowie den humanen iPSC und der Zelllinie HES-3 ebenfalls beobachtet werden.

Watanabe et al. konnten in 2007 [105] zeigen, dass die Inhibition der p160-Rho assoziiert coiled coil kinase (ROCK) durch Zugabe eines selektiven Kinase Inhibitors Y27632 (RI), das Überleben von hES Zellen nach enzymatischer Dissoziation mit porcinem Trypsin positiv beeinflusst. GTPasen der Rho Familie sind Teile intrazellulärer Signalwege und sind beteiligt an der Umwandlung ankommender Signale zu mechanischen Kräften, die bei Zell-Zell Kontakten, Mitose oder Migration eine Rolle spielen. Harb et al. konnten für mESC und hESC zeigen, dass Myosin II direkt durch ROCK beeinflusst wird und die Selbsterneuerung der pluripotenten Zellen auch ohne Zell-Zell Kontakt oder extrazelluläre Matrix bei RI Zugabe aufrechterhalten werden kann. Darüber hinaus könnte der Einfluss von RI auf Myosin II für den antiapoptotischen Effekt verantwortlich sein, da Myosin II bereits in verschiedenen tierischen Zelllinien mit Apoptose in Verbindung gebracht werden konnte [107].

Für eine schonende enzymatische Dissoziation in Einzelzellen wurden neben dem von Watanabe et al. verwendeten Trypsin weitere Methoden beschrieben. Ellerström et al [108] konnten zeigen, dass die Dissoziation mit TrypLE Select, einem rekombinanten Trypsinersatz, im Vergleich zu Trypsin, zu dreimal mehr Kolonien nach Vereinzeln führte. Des Weiteren wurde die erfolgreiche Einzelzelldissoziation von hESC mit Accutase, einer Mischung aus verschiedenen proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen, beschrieben

[109]. Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurde hier zunächst das von Ellerström et al. [108] beschriebenen TrypLE-basierte Protokoll verwendet und mit dem Rho Kinase Inhibitor kombiniert, um ein verbessertes Überleben der Einzelzellen zu ermöglichen.

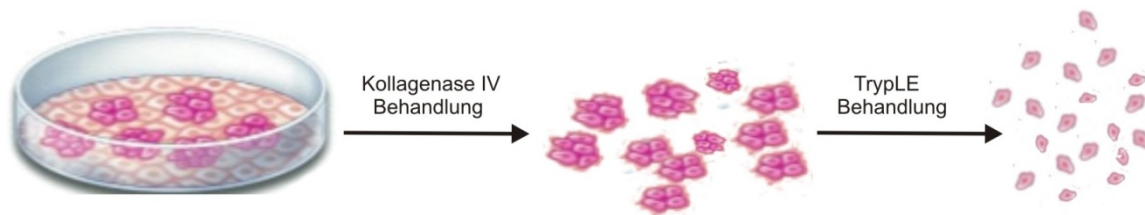


Abb. 12: Schematische Darstellung der Herstellung von Einzelzellsuspensionen mittels TrypLE. Unter Zugabe des Rho Kinase Inhibitors werden die Kolonien der undifferenzierten Stammzellen zunächst durch Kollagenase IV von den umgebenden Feederzellen gelöst. In einem weiteren Schritt werden die Zellverbände durch TrypLE zu Einzelzellen dissoziiert.

Die pluripotenten Zellen wurden zunächst mit Kollagenase IV von den Feederzellen getrennt und in einem weiteren Schritt mit TrypLE zu Einzelzellen dissoziiert. Nach Überführung der Einzelzellsuspensionen auf eine Unterlage von neuen Feederzellen bildeten sich Kolonien aus den RI supplementierten Ansätzen. Die entstandenen Kolonien konnten im Weiteren nach dem Standardprotokoll (Kollagenase IV Behandlung, Standardkulturmedium) expandiert werden.

Wurden die Zellen auf eine mit Gelatine beschichtete Zellkulturschale ausgesät, so bildet sich im Gegensatz zu den Feeder-basierten Kulturen ein Zellrasen aus (Abb. 13). Die Entwicklung Dissoziationsprotokolls war eine wichtige Vorarbeit für die Suspensionskulturen. Ausserdem war die etablierte Vereinzlung auch für die Transduktion pluripotenter Stammzellen von enormer Bedeutung. Der nach der Vereinzlung entstehende einschichtige Zellrasen ermöglichte die Etablierung eines neuen, sehr effizienten lentiviralen Transduktionsprotokolls. Dieses wurde für die Herstellung von Reporterzelllinien verwendet.

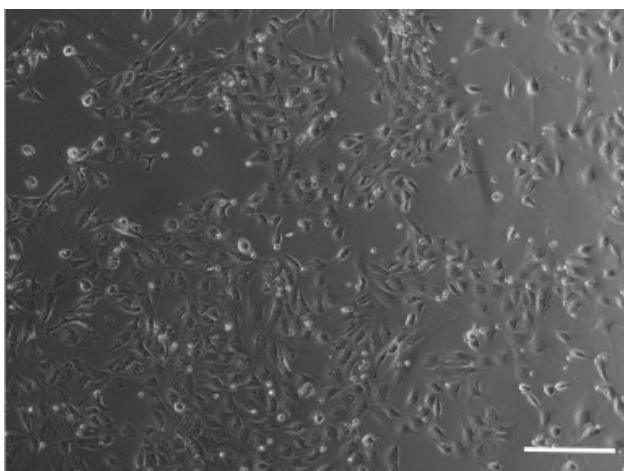


Abb. 13: Einschichtiger Zellrasen embryonaler Primaten Stammzellen (R366.4). Dissoziation zu Einzelzellen mit TrypLE und Überführung in Standardkulturmedium supplementiert mit 10 μ M RI auf Gelatine beschichtete Zellkulturschalen führt zu einschichtigen Kulturen der pluripotenten Zellen. Skalierung: 200 μ m

3.5. Herstellung von Reporterzelllinien zur vereinfachten Pluripotenzkontrolle

Stammzelllinien, die Reportergene unter der Kontrolle Zelltyp-spezifischer Promotoren tragen, stellen nicht nur ein wichtiges Werkzeug für die Aufreinigung verschiedener Stammzellderivate oder die Untersuchung von Mechanismen der Stammzelldifferenzierung dar, sondern ermöglichen auch eine unkomplizierte und direkte Beurteilung lebender Zellkulturen unabhängig von immunzytologischen Untersuchungen [110, 111].

Im Hinblick auf die Entwicklung von Kulturbedingungen für die Expansion undifferenzierter pluripotenter Zellen in Suspensionskultur war es ein Ziel dieser Arbeit, Reporterzelllinien herzustellen, die eine schnelle und verlässliche Analyse des Pluripotenzstatus kultivierter Stammzellen ermöglichen. Zur Beurteilung der Pluripotenz konnte eine von Gerrad et al. generierte Expressionskassette, bei der die Expression eines eGFP Reportergens vom Pluripotenz-assoziierten OCT4 Gen Promotor kontrolliert wird, verwendet werden [112]. Die Expressionskassette wurde von Dr. Wei Cui (Imperial College, London) zur Verfügung gestellt und in unserer Arbeitsgruppe über mehrere Klonierungsschritte wie in Abb. 14 dargestellt in einen Lentiviralen Vektor integriert [113]

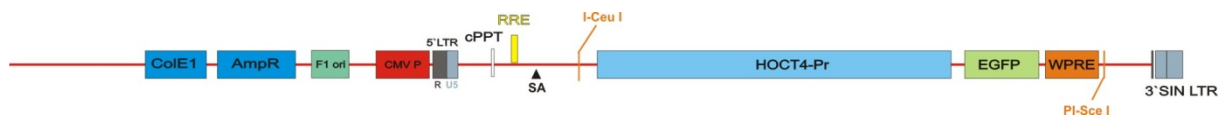


Abb. 14: Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors zum Transfer des hOCT4Pr eGFP Reporterkonstrukts. 11603bp AmpR – Ampicillinresistenz, ori – Startpunkt der Replikation, CMV-P – Promotor des Zytomegalovirus, LTR – long terminal repeats, RRV – Rev responsive element, WPRE – postranscriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus.

Die nach der Transduktion entstandenen Kolonien wurden mikroskopisch analysiert. (hiPS2 Abb. 15A, MF12 Zellen Abb. 15C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die eGFP Expression innerhalb der entstandenen relativ stark variierte (Abb. 15 B&D).

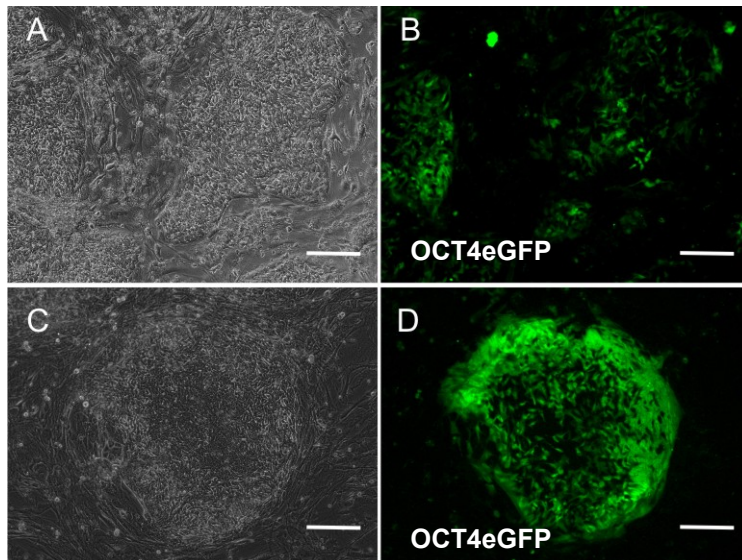


Abb. 15: Kolonien der undifferenzierten pluripotenten Stammzellen nach Transduktion. Die entstandenen Kolonien bestehen aus Zellen mit verschieden starker eGFP Expression (hiPS2 A&B, MF12 C&D). Skalierung: 200µm

Um die transgenen Zellen als Reportersystem verwenden zu können, wurden GFP positive Zellen mittels Fluoreszenz aktivierten Zellsortierens (FACS) und Einzelzellablage in 96 Well Platten übertragen. Hierbei wurde das zuvor etablierte Vereinzlungsprotokoll verwendet. Aus 480 abgelegten Zellen konnten für die embryonalen Primaten Stammzelllinien R366.4 und MF12 neun beziehungsweise sechs stabile Reporterzelllinien etabliert werden. Aus der Transduktion der hiPS2 gingen aus 384 drei stabile Reporterzelllinien hervor. Beispielhaft ist in Abb. 16 eine undifferenzierte Kolonie einer dieser Linien dargestellt. In der lichtmikroskopischen Darstellung (Abb. 16A) wird deutlich, dass die pluripotenten Zellen innerhalb der Kolonie eGFP exprimierten, während in den umgebenden Feederzellen keine Expression nachweisbar ist.

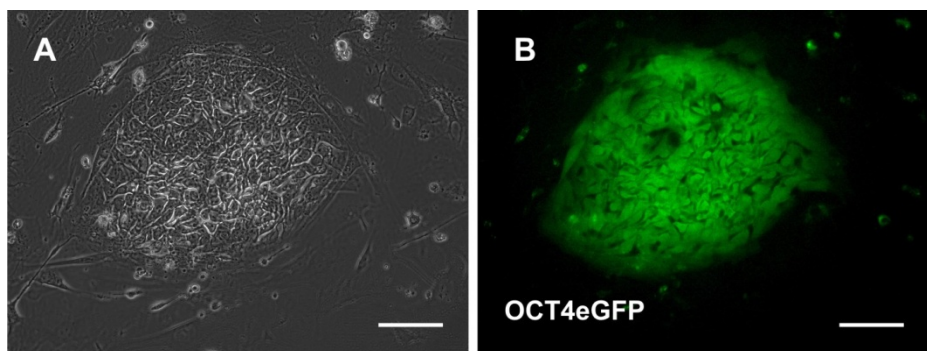


Abb. 16: hiPS2 OCT4eGFP Reporterzellen. Nach FACS Sorting konnten Einzelzellklone etabliert werden, die im Standardkultursystem Kolonien mit der typischen Morphologie undifferenzierter Zellen bildeten (A) und eine stabile eGFP Expression (B) zeigten. Skalierung: 200µm.

Für weitere Versuche wurde ein transgener Klon Linien mit einer hohen eGFP Expression ausgewählt, der bezüglich der Koloniemorphologie und des Kulturverhaltens keine Unterschiede zu den Ursprungszellen aufwies. Der entsprechende Klon hiPS2OCT4eGFP5 wurde wie im Folgenden beschrieben im Detail charakterisiert.

Zunächst wurde überprüft in wie weit die OCT4 Promotor-abhängige eGFP Expression mit der endogenen Expression des OCT4 Gens und der Expression des Pluripotenz assoziierten Oberflächenmarkers SSEA4 korreliert.

Durchflusszytometrische Analysen (Abb. 17) zeigten, dass in der Mehrheit der Zellen (~ 75 %), die den Oberflächenmarker SSEA4 exprimieren auch eGFP detektierbar ist. Als Kontrolle wurden untransduzierte hiPS2, mit der korrespondierenden Isotypenkontrolle behandelt. Die Kontrollzellen zeigten keine Signale in der Durchflusszytometrie.

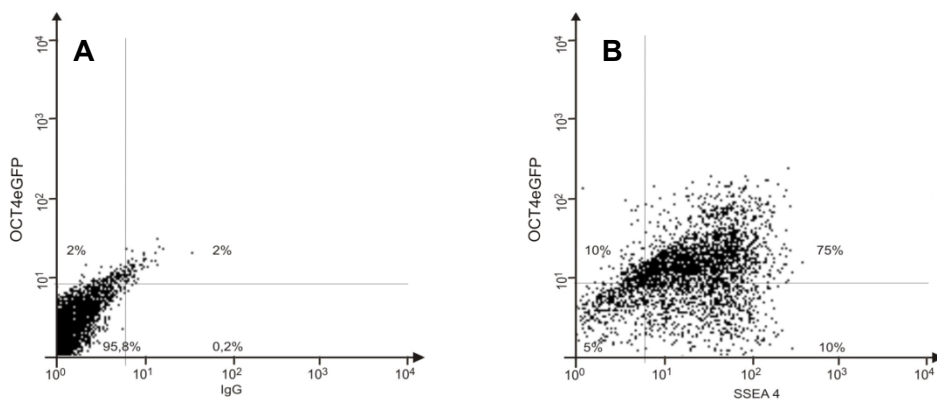


Abb. 17: Expression von SSEA4 und eGFP in hiPS2OCT4eGFP5. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigen, dass die Mehrheit der Zellen sowohl OCT4eGFP als auch den Stammzellmarker SSEA4 exprimieren.

Auf mRNA Ebene wurde die OCT4-Promotor abhängige eGFP Expression mit der endogenen Expression des OCT4-Gens abgeglichen. Dazu wurde während der Differenzierung überprüft, inwieweit die eGFP Expression entsprechend dem endogenen OCT4 herunter reguliert wird. Die Analyse erfolgte über qPCR normalisiert zur zellulären β -Actin Expression.

Die Einleitung der Differenzierung in EBs führte dazu, dass die Expression des endogenen OCT4 im zeitlichen Verlauf von Tag 0 bis Tag 4 um den Faktor ~ 3 abnahm. Für die OCT4 Promotor-abhängige eGFP Expression konnte für den gleichen Zeitraum eine Abnahme um den Faktor 9 gezeigt werden.

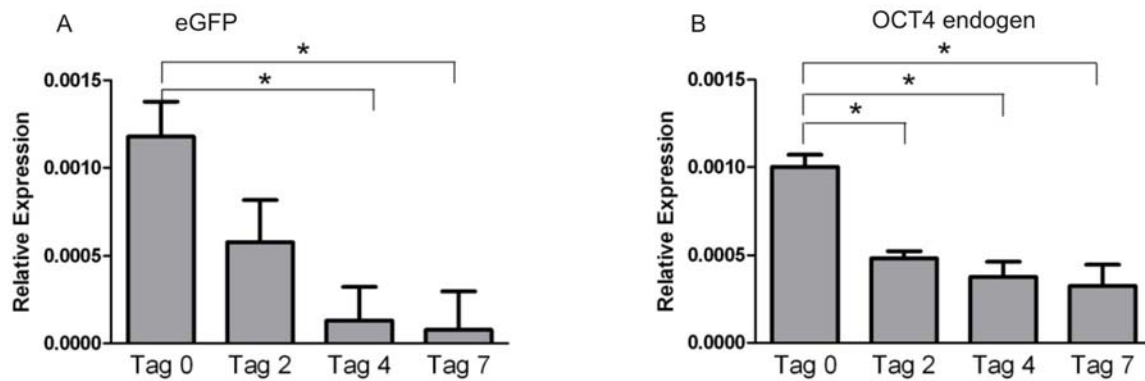


Abb. 18: Expression von OCT4-Promotor abhängigem eGFP und endogenem OCT4 während Differenzierung in EBs. qPCR Analysen der Expression von OCT4 abhängigem eGFP (A) und endogenem OCT4 (B) relativ zu β Actin von Tag 0 bis Tag 7 in hiPS Reporterzellen. * $p < 0,05$

Zur Korrelation der endogenen OCT4 Expression und der OCT4 Promotor-abhängigen eGFP Expression auf Einzelzellebene, wurden undifferenzierte Reporterzellen vereinzelt und als Zellrasen ausgesät. Um eine Differenzierung der Zellen zu induzieren, wurde die Kultur in Differenzierungsmedium durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Kulturen mit einem OCT4-spezifischen Antikörper gefärbt. Der größte Anteil der Zellen war zu diesem Zeitpunkt immer noch eGFP positiv und exprimierte gleichzeitig OCT4.(Abb. 19).

Die OCT4 Promotor-getriebene eGFP Expression ist daher ein geeigneter Surrogatmarker für die endogene OCT4-Gen Expression.

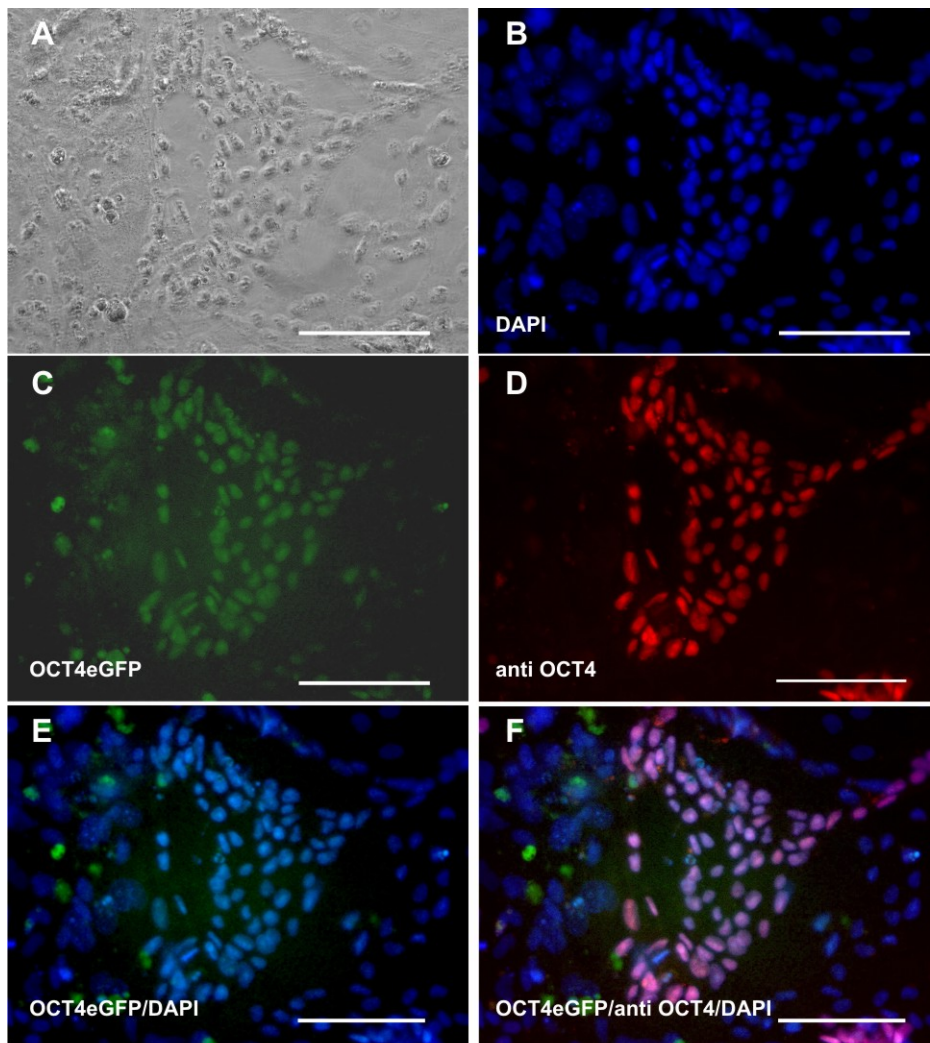


Abb. 19: hiPS2OCT4eGFP5 Differenzierungskulturen. Spezifische Antikörperfärbung der Zellen an Tag 1 zeigt, dass die OCT4eGFP Expression gut mit der endogenen OCT4 Expression korreliert. Lichtmikroskopische Darstellung der Kultur (A), Darstellung der Zellkerne mit DAPI (blau) (B), OCT4 Promotor abhängige eGFP Expression (grün, C), antiOCT4-Färbung (rot, D), Überlagerung der Fluoreszenzsignale eGFP und DAPI (E), eGFP, Anti OCT4 und DAPI (F). Skalierung: 100µm.

3.6. Etablierung von Suspensionskulturen durch Einzelzellinokulation

Die vorhergehenden Experimente (3.3) hatten gezeigt, dass die Initiation der Suspensionskulturen durch Inokulation ganzer Kolonien zu sehr inhomogenen Aggregaten führt. Deshalb wurden im Folgenden basierend auf dem etablierten Vereinzlungsprotokoll (3.4) Einzelzellsuspensionen als Ausgangskultur für die Expansion von pluripotenten Zellen in Suspension eingesetzt. Die Möglichkeit zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen sollte im Folgenden auf die angestrebten Suspensionskulturen angewendet werden. Um entstehende Aggregate in Suspensionskultur zum noch Passagieren effizienter und schonender zu vereinzeln, wurde das in (3.4) etablierte Protokoll weiter optimiert. Dazu wurden verschiedene proteolytische und kollagenolytische Enzyme getestet.

Verglichen wurde die Einzelzelldissoziation mittels Trypsin/EDTA, Accutase nach Bajpai et al. [109] und mit Kollagenase B nach Maltsev et al [114]. Kollagenase B war von Maltsev et al. für die enzymatische Dissoziation von Kardiomyozyten Arealen - differenziert aus mESC – verwendet worden.

Der Vergleich der Einzelzelldissoziation von hESC zeigte, dass mit dem Kollagenase-B-basierten Protokoll eine gute Vereinzlung der Aggregate bei gleichzeitiger höchster Zellvitalität erreicht werden konnte (Tabelle 11). Die Einzelzelldissoziation mit Kollagenase B wurde für die weiteren Experimente eingesetzt.

Tabelle 11: Vergleich der Lebendzellzahl 24 h nach Einzelzelldissoziation mit Trypsin/EDTA, Accutase und Kollagenase B. Lebendzellzahlbestimmung anhand Trypanblaufärbung

	Zellüberleben 24 h
Trypsin / EDTA	15 ±1,5%
Accutase	19,3±1,1%
Kollagenase B	40,3±4,3%

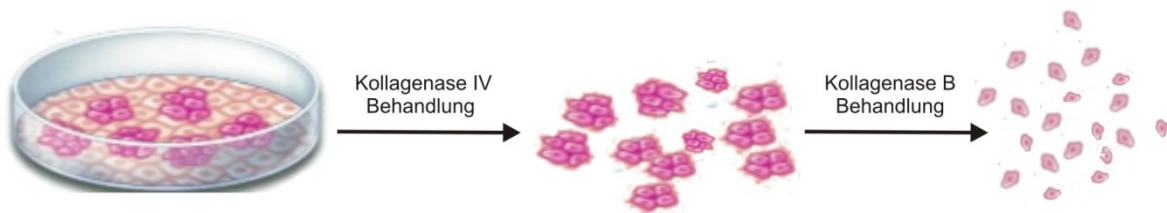


Abb. 20: Schematische Darstellung der Herstellung von Einzelzellsuspensionen mittels Kollagenase B. Unter Zugabe des Rho Kinase Inhibitors werden die Kolonien der undifferenzierten Stammzellen zunächst durch Kollagenase IV von den umgebenden Feederzellen gelöst. In einem weiteren Schritt werden die Zellverbände durch Kollagenase B zu Einzelzellen dissoziiert.

Um Zelllinien-abhängige Effekte auszuschließen, wurden die Experimente zum Zellüberleben nach Einzelzelldissoziation sowohl mit der Zelllinie hiPS2 als auch HES-3 Zellen durchgeführt. Die undifferenzierten Stammzellen wurden von den Feederzellen getrennt und enzymatisch vereinzelt. Die Aussaat erfolgte in verschiedene Medien jeweils in Gegenwart des Rho Kinase Inhibitors (RI) (10 μ M) im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen.

24 Stunden nach Inokulation wurden entstandene Aggregate vereinzelt und mittels Trypanblaufärbung der Anteil lebender Zellen bestimmt. Getestet wurden das Standardmedium ohne weitere Zusätze (KO-SR) und KnockOut DMEM mit FCS (KO-FCS) sowie das serumfreie definierte Medium mTeSR1 ([80]). Neben verschiedenen Wachstumsfaktoren wie TGF β und Aktivin A enthält mTeSR1 eine hohe bFGF Konzentration von 100 ng / ml im Vergleich zum Standardmedium (KO-SR; 8 ng / ml bFGF). Daher wurde als eine weitere Mediumvariante KO-SR mit einer erhöhten bFGF Konzentration von 100 ng / ml (KO-SR100) in die Experimente mit einbezogen. In jeden Testansatz wurden 1×10^5 Zellen / 3 ml Kulturmedium eingesetzt.

Ohne Zusatz von RI waren im Fall von hiPS2 in den KnockOut DMEM-basierten Medien nach 24 h nur noch maximal 6,5 % der inokulierten Zellen nachweisbar, während in mTeSR1 mit 24 % die beste Überlebensrate erzielt werden konnte (Abb. 21). Durch RI Zugabe konnten die Überlebensraten noch weiter verbessert werden. In den KnockOut DMEM-basierten Medien überlebten mit bis zu 24,8 % dreimal mehr Zellen die Dissoziation im Vergleich zu Kontrollen ohne Zusatz des Inhibitors. Die Supplementierung von mTeSR1 mit 10 μ M RI führte zu den höchsten Überlebensraten mit Zellzahlen in Höhe von 49 % der inokulierten Zellen.

In Experimenten mit hES Zellen konnten die Ergebnisse generell bestätigt werden. In mTeSR1 konnte eine Überlebensrate nach Einzelzelldissoziation von 36,6 % erreicht werden, die durch die Zugabe von RI nochmals auf 72,2 % gesteigert werden konnte.

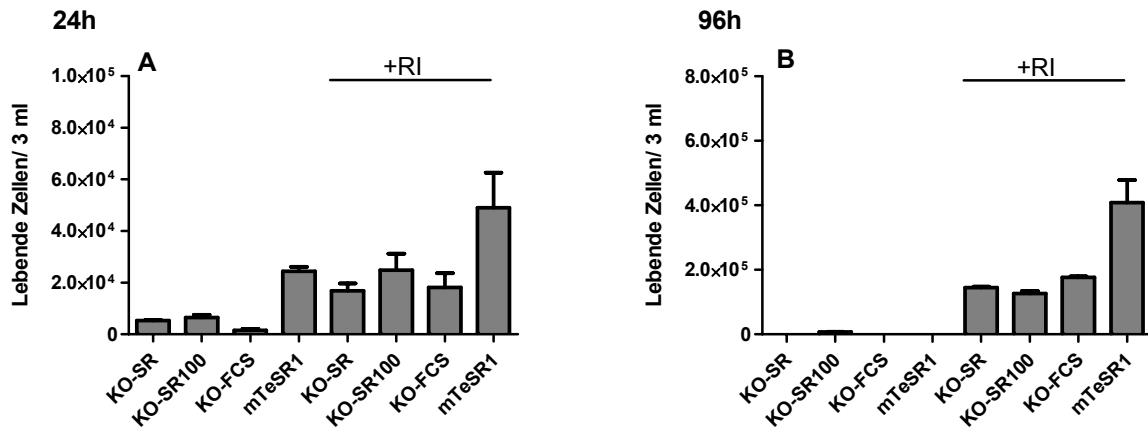


Abb. 21 Einfluss des verwendeten Mediums auf Zellüberleben und Proliferation nach Einzelzelldissoziation. Einzelzellsuspensionen von hiPS2 Zellen wurden in KnockOut DMEM basierten Medien (KO), mit Serumersatz (SR), supplementiert mit 100 ng / ml bFGF oder fötalem Kälberserum (FCS) sowie in mTeSR1 mit oder ohne Zugabe von 10 μ M RI überführt. Die Lebendzellzahl wurde 24 Stunden (A) und 96 Stunden (B) nach Inokulation anhand Trypanblaufärbung bestimmt.

Um die weitere Entwicklung der Zellen in den verschiedenen Medien beurteilen zu können, wurde nach 96 Stunden Kulturdauer erneut die Lebendzellzahl bestimmt (Abb. 21. C&D).

Für die hiPS konnten lediglich in den RI supplementierten Medien lebende Zellen nachgewiesen werden. In den KO-basierten Medien überlebten maximal 2×10^5 Zellen / 3 ml, während in mTeSR1 bis zu $4,7 \pm 1,6 \times 10^4$ Zellen / 3 ml nachweisbar waren.

Für die humanen ES Zellen konnte ebenfalls in mTeSR1 supplementiert mit 10 μ M RI die höchste Lebendzellzahl erzielt werden ($6,2 \pm 7,5 \times 10^4$ Zellen / 3 ml), während in den KO-basierten Medien und mTeSR ohne Zusatz des Inhibitors maximal 1×10^5 Zellen / 3 ml nachgewiesen werden konnten, was lediglich der Inokulationsdichte entsprach.

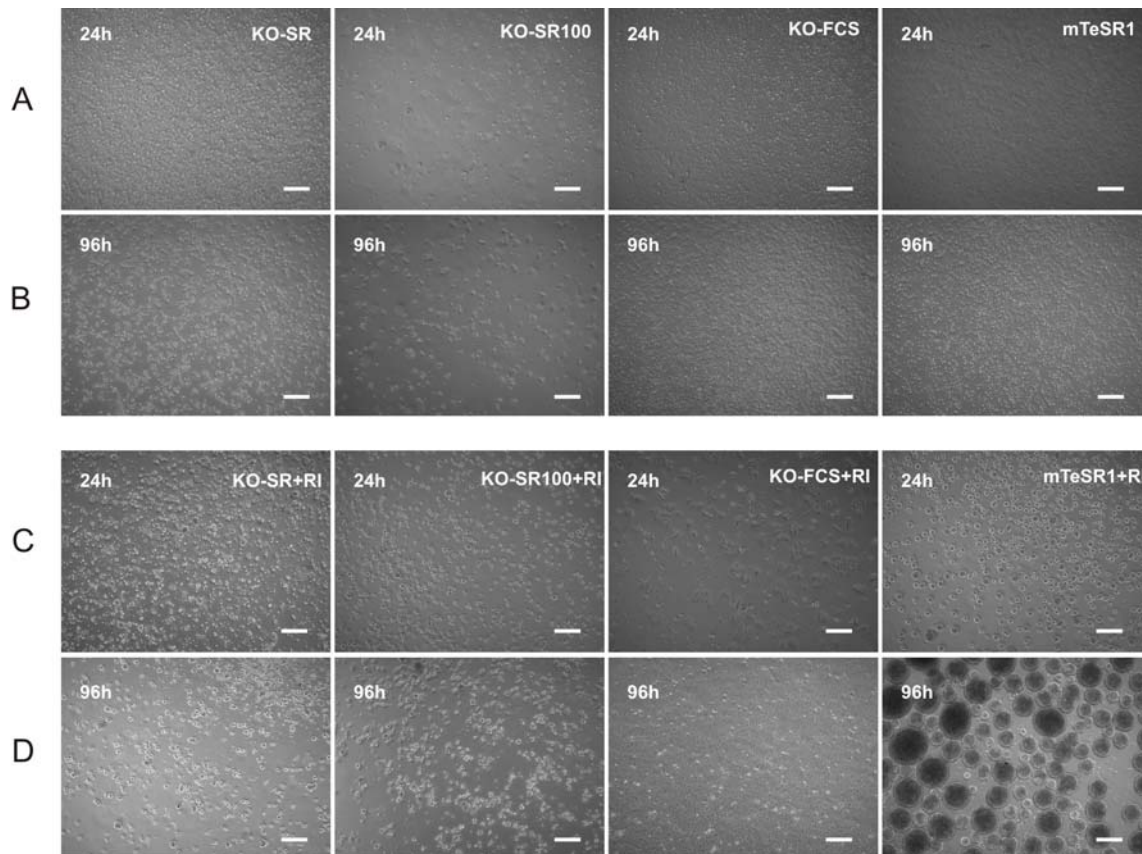


Abb. 22: Vergleich der Aggregatbildung von hiPS2 nach Einzelzellinokulation in verschiedenen Medien. 24 h (A) und 96 h (B) nach Einzelzellinokulation in KO-SR, KO-SR100, KO-FCS und mTeSR1 konnte keine Aggregatbildung ohne die Zugabe von RI beobachtet werden. Auch nach Zugabe von RI (C & D) konnte eine gleichmäßige Aggregatbildung nur in mTeSR1 + 10 μ M RI beobachtet werden. Skalierung 200 μ m

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der hiPS in den verschiedenen Medien mit und ohne Zugabe des Rho Kinase Inhibitors unterstreichen die Entwicklung der Zellzahlen (Abb. 22). Ohne den Zusatz des Inhibitors konnte keine Aggregatbildung beobachtet werden. Des Weiteren zeigten die Aufnahmen, dass der Zusatz des fetalen Kälberserums anstelle von Serumersatz zum Anheften der Zellen an die Oberfläche der Kulturschalen führte, und sich daher nicht für die Suspensionskulturen der pluripotenten Stammzellen eignet.

Zusammenfassend stellte sich eine Kombination aus mTeSR1 mit 10 μ M RI als am besten geeignet für die Expansion pluripotenter Zellen in Suspension heraus.

3.6.1. Zugabe von 6-bromoindirubin-3'-oxime

Arbeiten von Sato et al. [71] deuten darauf hin, dass auch 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO), ein pharmakologischer GSK3 Inhibitor über Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges zur Erhaltung der Pluripotenz beitragen kann. Um die Wirkung von BIO im etablierten Suspensionskultursystem zu testen, wurden hiPS in mTeSR1 + 10 μ M RI und 5 μ M BIO kultiviert.

Die Morphologie der resultierenden Aggregate war im Vergleich zur Kontrolle ohne BIO weniger einheitlich. Aggregate aus beiden Mediumvarianten wurden in das Feederzell-basierte System zurückgeführt. Ein direkter Vergleich zeigte, dass Kolonien aus mTeSR+RI eine einheitliche Morphologie und klaren Rand aufweisen, während die Zugabe von BIO eher zu Kolonien mit heterogener Morphologie und Struktur differenzierender Zellen führte (Abb. 23). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden weitere Analysen zur Zellproliferation und Markergenexpression nach BIO Zugabe nicht durchgeführt.

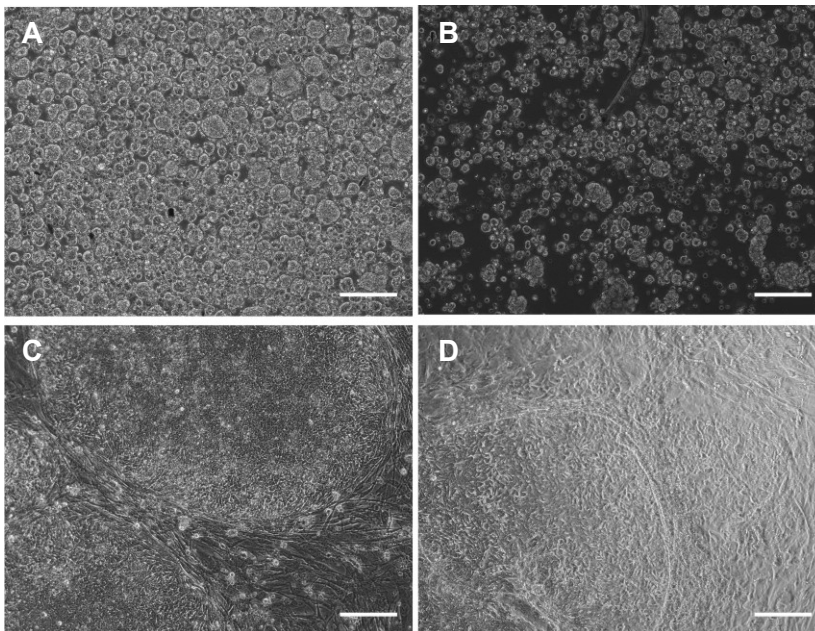


Abb. 23: Einfluss der Zugabe von 5 μ M BIO. hiPS2 Suspensionskulturen in mTeSR + RI 10 μ M (A) und in mTeSR + 5 μ M BIO + RI 10 μ M (B). Nach Rückführung in das Feederzell-basierte System bildeten die Aggregate aus den mTeSR + 10 μ M RI Kulturen Kolonien mit der Morphologie von undifferenzierten Zellen (C), während Aggregate aus den mTeSR + 5 μ M BIO + 10 μ M RI Kulturen zumeist Kolonien mit Strukturen die auf Differenzierung hindeuten, hervorbrachten (D). Skalierung 200 μ m

3.7. Charakterisierung der Suspensionskulturen

Zur Charakterisierung der Suspensionskulturen im Vergleich zu adhären Standardkulturen sind primär folgende Kriterien entscheidend: die langfristige Aufrechterhaltung der Pluripotenz sowie die Zellexpansion, d.h. die Zunahme der Zellzahl über die Zeit. Im Folgenden wurden verschiedene analytischen Methoden eingesetzt, um diese Kriterien zu überprüfen. Die Experimente zur Charakterisierung der Suspensionskulturen wurden in einem Maßstab von 3 ml in 6-Well Suspensionschalen durchgeführt. Ein Kriterium, welches zur Beurteilung der Suspensionskulturen herangezogen wurde, ist die Entwicklung der Aggregatgröße im Verlauf der Kultur. Für hES Zellen konnten Ng et al. beispielsweise zeigen, dass eine effiziente Differenzierung der Zellen in hematopoetische Zelltypen von der Größe der entstehenden EBs abhängig ist. Es wurden Zellzahlen von 300 – bis zu 10.000 Zellen pro EB getestet und es konnte gezeigt werden, dass erst ab einer Zellzahl von 500 Zellen pro EB zu einer effizienten Differenzierung kommt, wobei eine Zellzahl von 1000 Zellen pro EB die besten Ergebnisse lieferte [115]. Für die Suspensionskulturen undifferenzierter Stammzellen wurde daher davon ausgegangen, dass eine relativ kleine Aggregatgröße im Hinblick auf die zu vermutende geringe Tendenz zur Differenzierung von Vorteil ist. Die als Einzelzellsuspensionen inokulierten Zellen bildeten unter Suspensionskulturbedingungen Aggregate, deren Größe im Verlauf der Kulturen kontinuierlich zunahm. Bis zu Tag 4 wiesen die entstandenen Aggregate eine homogene Morphologie auf (Abb. 24). Eine Bestimmung der Zellzahl ergab ~170 Zellen pro Aggregat, was deutlich unter der von Ng et al. gefundenen Mindestzellzahl für eine effiziente Differenzierung liegt. Bei Weiterführung der Kulturen über Tag 4 hinaus nahm die Aggregatgröße weiter zu. Die entstandenen Aggregate verloren im Verlauf der Kultur von Tag 5 bis Tag 7 ihre homogene Morphologie. Erste Strukturen wurden beobachtet, die auf eine beginnende Differenzierung hinweisen könnten (Abb. 24). qPCR-basierte Expressionsanalysen bestätigten diese initiale Annahme allerdings nicht (3.7.2.5).

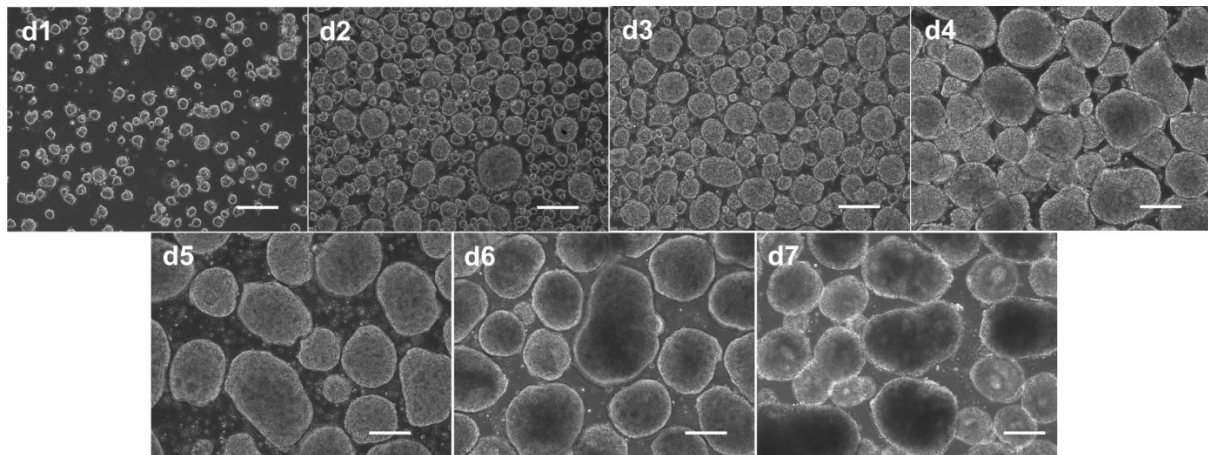


Abb. 24: Lichtmikroskopische Darstellung der Zellaggregate nach Einzelzellinokulation im Kulturverlauf. Dargestellt sind Aggregate zwischen Tag 1 und Tag 7 einer Suspensionskultur von hiPS2. Skalierung 200µm

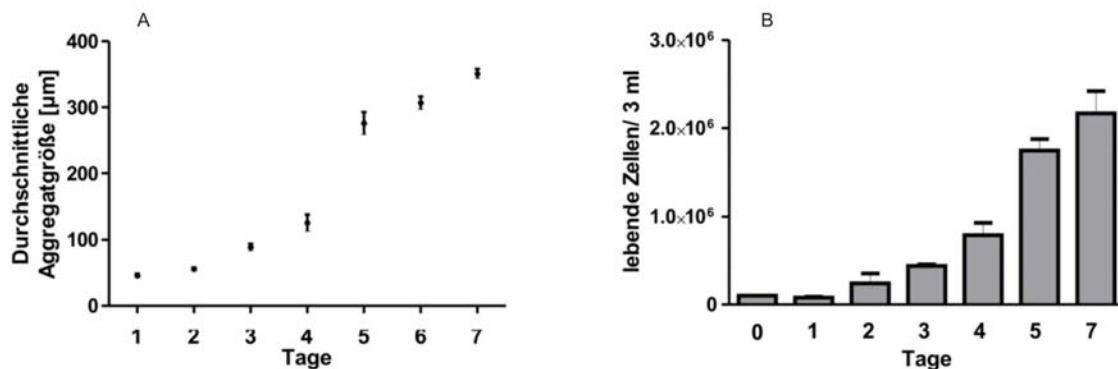


Abb. 25: Aggregatgrößen und Lebendzellzahl im Kulturverlauf. Zunahme der durchschnittlichen Aggregatgröße (A) und der Lebendzellzahl, ermittelt anhand Trypanblaufärbung (B) der hiPS2 bei einer Kulturdauer von 7 Tagen.

Die durchschnittliche Aggregatgröße und die Lebendzellzahl der hiPS wurden im Verlauf von Tag 1 bis Tag 7 näher charakterisiert. Im Verlauf der Kulturen stieg die durchschnittliche Aggregatgröße von 45 µm an Tag 1 auf 125 µm an Tag 4 und weiter auf 350 µm an Tag 7 an. An Tag 7 wurde eine Lebendzellzahl von $2,17 \pm 2,5 \times 10^5$ Zellen / 3 ml erhalten, dies entsprach einer 21 fachen Zellexpansion in 7 Tagen.

Um Tag 7 Aggregate enzymatisch vereinzeln zu können, mussten deutlich höhere mechanische Scherkräfte eingesetzt werden als bei einer Vereinzelnung an Tag 4 der Kultur. Vermutlich basierte die festere Struktur der Aggregate auf einem höheren Anteil extrazellulärer Matrix. Trotz der kontinuierlichen Zunahme der Aggregatgröße stellte sich, aufgrund der im Kulturverlauf zunehmenden schwierigen Vereinzelnung, Tag 4 als optimaler Zeitpunkt für das mit Einzelzelldissoziation verbundene Passagieren heraus.

Die gesammelten Ergebnisse führten letztendlich zu folgendem optimierten Prozess: Die vereinzelt Zellen wurden in mTeSR1 supplementiert mit 10 µM RI in Suspension kultiviert. Zum Passagieren wurden die Aggregate alle 4 Tage mittels Kollagenase B Behandlung in Einzelzellen dissoziiert und mit einer Inokulationsdichte von 1×10^5 Zellen / 3 ml erneut ausgesät.

3.7.1. Wachstumskinetik und Aggregatgrößenbestimmung in Suspensionskulturen

Detaillierte Analysen der Wachstumskinetiken wurden für die Suspensionskulturen der humanen ES und iPS Zellen im Kulturverlauf von Tag 0 bis Tag 4 durchgeführt. Wie schon in Kapitel 3.6 beschrieben führte die Einzelzelldissoziation zu in beträchtlichem Umfang zum Zelltod, so dass 24 h nach Dissoziation noch ca. 50 % der initial eingesetzten Zellzahl nachweisbar war.. In den folgenden Tagen konnte eine kontinuierliche signifikante Zunahme der Zellzahl gezeigt werden. Nach 4 Tagen konnte für die hiPS eine Zellzahl von $4,7 \pm 1,6 \times 10^5$ Zellen / 3 ml und für die hES eine Zellzahl von $6,3 \pm 0,75 \times 10^5$ Zellen / 3 ml ermittelt werden. Dies entspricht für die hiPS einer etwa 4 fachen und für die hES einer etwa 6 fachen Zellexpansion.

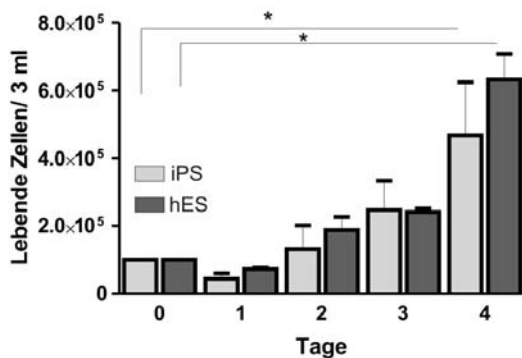


Abb. 26: Wachstumskinetik der humanen iPS bzw. humanen ES Zellen im Kulturverlauf. Bestimmung der Lebendzellzahl von Tag 0 bis Tag 4 anhand Trypanblaufärbung, n=3, * p<0.05

Eine Analyse der Aggregatgröße während der 4 Tage Suspensionskulturen zeigte, dass der prozentuale Anteil, der Aggregate, die kleiner als 50 µm waren, sich von 88,3% (hiPS) bzw. 88,7 % (hES) an Tag 1 der Kultur nach 0,13 % (hiPS) bzw. 0,7% (hES) an Tag 4 verschob. Gleichzeitig stieg prozentuale Anteil der Aggregate, die größer als 100 µm waren, von 0,2% (hiPS) bzw. 0,7 % (hES) an Tag 1 auf 73,3 % (hiPS) bzw. 74,5 % (hES) an Tag 4 an.

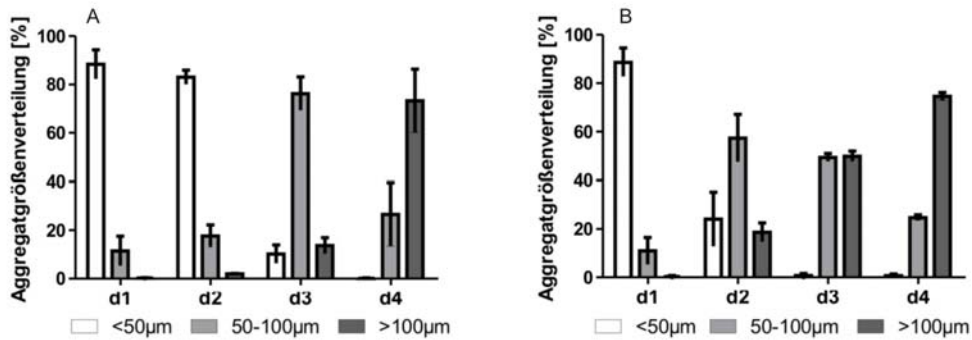


Abb. 27: Größenverteilung der Aggregate im Verlauf der Kultur. hiPS (A) und hESC (B), n=3

3.7.2. Untersuchung des Differenzierungsstatus

3.7.2.1. Nachweis der Pluripotenz

Die Kultivierung einer Reporterzelllinie (hiPS2OCT4eGFP5) in Suspensionskultur über 20 Passagen unter den etablierten Bedingungen zeigte, dass die entstandenen Aggregate sowohl an Tag 1 als auch an Tag 4 einer Passage eGFP exprimierten (Abb. 28). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Pluripotenz der Zellen während der Langzeitkultivierung in Suspension erhalten blieb.

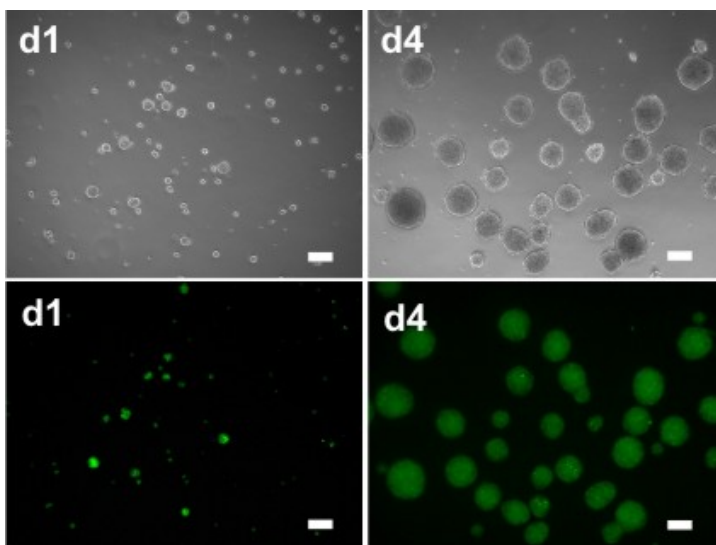


Abb. 28: hiPS2OCT4eGFP5 in Suspensionskultur. Expression des OCT4 Promotor-abhängigen eGFP zeigt den Erhalt der Pluripotenz nach 20 Passagen in Suspension. Skalierung: 200µm.

Zur detaillierten Untersuchung der etablierten Suspensionskulturen wurden sowohl auf mRNA als auch auf Protein Ebene die Expression von Pluripotenzmarkern untersucht und mit Feederzell-basierten Standardkulturen verglichen. Die Analysen auf Proteinebene wurden durchflusszytometrisch und immunzytologisch vorgenommen. Für den Vergleich auf transkriptioneller Ebene wurden qPCRs für Pluripotenz- und Differenzierungs-assoziierte Gene durchgeführt.

3.7.2.2. Durchflusszytometrische Analysen

Für durchflusszytometrische Analysen wurde die Oberflächenmarker SSEA4 und TRA 1-60 gewählt. Als Vergleichsprobe wurden humane iPS Zellen aus Feederzell-basierten Kulturen mitgeführt.

Nach 10 Passagen in Suspensionskultur waren an Tag 4 der Kultur 93 % der hiPS positiv für SSEA4 und 74 % positiv für TRA 1-60. Für die HES-3 Zellen konnten 94 % SSEA4 und 97 % TRA 1-60 positive Zellen gezeigt werden. In den Feederzell-basierten Kontrollen wurden 83 % SSEA 4 und für 69 % TRA 1-60 positive Zellen detektiert.

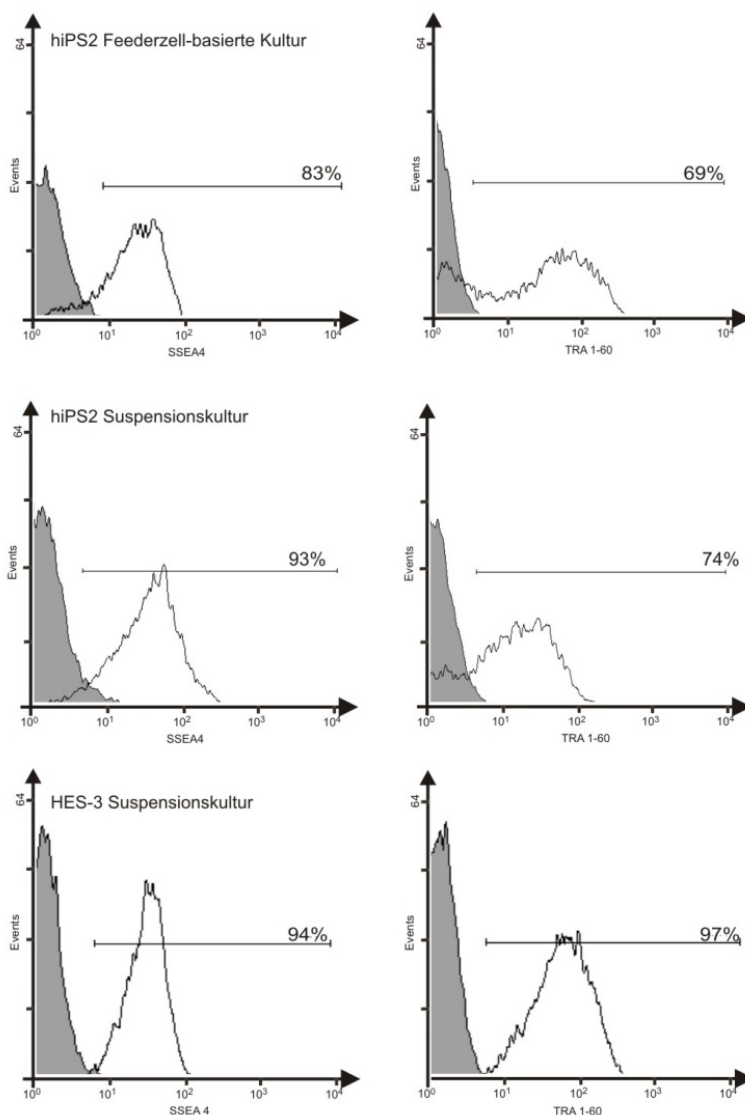


Abb. 29: Vergleich der Expression von SSEA4 und TRA 1-60 in Suspensionskulturen und Feederzell-basierten Kulturen. Anhand von durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde die Expression der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker SSEA 4 und TRA 1-60 in Tag 4 Suspensionskulturen von hiPS2 und HES-3 Zellen mit Feederzell-basierten hiPS2 Kulturen verglichen.

Mittels FACS wurde ausserdem die Expression von SSEA4 und OCT4 im Verlauf einer Passage von Tag 1 bis Tag 4 untersucht. Der Anteil OCT4 positiver Zellen veränderte sich nicht signifikant und lag zwischen 94,6 % an Tag 1 und 96,7 % an Tag 4. Zwischen 90,6 % und 86,7 % der Zellen waren positiv für SSEA4.

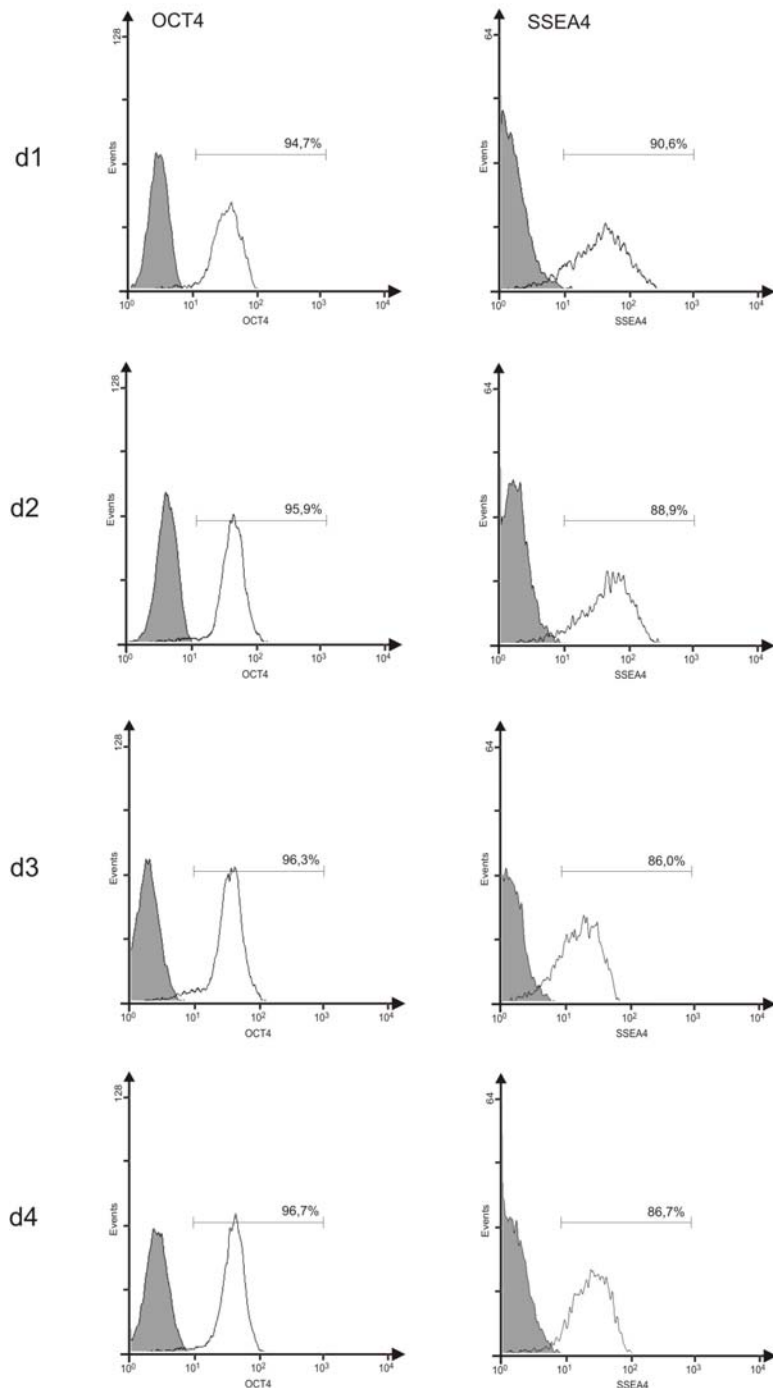


Abb. 30: SSEA4 und OCT4 Expression in Suspensionskulturen im Kulturverlauf. Anhand von durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde die Expression des Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker SSEA 4 und des Transkriptionsfaktors OCT4 in Suspensionskulturen im Kulturverlauf von Tag 1 bis Tag 4 untersucht.

3.7.2.3. Nachweis von Pluripotenzmarkern über Immunzytologie

Für die Immunzytologischen Untersuchungen wurden Aggregate aus Suspensionskulturen nach 10 Passagen in das Feederzell-basierte Kultursystem zurückgeführt. Nahezu alle überführten Aggregate bildeten Kolonien, die zumeist die typische Morphologie undifferenzierter Zellen zeigten. Die Kolonien wurden auf die Expression der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker SSEA4 und TRA 1-60 sowie des Transkriptionsfaktors OCT4 untersucht. Alle untersuchten Kolonien zeigten die Expression der untersuchten Pluripotenz-assoziierten Marker.

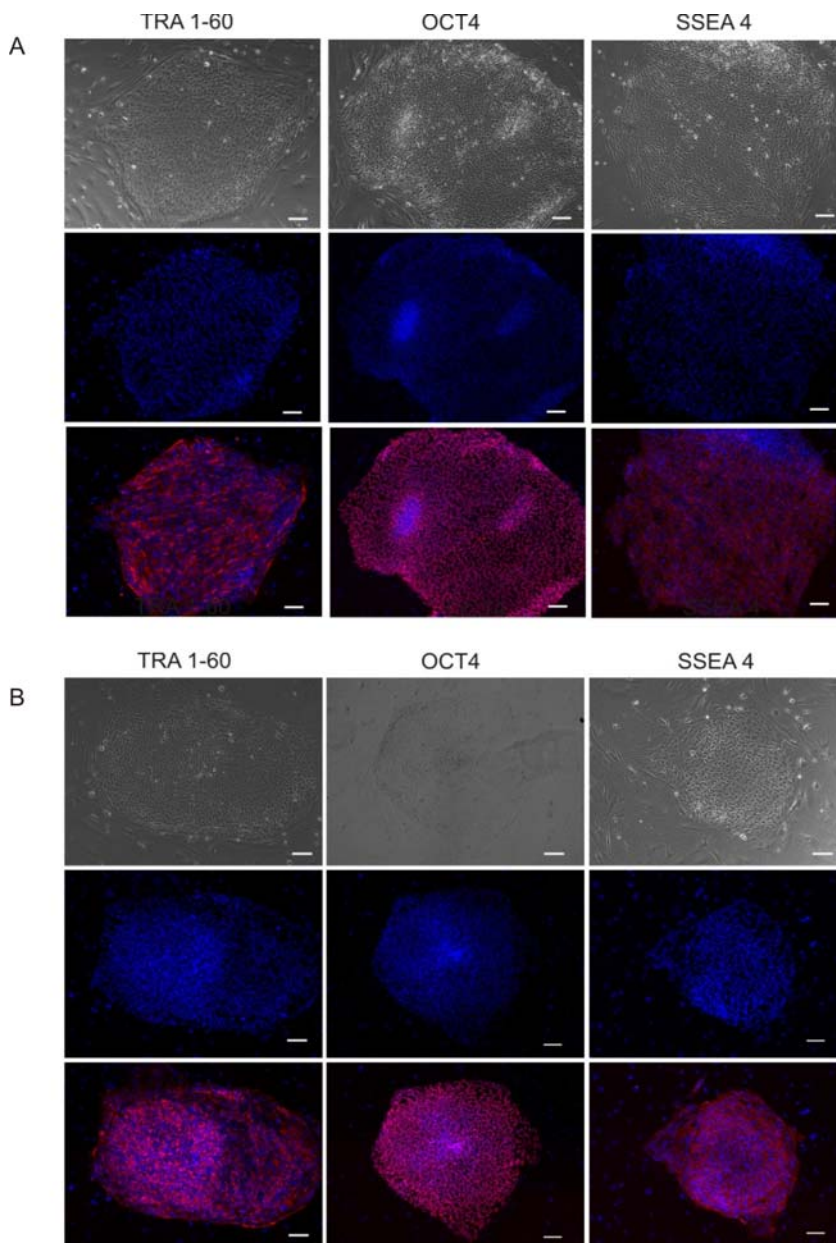


Abb. 31: Immunzytologische Analysen für SSEA4, TRA 1-60 und OCT4. hiPS2 (A) und HES-3 (B), die nach 10 Passagen in Suspensionskultur in das Feederzell-basierte System zurückgeführt wurden, bildeten Kolonien mit der Morphologie undifferenzierter Zellen. Immunzytologische Analysen dieser Kolonien zeigten positive Ergebnisse für SSEA4, TRA1-60 und OCT4. Spezifische Antikörperfärbungen rot, Zellkerndarstellung DAPI (blau). Skalierung: 200µm.

3.7.2.4. Expressionsanalysen mittels quantitativer Real Time PCR

Auf transkriptioneller Ebene wurden qPCRs für NANOG, OCT4 und RONIN [116] (Tabelle 4) durchgeführt. Um sicherzustellen, dass tatsächlich die Expression der endogenen Faktoren detektiert wird, wurden die Primersequenzen so gewählt, die Primer nicht an den zur Reprogrammierung verwendeten Transgenen (OCT4, NANOG) binden. Als frühe Differenzierungsmarker wurden SOX1 (Ectoderm), SOX17 (Endoderm) und BRACHYURY (Mesoderm) gewählt.

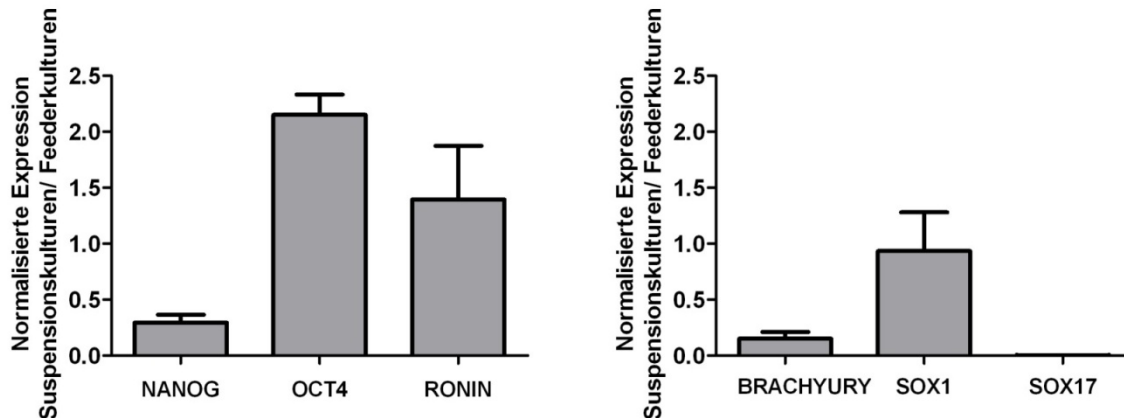


Abb. 32: Expressionsanalysen von Pluripotenz-assoziierten und Differenzierungs-assoziierten Markern. qPCR Untersuchungen der Expression der Pluripotenz-assoziierten Marker NANOG, OCT4 und RONIN und der frühen Differenzierungsmarkern BRACHYURY, SOX1 und SOX17 in hiPS2 Suspensionskulturen in Relation zur Expression in hiPS2 Feederzell-basierten Kulturen.

Für die Transkriptionsfaktoren OCT4 und RONIN konnte in Suspensionskultur eine Faktor 2,15 bzw. 2,19 erhöhte Expression gezeigt werden, während die Expression von NANOG leicht verringert war. Die Expression des frühen Differenzierungsmarker SOX1 war vergleichbar, während die Expression des mesodermalen Markers BRACHYURY und des endodermalen Markers SOX17 niedriger war als in Feederzell-basierten Kulturen.

3.7.2.5. Expressionsanalysen mittels StellArrays

Das System des StellArrays (<http://array.lonza.com/stellarrays/>) ermöglicht Expressionsanalysen im 96 Well Format und somit eine parallele quantitative Analyse einer relativ großen Anzahl relevanter Gene. Die verwendeten Arrays beinhalten sowohl Pluripotenz- wie auch Differenzierungs-assoziierte Gene. Für die Arrays wurde cDNAs von 3 verschiedenen hiPS Linien (hiPS1, hiPS2 und hiPS2OCT4eGFP5) und humanen ES Zellen sowie cDNA verschiedener Endothelzellisolate und humaner Vorhautfibroblasten eingesetzt. Die erhaltenen Ct Werte wurden gegeneinander aufgetragen und mit Hilfe der linearen Regression und dem errechneten Korrelationskoeffizienten R^2 verglichen. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten sind in Abb. 33 zusammengefasst.

Zur Analyse der erhaltenen Daten wurden jeweils verschiedene Gruppen miteinander verglichen. In Gruppe 1 erfolgte ein Abgleich der verschiedenen Endothelzellisolate untereinander. Gruppe 2 beinhaltet den Vergleich der verschiedenen hiPS Zelllinien im gleichen Kultursystem. In Gruppe 3 wurden hiPS Linien mit hESC im gleichen Kultursystem verglichen. Gruppe 4 zeigt den Vergleich von kombinierten Werten der hiPS Linien und hESC aus Suspensionskulturen gegen die kombinierten Werte der hiPS Linien und hESC im Feederzell-basierten Kultursystem. In Gruppe 5 und 6 wurden die verschiedenen Endothelzellisolate bzw. die humanen Vorhautfibroblasten gegen hiPS / hESC verglichen.

Die Mittelwerte aus den Korrelationskoeffizienten der einzelnen Gruppen sind graphisch in (Abb. 33 B) dargestellt.

Der mittlere R^2 von 0,97 in Gruppe 1 zeigt, dass sich die Expressionsmuster der verwendeten Endothelzellisolate für die untersuchten Gene offensichtlich nicht unterscheiden. Wiederholte Messungen von cDNA aus der gleichen RNA Präparation, lieferten Werte zwischen 0,99 und 0,95. Die Abweichungen, die sich für die verschiedenen Endothelzellisolate ergaben, liegen damit im technisch-bedingten Schwankungsbereich der verwendeten Arrays.

Vergleiche der verschiedenen iPS Klone untereinander bzw. mit humanen ES Zellen liefern einen Koeffizienten von 0,85 bzw. 0,80. Die Expression der untersuchten Gene ist in diesen Gruppen sehr ähnlich. Der Vergleich zwischen Suspensionskulturen und Feederzell-basierten Kulturen ergab einen etwas niedrigeren R^2 von 0,69. Im Gegensatz dazu ergab der Vergleich der verwendeten pluripotenten Zellen mit den Endothelzellisolaten bzw. mit den humanen Vorhautfibroblasten lediglich einen R^2 von 0,15 bzw. 0,1.

Exemplarisch sind in Abb. 34 Scatterplots aus Gruppe 2,3, 4 und 5 dargestellt. Hier wird ebenfalls deutlich, dass die Unterschiede, die sich im Expressionsmuster zwischen Zellen aus Suspensionskulturen und Zellen aus Feederzell-basierten Kulturen in der gleichen Größenordnung bewegen wie auch bei Vergleichen von hiPS mit hESC.

A

	iPS2 FBAK	iPS 1 FBAK	iPS GFP5 FBAK	hES FBAK	iPS2 Suspension	iPS 1 Suspension	iPS GFP 5 Suspension	hES Suspension	EC Isolation I	EC Isolation II	EC Isolation III	hVF
iPS2 FBAK												
iPS 1 FBAK	0.9											
iPS GFP5 FBAK	0.88	0.88										
hES FBAK	0.68	0.81	0.78									
iPS2 Suspension	0.59	0.6	0.62	0.72								
iPS 1 Suspension	0.62	0.68	0.64	0.82	0.85							
iPS GFP 5 Suspension	0.6	0.6	0.58	0.72	0.78	0.85						
hES Ssuspension	0.61	0.66	0.6	0.8	0.8	0.89	0.89					
EC Isolation I	0.13	0.16	0.15	0.15	0.16	0.15	0.18	0.14				
EC Isolation II	0.1	0.14	0.13	0.15	0.15	0.14	0.21	0.14	0.96			
EC Isolation III	0.15	0.18	0.17	0.17	0.14	0.14	0.19	0.17	0.98	0.98		
hVF	0.14	0.14	0.12	0.12	0.1	0.08	0.08	0.05	0.33	0.32	0.29	

Gruppe 1: verschiedene Endothelzellisolationen
Gruppe 2: verschiedene iPS Klone im gleichen Kultursystem
Gruppe 3: verschiedene iPS Klone gegen hES im gleichen Kultursystem
Gruppe 4: iPS/hES (n=4) Suspension gegen iPS/hES (n=4) Feederbasierte Kultur
Gruppe 5: EC Isolationen (n=3) gegen iPS/hES (n=4)
Gruppe 6: human Vorhautfibroblasten (n=1) gegen iPS/hES (n=4)

B

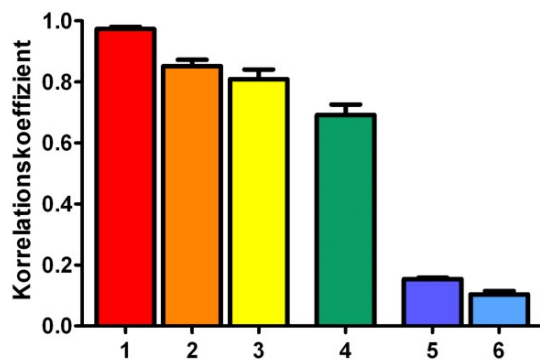


Abb. 33: qPCR Untersuchung von 96 Genen, assoziiert mit Pluripotenz oder Differenzierung mittels StellArrays. Analyse von 3 verschiedenen hiPS Linien und einer hESC Linie, die in Suspension und im Feederzell-basierten System kultiviert wurden. Die Expressionsmuster der untersuchten Zellen wurden zum Einen untereinander verglichen und des Weiteren mit den Expressionsmustern von drei verschiedenen Endothelzellisolaten sowie adulten Fibroblasten. Die berechneten linearen Korrelationskoeffizienten aus jedem Vergleich basierend auf den erhaltenen Ct Werten aller 96 Gene dienen als Maß der Ähnlichkeit und sind in (A) und zusammengefasst als Balkendiagramm in (B) dargestellt.

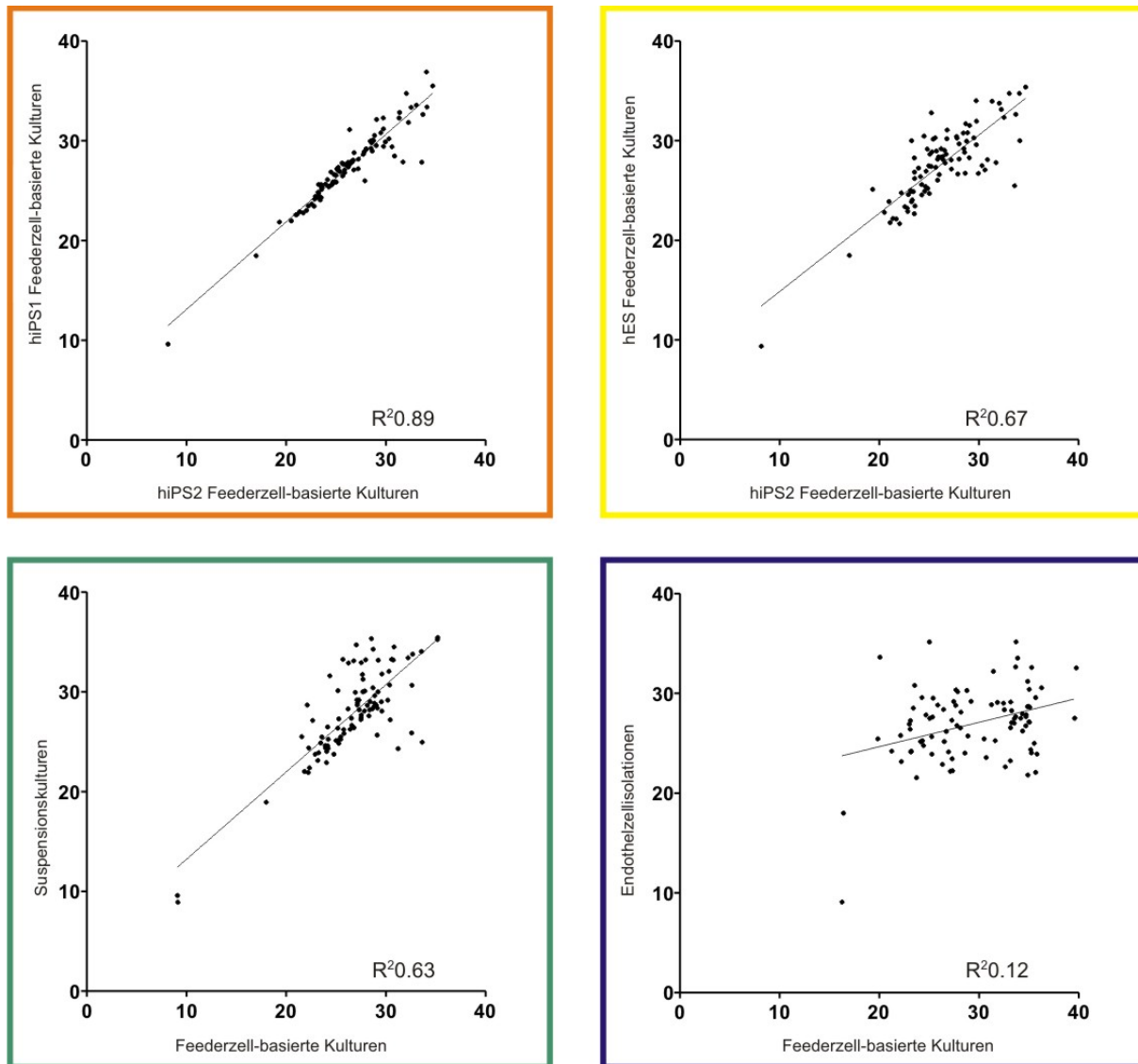


Abb. 34: Scatterplot Darstellung ausgewählter Vergleiche aus Abb. 33 mit zugehörigen Korrelationskoeffizienten R^2 .

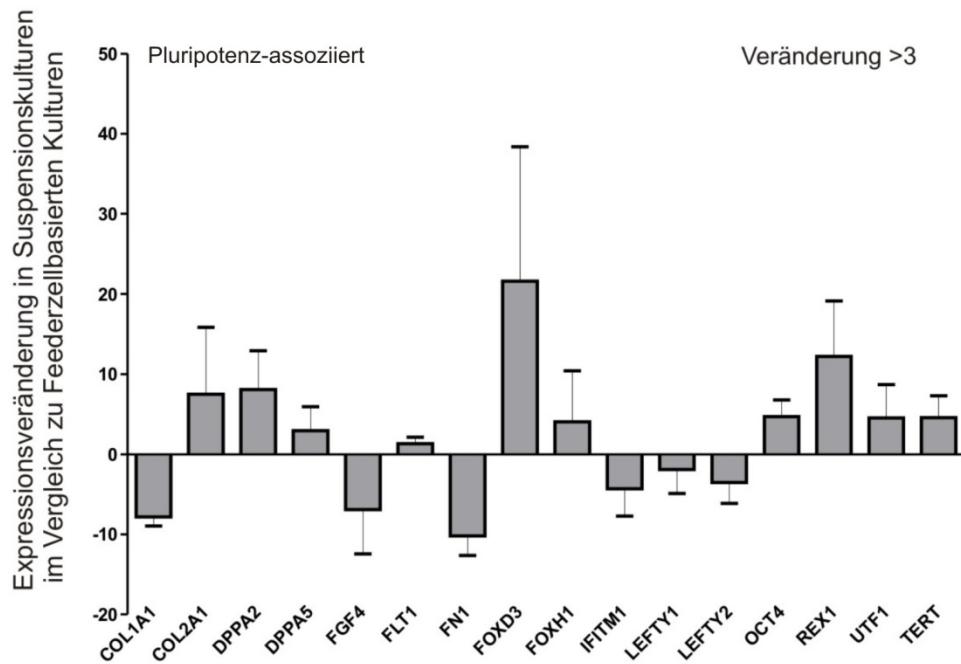
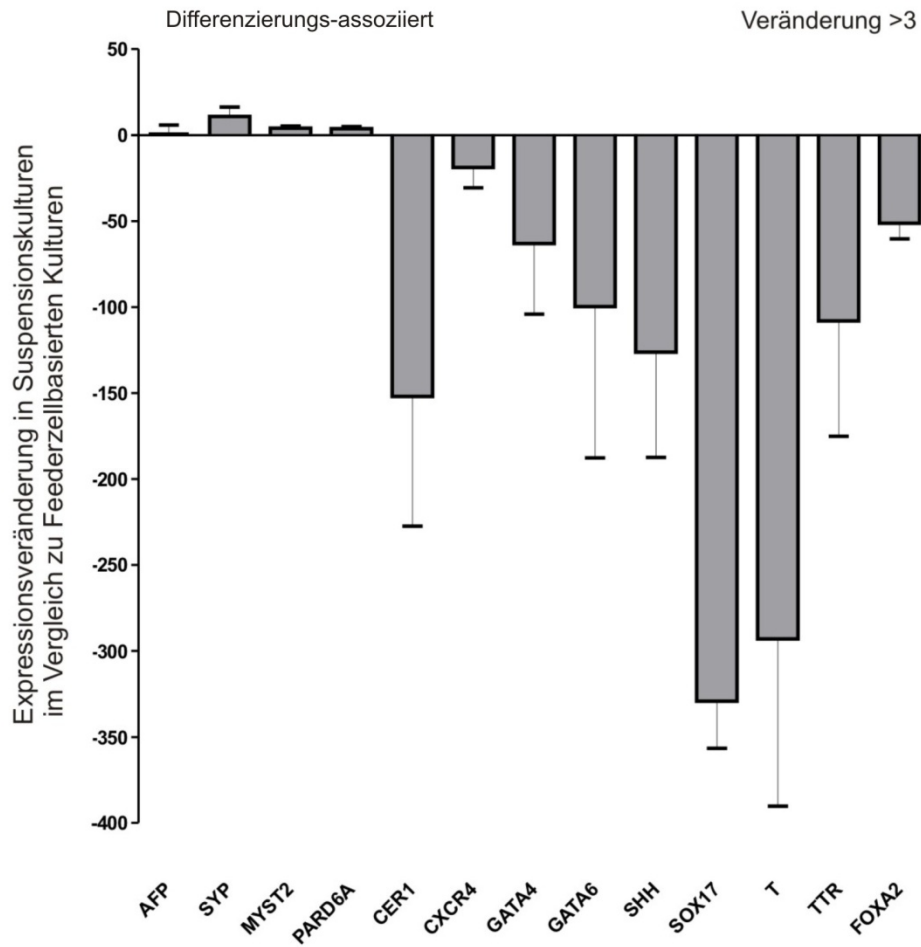
Um eine detailliertere Aussage zur Expression der untersuchten Gene treffen zu können, wurden die erhaltenen Daten mit Hilfe eines Algorithmus, dem Global Pattern Recognition (GPR) data analysis tool (Bar Harbor Biotechnology, USA) [117] analysiert. Die GPR Software normalisiert die Daten eines jeden Gens mit den Daten aller anderen Gene und macht daher eine eventuell problematische Normalisierung auf ein einzelnes Housekeeping Gen überflüssig.

Für die vergleichende Analyse der Genexpressionsdaten wurden darüber hinaus 4 Gruppen gebildet. Zum Einen wurde unterschieden in Pluripotenz-assoziierte und Differenzierungs-assoziierte Gene, zum Anderen wurde weiter differenziert in Gene, die eine Veränderung der Expression um mehr als das 3 fache zeigten und Gene deren Expression sich um weniger als Faktor 3 unterschieden.

In der Gruppe der Differenzierungs-assoziierten Gene, die sich um mehr als Faktor 3 verändern, wurden 4 Gene identifiziert - AFP, SYP, MYST2 und PARD6A - die in den Suspensionskulturen höher exprimiert waren. 9 Gene - CER1, CXCR4, GATA4, GATA6, SHH, SOX17,T, TTR, FOXA2 - waren im Vergleich zu Feederzell-basierten Kulturen bis zu Faktor 350 (SOX17) schwächer exprimiert.

Die Expression von 16 Pluripotenz-assoziierten Genen zeigte eine Veränderung um mehr als Faktor 3. Zehn der untersuchten Gene zeigten eine höhere Expression in den Suspensionskulturen, als in den Feederzell-basierten Kulturen. Sechs der untersuchten Gene zeigten eine geringere Expression in Suspension. Die Pluripotenz-assoziierten Gene OCT4 und REX1 zeigten eine höhere Expression in den Suspensionskulturen, während NANOG und SOX2 sehr ähnlich exprimiert waren mit einer Veränderung in der Expression ≤ 3 .

Die Ergebnisse für die Expression von OCT4 und NANOG sowie die geringere Expression der mesendodermalen Marker (SOX17, BRACHYURY) die mittels der StellArrays nachgewiesen wurden, bestätigen die Ergebnisse der herkömmlichen qPCR. Alle weiteren auf dem StellArray repräsentierten Gene (67) zeigten Unterschiede im Expressionslevel, $< \text{Faktor } 3$.



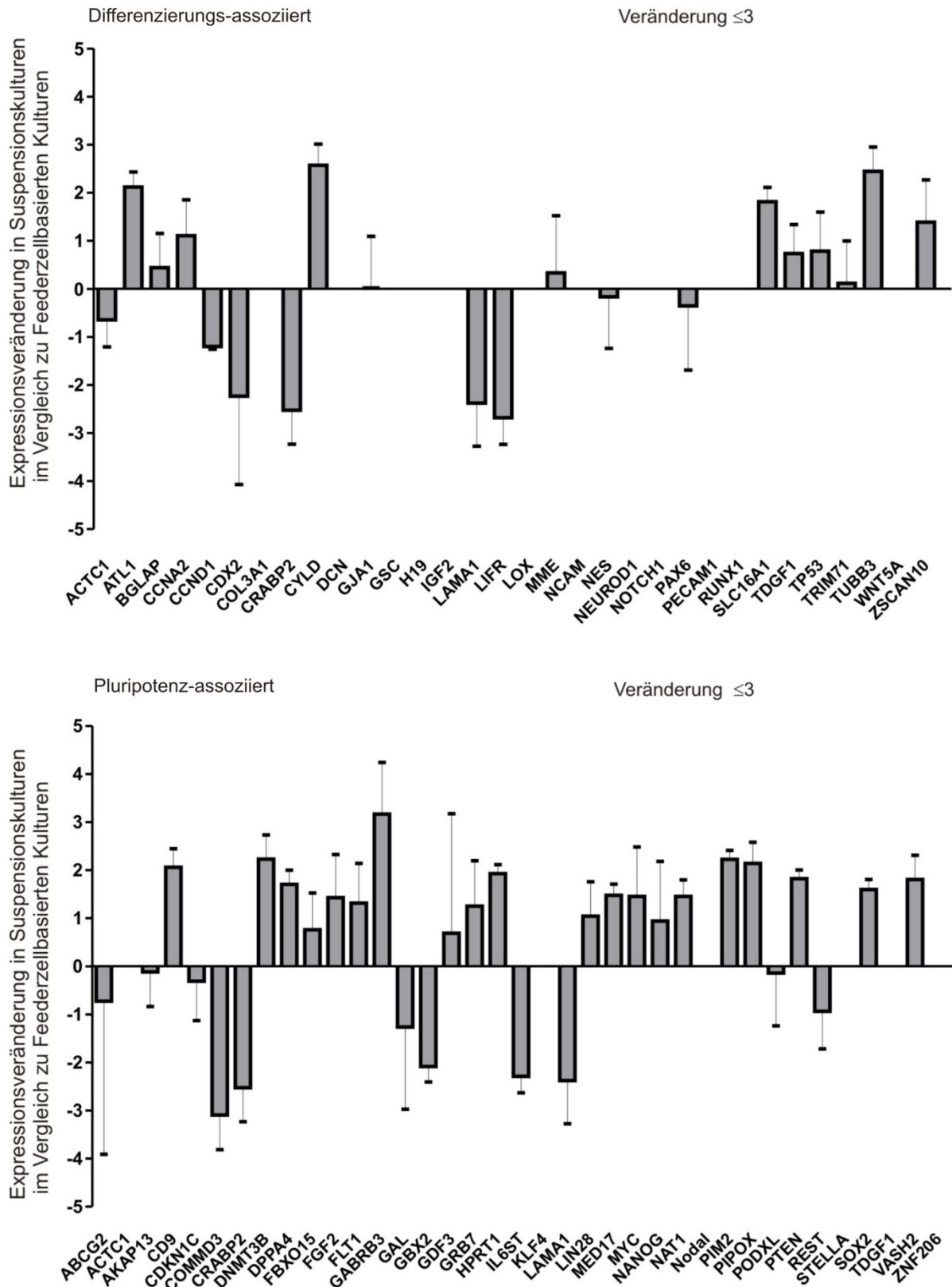


Abb. 35: Expressionsunterschiede in Suspensions- und Feederzell-basierten Kulturen. Die aus den StellArray Analysen erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Global Pattern Recognition (GPR) data analysis tool (Bar Harbor Biotechnology, USA) analysiert. Analytierte Gene wurden basierend auf dem Unterschied im Expressionslevel zwischen Suspensions- und Feederzell-basierten Kulturen ($\Delta \leq 3$ und $\Delta > 3$) sowie in Differenzierungs- und Pluripotenzassoziierte Gene eingeteilt.

Für die Untersuchung der Genexpression im Verlauf der Suspensionskulturen wurden mittels StellArrays Zellen an Tag 2, 4, 5 und 7 der Suspensionskulturen analysiert und verglichen. Für diese Vergleiche wurden Arrays eingesetzt, die eine begrenzte Anzahl von 32 Genen umfassen, wobei relevante Gene wie z.B. OCT4, NANOG, REX 1, SOX17 und BRACHYURY vertreten sind. Diese vergleichenden Untersuchungen zeigten keine relevanten Unterschiede in der Expression der Pluripotenz-assoziierten und Differenzierungs-assoziierten Gene zwischen Tag 2 und Tag 4 bzw. Tag 2 und Tag 7 der Suspensionskulturen (Tabelle 12). Scatterplots der Vergleiche zwischen Tag 2 und Tag 4, Tag 2 und Tag 5, Tag 2 und Tag 7 und die aus der linearen Regression resultierenden Korrelationskoeffizienten R^2 von 0,96 machen die große Ähnlichkeit der Genexpression deutlich.

Tabelle 12: Expressionsanalysen mittels StellArrays (32) an Tag 2, Tag 4 und Tag 7 der Suspensionskulturen.

	d2 vs d4	
Gen	Fold Change	p-Value
UTF1	2,66	0,0943
COL2A1	2,11	0,1771
DNMT3B	-1,5	0,2042
LIN28	-1,63	0,2128
TDGF1	1,41	0,2359
LIFR	-1,42	0,2587
FLT1	-1,93	0,2615
PODXL	-1,16	0,2803
TERT	1,21	0,3305
GDF3	1,01	0,3339
NANOG	1,17	0,3344
WNT5A	1,08	0,34
CD9	-8,15	0,3488
REST	-1,01	0,3498
HAND1	1,2	0,3513
EOMES	-2,01	0,3529
FGF4	1,69	0,3548
Hs18s	1,03	0,3742
SOX2	1,37	0,3944
POU5F1	-1,52	0,4135
GATA6	-1,91	0,4963
FOXA2	-1,01	0,5158
SOX17	-3,23	0,527
CXCR4	-1,56	0,5586
CER1	-1,81	0,5998
PAX6	-1,18	0,7188
GATA4	-1,66	0,7671
HSGenomic	NaN	NaN
ZFP42	NaN	NaN
T	NaN	NaN
CDX2	NaN	NaN
SHH	NaN	NaN

	d2 vs d7	
Gen	Fold Change	p-Value
UTF1	3,94	0,0397
SOX2	1,12	0,1167
DNMT3B	-1,71	0,1248
COL2A1	1,81	0,1323
FGF4	5,69	0,133
GDF3	-2,03	0,1438
NANOG	1,13	0,1704
WNT5A	1,19	0,1717
FOXA2	-3,74	0,1734
PODXL	-1,11	0,1885
LIN28	-1,62	0,2136
Hs18s	-1,46	0,2152
HAND1	-1,56	0,2255
TERT	-1,34	0,2361
REST	-1,03	0,2405
POU5F1	-1,4	0,2544
EOMES	-3,47	0,2561
LIFR	-1,18	0,2615
CD9	-8,63	0,333
FLT1	-1,59	0,3644
TDGF1	-1,05	0,3672
CXCR4	-1,22	0,3736
PAX6	1,12	0,4474
CER1	-2,45	0,4501
SOX17	-2,66	0,4702
GATA6	-2,67	0,4858
GATA4	-1,08	0,6236
HSGenomic	NaN	NaN
ZFP42	NaN	NaN
T	NaN	NaN
CDX2	NaN	NaN
SHH	NaN	NaN

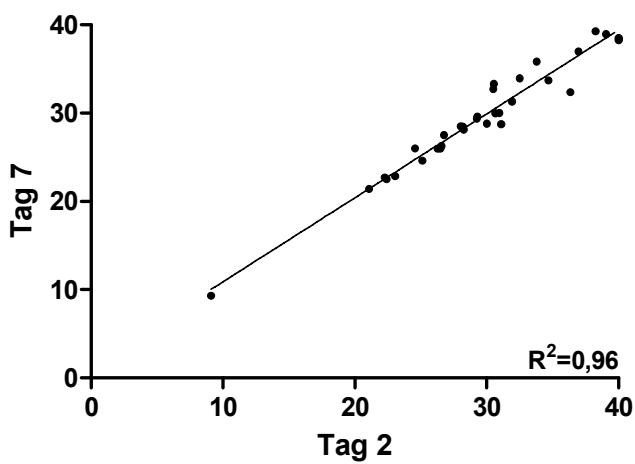
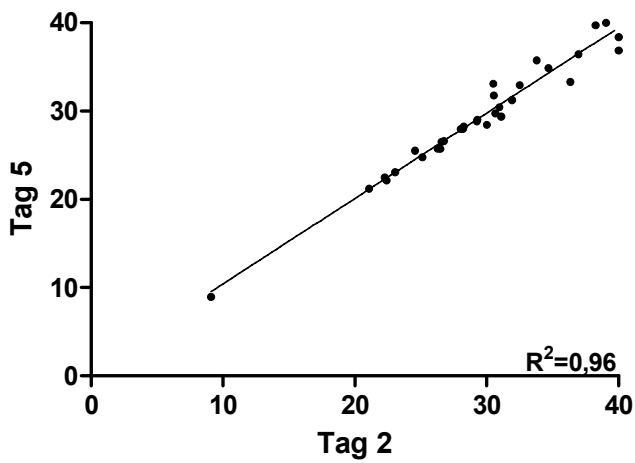
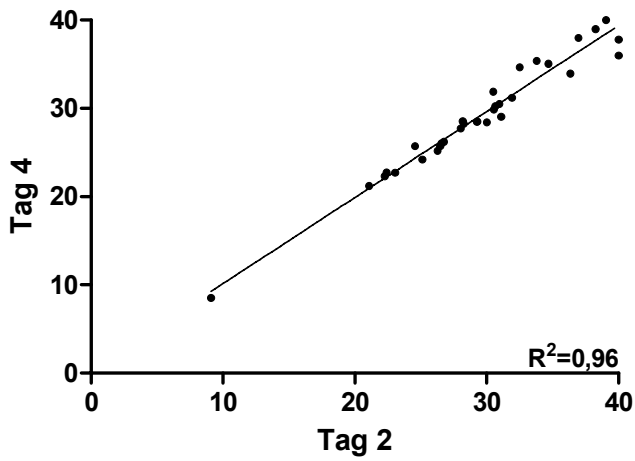


Abb. 36: Scatterplotdarstellung der Genexpressionsvergleiche mittels 32 Gen StellArrays. Verglichen wurde die Genexpression an Tag 2 mit der Genexpression an Tag 4, Tag 5 und Tag 7 der Suspensionskultur. Es konnten keine signifikanten Veränderungen in der Expression der 32 enthaltenen Gene gefunden werden.

3.7.3. Genetische Stabilität der Zellen aus Suspensionskulturen

Um die genetische Stabilität der pluripotenten Zellen nach 10 bzw. 20 Passagen in Suspensionskulturen beurteilen zu können, wurden G- Banden Karyogramme angefertigt (Abteilung Humangenetik, Prof. K. Miller, MH-Hannover). Für jede Probe wurden 10- 15 Metaphasen untersucht. In keiner der präparierten Metaphasen konnten abnormale Chromosomenmuster nachgewiesen werden.

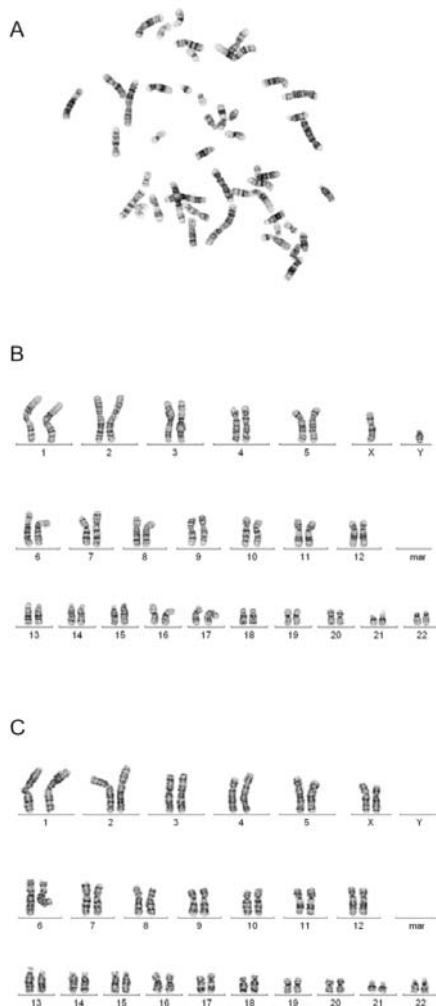


Abb. 37: G-Banden Karyogramme. Karyotypanalysen von hiPS2 und HES-3 wurden nach 20 bzw. 9 Passagen in Suspensionskultur durchgeführt. Es wurden jeweils mindestens 10 Metaphasen untersucht. In keiner Präparation konnten abnormale Chromosomenmuster gefunden werden. Darstellung einer untersuchten Metaphase der hiPS2 (A), zugehöriges Karyogramm (B), Karyogramm der HES-3 (C).

Die Charakterisierung der etablierten Suspensionskulturen sowie der Vergleich mit den Feederzell-basierten Standardkulturen haben gezeigt, dass im Hinblick auf die Markergenexpression keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kultursystemen auftraten. Die Karyotypanalysen zeigten ausserdem, dass die Zellen auch nach 20 Passagen einen stabilen Karyotyp aufwiesen.

3.7.4. *In vitro* und *in vivo* Differenzierung pluripotenter Zellen aus Suspensionskulturen

Neben dem Nachweis von Pluripotenz-assoziierten Genen in den Suspensionskulturen ist die Untersuchung des Differenzierungspotentials der in Suspensionskultur expandierten Zellen ein weiteres Beurteilungskriterium für den Zustand der Zellen im etablierten Kultursystem. Anhand von *in vitro* und *in vivo* Differenzierungsexperimenten wurde untersucht, ob die Zellen in Suspensionskultur die Fähigkeit behalten Derivate aller drei Keimblätter hervorzubringen.

3.7.4.1. *In vitro* Differenzierung pluripotenter Zellen aus Suspensionskulturen

Das Expressionsmuster der *in vitro* differenzierten humanen iPS Zellen an Tag 20 nach Einleitung der Differenzierung zeigte die Expression von Markern des Ectoderms (WNT1 und FGF5), des Endoderms (AFP, TTR), des frühen Mesendoderms (BRACHYURY) und der mesodermalen sowie kardialen Entwicklungsrichtung (NKX2.5, TBX5, TBX20, MLC2a, α MHC).

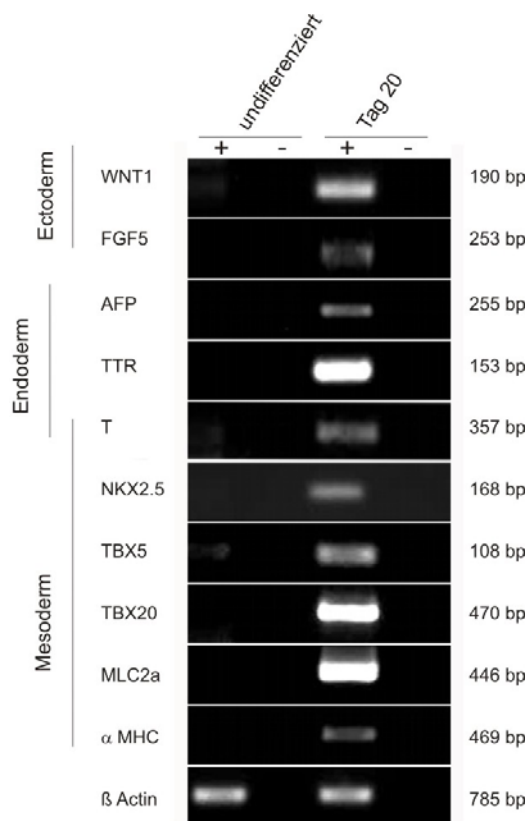


Abb. 38: Markergenexpression in undifferenzierten hiPS2 aus Suspensionskultur und an Tag 20 nach Einleitung der Differenzierung. Mittels semiquantitativer PCR konnte die Expression von Markern des Ectoderms (WNT1, FGF5), des Endoderms (AFP, TTR) des Mesendoderms (BRACHYURY (T)) und des Mesoderms (NKX2.5, TBX5, TBX20, MLC2a, α MHC) nachgewiesen werden.

Die immunzytologischen Untersuchungen bestätigten die qPCR-Daten und wiesen eine Expression von β 3 Tubulin und Cytokeratin 18 für ectoderm, AFP und SOX17 für endoderm sowie Desmin als Marker für mesoderm nach (Abb. 39). Das Auftreten kontrahierender Areale ab Tag 14 der Differenzierung deutet auf die Entstehung funktioneller Herzmuskelzellen hin. Des Weiteren konnten auch über anti NKX 2.5 / sarc. Actinin Doppelfärbung und eine Troponin T Färbung quergestreifte Kardiomyozyten nachgewiesen werden. (Abb. 40).

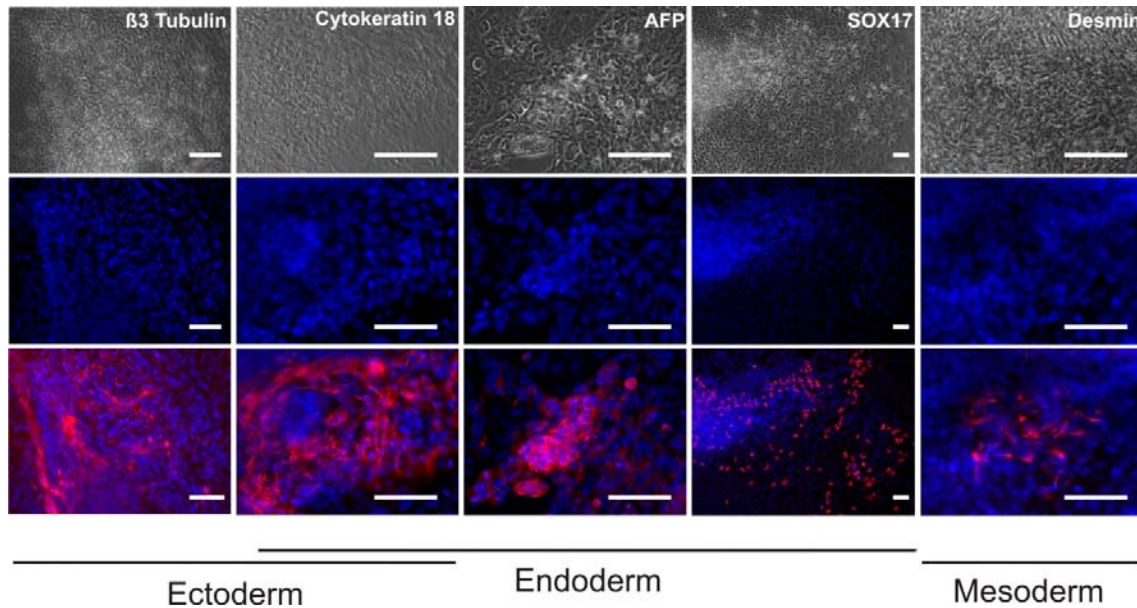


Abb. 39: Immunzytologische Untersuchungen von hiPS2 aus Suspensionskulturen 20 Tage nach Einleitung der Differenzierung. Marker für die ectodermale, endodermale und mesodermale Entwicklungslinie konnten nachgewiesen werden. Spezifische Antikörperfärbung (β 3 Tubulin, Cytokeratin 18, AFP,SOX17 und Desmin) rot, Zellkerndarstellung DAPI (blau). Skalierung: 100 μ m.

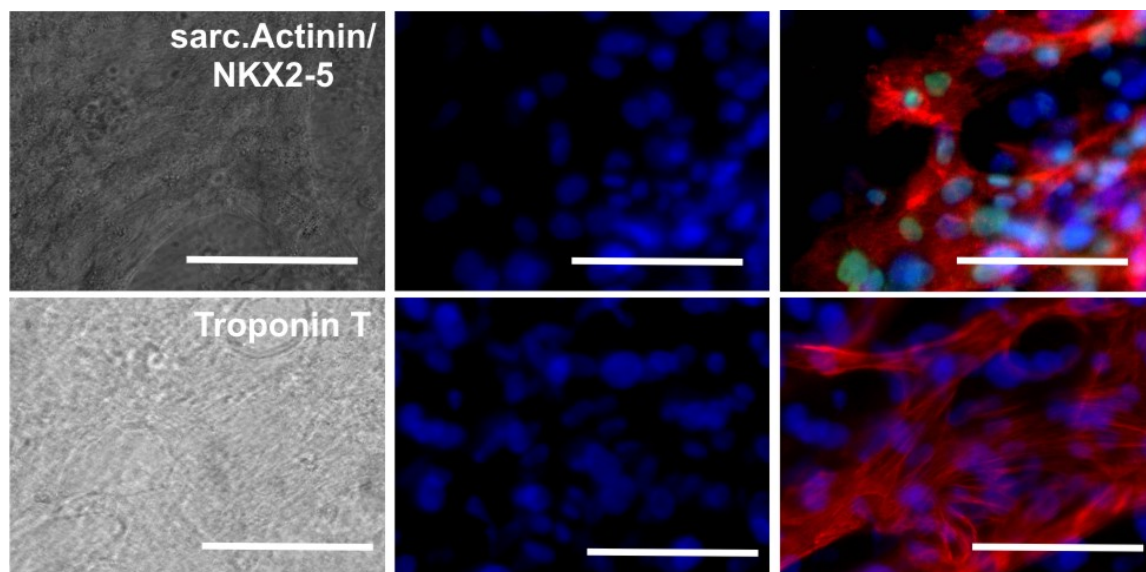


Abb. 40: Expression kardialer Markergene in hiPS2 aus Suspensionskulturen 20 Tage nach Einleitung der Differenzierung. Kardiomyozyten-spezifische Antikörperfärbung für sarkomeres Actinin, Troponin T, (rot), NKX2.5 (grün), Zellkerndarstellung DAPI (blau). Skalierung: 100 μ m.

Weiterhin wurde ein quantitativer Vergleich des Potentials zur Differenzierung in Kardiomyozyten von Zellen aus Feederzell-basierter Kultur und Suspensionskultur durchgeführt. Die Differenzierung erfolgte mittels eines EB basierten Protokolls. An Tag 21 wurden aus den Differenzierungskulturen Cytospots hergestellt, die mit dem Kardiomyozyten-spezifischen Marker Troponin T gefärbt wurden. Das Verhältnis von Troponin T-positiven Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl (DAPI-positive Zellkerne) wurde für jeweils 3 unabhängige Ansätze bestimmt. In den Differenzierungsansätzen aus Feederzell-basierten Kulturen generiert wurden, konnten durchschnittlich 2% Troponin T positive Zellen nachgewiesen werden, nahezu der gleiche Anteil (1,6%) war in den Suspensionskultur-basierten Ansätzen nachweisbar (Abb. 41 A).

Über qPCR konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied für die Expression des Kardiomyozyten-spezifischen Markers α MHC relativ zur zellulären β Actin Expression in den Suspensionskultur-basierten gegenüber den Feederzell-basierten Differenzierungskulturen nachgewiesen werden (Abb. 41 B).

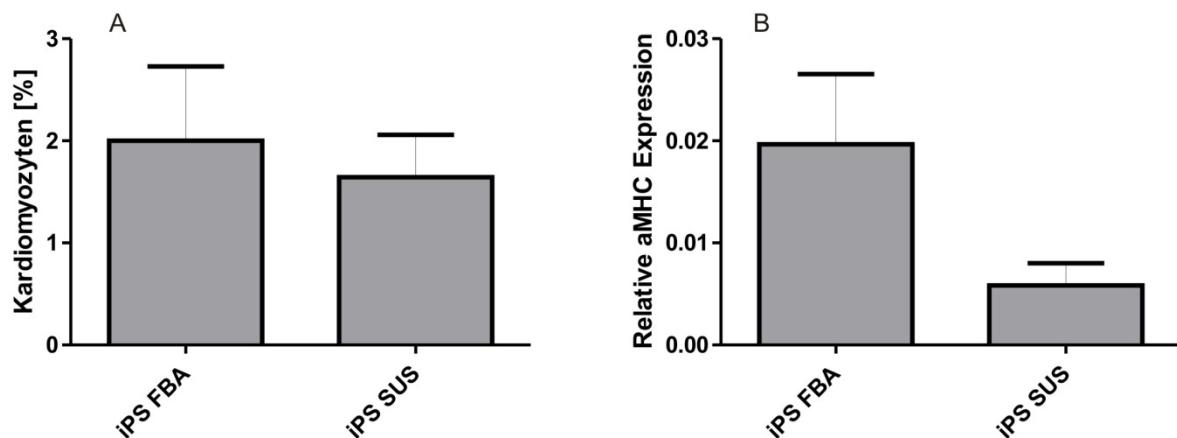


Abb. 41: Quantitativer Vergleich des Differenzierungspotentials. Zellen aus Suspensionskulturen (SUS) und Zellen aus Feeder-basierten adhärennten Kulturen (FBA) wurden über ein EB-basiertes Protokoll differenziert. An Tag 21 nach Einleitung der Differenzierung wurde eine quantitative Analyse des Anteils von Troponin T positiven Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl mittels Cytospots (n=3) (A) und ein quantitativer Vergleich der relativen α MHC Expression in den verschiedenen Differenzierungskulturen (B) (n=3) durchgeführt ohne dabei signifikante Unterschiede aufzeigen zu können.

3.7.4.2. In vivo Differenzierung pluripotenter Zellen aus Suspensionskulturen

Ein Charakteristikum pluripotenter Zellen ist ihre Fähigkeit zur Teratombildung nach Injektion in immundefiziente Mäuse. Thomson et al. [5] zeigten durch Teratombildung die Pluripotenz der von ihnen etablierten hES Zellen. Ebenso spielen Teratomassays bei der Identifizierung von pluripotenten Zellen die durch Reprogrammierung generiert wurden eine wichtige Rolle [7, 19]. Die erfolgreiche Durchführung von Teratomassays ist des Weiteren im Allgemeinen ein wichtiger Hinweis auf den Erhalt der Pluripotenz nach Kultivierung in verschiedenen Systemen. So wiesen etwa Amit et al. [100] in ihrer Studie zur Etablierung von Feederzell-freien und serumfreien Bedingungen, unter anderem durch die Bildung von Teratomen den Erhalt der Pluripotenz nach. Ebenso zeigten Xu et al. Teratombildung, nachdem die hESC in einem Feeder-freien System expandiert wurden [75].

Um das Differenzierungspotenzial *in vivo* zu überprüfen, wurden die humanen iPS Zellen und die humanen ES Zellen, die über 10 Passagen in Suspension expandiert wurden, in die Nierenkapsel beziehungsweise in den Oberschenkelmuskel immundefiziente Mäuse injiziert. Nach 8 bzw. 10 Wochen hatten die Mäuse Teratome entwickelt, diese wurden explantiert und histologisch analysiert. Injektionen und Explantation wurden freundlicherweise von Herrn Christian Rathert durchgeführt, die histologische Aufarbeitung erfolgte durch Dr. Silke Glage am Institut für Versuchstierkunde, MH – Hannover .

Es konnte sowohl in den Teratomen aus hiPS2 als auch aus den humanen ES Zellen, Gewebe aller drei Keimblätter inklusive Drüsenepithel mit Mucinzellen, mesodermales Gewebe und neuronales Gewebe nachgewiesen werden. Des weiteren konnten keine Unterschiede in Bezug auf den Reifegrad und die Größe der Teratome aus den in Suspension expandierten Zellen gegenüber Teratomen, die aus Zellen aus Standardkulturen hervorgegangen waren, festgestellt werden.

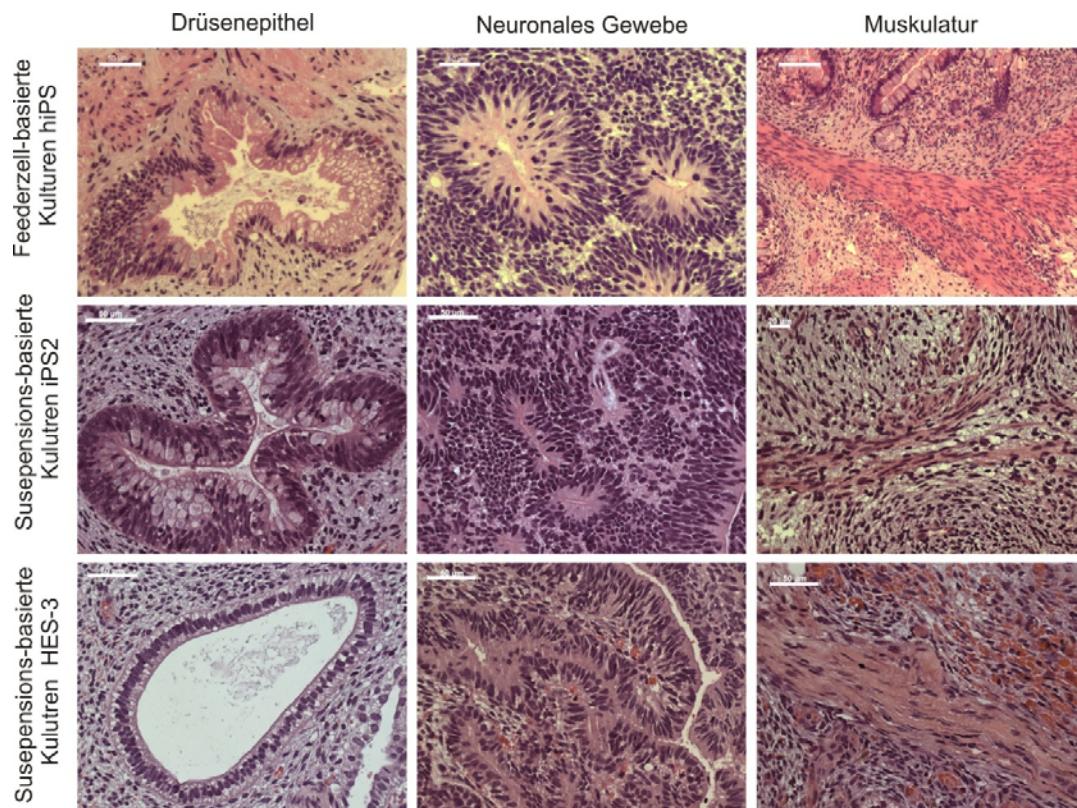


Abb. 42: Histologische Untersuchungen der aus Suspensions-basierten und Feederzell-basierten Kulturen entstandenen Teratome. Injektion der undifferenzierten hiPS2 und HES-3 nach 10 bzw. 9 Passagen in Suspensionskultur in immundefiziente Mäuse führte zu der Bildung von Teratomen, die Gewebe aller drei Keimblätter enthielten und sich in Bezug auf Reifegrad und Größe nicht von Teratomen unterschieden, die aus Zellen aus Standardkulturen hervorgegangen waren.

Wie schon die Untersuchungen zur Markergenexpression, zeigten auch die Experimente zum Differenzierungsverhalten *in vivo* und *in vitro* keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Zellen aus den etablierten Suspensionskulturen und Zellen, die in den Feederzell-basierten Standardkulturen expandiert wurden.

3.8. Expansion von Primaten ES Zellen in Suspensionskultur

Um die universelle Anwendbarkeit des neuen Kultursystems zu untersuchen, wurden die für hiPS und hESC etablierten Bedingungen zur Expansion pluripotenter Stammzellen in weiteren Versuchen auf die für die initialen Versuche verwendeten Primaten ES Zellen (R366.4 & MF12) angewendet. Die Primaten ESC wurden analog zu den humanen Zellen enzymatisch mit Kollagenase IV von den Feederzellen getrennt und in einem weiteren Schritt mit Kollagenase B zu Einzelzellen dissoziiert. Die Inokulation der Kulturen mit Einzelzell-dissoziierten MF12 Zellen in mTeSR1 supplementiert mit 10 μ M RI führte nach 3 Tagen zur Bildung von Zellaggregaten mit homogener Morphologie, während ohne den Zusatz des Rho Kinase Inhibitors keine gleichmäßige Aggregatbildung beobachtet werden konnte (Abb. 43).

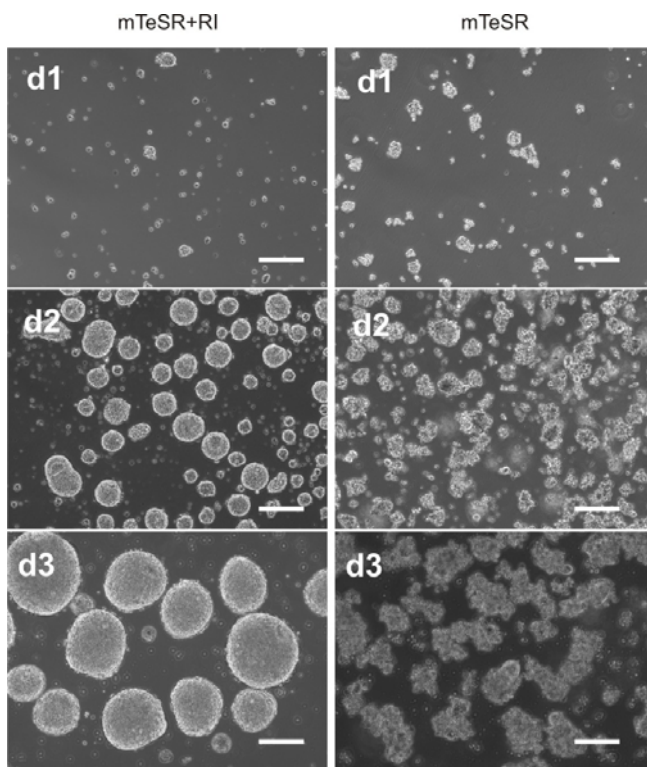


Abb. 43: Einzelzell-inokulierte Suspensionskulturen der Primaten ES Zelllinie MF12. Kulturen in mTeSR1 + 10 μ M RI zeigten die Bildung homogener Zellaggregate (links), ohne Zugabe des Rho Kinase Inhibitors erfolgte keine gleichmäßige Aggregatbildung (rechts). Skalierung: 200 μ m.

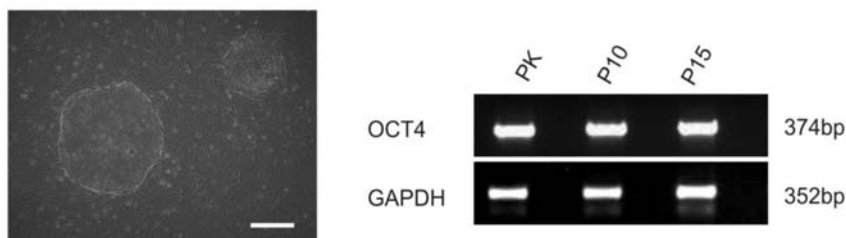


Abb. 44: Rückführung von MF12 Suspensionsaggregaten in das Feederzell-basierte Kultursystem. Entstandene Kolonien zeigten typische Morphologie undifferenzierter Zellen. Skalierung: 200 μ m. Semiquantitative RT PCR zeigte die Expression von OCT4 nach 10 bzw. 15 Passagen Suspensionskultur im Vergleich zum Feederzell-basierten System (PK).

Bei Rückführung der MF12 Zellaggregate in das Feederzell-basierte Kultursystem entstanden Kolonien mit der typischen Morphologie undifferenzierter Zellen, die sich durch einen klaren Rand von den sie umgebenden Feederzellen abgrenzten. Durch semiquantitative RT-PCR konnte die Expression OCT4 sowohl nach 10 als auch nach 15 Passagen Suspensionskultur in nachgewiesen werden (Abb. 44 B). *In vitro* Differenzierungsversuche mit MF12 Zellen nach 15 Passagen in Suspensionskultur führten zur Entstehung verschiedener Zelltypen. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnten Derivate verschiedener Keimblätter nachgewiesen werden, inklusive sarkomerem Actinin und CD31 (Mesoderm) sowie β 3 Tubulin für das Ectoderm (Abb. 45).

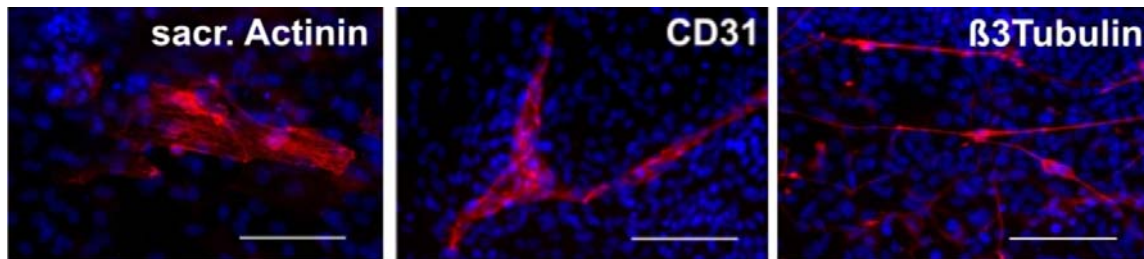


Abb. 45: Immunzytologische Analyse von MF12 Zellen aus Suspensionskultur 21 Tage nach Einleitung der Differenzierung. Spezifische Antikörperfärbung (sarkomeres Actinin, CD31 und β 3 Tubulin (rot), Kernfärbung DAPI (blau). Skalierung: 100 μ m.

In Kulturen der Primaten ES-Zelllinie R366.4 konnte 3 Tage nach Einzelzellinokulation ebenfalls die Entstehung von Zellaggregaten mit homogener Morphologie beobachtet werden. Die Verwendung einer OCT4eGFP R366.4 Reporterzelllinie ermöglichte erste Aussagen zur Pluripotenz der Kulturen. Anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte der Erhalt der OCT4-abhängigen eGFP Expression gezeigt werden (Abb. 46).

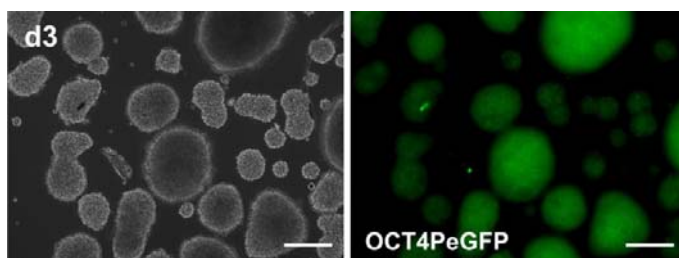


Abb. 46: Suspensionskulturen eines OCT4eGFP transgenen Klons der Rhesus ES Zelllinie R366.4. 3 Tage nach Einzelzellinokulation in mTeSR1 + 10 μ M RI konnte die Entstehung von Zellaggregaten beobachtet werden, die eine einheitliche Morphologie und die OCT4 Promotor abhängige eGFP Expression zeigen. Skalierung: 200 μ m.

3.9. Übertragung der Suspensionskulturen in ein dynamisches System

Als Vorarbeit für die angestrebte Übertragung der etablierten Suspensionskulturen in einen größeren Maßstab und die Umsetzung des nächsten Schrittes in Richtung einer kontrollierbaren Prozessführung, wurden die etablierten Suspensionskulturen zunächst aus dem statischen 6 Well-basierten System in ein dynamisches System übertragen.

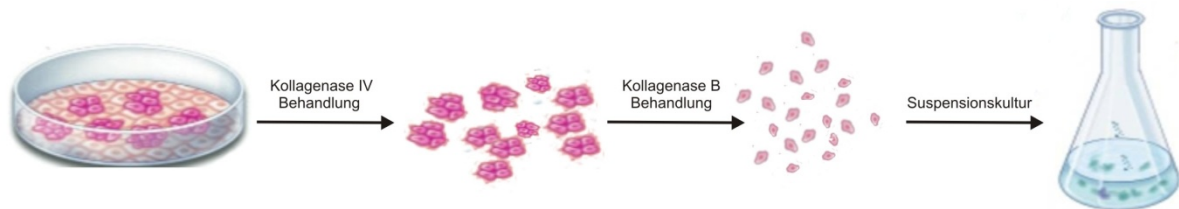


Abb. 47: Schematische Darstellung der Übertragung der statischen Suspensionskulturen in ein dynamisches Kultursystem. Die erzeugten Einzelzellsuspensionen wurden für die Kultur unter dynamischen Bedingungen in Erlenmeyerkolben mit einem Arbeitsvolumen von 25 ml überführt.

Hierfür wurden die Suspensionskulturen in Erlenmeyerkolben (125 mL) mit einem Arbeitsvolumen von 25 ml überführt und auf einem Orbitalschüttler im Inkubator durchgeführt. Die Inokulationsdichte von 0.3×10^5 Zellen / ml wurde für die dynamische Kultur beibehalten.

Die Schüttelfrequenz des Orbitalschüttlers war ein kritischer Faktor bei der Durchführung der Experimente. Bei einer Frequenz von > 75 Umdrehungen / Minute (UpM) kam es zu Ablagerung der Zellen an der Kolbenwand in Höhe des Mediumspiegels, während eine Frequenz von < 35 UpM zu einer massiven Verklumpung der inokulierten Einzelzellen führte. Bei einer Frequenz von 50 UpM wurden die ausgesäten Zellen gleichmäßig im Medium verteilt und bildeten Aggregate mit einer relativ homogenen Größenverteilung (Abb. 48), deren Größe vergleichbar zu den im statischen System erreichten Aggregatgrößen war.

Um eine Aussage zum Pluripotenzstatus der Zellen nach 4 Tagen Expansion im dynamischen System treffen zu können, wurden FACS Analysen für SSEA4 durchgeführt (Abb. 48); die Mehrheit der Zellen ($>90\%$) in den dynamischen Kulturen waren positiv. Die Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung nach 4 Tagen ergab eine 3,9 fache Zunahme der Lebendzellzahl im dynamischen System.

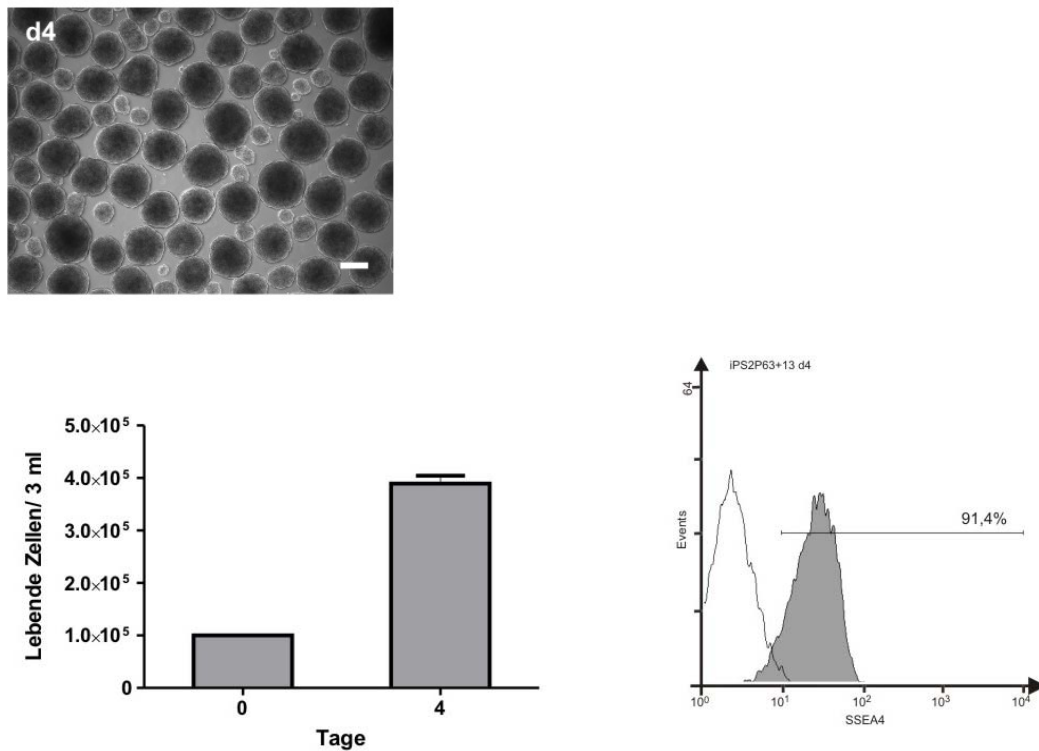


Abb. 48: Übertragung der statischen Suspensionskulturen in ein dynamisches Kultursystem. 4 Tage nach Einzelzellinokulation haben sich Aggregate mit einheitlicher Größe und Morphologie gebildet, Skalierung: 200 μm (A). Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte über eine Trypanblaufärbung (B). Durchflusszytometrische Untersuchungen an Tag 4 der Kultur zeigten 91,4 % positive Zellen für den Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker SSEA4.

Zusammenfassend unterstreichen die gesammelten Daten zur Zellproliferation, Markergenexpression, *in vitro* und *in vivo* Differenzierung sowie die generelle Übertragbarkeit in ein dynamisches Kultursystem eine universelle Anwendbarkeit des hier entwickelten neuartigen Kultursystems.

Die erarbeiteten Ergebnisse zur skalierbaren Suspensionskultur undifferenzierter Stammzellen von Mensch und Javaneraffe wurden im März 2010 zur Publikation in *Stem Cell Research* akzeptiert.

4. DISKUSSION

4.1. Humane induzierte Stammzellen aus Nabelschnurblut

Die erfolgreiche Generierung humaner pluripotenter Stammzellen aus somatischen Zellen eröffnete vielversprechende Möglichkeiten im Bereich der klinischen Anwendung pluripotenter Zellen und deren Derivaten. Die generierten hiPS stellen eine ethisch unbedenkliche Alternative zu den umstrittenen hESC dar.

Eine wichtige Voraussetzung für die routinemäßige Generierung pluripotenter Stammzellen aus somatischen Zellen ist eine geeignete Zellquelle. Die verwendeten Ausgangszellen sollten möglichst ohne invasive Eingriffe leicht isolierbar und gut expandierbar sein. Des Weiteren ist eine gute Transduzierbarkeit bzw. die Möglichkeit effizient genetische Manipulationen an den Zellen vornehmen zu können ein wichtiger Aspekt. Takahashi et al. [7] verwendeten zunächst Fibroblasten als Zellquelle für die Reprogrammierungen. Isolation und Expansion von Fibroblasten sowie deren genetische Manipulation sind gut etablierte Techniken und machen diese Zellen zu einer gut charakterisierten Zellquelle. Im Hinblick auf verfügbare und Patienten-spezifische Zellquellen konnten Aasen et al. [41] Keratinozyten als Ausgangszellen für Reprogrammierungen einsetzen, die sie zuvor aus einzelnen Haaren generieren konnten. Blut stellt eine weitere, gut zugängliche Zellquelle dar. hiPS Generierung basierend auf CD34 positiven hematopoetischen Zellen aus peripherem Blut konnte bereits gezeigt werden [118]. Die Generierung der hiPS mit den derzeit verfügbaren Protokollen ist immer noch kostspielig und vor allem zeitaufwendig. Da mehrheitlich ältere Menschen auf die therapeutischen Anwendungen angewiesen sein werden, ist die Qualität der Ausgangszellen ebenfalls kritisch. Somatische Mutationen, die sich mit zunehmendem Lebensalter akkumulieren können [119, 120], würden auch in den generierten hiPS bestehen bleiben [121] und könnten etwa zur Entartung der Zellen führen.

Als alternative Zellquelle zu Zellen aus adultem peripherem Blut konnten hier Endothelzellen, gewonnen aus Nabelschnurblut für Reprogrammierungen eingesetzt werden. Diese Zellen repräsentieren eine im Vergleich zu den bisher verwendeten Zellen sehr junge Ausgangspopulation. Das Risiko somatischer Mutationen, die auf die generierten hiPS übergehen ist vergleichsweise gering. Darüber hinaus ist die Kultur und genetische Manipulation dieser Zellen ebenfalls gut etabliert. Die aus Nabelschnurblut gewonnen Endothelzellen wurden daher als geeignete Zellquelle identifiziert und konnten erfolgreich reprogrammiert werden [95]. In Kombination mit den bereits weltweit verfügbaren Nabelschnurbanken [122], die einen große Menge Ausgangsmaterial bereitstellen könnten, wäre es möglich Stammzellbanken zu generieren, wie sie bereits für die Anwendung von hESC diskutiert wurden [56]. Es könnten so für eine große Mehrheit der Patienten hiPS zur

Verfügung gestellt werden, die ausreichend charakterisiert und im Anwendungsfall schnell verfügbar wären [123].

4.2 Entwicklung von Suspensions-basierten Expansionsprozessen für humane pluipotente Zellen

Die Bereitstellung pluripotenter Zellen in, für klinische Anwendungen, ausreichender Quantität und vor allem unter Standards des *GMP* hergestellter Qualität, ist mit den bisher zur Verfügung stehenden Expansionsprozessen nicht zu realisieren. Um reproduzierbare Prozessbedingungen für die Expansion der pluripotenten Zellen bereitzustellen, scheinen Bioreaktorprozesse die mit Einzelzellsuspensionen inokuliert werden können, das am besten geeignete System zu sein.

Im Vergleich zu mESC, die Überlebensraten von bis zu 60 % nach Dissoziation erreichen [124], finden sich bei humanen pluripotenten Zellen durch die hohe Sensitivität gegenüber enzymatischer Dissoziation und Scherstress nur zwischen 1 – 5 % der Zellen nach Dissoziation wieder [15, 124]. Hasegawa et al. etablierten hESC Sublinien, die eine größere Toleranz gegenüber enzymatischer Dissoziation mit Überlebensraten von bis zu 25 % zeigten. Allerdings ist davon auszugehen, dass die notwendige Selektion in Bezug auf höhere Dissoziationstoleranz zu Subklonen führt, die genetische Abnormalitäten aufweisen und deren klinische Eignung deshalb fraglich ist.

Watanabe et al. konnten das Überleben von hESC nach Einzelzelldissoziation durch Zugabe eines niedermolekularen Inhibitors erheblich steigern. In ihrer Studie zeigten sie den anti-apoptotischen Effekt eines Rho Kinase Inhibitors (RI) auf Einzelzellsuspensionen von 3 hESC Zelllinien bei der Differenzierung in neuronale Vorläuferzellen. In weiteren Studien konnten Li et al. [125, 126] ebenfalls zeigen, dass RI sich positiv auf das Überleben nach Kryokonservierung von hESC auswirkt.

Sowohl für die verwendeten humanen pluripotenten Zellen als auch für die embryonalen Stammzellen der nicht humanen Primatenspezies konnte der positive Effekt der RI Zugabe auf das Zellüberleben bei enzymatischer Dissoziation gezeigt werden. Durch die Zugabe des Inhibitors konnten Überlebensraten von bis 50 % erzielt werden. Die erfolgreiche Übertragung des von Watanabe et al. vorgestellten Protokolls auf die Expansion von humanen pluripotenten Zellen war eine grundlegende Voraussetzung für die Inokulation der Suspensionskulturen mit definierten, reproduzierbaren Startzellzahlen.

Um die Suspensionskulturen aber zur Expansion der undifferenzierten Zellen einsetzen zu können, sollte die zu erreichende Zellmassenzunahme zumindest vergleichbar zu herkömmlichen, Feederzell-basierten oder Matrix-basierten Kultursystemen sein.

Ein wichtiger Aspekt für die Expansion der undifferenzierten Zellen in einem Kultursystem ohne Feederzellen ist die Bereitstellung geeigneter Wachstumsbedingungen durch das eingesetzte Kulturmedium. Ludwig et al. entwickelten durch Optimierung verschiedenster Faktoren wie der Bereitstellung von Wachstumsfaktoren in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen und des physiochemischen Milieus, wie pH Wert und Osmolarität, ein Medium speziell für Kulturen von hES unter definierten Bedingungen [80]. Das entwickelte Medium, mTeSR1, ermöglichte die Expansion verschiedener hESC Linien im undifferenzierten Zustand auf einer Matrix aus Kollagen IV, Fibronectin, Laminin und Vitronectin.

Basierend auf der Arbeit von Ludwig et al. sollte mTeSR1 zusätzlich zum KO-DMEM Standardkulturmedium für die Expansion pluripotenter Zellen in Suspension verwendet werden. Im Vergleich zu den KO-DMEM basierten Medien erwies sich mTeSR1 als besser geeignet für die Durchführung der Suspensionskulturen. Auch durch die Supplementierung des KO-DMEM basierten Mediums mit hohen bFGF Konzentrationen, welches in der Studie von Ludwig et al. als kritischster Faktor für Proliferation und Erhalt der Pluripotenz beschrieben wurde, konnten die Ergebnisse die mit mTeSR erzielt wurden, in den KO-DMEM basierten Medien nicht erreicht werden.

Bereits 24 Stunden nach der Vereinzelnung zeigte sich ein höheres Zellüberleben in mTeSR1 verglichen mit den KO-DMEM basierten Medien. Aber erst die Kombination von mTeSR1 mit der Zugabe des Rho Kinase ermöglichte die Inokulation der Kulturen mit Einzelzellen bei einem Zellüberleben von etwa 50 % und ergab gleichzeitig Zellmassenzunahmen von 4 - 6-fach in 4 Tagen, vergleichbar zu bereits beschriebenen MC-basierten Suspensionskulturen [87] und adhärent wachsenden Kulturen auf Feederzellen oder definierten Matrices [100].

In einer zu dem hier erarbeiteten Kultursystem ähnlichen Studie von Krawetz et al. [127] konnte ebenfalls eine Expansion von undifferenzierten hES Zellen gezeigt werden. Der beschriebene Prozess verzichtete auf die Verwendung von Trägermaterialien und basierte auf Einzelzellinokulation. Als Kulturmedium wurde hier ebenfalls mTeSR1 verwendet. Beurteilt wurden die erhaltenen Suspensionskulturen der verwendeten hESC Linie H9 anhand von Immunfluoreszenz, FACS und RT-PCR Daten. Weder für die FACS Analysen noch für die, hier auch nur semiquantitativen PCR Daten, wurden als Kontrollen Zellen aus adhärenter Kultur mitgeführt, was keinen direkten Vergleich der Kultursysteme zulässt. Das Differenzierungspotential der in Suspension expandierten Zellen wurde nach EB basierter *in vitro* Differenzierung über den Nachweis der Markergenexpression der verschiedenen Keimblätter gezeigt. Die Expression wurde ausschließlich über semiquantitative PCR Daten gezeigt, wobei keine Daten zur möglichen Expression in den als undifferenziert beschriebenen Zellen, welche für die Differenzierungsexperimente eingesetzt wurden,

gezeigt sind. Krawetz et al. [127] beschreiben weiterhin für ihre Kulturen eine 25 fache Zunahme in 6 Tagen. In den präsentierten Daten zur Zellexpansion sind allerdings nur Zunahmen von 9 - bis etwa 13 - fach in 6 Tagen ersichtlich und liegen somit nicht über den erzielten Ergebnissen, des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Kultursystems. Ein negativer Effekt des RI auf die Proliferationsrate, wie er von Krawetz et al. beschrieben wird, konnte weder in den hier durchgeführten Experimenten noch in unabhängigen Studien [107] bestätigt werden. In den von Krawetz et al. durchgeführten Experimenten war eine Expansion der undifferenzierten Zellen als Suspensionsaggregate darüber hinaus nur durch die Zugabe von Rapamycin möglich. Die Autoren vermuteten, dass es zu einer spontanen Differenzierung der verwendeten hES Zelllinie zu Fibroblasten kommt, welche wiederum die Stabilität der Suspensionsaggregate negativ beeinflussen sollten. Durch die Zugabe von Rapamycin und somit einer Blockierung des mTOR Signalweges sollte die Differenzierung zu Fibroblasten blockiert und dieser Effekt verhindert werden. Das Vorhandensein von Fibroblasten in den entstandenen Aggregaten wurde über den Nachweis von FGF-R1 positiven Zellen gezeigt. Da FGF-R1 kein spezifischer Fibroblasten Marker ist [128] und weder eine geeignete Isotypenkontrolle noch quantitative Daten zu dieser Hypothese erbracht wurden, erlaubten diese Ergebnisse keine eindeutige Aussage zur Bildung von Fibroblasten in den Suspensionsaggregaten und deren möglichen Einfluss auf die Kulturführung. Da alle präsentierten Daten lediglich auf Experimenten basieren, die mit hESC der Linie H9 durchgeführt wurden, ist ein Zelllinien-abhängiger Effekt nicht auszuschließen.

Die Experimente mit verschiedenen humanen iPS Zelllinien, hESC sowie den ESC Linien der Primatenspezies, in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass eine Expansion der undifferenzierten Zellen nach Einzelzellinokulation ohne den Einsatz von MC als Trägermaterial oder die Zugabe von Rapamycin zur Hemmung der Differenzierung in mTeSR1 + 10 μ M RI erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Die generelle Skalierbarkeit der etablierten Kulturen konnte durch die Übertragung der Kulturen in dynamische Erlenmeyerkulturen gezeigt werden. Geht man von den hier verwendeten $0,3 \times 10^5$ Zellen / mL mit den mindestens erreichten Zellzahlzunahmen von 4 fach in 4 Tagen aus, wäre eine Bereitstellung der zu Beginn abgeschätzten 10 Milliarden Zellen in einer 100 L Kultur denkbar. Kulturvolumina von 100 L sind in der biopharmazeutischen Industrie keine Ausnahme und vom technischen Aufwand zu bewältigen, im Gegensatz zu den für die gleiche Zellmenge benötigten Zellkulturschalen. Eine theoretische Abschätzung der Zellmengen, die mit dem entwickelten System zu erreichen wären, wurde anhand der durchschnittlich erreichten Proliferationsraten durchgeführt. Nach 10 Passagen (40 Tagen) können Zellzahlen von $2,2 \times 10^{11}$ Zellen erreicht

werden, was einer $7,3 \times 10^6$ fachen Expansion entspricht (Abb. 49)

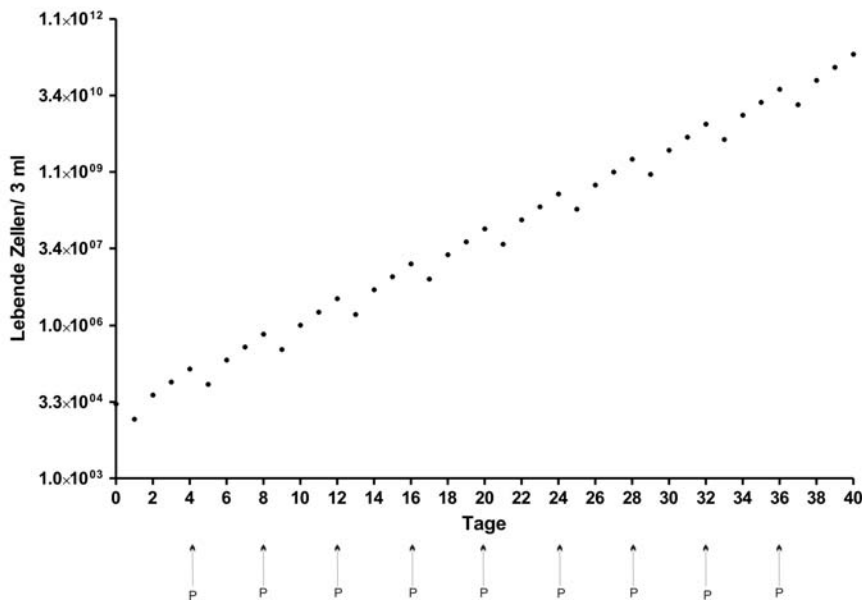


Abb. 49: Theoretische Abschätzung der erreichbaren Zellzahlen im entwickelten Suspensionskultursystem.

Bei der Entwicklung klinisch relevanter Prozesse sind die entstehenden Kosten ein weiterer wichtiger Aspekt. Führt man die Abschätzung der benötigten 100 L Kulturvolumen mit dem derzeitigen Preis des verwendeten mTeSR1 weiter, würden allein für die Bereitstellung der Zellmengen für einen Patienten Medienkosten von ~ 60.000 € entstehen. Eine Optimierung der Zellausbeute bezogen auf Kulturvolumen bzw. Mediumverbrauch muss daher angestrebt werden.

Im Hinblick auf eine weitere Optimierung der Kulturen konnten Niebruegge et al. bereits zeigen, dass eine kontinuierliche Prozessführung zu signifikant höheren Gesamtzellausbeuten bei gleichzeitig geringerem Mediumverbrauch führen kann [129]. Eine Erhöhung der Zelldichte zusammen mit kontinuierlichen Strategien für die Prozessführung könnte auch für die Expansion der humanen pluripotenten Zellen zu höheren Gesamtzellausbeuten führen und somit das Kulturvolumen zur Bereitstellung benötigter Zellmengen deutlich senken.

4.2.1 Erhalt der Pluripotenz durch periodische oder permanente Dissoziation

Durch wiederholte Dissoziation der Zellaggregate ist es möglich die Aggregatgröße kontrolliert unterhalb der, für eine effiziente Differenzierung benötigten Größe zu halten. Die generierten Aggregate erreichten nach 4 Tagen Kultur eine durchschnittliche Größe von ~ 200 µm und lagen somit unter der von Bauwens et al. beschriebenen EB Größe von mindestens 250 µm für eine effektive Differenzierung von hESC [89]. Die ermittelten ~ 160 Zellen pro Aggregat würden laut Ng et al. [115] ebenfalls nicht für eine effiziente Differenzierung ausreichen.

Die Begrenzung der Aggregatgröße durch periodische Dissoziation zu Einzelzellen, die damit einhergehende Unterbrechung der Zell-Zell Kontakte innerhalb der Aggregate und das Aufbrechen der entstandenen extrazellulären Matrix scheint daher eine geeignete Methode zu sein, um Differenzierungsprozesse in den Suspensionsaggregaten zu unterdrücken.

Die Balance zwischen Zellmassenverlusten durch Einzelzelldissoziation und der Hemmung der Differenzierung durch Begrenzung der Aggregatgröße sowie die Unterdrückung parakriner Effekte durch das Aufbrechen von Zell-Zell Kontakten eröffnet die Möglichkeit der Expansion der undifferenzierten Zellen als Aggregate in Suspension.

Alternativ zu periodischer Einzelzelldissoziation könnte durch permanente Zugabe proteolytischer oder kollagenolytischer Enzyme zur Kultur die Zunahme der Aggregatgröße reguliert werden, um somit die Zellmassenverluste durch die Einzelzelldissoziation zu reduzieren.

4.2.2 Qualität der hergestellten Zellen – Analyse von Stammzellmarkern, Karyostabilität und Differenzierungspotential

Neben dem Vergleich der erreichbaren Zellzahlen in adhärennten Kulturen und den hier etablierten Suspensionskulturen ist ein eingehender Vergleich der Kulturbedingungen bezüglich Erhalt der Pluripotenz und des Differenzierungspotentials notwendig.

4.2.2.1. Expression von spezifischen Reporter genen als Qualitätskriterium

Der Einsatz Zelltyp-spezifischer Promotoren ermöglicht die spezifische Expression von Reporter genen oder Resistenzen in relevanten Zelltypen [61, 110, 112, 130-132].

Die in der Arbeit hergestellten Reporterzelllinien mit OCT4 Promotor-abhängiger eGFP Expression sollten zur schnellen und direkten Kontrolle der Pluripotenz dienen. OCT4 (POU5F1) gehört zur POU (Pit-Oct-Unc) Transkriptionsfaktorfamilie [133] und ist ein wichtiger Marker für die Pluripotenz [134]. In undifferenzierten hES Zellen konnten Reubinoff et al. [23] hohe Expressionslevel nachweisen, die während der Differenzierung deutlich abnehmen.

Das verwendete Konstrukt wurde bereits von Gerrad et al. [112] beschrieben. Nach Transfektion konnten Gerrad et al. die stabile und spezifische OCT4-abhängige eGFP Expression in hES Zellen bei gleichzeitiger Korrelation mit endogener OCT4 Genexpression und Expression der Oberflächenmarker SSEA4 und TRA1-60 zeigen. Humane ES Zellen der Linie H9, die ebenfalls eine stabile eGFP Expression in Abhängigkeit des OCT4 Promotors zeigten, verwendeten Bajpai et al. [109] für ihre Untersuchungen zur Accutase Dissoziation. In beiden Studien konnte eine leicht unterschiedliche Expression des eGFP und des endogenen OCT4 beobachtet werden. Es gab in beiden Fällen schwach eGFP positive Zellen, die negativ für das OCT4 Protein waren, hervorgerufen durch die unterschiedliche Halbwertszeit der Proteine. Die in der vorliegenden Arbeit generierten Zelllinien zeigten ebenfalls eine spezifische Expression des OCT4-abhängigen eGFP. Die Expression konnte sowohl zur endogenen OCT4 Genexpression als auch zur Expression des Oberflächenmarkers SSEA4 korreliert werden. Auch hier konnte eine leicht unterschiedliche Expression der beiden Proteine in einzelnen Zellen beobachtet werden, allerdings mit einer verlängerten Expression des OCT4 Proteins, welche möglicherweise mit der Expression des noch vorhandenen OCT4 Transgens erklärt werden könnte [95]. Generell konnte aber die Korrelation des OCT4 abhängigen eGFP Expression zur Pluripotenz wie auch in den Studien von Gerrad und Bajpai [109, 112] gezeigt werden. Die generierten Reporterzelllinien eigneten sich sehr gut für die vereinfachte Überwachung der Pluripotenz in den etablierten Kulturen. Neben der Überwachung der Pluripotenz ermöglicht die Verwendung Zelltyp-spezifischer Genexpression die Identifizierung und Aufreinigung gewünschter Zelltypen zu verschiedenen Differenzierungsstadien [61, 135]. Die Kombination verschiedener Reporter- oder Selektionskonstrukte könnte zukünftig die Abbildung von Differenzierungsprozessen und anschließende Aufreinigung von generierten Subpopulationen innerhalb eines Prozesses ermöglichen.

4.2.2.2. Beurteilung der Zellqualität anhand von molekularbiologischen Methoden

Um den Pluripotenzstatus detaillierter beurteilen zu können, kamen verschiedene quantitative Methoden zum Einsatz.

Mittels qPCR konnten für 3 Pluripotenz-assoziierten Marker (NANOG, OCT4 und RONIN) keine nennenswerten Unterschiede in den Expressionshöhen der untersuchten Gene in den verglichenen Kultursystemen nachgewiesen werden. Wichtig war hierbei, dass die verwendeten Primersequenzen spezifisch für die endogenen Expressionen der Transkriptionsfaktoren OCT4 und NANOG waren. Dies war von Bedeutung da bei der Charakterisierung der hier eingesetzten hiPS Zellen gezeigt wurde, dass insbesondere die Expression des für die Reprogrammierung verwendete OCT4 Transgen in den generierten pluripotenten Zellen nicht vollständig abgeschaltet war [95].

Des Weiteren wurden durchflusszytometrische Analysen zur Expression der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarkern SSEA4 und TRA1-60 durchgeführt. Wie auch in der Studie von Oh et al [87] konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der Zellen auch nach bis zu 17 Passagen positiv für die untersuchten Marker war.

Um einen umfangreicheren Vergleich der Kultursysteme anstellen zu können, wurde das qPCR-basierte Verfahren des StellArrays (<http://array.lonza.com/stellarrays/>) eingesetzt. Mit Hilfe dieser Assays konnte die Expression von ausgesuchten Genen zwischen verschiedenen Zell- und Kulturtypen verglichen werden. Im Vergleich zu Genomweiten Microarrays liefern StellArrays nur Daten zu einer begrenzten Anzahl von Genen. Auf der anderen Seite bieten sie gegenüber Genarrays den Vorteil, dass nicht nur semiquantitative sondern quantitative Expressionsdaten geliefert werden. Die vorgefertigten qPCR Platten können mit bestehenden qPCR Cyclern bearbeitet werden und ermöglichen daher schnelle Analysen mit Hilfe etablierter Laborausstattung.

Eine Auswertung der erhaltenen Daten kann entweder direkt über die Ct-Werte oder über einen GPR Algorithmus erfolgen [117]. Die Auswertung anhand von Ct-Werten machte die generell große Ähnlichkeit zwischen den untersuchten Kultursystemen deutlich. Die detaillierte Auswertung der Genexpressionen zeigte sowohl für Pluripotenz-assoziierte als auch Differenzierungs-assoziierte Gene Unterschiede auf. Vor allem Marker der endodermalen und mesodermalen Entwicklungsrichtung waren in den Suspensionskulturen schwächer exprimiert, gleichzeitig konnte aber keine auffällige Erhöhung ectodermaler Marker beobachtet werden. Unterschiede z.B. im Bezug auf Genexpression die mit der Ausbildung des Cytoskeletts oder Adhäsionsmolekülen zusammenhängen, die beim Übergang von adhären zu Suspensionskulturen zu erwarten wären, ließen sich mit den in die hier verwendeten StellArrays nicht untersuchen. Zukünftige Experimente mit Analyse relevanter Oberflächenproteine und ihrer Glykosylierungen unter den verschiedenen Kulturbedingungen könnten hier weitergehende Aussagen erlauben. Vollständige Vergleiche der Genexpressionsmuster in unterschiedlichen Kultursystemen würden jedoch nur Genomweite Microarrays zulassen.

Mit Hilfe der verschiedenen angewendeten quantitativen Methoden konnte die Ähnlichkeit der Kultursysteme in Bezug auf Erhalt der Pluripotenz unterstrichen werden.

4.2.2.3. Das *in vitro* Differenzierungspotential als Beurteilungskriterium

Durch die hier durchgeführten *in vitro* Differenzierungsversuche konnte neben den *in vivo* Differenzierungen die Fähigkeit der Zellen zur Bildung verschiedener Zelltypen nachgewiesen werden. Neben dem generellen Nachweis ist es für eventuelle spätere therapeutische Anwendungen unerlässlich, spezifische Zelltypen aus den undifferenzierten Zellen generieren zu können. Verschiedene Gruppen konnten bereits in 2001 die Differenzierung humaner ES Zellen hinzu neuronalen Zelltypen [24-26], Insulin produzierenden Zellen [27] und Kardiomyozyten [29] zeigen. Ebenso konnte für die generierten hiPS die Differenzierung in verschiedene Zelltypen, wie z.B. Hepatozyten [43], neuronale Zelltypen [136] und Kardiomyozyten [44, 95] erreicht werden.

Die *in vitro* Differenzierung der in Suspensionskulturen expandierten Zellen in Derivate der drei Keimblätter konnte durch die aus PCR und Immunzytologie erhaltenen Daten eindeutig gezeigt werden. Da die kardiale Differenzierung pluripotenter Stammzellen einen Schwerpunkt der Arbeitsgruppe darstellt [22, 137] und notwendige Methoden in der Arbeitsgruppe etabliert waren, wurde die kardiale Differenzierung näher untersucht. Das Entstehen von spontan kontrahierenden Arealen, welche mit Kardiomyozyten spezifischen Markern (NKX 2.5 und kardialem Troponin T) anfärbbar waren, zeigte zunächst, dass hiPS aus Suspensionskultur generell kardial differenzieren können. Aus unserer Sicht reicht der Nachweis, dass die in Suspensionskultur generierten Zellen zu Derivaten aller Keimblätter differenzieren können, jedoch nicht aus, um die Funktionalität der neuen Kulturmethode zu belegen. Aus diesem Grund wurden zusätzlich quantitative Differenzierungsassays im Vergleich zu Zellen aus Feederzell-basierter Kultur durchgeführt. Das Potential zur Generierung kardialer Zelltypen aus Zellen der verschiedenen Expansionssysteme sollte quantitativ verglichen werden. Hierzu wurden Differenzierungskulturen mittels qPCR und quantitativen Analysen auf Einzelzellebene untersucht. Ein Vergleich der Anteile an Troponin T positiven Zellen führte zu sehr ähnlichen Ergebnissen, während die qPCR Daten eine höhere α MHC Expression in den Differenzierungskulturen zeigten, die aus Feederzell-basierten Expansionskulturen hervorgegangen waren. Da keine Aussage zum Reifegrad der entstandenen kardialen Zelltypen gemacht werden kann, könnte dieser Unterschied durch unterschiedlich starke α MHC Expression pro Zelle zurückzuführen sein und muss nicht zwangsläufig für eine effizientere Differenzierung stehen. Darüber hinaus konnte bereits durch die vergleichenden Expressionsanalysen der Zellen aus beiden Kultursystemen gezeigt werden, dass in den Feederzell-basierten Kulturen mesendodermale Markergene höher exprimiert waren als in den Suspensions-basierten Kulturen. Das Vorhandensein mesendodermaler Vorläuferzellen in den Kulturen würde wiederum die Differenzierung in diese Zelltypen begünstigen.

In bereits beschriebenen Protokollen zur kardialen Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen konnte gezeigt werden, dass die erhaltenen kontrahierenden Areale oft weniger als 1 % Kardiomyozyten enthalten [58]. Der Anteil an Troponin T positiven Zellen in den hier durchgeführten Experimenten von ~ 2 % liegt in einem ähnlichen Bereich. Erst durch Optimierungen konnten Anteile von bis zu 25 % kardialen Zelltypen erreicht werden [57, 58]. Da es in erster Linie darum ging, das Differenzierungspotential der verwendeten Zelltypen vergleichend zu untersuchen, wurden an dieser Stelle keine Experimente zur Steigerung der Effizienz durchgeführt. Für weitere Anwendungen von kardialen Zelltypen aus diesem System wären Optimierungen der Differenzierungseffizienz und Aufreinigungsstrategien zwingend notwendig. Die Möglichkeit, die in Suspension expandierten Zellaggregaten direkt in Differenzierungsbedingungen zu überführen, bietet sich im Weiteren an, um kombinierte Prozesse aus Expansion und anschließender Differenzierung zu erarbeiten. Wie Schröder et al. [61] für die Expansion von mESC und anschließender Differenzierung und Selektion von Kardiomyozyten zeigen konnten, eignen sich diese Strategien für die Bereitstellung relevanter Zelltypen aus kontrollierten Prozessen.

4.2.2.4. Die Genetische Stabilität

Eine notwendige Voraussetzung für therapeutische aber auch forschungsbezogene Anwendungen der pluripotenten Zellen und ihrer Derivate ist der Erhalt der genetischen Stabilität. hESC Linien gelten, nach erfolgreicher Etablierung als chromosomal stabil [138]. Mit zunehmender Kulturdauer und in Abhängigkeit der Kulturbedingungen steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit von genetischen Veränderungen an. Abnormale Chromosomenmuster konnten sowohl in Langzeitkulturen pluripotenter Zellen [139, 140] als auch nach Veränderung der Kulturbedingungen nachgewiesen werden [124, 141, 142]. Für Zellen aus den hier durchgeführten Suspensionskulturen konnte auch nach 20 Passagen noch ein normaler Karyotyp nachgewiesen werden. Die Ergebnisse belegen, dass pluripotente Stammzellen in Suspensionskultur keine höhere Neigung zu chromosomalen Abnormalitäten zeigen, als in Feederzell-basierten Kulturen. Die Untersuchungen wurden anhand von G-Banden Karyogrammen durchgeführt. Lefort et al. stellten allerdings [143] den Nachweis der genetischen Stabilität allein anhand von klassischen Methoden wie z.B. G-Banden Karyogrammen in Frage. Diese Methoden erreichen eine Auflösung von 5 – 10 Megabasen während sensitivere aber auch mit höherem Aufwand verbundene Methoden wie Single Nucleotide Polymorphismus Arrays (SNP) Auflösungen von unter 100 Kilobasen erlauben. Um klinische Anwendungen der generierten Zellen zu ermöglichen, sind umfangreiche Analysen der genetischen Stabilität, die über die standardmäßig verwendeten Methoden hinausgehen, in Zukunft nötig.

5. AUSBLICK

Die von Takahashi et al [19] in 2006 in ihrem bahnbrechenden Cell-Paper vorgestellte Reprogrammierung somatischer Zellen zu so genannten induzierten pluripotenten Stammzellen wird unterdessen als entscheidender Meilenstein der Stammzellforschung angesehen. Erstmals ist nun mit den humanen iPS ein ethisch unbedenklicher und in autologer Form herstellbarer Zelltyp verfügbar, welcher sich in alle erdenklichen Zelltypen differenzieren und potentiell unbegrenzt vermehren lässt. Die derzeitige rasante Entwicklung des Forschungsfeldes lässt vermuten, dass bisherige Hürden und Risiken für die Verwendung solcher Zellen in Klinik und Pharmascreening bald überwunden sein könnten. So wird derzeit mit Hochdruck daran gearbeitet, das Risiko der Teratombildung nach Transplantation zu minimieren, die bisher meist ineffiziente und wenig spezifische Differenzierung zu verbessern und Onkogene und inserierende virale Vektoren für die Reprogrammierung zu ersetzen.

Einer der kritischen Punkte für die klinische Verwendung von patienteneigenen Zellen, insbesondere wenn aus älteren Patienten isoliert, ist sicher die Gefahr, dass im Genom während des Lebens angehäufte Mutationen zu Funktionverlust und maligner Transformation in iPS-Zellen und deren Derivaten führen. Hier bietet die Verwendung von juvenilen Zellquellen wie Nabelschnurblut für die Herstellung von iPS eine Lösung an. Nachdem wir erst kürzlich zeigen konnten, dass sich aus Nabelschnurblut humane iPS generieren lassen, und diese z.B. in funktionelle Herzmuskelzellen differenziert werden können, müssen nun sicher Folgestudien durchgeführt werden, um z.B. deren genetische Stabilität während der Expansion zu belegen und Differenzierungsprotokolle zu optimieren.

Eine weitere Hürde für die klinische Anwendung solcher Zellen stellten bisher die traditionell verwendeten Kultursysteme dar. Unter den üblichen adhärennten (und meist „Feeder“-abhängigen) schlecht definierten Bedingungen war die Herstellung der benötigten riesigen Zellmengen in klinischer Qualität bisher nicht möglich. Durch die Entwicklung der innerhalb dieser Dissertation entwickelten Kulturbedingungen, welche nun erstmals die Expansion humaner pluripotenter Zellen in einem Suspensions-basierten System unter definierten Bedingungen erlauben, ist der erste Schritt hin zur „Large Scale“ Produktion unter kontrollierten Prozessbedingungen gelungen.

Für die nun geplanten Prozessoptimierungen steht unterdessen ein Parallelbioreaktorsystem zur Verfügung (DASGIP AG, Jülich, Deutschland) in dem 4 Kulturgefäße mit einem Arbeitsvolumen von 50 – 250 mL unter kontrollierten und geregelten Bedingungen betrieben werden können. Die Möglichkeit zur Regelung verschiedener Parameter wie z.B. Sauerstoffzufuhr, Durchmischungsgeschwindigkeit oder des pH Wertes

erlaubt es dabei, die Kulturen - im Gegensatz zu statischen 6 Well-Kulturen - permanent unter optimalen physiochemischen Bedingungen zu halten. Die kontrollierbaren geregelten Prozessbedingungen sollen in Zukunft nicht nur die Massenherstellung von iPS-Derivaten unter *GMP*-Bedingungen erlauben, sondern sollten durch die höherer Reproduzierbarkeit im Vergleich zu traditionellen Kulturen eine deutlich vereinfachte Untersuchung molekularer Grundlagen der Stammzellkultur erlauben, welche im Hinblick auf weitere Optimierungen von höchster Bedeutung sind.

So sollen basierend auf den erwarteten vertieften mechanistischen Einblicken Veränderungen der Mediumzusammensetzungen, Zelldichten oder Fütterungsstrategien für die Entwicklung optimierter Prozessbedingungen getestet werden. Da das eingesetzte Medium mTeSR1 ein erheblicher Kostenfaktor für die Prozesse ist, ist die Entwicklung alternativer Medien von bereits in Planung. Niedermolekulare Zusätze als Ersatz rekombinanter Faktoren wie bFGF oder TGF β , deren Bereitstellung in geeigneter Qualität sehr kostenaufwendig sein kann, könnten die Medienkosten senken.

Da durch Konstant halten physikalischer Größen wie Gefäß – und Rührergeometrie der im DASGIP System verwendete Reaktortyp eine lineare Skalierung vom Labormaßstab zu größeren Prozessvolumina erlaubt, sollten die in den 50 – 250 ml Kulturen erreichten Optimierungen auf größere Volumina übertragbar sein.

Anschließend an die Optimierung der Suspensionsprozesse zur Expansion sollen die generierten Zellen unter definierten Bedingungen zu relevanten Zelltypen, hier vor allem kardiovaskuläre Vorläufer, Kardiomyozyten, Endothelzellen und Lungenepithelzellen differenziert werden. Definierte Bedingungen wie sie etwa von Xu et al. für die Differenzierung von Kardiomyozyten unter serumfreien Bedingungen gezeigt werden konnte, sollen auf die in Suspension expandierten Zellen übertragen werden.

Die Erhöhung der Zelldichten könnte eine bessere Zellausbeute je eingesetzter Medieneinheit zulassen und somit zur Senkung der Gesamtprozesskosten beitragen. Eine kontinuierliche Prozessführung, wie sie von Niebruegge et al. vorgestellt wurde, lässt eine Erhöhung der Zellausbeute bei gleichzeitiger Verringerung des Mediumverbrauchs zu. Es ist zu erwarten, dass die Erhöhung der Zelldichte im Prozess die Bildung und Größe der Zellaggregate beeinflusst. Um entstehende Aggregate in Größenbereichen zu halten, die das Einsetzen von Differenzierungsprozessen hemmen, und die gleichmäßige Durchmischung der Suspension mit zunehmender Aggregatgröße im Verlauf des Prozesses zu gewährleisten ist die, wie auch von Schröder et al. gezeigte Veränderung des Rührerdesigns ein möglicher Optimierungspunkt [61].

Für die Beurteilung der kombinierten Suspensionsprozesse sollen weitere transgene hiPS Linien verwendet werden. Die mehrfach transgenen Linien sollen dabei sowohl ein Reporterkonstrukt zur Beurteilung des Pluripotenzstatus, (wie das hier verwendete OCT4eGFP Konstrukt) als auch Reportergene unter zelltypspezifischen Promotoren wie etwa α MHC oder MLC2v für Kardiomyozyten spezifische Expression, tragen. Die Trennung von terminal differenzierten oder Progenitor-Zellen, die für Zelltherapien eingesetzt werden sollen, von verbleibenden undifferenzierten Zellpopulationen ist zur Vermeidung der Teratombildung nach Transplantation unbedingt notwendig [54]. Die Ausstattung der verwendeten Reaktorsysteme mit Fluoreszenzsonden würde mit Hilfe einer Zelltypspezifischen Expression verschiedener Fluoreszenzproteine ein *On-line Monitoring* der Prozesse erlauben. Die Expression eines Antibiotikaresistenzgens unter der Kontrolle zelltypspezifischen Promotoren erlaubt wie von Klug et al. [144] bereits in 1996 für Kardiomyozytendifferenzierungen aus mESC gezeigt, eine Aufreinigung der erhalten Kardiomyozytenpopulation aus den Differenzierungskulturen und würde somit das Entfernen unerwünschter Zellpopulationen ermöglichen.

Ein auf diese Weise optimierter Prozess, der die Expansion und im Weiteren die Bereitstellung relevanter Zellpopulationen in der benötigten Reinheit ermöglicht, würde erstmals nicht nur die Voraussetzungen für eine industrielle Zellproduktion für die Anwendung in pharmakologischen Testsystemen schaffen, sondern könnte mittel- bis langfristig auch zum klinischen Einsatz iPS-abgeleiteter Stammzellderivate führen.

6. ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
ACTC	Alpha cardiac muscle 1
AFP	Alpha feto protein
AKAP13	A-kinase anchor protein 13
αMHC	Alpha Myosin Heavy Chain
ATL1	Atlastin GTPase 1
BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein
BIO	6-bromoindirubin-3'-oxime
BHK	Baby Hamster Kidney
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw	Beziehungsweise
C°	Grad Celsius
CCNA2	Cyclin A2
CCND1	Cyclin D1
CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
cDNA	complementary DNA
CDX2	Caudal type homeobox 2
CER1	Common eliminated region 1
CHO	Chinese Hamster Ovary
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1
COL2A1	Collagen, type II, alpha 1
COL3A1	Collagen, type III, alpha 1
COMMD3	COMM_Domain containing protein 3
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
CYLD	Cylindromatosis
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCN	Decorin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3B	DNA(cytosine-5-)methyltransferase 3 beta
dNTP	Desoxyribonukeotidtriphosphat
DPPA2	Developmental pluripotency associated 2
DPPA4	Developmental pluripotency associated 4
DPPA5	Developmental pluripotency associated 5
EB	Embryoid Body
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EOMES	Eomesodermin homolog
FACS	Fluorescens Activated Cell Sorting
FBXO15	F-box protein 15
FCS	Fötales Kälber Serum (Fetal Calf Serum)
FGF2	Fibroblast growth factor 2

FGF4	Fibroblast growth factor 4
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1
FN1	Fibronectin 1
FOXA2	Forkhead box A2
FOXD3	Forkhead box D3
FOXH1	Forkhead box H1
GABRB3	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3; GAL galanin prepropeptide
GATA4	GATA binding protein 4
GATA6	GATA binding protein 6
GBX2	Gastrulation brain homeobox 2
GDF3	Growth differentiation factor 3
GJA1	Gap junction protein, alpha 1
GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7
GSC	Gooseoid homeobox
GSK 3 I	Glykogen Synthase Kinase 3 Inhibitors
hESC	humane Embryonale Stammzellen
hiPS	humane induzierte pluripotente Stammzellen
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
KLF4	Kruppel-like factor 4
L	Liter
LAMA1	Laminin, alpha 1
LEFTB	Left-right determination, factor B
LEFTY2	Left-right determination factor 2
LIF	Leukemia inhibitory Factor
LIFR	Leukemia inhibitory factor receptor alpha
Lin28	RNA-binding protein LIN-28
LOX	Lysyl oxidase
MED17	Mediator complex subunit 17
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
mESC	Murine embryonale Stammzellen
MC	Microcarrier
min	Minute
ml	Milliliter
MLC2v	Myosin Light Chain 2 ventricular
MME	Membrane metallo-endopeptidase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MYC	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
MYST2	MYST histone acetyltransferase 2
NANOG	Homeobox transcription factor Nanog

NAT1	N-acetyltransferase 1
NCAM	Neural cell adhesion molecule 1
NES	Nestin
NEUROD1	Neurogenic differentiation 1
NODAL	Nodal homolog (mouse)
NOTCH1	Neurogenic locus notch homolog protein 1
OCT4	Pou5F1, POU class 5 homeobox 1
PARD6A	Par-6 partitioning defective 6 homolog alpha
PAX6	Paired box 6
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion)
Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PI	Propidium Iodid
PIM2	Pim-2 oncogene
PIPOX	Pipecolic acid oxidase
PODXL	Podocalyxin-like
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
qPCR	quantitative Real Time PCR
REST	RE1-silencing transcription factor
REX 1	ZFP42, zinc finger protein 42
RI	Rho Kinase Inhibitor
RNA	Ribonucleinsäure (Ribonucleicacid)
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SHH	Sonic hedgehog homolog
SLC16A1	Solute carrier family 16, member 1
SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SR	Serum Replacement
SSEA	Stage specific embryonic antigene
STELLA	Developmental pluripotency associated 3 (DPPA3)
SYP	Synaptophysin
T	Brachyury
T_A	Annealing Temperatur
TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1
TERT	Telomerase
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TRA	Trafalger
TRIM71	Tripartite motif-containing 71
TRP53	Tumor protein p53
TTR	Transthyretin
TUBB3	Tubulin, beta 3
UPM	Umdrehungen pro Minute
UTF1	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
VASH2	Vasohibin 2
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
ZNF206	Zinc finger protein 206

7. LITERATUR

- [1] J.Y. Liu, J. Hafner, G. Dragieva, B. Seifert, and G. Burg, Autologous cultured keratinocytes on porcine gelatin microbeads effectively heal chronic venous leg ulcers, *Wound Repair Regen.* 12 (2004) 148-56.
- [2] K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, N. Maeda, H. Watanabe, K. Yamamoto, S. Nagai, A. Kikuchi, Y. Tano, and T. Okano, Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface, *Transplantation.* 77 (2004) 379-85.
- [3] J.A. Thomson, J. Kalishman, T.G. Golos, M. Durning, C.P. Harris, R.A. Becker, and J.P. Hearn, Isolation of a primate embryonic stem cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (1995) 7844-8.
- [4] H. Suemori, T. Tada, R. Torii, Y. Hosoi, K. Kobayashi, H. Imahie, Y. Kondo, A. Iritani, and N. Nakatsuji, Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI, *Dev Dyn.* 222 (2001) 273-9.
- [5] J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science.* 282 (1998) 1145-7.
- [6] J.H. Kim, J.M. Auerbach, J.A. Rodriguez-Gomez, I. Velasco, D. Gavin, N. Lumelsky, S.H. Lee, J. Nguyen, R. Sanchez-Pernaute, K. Bankiewicz, and R. McKay, Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease, *Nature.* 418 (2002) 50-6.
- [7] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell.* 131 (2007) 861-72.
- [8] D. Jing, A. Parikh, J.M. Canty, Jr., and E.S. Tzanakakis, Stem cells for heart cell therapies, *Tissue Eng Part B Rev.* 14 (2008) 393-406.
- [9] L.T. Lock and E.S. Tzanakakis, Stem/Progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes, *Tissue Eng.* 13 (2007) 1399-412.
- [10] H.E. Young and A.C. Black, Jr., Adult stem cells, *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 276 (2004) 75-102.
- [11] A.M. Wobus, Potential of embryonic stem cells, *Mol Aspects Med.* 22 (2001) 149-64.
- [12] M.J. Evans and M.H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature.* 292 (1981) 154-6.
- [13] I. Ginis, Y. Luo, T. Miura, S. Thies, R. Brandenberger, S. Gerecht-Nir, M. Amit, A. Hoke, M.K. Carpenter, J. Itskovitz-Eldor, and M.S. Rao, Differences between human and mouse embryonic stem cells, *Dev Biol.* 269 (2004) 360-80.
- [14] S. Koestenbauer, N.H. Zech, H. Juch, P. Vanderzwalmen, L. Schoonjans, and G. Dohr, Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells, *Am J Reprod Immunol.* 55 (2006) 169-80.
- [15] M. Amit, M.K. Carpenter, M.S. Inokuma, C.P. Chiu, C.P. Harris, M.A. Waknitz, J. Itskovitz-Eldor, and J.A. Thomson, Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture, *Dev Biol.* 227 (2000) 271-8.
- [16] H.J. Rippon and A.E. Bishop, Embryonic stem cells, *Cell Prolif.* 37 (2004) 23-34.
- [17] M.J. Munsie, A.E. Michalska, C.M. O'Brien, A.O. Trounson, M.F. Pera, and P.S. Mountford, Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei, *Curr Biol.* 10 (2000) 989-92.
- [18] C.A. Cowan, J. Atienza, D.A. Melton, and K. Eggan, Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells, *Science.* 309 (2005) 1369-73.
- [19] K. Takahashi and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell.* 126 (2006) 663-76.

- [20] B.J. Conley, A.O. Trounson, and R. Mollard, Human embryonic stem cells form embryoid bodies containing visceral endoderm-like derivatives, *Fetal Diagn Ther.* 19 (2004) 218-23.
- [21] X.L. Kuai, C. Gagliardi, M. Flaas, and B.A. Bunnell, Differentiation of nonhuman primate embryonic stem cells along neural lineages, *Differentiation.* 77 (2009) 229-38.
- [22] K. Schwanke, S. Wunderlich, M. Reppel, M.E. Winkler, M. Matzkies, S. Groos, J. Itskovitz-Eldor, A.R. Simon, J. Hescheler, A. Haverich, and U. Martin, Generation and characterization of functional cardiomyocytes from rhesus monkey embryonic stem cells, *Stem Cells.* 24 (2006) 1423-32.
- [23] B.E. Reubinoff, M.F. Pera, C.Y. Fong, A. Trounson, and A. Bongso, Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro, *Nat Biotechnol.* 18 (2000) 399-404.
- [24] S.C. Zhang, M. Wernig, I.D. Duncan, O. Brustle, and J.A. Thomson, In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells, *Nat Biotechnol.* 19 (2001) 1129-33.
- [25] M. Schuldiner, R. Eiges, A. Eden, O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor, R.S. Goldstein, and N. Benvenisty, Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells, *Brain Res.* 913 (2001) 201-5.
- [26] B.E. Reubinoff, P. Itsykson, T. Turetsky, M.F. Pera, E. Reinhartz, A. Itzik, and T. Ben-Hur, Neural progenitors from human embryonic stem cells, *Nat Biotechnol.* 19 (2001) 1134-40.
- [27] S. Assady, G. Maor, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor, K.L. Skorecki, and M. Tzukerman, Insulin production by human embryonic stem cells, *Diabetes.* 50 (2001) 1691-7.
- [28] D.S. Kaufman, E.T. Hanson, R.L. Lewis, R. Auerbach, and J.A. Thomson, Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (2001) 10716-21.
- [29] I. Kehat, D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir, H. Segev, M. Amit, A. Gepstein, E. Livne, O. Binah, J. Itskovitz-Eldor, and L. Gepstein, Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes, *J Clin Invest.* 108 (2001) 407-14.
- [30] D.A. Lamba, J. Gust, and T.A. Reh, Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice, *Cell Stem Cell.* 4 (2009) 73-9.
- [31] D. Yang, Z.J. Zhang, M. Oldenburg, M. Ayala, and S.C. Zhang, Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats, *Stem Cells.* 26 (2008) 55-63.
- [32] J. Yu, M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian, J. Nie, G.A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II, and J.A. Thomson, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science.* 318 (2007) 1917-20.
- [33] M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochizuki, N. Takizawa, and S. Yamanaka, Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts, *Nat Biotechnol.* 26 (2008) 101-6.
- [34] D. Huangfu, K. Osafune, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, S. Chen, W. Muhlestein, and D.A. Melton, Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2, *Nat Biotechnol.* 26 (2008) 1269-75.
- [35] J.B. Kim, B. Greber, M.J. Arauzo-Bravo, J. Meyer, K.I. Park, H. Zaehres, and H.R. Scholer, Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4, *Nature.* 461 (2009) 649-3.
- [36] M.E. Hester, S. Song, C.J. Miranda, A. Eagle, P.H. Schwartz, and B.K. Kaspar, Two factor reprogramming of human neural stem cells into pluripotency, *PLoS One.* 4 (2009) e7044.

- [37] J. Yu, K. Hu, K. Smuga-Otto, S. Tian, R. Stewart, Slukvin, II, and J.A. Thomson, Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences, *Science*. 324 (2009) 797-801.
- [38] K. Kaji, K. Norrby, A. Paca, M. Mileikovsky, P. Mohseni, and K. Woltjen, Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors, *Nature*. 458 (2009) 771-5.
- [39] K. Woltjen, I.P. Michael, P. Mohseni, R. Desai, M. Mileikovsky, R. Hamalainen, R. Cowling, W. Wang, P. Liu, M. Gertsenstein, K. Kaji, H.K. Sung, and A. Nagy, piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells, *Nature*. 458 (2009) 766-70.
- [40] D. Kim, C.H. Kim, J.I. Moon, Y.G. Chung, M.Y. Chang, B.S. Han, S. Ko, E. Yang, K.Y. Cha, R. Lanza, and K.S. Kim, Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins, *Cell Stem Cell*. 4 (2009) 472-6.
- [41] T. Aasen, A. Raya, M.J. Barrero, E. Garreta, A. Consiglio, F. Gonzalez, R. Vassena, J. Bilic, V. Pekarik, G. Tiscornia, M. Edel, S. Boue, and J.C. Izpisua Belmonte, Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes, *Nat Biotechnol*. 26 (2008) 1276-84.
- [42] K.D. Choi, J. Yu, K. Smuga-Otto, G. Salvagiotto, W. Rehrauer, M. Vodyanik, J. Thomson, and I. Slukvin, Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells, *Stem Cells*. 27 (2009) 559-67.
- [43] Z. Song, J. Cai, Y. Liu, D. Zhao, J. Yong, S. Duo, X. Song, Y. Guo, Y. Zhao, H. Qin, X. Yin, C. Wu, J. Che, S. Lu, M. Ding, and H. Deng, Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells, *Cell Res*. 19 (2009) 1233-42.
- [44] J. Zhang, G.F. Wilson, A.G. Soerens, C.H. Koonce, J. Yu, S.P. Palecek, J.A. Thomson, and T.J. Kamp, Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells, *Circ Res*. 104 (2009) e30-41.
- [45] Z. Ye, H. Zhan, P. Mali, S. Dowey, D.M. Williams, Y.Y. Jang, C.V. Dang, J.L. Spivak, A.R. Moliterno, and L. Cheng, Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders, *Blood*. 114 (2009) 5473-80.
- [46] R. Maehr, S. Chen, M. Snitow, T. Ludwig, L. Yagasaki, R. Goland, R.L. Leibel, and D.A. Melton, Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106 (2009) 15768-73.
- [47] A.D. Ebert, J. Yu, F.F. Rose, Jr., V.B. Mattis, C.L. Lorson, J.A. Thomson, and C.N. Svendsen, Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient, *Nature*. 457 (2009) 277-80.
- [48] J.T. Dimos, K.T. Rodolfa, K.K. Niakan, L.M. Weisenthal, H. Mitsumoto, W. Chung, G.F. Croft, G. Saphier, R. Leibel, R. Goland, H. Wichterle, C.E. Henderson, and K. Eggan, Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons, *Science*. 321 (2008) 1218-21.
- [49] J. Winkler, I. Sotiriadou, S. Chen, J. Hescheler, and A. Sachinidis, The potential of embryonic stem cells combined with -omics technologies as model systems for toxicology, *Curr Med Chem*. 16 (2009) 4814-27.
- [50] P. Sartipy, P. Bjorquist, R. Strehl, and J. Hyllner, The application of human embryonic stem cell technologies to drug discovery, *Drug Discov Today*. 12 (2007) 688-99.
- [51] J.E. Trosko and C.C. Chang, Factors to consider in the use of stem cells for pharmaceutical drug development and for chemical safety assessment, *Toxicology*. (2009).
- [52] S. Adler, C. Pellizzer, L. Hareng, T. Hartung, and S. Bremer, First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells, *Toxicol In Vitro*. 22 (2008) 200-11.
- [53] A. Colman and O. Dreesen, Pluripotent stem cells and disease modeling, *Cell Stem Cell*. 5 (2009) 244-7.
- [54] C.E. Murry and G. Keller, Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development, *Cell*. 132 (2008) 661-80.

- [55] M. Drukker, G. Katz, A. Urbach, M. Schuldiner, G. Markel, J. Itskovitz-Eldor, B. Reubinoff, O. Mandelboim, and N. Benvenisty, Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (2002) 9864-9.
- [56] C.J. Taylor, E.M. Bolton, S. Pocock, L.D. Sharples, R.A. Pedersen, and J.A. Bradley, Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching, *Lancet.* 366 (2005) 2019-25.
- [57] X.Q. Xu, R. Graichen, S.Y. Soo, T. Balakrishnan, S.N. Rahmat, S. Sieh, S.C. Tham, C. Freund, J. Moore, C. Mummery, A. Colman, R. Zweigerdt, and B.P. Davidson, Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells, *Differentiation.* 76 (2008) 958-70.
- [58] C.L. Mummery, D. Ward, and R. Passier, Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes by coculture with endoderm in serum-free medium, *Curr Protoc Stem Cell Biol.* Chapter 1 (2007) Unit 1F 2.
- [59] J. Jiang, M. Au, K. Lu, A. Eshpeter, G. Korbitt, G. Fisk, and A.S. Majumdar, Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells, *Stem Cells.* 25 (2007) 1940-53.
- [60] J.N. Warnock and M. Al-Rubeai, Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells, *Biotechnol Appl Biochem.* 45 (2006) 1-12.
- [61] M. Schroeder, S. Niebruegge, A. Werner, E. Willbold, M. Burg, M. Ruediger, L.J. Field, J. Lehmann, and R. Zweigerdt, Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control, *Biotechnol Bioeng.* 92 (2005) 920-33.
- [62] G.R. Martin, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78 (1981) 7634-8.
- [63] C.M. Verfaillie, M.F. Pera, and P.M. Lansdorp, Stem cells: hype and reality, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* (2002) 369-91.
- [64] T. Matsuda, T. Nakamura, K. Nakao, T. Arai, M. Katsuki, T. Heike, and T. Yokota, STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells, *Embo J.* 18 (1999) 4261-9.
- [65] T. Yamane, S.J. Dylla, M. Muijtjens, and I.L. Weissman, Enforced Bcl-2 expression overrides serum and feeder cell requirements for mouse embryonic stem cell self-renewal, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (2005) 3312-7.
- [66] Q.L. Ying, J. Nichols, I. Chambers, and A. Smith, BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3, *Cell.* 115 (2003) 281-92.
- [67] R.K. Humphrey, G.M. Beattie, A.D. Lopez, N. Bucay, C.C. King, M.T. Firpo, S. Rose-John, and A. Hayek, Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent, *Stem Cells.* 22 (2004) 522-30.
- [68] M.E. Levenstein, T.E. Ludwig, R.H. Xu, R.A. Llanas, K. VanDenHeuvel-Kramer, D. Manning, and J.A. Thomson, Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal, *Stem Cells.* 24 (2006) 568-74.
- [69] U. Yoshida-Koide, T. Matsuda, K. Saikawa, Y. Nakanuma, T. Yokota, M. Asashima, and H. Koide, Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 313 (2004) 475-81.
- [70] R.H. Xu, X. Chen, D.S. Li, R. Li, G.C. Addicks, C. Glennon, T.P. Zwaka, and J.A. Thomson, BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast, *Nat Biotechnol.* 20 (2002) 1261-4.
- [71] N. Sato, L. Meijer, L. Skaltsounis, P. Greengard, and A.H. Brivanlou, Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor, *Nat Med.* 10 (2004) 55-63.
- [72] B.S. Mallon, K.Y. Park, K.G. Chen, R.S. Hamilton, and R.D. McKay, Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells, *Int J Biochem Cell Biol.* 38 (2006) 1063-75.

- [73] M. Amit, V. Margulets, H. Segev, K. Shariki, I. Laevsky, R. Coleman, and J. Itskovitz-Eldor, Human feeder layers for human embryonic stem cells, *Biol Reprod.* 68 (2003) 2150-6.
- [74] C.Y. Fong and A. Bongso, Derivation of human feeders for prolonged support of human embryonic stem cells, *Methods Mol Biol.* 331 (2006) 129-35.
- [75] C. Xu, M.S. Inokuma, J. Denham, K. Golds, P. Kundu, J.D. Gold, and M.K. Carpenter, Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells, *Nat Biotechnol.* 19 (2001) 971-4.
- [76] H.K. Kleinman, M.L. McGarvey, L.A. Liotta, P.G. Robey, K. Tryggvason, and G.R. Martin, Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma, *Biochemistry.* 21 (1982) 6188-93.
- [77] Y. Li, S. Powell, E. Brunette, J. Lebkowski, and R. Mandalam, Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products, *Biotechnol Bioeng.* 91 (2005) 688-98.
- [78] P. Stojkovic, M. Lako, S. Przyborski, R. Stewart, L. Armstrong, J. Evans, X. Zhang, and M. Stojkovic, Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells, *Stem Cells.* 23 (2005) 895-902.
- [79] P. Stojkovic, M. Lako, R. Stewart, S. Przyborski, L. Armstrong, J. Evans, A. Murdoch, T. Strachan, and M. Stojkovic, An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells, *Stem Cells.* 23 (2005) 306-14.
- [80] T.E. Ludwig, V. Bergendahl, M.E. Levenstein, J. Yu, M.D. Probasco, and J.A. Thomson, Feeder-independent culture of human embryonic stem cells, *Nat Methods.* 3 (2006) 637-46.
- [81] A. Joannides, C. Fiore-Heriche, K. Westmore, M. Caldwell, A. Compston, N. Allen, and S. Chandran, Automated mechanical passaging: a novel and efficient method for human embryonic stem cell expansion, *Stem Cells.* 24 (2006) 230-5.
- [82] S. Terstegge, I. Laufenberg, J. Pochert, S. Schenk, J. Itskovitz-Eldor, E. Endl, and O. Brustle, Automated maintenance of embryonic stem cell cultures, *Biotechnol Bioeng.* 96 (2007) 195-201.
- [83] R.J. Thomas, D. Anderson, A. Chandra, N.M. Smith, L.E. Young, D. Williams, and C. Denning, Automated, scalable culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions, *Biotechnol Bioeng.* 102 (2009) 1636-44.
- [84] E.Y. Fok and P.W. Zandstra, Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation, *Stem Cells.* 23 (2005) 1333-42.
- [85] A.M. Fernandes, T.G. Fernandes, M.M. Diogo, C.L. da Silva, D. Henrique, and J.M. Cabral, Mouse embryonic stem cell expansion in a microcarrier-based stirred culture system, *J Biotechnol.* 132 (2007) 227-36.
- [86] B.W. Phillips, R. Horne, T.S. Lay, W.L. Rust, T.T. Teck, and J.M. Crook, Attachment and growth of human embryonic stem cells on microcarriers, *J Biotechnol.* 138 (2008) 24-32.
- [87] S.K. Oh, A.K. Chen, Y. Mok, X. Chen, U.M. Lim, A. Chin, A.B. Choo, and S. Reuveny, Long-term microcarrier suspension cultures of human embryonic stem cells, *Stem Cell Res.* (2009).
- [88] Y. Nie, V. Bergendahl, D.J. Hei, J.M. Jones, and S.P. Palecek, Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers, *Biotechnol Prog.* 25 (2009) 20-31.
- [89] C.L. Bauwens, R. Peerani, S. Niebruegge, K.A. Woodhouse, E. Kumacheva, M. Husain, and P.W. Zandstra, Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories, *Stem Cells.* 26 (2008) 2300-10.
- [90] N.I. zur Nieden, J.T. Cormier, D.E. Rancourt, and M.S. Kallos, Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors, *J Biotechnol.* 129 (2007) 421-32.

- [91] J.T. Cormier, N.I. zur Nieden, D.E. Rancourt, and M.S. Kallos, Expansion of undifferentiated murine embryonic stem cells as aggregates in suspension culture bioreactors, *Tissue Eng.* 12 (2006) 3233-45.
- [92] S. Gerecht-Nir, S. Cohen, and J. Itskovitz-Eldor, Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation, *Biotechnol Bioeng.* 86 (2004) 493-502.
- [93] G. Yirme, M. Amit, I. Laevsky, S. Osenberg, and J. Itskovitz-Eldor, Establishing a dynamic process for the formation, propagation, and differentiation of human embryoid bodies, *Stem Cells Dev.* 17 (2008) 1227-41.
- [94] C.M. Cameron, H. Wei-Shou, and S.K. Dan, Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation, *Biotechnology and Bioengineering.* 94 (2006) 938-948.
- [95] A. Haase, R. Olmer, K. Schwanke, S. Wunderlich, S. Merkert, C. Hess, R. Zweigerdt, I. Gruh, J. Meyer, S. Wagner, L.S. Maier, D.W. Han, S. Glage, K. Miller, P. Fischer, H.R. Scholer, and U. Martin, Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood, *Cell Stem Cell.* 5 (2009) 434-41.
- [96] M.F. Pera, B. Reubinoff, and A. Trounson, Human embryonic stem cells, *J Cell Sci.* 113 (Pt 1) (2000) 5-10.
- [97] C. Xu, E. Rosler, J. Jiang, J.S. Lebkowski, J.D. Gold, C. O'Sullivan, K. Delavan-Boorsma, M. Mok, A. Bronstein, and M.K. Carpenter, Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium, *Stem Cells.* 23 (2005) 315-23.
- [98] R.H. Xu, R.M. Peck, D.S. Li, X. Feng, T. Ludwig, and J.A. Thomson, Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells, *Nat Methods.* 2 (2005) 185-90.
- [99] H. Koivisto, M. Hyvarinen, A.M. Stromberg, J. Inzunza, E. Matilainen, M. Mikkola, O. Hovatta, and H. Teerijoki, Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor, *Reprod Biomed Online.* 9 (2004) 330-7.
- [100] M. Amit, C. Shariki, V. Margulets, and J. Itskovitz-Eldor, Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells, *Biol Reprod.* 70 (2004) 837-45.
- [101] M. Schuldiner, O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor, D.A. Melton, and N. Benvenisty, Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (2000) 11307-12.
- [102] K. Yoshida, I. Chambers, J. Nichols, A. Smith, M. Saito, K. Yasukawa, M. Shoyab, T. Taga, and T. Kishimoto, Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways, *Mech Dev.* 45 (1994) 163-71.
- [103] L. Daheron, S.L. Opitz, H. Zaehres, M.W. Lensch, P.W. Andrews, J. Itskovitz-Eldor, and G.Q. Daley, LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells, *Stem Cells.* 22 (2004) 770-8.
- [104] T. Sumi, Y. Fujimoto, N. Nakatsuji, and H. Suemori, STAT3 is dispensable for maintenance of self-renewal in nonhuman primate embryonic stem cells, *Stem Cells.* 22 (2004) 861-72.
- [105] K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J.B. Takahashi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Muguruma, and Y. Sasai, A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells, *Nat Biotechnol.* 25 (2007) 681-6.
- [106] A.D. Pyle, L.F. Lock, and P.J. Donovan, Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival, *Nat Biotechnol.* 24 (2006) 344-50.
- [107] N. Harb, T.K. Archer, and N. Sato, The Rho-Rock-Myosin signaling axis determines cell-cell integrity of self-renewing pluripotent stem cells, *PLoS One.* 3 (2008) e3001.
- [108] C. Ellerstrom, R. Strehl, K. Noaksson, J. Hyllner, and H. Semb, Facilitated expansion of human embryonic stem cells by single-cell enzymatic dissociation, *Stem Cells.* 25 (2007) 1690-6.

- [109] R. Bajpai, J. Lesperance, M. Kim, and A.V. Terskikh, Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells, *Mol Reprod Dev.* 75 (2008) 818-27.
- [110] I. Gruh, S. Wunderlich, M. Winkler, K. Schwanke, J. Heinke, U. Blomer, A. Ruhparwar, B. Rohde, R.K. Li, A. Haverich, and U. Martin, Human CMV immediate-early enhancer: a useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors, *J Gene Med.* 10 (2008) 21-32.
- [111] S. Wunderlich, I. Gruh, M.E. Winkler, J. Beier, K. Radtke, A. Schmiedl, S. Groos, A. Haverich, and U. Martin, Type II Pneumocyte-Restricted Green Fluorescent Protein Expression After Lentiviral Transduction of Lung Epithelial Cells, *Hum Gene Ther.* (2007).
- [112] L. Gerrard, D. Zhao, A.J. Clark, and W. Cui, Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency, *Stem Cells.* 23 (2005) 124-33.
- [113] I. Gruh, K. Schwanke, S. Wunderlich, U. Blomer, M. Scherr, A. Ganser, A. Haverich, and U. Martin, Shuttle system allowing simplified cloning of expression cassettes into advanced generation lentiviral vectors, *Biotechniques.* 38 (2005) 530, 532, 534.
- [114] V.A. Maltsev, A.M. Wobus, J. Rohwedel, M. Bader, and J. Hescheler, Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents, *Circ Res.* 75 (1994) 233-44.
- [115] E.S. Ng, R.P. Davis, L. Azzola, E.G. Stanley, and A.G. Elefanty, Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation, *Blood.* 106 (2005) 1601-3.
- [116] M. Dejosez, J.S. Krumenacker, L.J. Zitur, M. Passeri, L.F. Chu, Z. Songyang, J.A. Thomson, and T.P. Zwaka, Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells, *Cell.* 133 (2008) 1162-74.
- [117] S. Akilesh, D.J. Shaffer, and D. Roopenian, Customized molecular phenotyping by quantitative gene expression and pattern recognition analysis, *Genome Res.* 13 (2003) 1719-27.
- [118] Y.H. Loh, S. Agarwal, I.H. Park, A. Urbach, H. Huo, G.C. Heffner, K. Kim, J.D. Miller, K. Ng, and G.Q. Daley, Generation of induced pluripotent stem cells from human blood, *Blood.* 113 (2009) 5476-9.
- [119] T. Ono, Y. Uehara, Y. Saito, and H. Ikehata, Mutation theory of aging, assessed in transgenic mice and knockout mice, *Mech Ageing Dev.* 123 (2002) 1543-52.
- [120] A. Trifunovic and N.G. Larsson, Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing, *J Intern Med.* 263 (2008) 167-78.
- [121] R.M. Marion, K. Strati, H. Li, A. Tejera, S. Schoeftner, S. Ortega, M. Serrano, and M.A. Blasco, Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell.* 4 (2009) 141-54.
- [122] S. Yamanaka, A fresh look at iPS cells, *Cell.* 137 (2009) 13-7.
- [123] H.E. Broxmeyer, Will iPS cells enhance therapeutic applicability of cord blood cells and banking?, *Cell Stem Cell.* 6 21-4.
- [124] K. Hasegawa, T. Fujioka, Y. Nakamura, N. Nakatsuji, and H. Suemori, A method for the selection of human embryonic stem cell sublines with high replating efficiency after single-cell dissociation, *Stem Cells.* 24 (2006) 2649-60.
- [125] X. Li, R. Krawetz, S. Liu, G. Meng, and D.E. Rancourt, ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells, *Hum Reprod.* 24 (2009) 580-9.
- [126] X. Li, G. Meng, R. Krawetz, S. Liu, and D.E. Rancourt, The ROCK inhibitor Y-27632 enhances the survival rate of human embryonic stem cells following cryopreservation, *Stem Cells Dev.* 17 (2008) 1079-85.
- [127] R. Krawetz, J.T. Taiani, S. Liu, G. Meng, X. Li, M.S. Kallos, and D. Rancourt, Large-Scale Expansion of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells in Stirred Suspension Bioreactors, *Tissue Eng Part C Methods.* (2009).
- [128] C.H. Widberg, F.S. Newell, A.W. Bachmann, S.N. Ramnoruth, M.C. Spelta, J.P. Whitehead, L.J. Hutley, and J.B. Prins, Fibroblast growth factor receptor 1 is a key

- regulator of early adipogenic events in human preadipocytes, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296 (2009) E121-31.
- [129] S. Niebruegge, A. Nehring, H. Bar, M. Schroeder, R. Zweigerdt, and J. Lehmann, Cardiomyocyte production in mass suspension culture: embryonic stem cells as a source for great amounts of functional cardiomyocytes, *Tissue Eng Part A.* 14 (2008) 1591-601.
- [130] S. Wunderlich, I. Gruh, M.E. Winkler, J. Beier, K. Radtke, A. Schmiedl, S. Groos, A. Haverich, and U. Martin, Type II pneumocyte-restricted green fluorescent protein expression after lentiviral transduction of lung epithelial cells, *Hum Gene Ther.* 19 (2008) 39-52.
- [131] R. Eiges, M. Schuldiner, M. Drukker, O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor, and N. Benvenisty, Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells, *Curr Biol.* 11 (2001) 514-8.
- [132] C. Gimond, S. Marchetti, and G. Pages, Differentiation of mouse embryonic stem cells into endothelial cells: genetic selection and potential use in vivo, *Methods Mol Biol.* 330 (2006) 303-29.
- [133] H.R. Scholer, S. Ruppert, N. Suzuki, K. Chowdhury, and P. Gruss, New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4, *Nature.* 344 (1990) 435-9.
- [134] G.J. Pan, Z.Y. Chang, H.R. Scholer, and D. Pei, Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4, *Cell Res.* 12 (2002) 321-9.
- [135] M. Parmar and M. Li, Early specification of dopaminergic phenotype during ES cell differentiation, *BMC Dev Biol.* 7 (2007) 86.
- [136] S. Karumbayaram, B.G. Novitch, M. Patterson, J.A. Umbach, L. Richter, A. Lindgren, A.E. Conway, A.T. Clark, S.A. Goldman, K. Plath, M. Wiedau-Pazos, H.I. Kornblum, and W.E. Lowry, Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons, *Stem Cells.* 27 (2009) 806-11.
- [137] C. Mauritz, K. Schwanke, M. Reppel, S. Neef, K. Katsirntaki, L.S. Maier, F. Nguemo, S. Menke, M. Haustein, J. Hescheler, G. Hasenfuss, and U. Martin, Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells, *Circulation.* 118 (2008) 507-17.
- [138] C. Hanson and G. Caisander, Human embryonic stem cells and chromosome stability, *Apmis.* 113 (2005) 751-5.
- [139] N.R. Forsyth, A. Musio, P. Vezzoni, A.H. Simpson, B.S. Noble, and J. McWhir, Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities, *Cloning Stem Cells.* 8 (2006) 16-23.
- [140] A. Maitra, D.E. Arking, N. Shivapurkar, M. Ikeda, V. Stastny, K. Kassaei, G. Sui, D.J. Cutler, Y. Liu, S.N. Brimble, K. Noaksson, J. Hyllner, T.C. Schulz, X. Zeng, W.J. Freed, J. Crook, S. Abraham, A. Colman, P. Sartipy, S. Matsui, M. Carpenter, A.F. Gazdar, M. Rao, and A. Chakravarti, Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells, *Nat Genet.* 37 (2005) 1099-103.
- [141] M.P. Imreh, K. Gertow, J. Cedervall, C. Unger, K. Holmberg, K. Szoke, L. Csoregh, G. Fried, S. Dilber, E. Blennow, and L. Ahrlund-Richter, In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells, *J Cell Biochem.* 99 (2006) 508-16.
- [142] P. Catalina, R. Montes, G. Ligerio, L. Sanchez, T. de la Cueva, C. Bueno, P.E. Leone, and P. Menendez, Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties?, *Mol Cancer.* 7 (2008) 76.
- [143] N. Lefort, A.L. Perrier, Y. Laabi, C. Varela, and M. Peschanski, Human embryonic stem cells and genomic instability, *Regen Med.* 4 (2009) 899-909.
- [144] M.G. Klug, M.H. Soonpaa, G.Y. Koh, and L.J. Field, Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts, *J Clin Invest.* 98 (1996) 216-24.

8. ANHANG

Synthesis of Rho-Kinase inhibitor Y-27632 (**1**)

(A.Kirschning, J. Paleček, Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover)

Y-27632¹ is highly potent, cell-permeable, selective ROCK (Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase) inhibitor. $K_i = 140 \text{ nM}$ for p160^{ROCK}.

Previous syntheses of **1** (Figure 1) and its analogues have originated from an inexpensive 1,4-cyclohexyldimethanol^{1a}, *trans*-1,4-cyclohexanedicarboxylic acid^{1b} or α -alkylbenzylamines as chiral educts^{1c-d}.

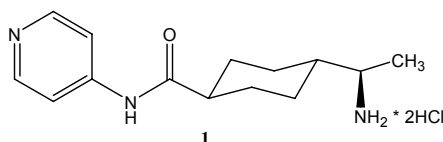
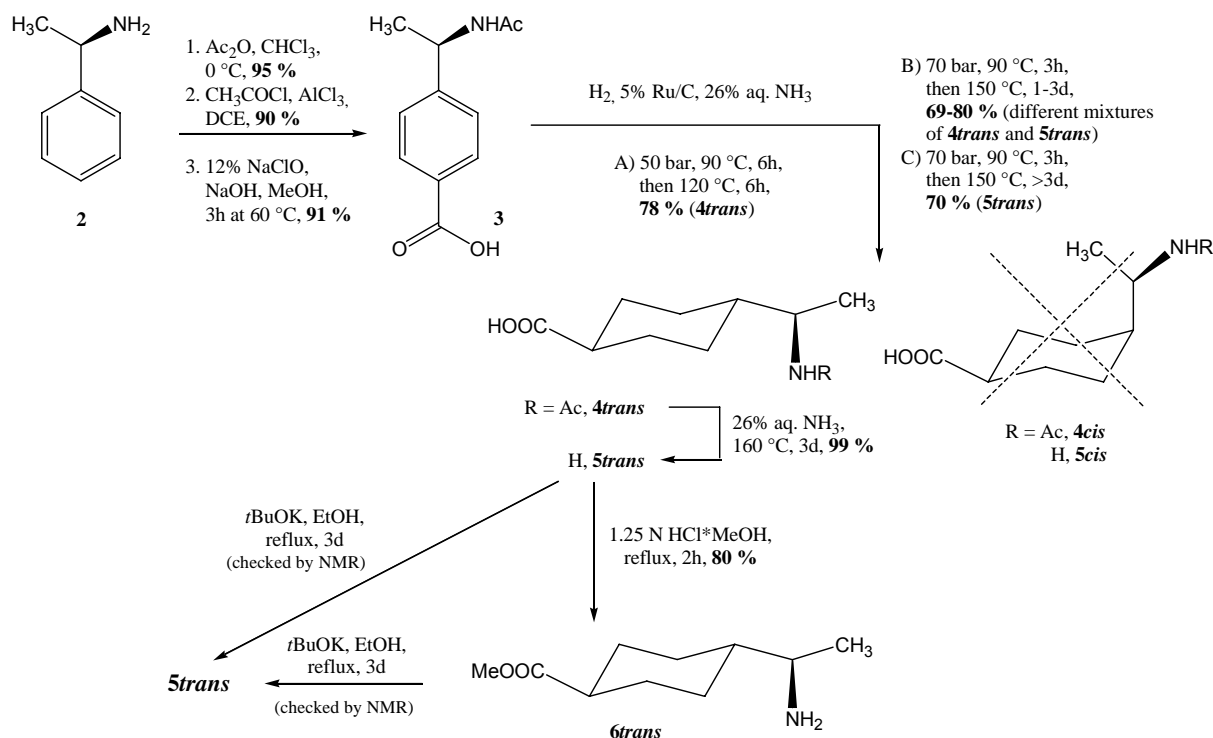


Figure 1 Rho-Kinase inhibitor Y-27632 (**1**)

Our synthesis of **1** started from the commercially available (*R*)-1-phenylethylamine (**2**) (Scheme 1) which was in the three-step sequences via *N*-acylation^{1c,2}, Friedel-Crafts acylation^{1c,3} and Haloform reaction^{1c,3} transformed to the carboxylic acid **3**.

The crucial hydrogenation step (H_2 , 5% Ru/C, 26% aqueous ammonia)^{1c} was carried out in an autoclave under different conditions. During more than twenties hydrogenation experiments, we observed that only a single cyclohexane isomer **4** or **5** was formed. Lower initial pressure, temperature and short reaction time (50 bar/90 °C/6 h, then 120 °C/6 h) led to the acetamidoethyl acid **4** nevertheless the starting benzoic acid **3** (ca 10 %) was observed in the NMR spectrum. When the hydrogenation was carried out at higher pressure 70 bar and temperature 150 °C for 1-3 days, the mixture of two isomers, the *N*-acetylated acid **4** and the deacetylated acid **5**, in different ratios was isolated. The resulting mixtures **4** and **5** were afterwards heated in an autoclave with 26% aqueous ammonia at 160 °C for 3 days and were fully converted to the aminoethyl acid **5**. The longer reaction time (>3 days) under same hydrogenation conditions afforded directly the acid **5**. In all cases the acids **4** or **5** were originated as a single *trans*-isomer. The *cis/trans* cyclohexane-mixtures were not isolated as well as the before-published results^{1c}.



Scheme 1 Synthesis of (*R*)-4-(1-aminoethyl)cyclohexanecarboxylic acid (**5trans**) and isomerisation attempts

The desired *trans*-conformation on a cyclohexane ring **4,5** was determined with two isomerization attempts, $^1\text{H-NMR}$ analysis of the analytical pure sample **5** and later also comparison of NMR data the synthesized Y-27632 (**1**) with commercial available compound **1** (Figure 3).

Firstly, we attempted two isomerization experiments^{1c,4,5} (Scheme 1) on the acid **5** and the methyl ester **6** which was easily prepared by esterification using methanolic HCl (1.25 N solution). The compound **5** or **6** were refluxed with *t*BuOK in ethanol for 3 days without the conformation changes on the cyclohexane ring (checked by NMR), only the ester **6** hydrolysed to the acid **5**. These results indicate that the thermodynamically more stable *trans*-conformation of the acid **5** (**4**) was already formed during the hydrogenation step.

Next, the recrystallization of the cyclohexanecarboxylic acid hydrochloride **5trans** $\cdot\text{HCl}$ from the mixture ethanol-acetonitrile gave an analytical pure sample and the assignment of the axial-*proton coupling constants* ($^3J_{\text{aa}}$ ca 12-13 Hz) at the positions H-1 and H-4 in $^1\text{H-NMR}$ (Figure 2) confirmed *trans*-conformation.

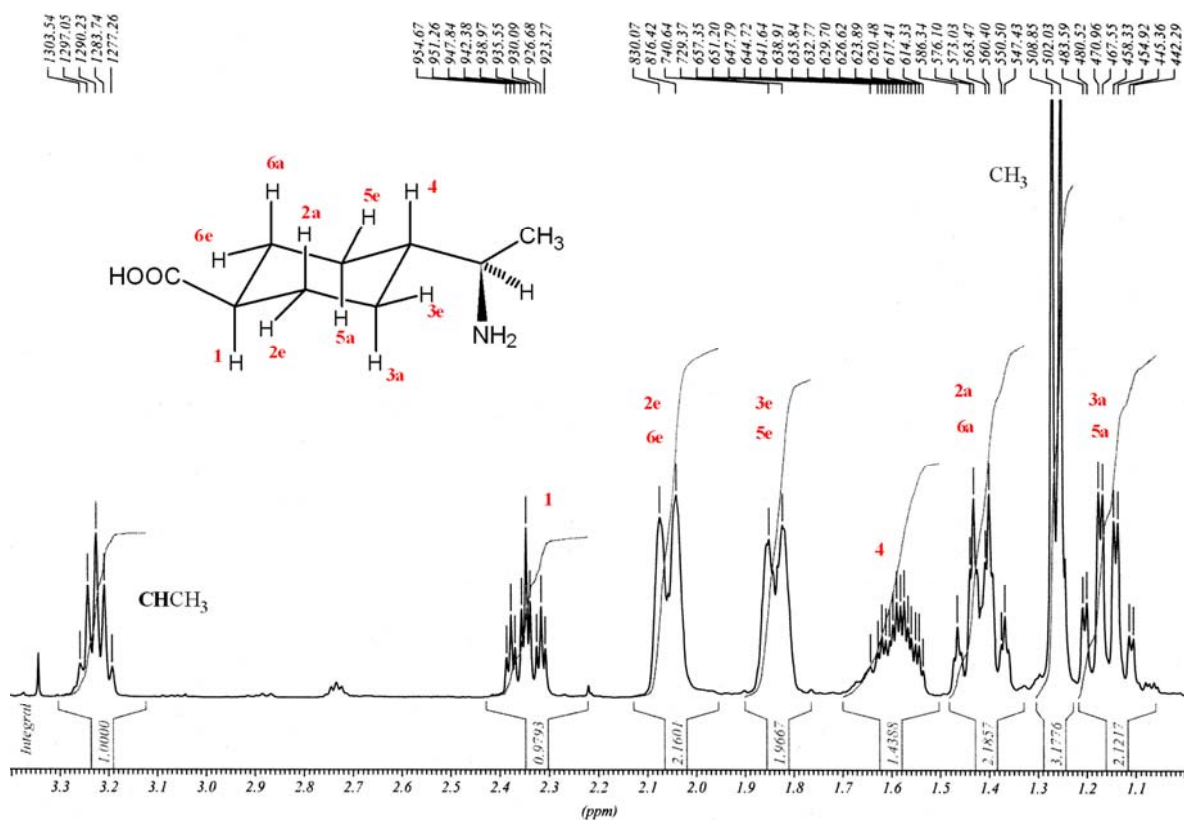
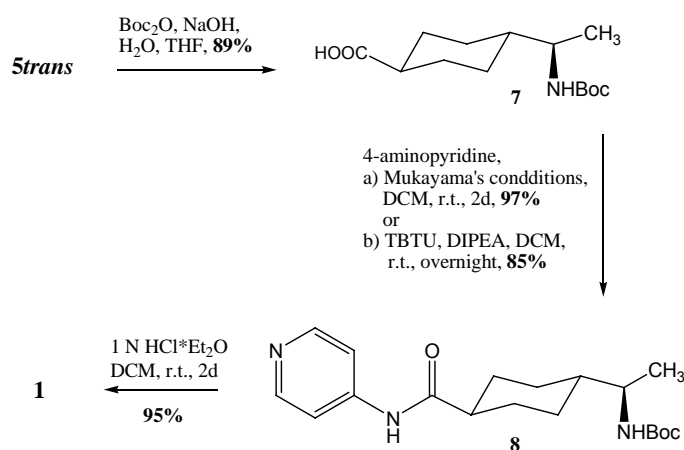


Figure 2 $^1\text{H-NMR}$ spectra of *trans*-(*R*)-4-(1-aminoethyl)cyclohexanecarboxylic acid hydrochloride (**5trans*HCl**)

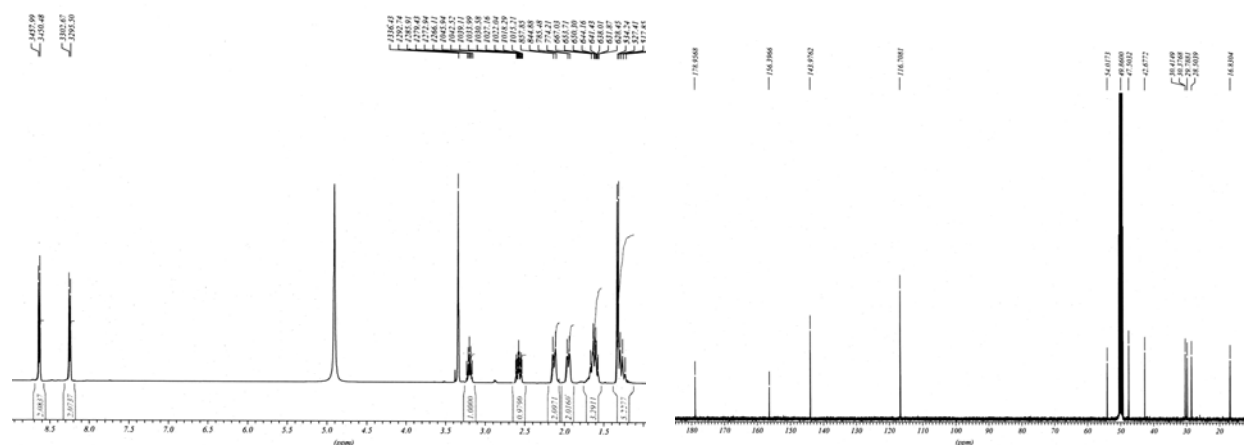
Then, the synthesis of Y-27632 (**1**) followed by *N*-Boc protection⁶ and the amidation of the acid **5** with 4-aminopyridine under the Mukayama's (2-chloro-1-methyl pyridinium iodide, Et_3N , DCM)⁷ (97%) or TBTU/DIPEA^{1a} (85%) conditions. The Boc-protected group on **8** was cleaved with 1N HCl solution in diethyl ether to afford the target **1** (Scheme 2).



Scheme 2 Synthesis of Rho-Kinase inhibitor Y-27632 (**1**)

The spectroscopic data (^1H -, ^{13}C -NMR, MS) as well as the optical rotation of the Rho-Kinase inhibitor Y-27632 (**1**) ($[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -11.5 (c 0.5, MeOH) were in full agreement with the commercial available compound (Figure 3). Surprisingly, this optical rotation is not in the agreement with the published data: Ref. ^{1b} $[\alpha]_{\text{D}}$ +4.3 (c 1, MeOH) and Ref. ^{1d} $[\alpha]_{\text{D}}$ +4.6 (c 1, MeOH). Other analytical data were not published up to now.

a)



b)

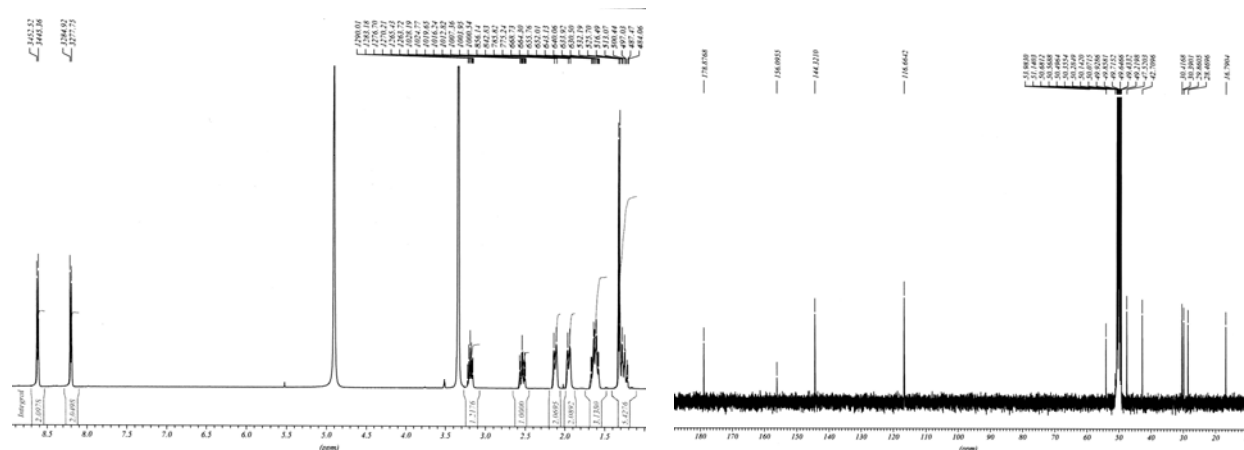


Figure 3 ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of Rho-Kinase inhibitor (**1**): a) synthesized compound; b) commercial available compound

Experimental part:**(*R*)-*N*-(1-phenylethyl)acetamide**

Acetic anhydride (33.7 g, 330 mmol, 2 equiv) was dropwise added to a solution of (*R*)-1-phenylethylamine (**2**) (20 g, 165 mmol, 1 equiv) in chloroform (150 mL) at 0 °C. After completion of the reaction (checked by TLC, ethyl acetate-methanol, 9:1), ice water (150 mL) was added and the mixture was extracted with chloroform (3x150 mL). The extract was washed with 1N aqueous solution of NaOH (100 mL), dried over MgSO₄, filtered, concentrated and dried overnight under vacuum to afford the acetamide (*R*)-*N*-(1-phenylethyl)acetamide (25.6 g, 95 %) as white crystals.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.50 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH₃), 2.01 (s, 3H, CH₃CONH), 5.21 (quint, 1H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH), 5.83 (bs, 1H, NH), 7.31-7.39 (m, 5H, 5 x Ar-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 21.7 (CH₃), 23.5 (CH₃), 48.8 (CH), 126.2 (Ar-CH), 127.4 (Ar-CH), 128.7 (Ar-CH), 143.1 (Ar-C), 169.0 (C=O).

The spectroscopic data of the (*R*)-*N*-(1-phenylethyl)acetamide were in full agreement with the literature^{1c,2b}.

(*R*)-*N*-(1-(4-acetylphenyl)ethyl)acetamide

Aluminium chloride (44 g, 331.3 mmol, 2 equiv) was portionwise added to a solution of (*R*)-*N*-(1-phenylethyl)acetamide (27 g, 165.6 mmol, 1 equiv) in 1,2-dichloroethane (150 mL) at r.t. Then, acetyl chloride (15.6 g, 198.7 mmol, 1.2 equiv) was dropwise added, the mixture was stirred at the same temperature for 1 h and subsequently at 60 °C for 3 h. After completion of the reaction (checked by TLC, ethyl acetate), the mixture was poured on the ice and extracted with dichloromethane (3 x 150 mL). The extract was washed with water (100 mL) dried over MgSO₄, filtered, concentrated and the residue obtained was crystallized from the mixture of isopropyl ether-ethanol (ca 9:1) to afford the (*R*)-*N*-(1-(4-acetylphenyl)ethyl)acetamide (30.6 g, 90 %) as orange crystals.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.49 (d, 3H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃), 1.99 (s, 3H, CH₃CONH), 2.56 (s, 3H, CH₃CO), 5.14 (quint, 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH), 5.90 (bs, 1H, NH), 7.41 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2 x Ar-H), 7.92 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, 2 x Ar-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 21.8 (CH₃), 23.3 (CH₃), 26.6 (CH₃), 48.6 (CH), 126.3 (Ar-CH), 128.5 (Ar-CH), 136.1 (Ar-C), 148.7 (Ar-C), 169.2 (C=O), 197.7 (C=O).

The spectroscopic data of the (*R*)-*N*-(1-(4-acetylphenylethyl)acetamide) were in full agreement with the literature^{1c}.

(*R*)-4-(1-acetamidoethyl)benzoic acid (3)

Sodium hypochlorite (12% solution, 130 mL) was dropwise added to a mixture of (*R*)-*N*-(1-(4-acetylphenyl)ethyl)acetamide (10 g, 48.7 mmol, 1 equiv), and sodium hydroxide (2.2 g, 52.9 mmol, 1.1 equiv) in methanol (100 mL) at r.t.. The mixture was heated to 60 °C for 1 h. After completion of the reaction (checked by TLC, ethyl acetate-methanol, 9:1), the solvent was removed and the residue obtained was poured into ice water (200 mL). Then, conc. hydrochloric acid was added to make a precipitate of crystals, which were filtered off and a layer of acidic water was extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The organic layer was evaporated, dried overnight under vacuum and resulted crystals were added to a precipitate of crystals obtained before. The collected yellow crystals afforded the (*R*)-4-(1-acetamidoethyl)benzoic acid (**3**) (9.18 g, 91 %).

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 400 MHz): δ 1.49 (d, 3H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, CH₃), 2.01 (s, 3H, CH₃CONH), 5.06 (q, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, CH), 7.49 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, 2 x Ar-H), 8.01 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, 2 x Ar-H), Signal NH was not observed in the spectrum.

¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 100 MHz): δ 23.1 (CH₃), 23.4 (CH₃), 50.9 (CH), 127.9 (Ar-CH), 131.4 (Ar-C), 131.5 (Ar-CH), 151.5 (Ar-C), 170.5 (C=O), 173.3 (C=O).

The spectroscopic data of the (*R*)-4-(1-acetamidoethyl)benzoic acid (**3**) were in full agreement with the literature^{1c}.

Hydrogenation – general procedure

A solution of benzoic acid **3** and 5% ruthenium carbon in 26% aqueous ammonia was stirred in an autoclave. The catalyst was filtered off through a short **pad of Celite**. The **filter pad** was **washed with water and the filtrate was concentrated and dried overnight** under vacuum to afford the acids **4trans** (Method A), mixture of **4trans/5trans** (Method B) or **5trans** (Method C).

Method A: *trans*-(*R*)-4-(1-acetamidoethyl)cyclohexanecarboxylic acid (*4trans*)

Benzoic acid **3** (1 g, 4.83 mmol) and 5% ruthenium carbon (0.7 g) in 26% aqueous ammonia (5 mL) were reacted according to the general procedure at initial hydrogen pressure of 50 bar and at 90 °C for 6 h and then at 120 °C for 6 h and yielded the acid **4trans** (0.80 g, 78 %). The starting benzoic acid **3** (ca 10%) was observed in the NMR spectrum.

Method B: mixture of *4trans*/*5trans*

Benzoic acid **3** (5 g, 24.1 mmol) and 5% ruthenium carbon (5 g) in 26% aqueous ammonia (25 mL) were reacted according to the general procedure at initial hydrogen pressure of 70 bar and at 90 °C for 3 h and then at 150 °C for 1-3 d and yielded the mixture of **4trans/5trans** in the different ratios (3-3.9 g, calc. ca 69-80 %).

Method C: *trans*-(*R*)-4-(1-aminoethyl)cyclohexanecarboxylic acid (*5trans*)

Benzoic acid **3** (5 g, 24.1 mmol) and 5% ruthenium carbon (5 g) in 26% aqueous ammonia (25 mL) were reacted according to the general procedure at initial hydrogen pressure of 70 bar and at 90 °C for 3 h and then at 150 °C for >3 d and yielded the acid **5trans** (2.89 g, 70 %).

Transformation of the mixture *4trans*/*5trans* to *5trans*

A solution of the mixture **4trans/5trans** (4 g) in 26% aqueous ammonia (40 mL) was stirred in an autoclave at 160 °C for 3 d. Then, the solvent was evaporated and the product was dried **overnight** under vacuum to afford the acid **5trans** (3.7 g, calc. ca 99%).

Transformation of *5trans* to the cyclohexanecarboxylic acid hydrochloride (*5transHCl)**

The concentrated HCl (0.5 mL) was slowly added to a solution of the acid **5trans** (0.3 g) in water (2 mL). The mixture was stirred overnight, the solvent was evaporated and the resulting solid dried **overnight** under vacuum and then recrystallized from a mixture of ethanol-acetonitrile to afford the analytical pure sample of acid **5trans***HCl (0.28 g).

***trans*-(R)-4-(1-acetamidoethyl)cyclohexanecarboxylic acid (4*trans*)**

¹H-NMR (MeOH-*d*₄/DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.05 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, CH₃), 1.17-1.68 (m, 7H), 1.92 (s, 3H, CH₃CO), 2.05 (m, 2H), 2.52 (m, 1H, H-1), 3.81 (quint, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, CHCH₃).

¹³C-NMR (MeOH-*d*₄/DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 16.9 (CH₃), 21.4 (CH₃CO), 25.5 (CH₂), 25.6 (CH₂), 26.1 (CH₂), 26.3 (CH₂), 39.5 (CH-4), 41.7 (CH-1), 47.8 (CHCH₃), 170.8 (CH₃CO), 177.2 (C=O).

MS (-ESI): m/z (%) = 212.1570 (100) [M-H]⁻.

MS (+ESI): m/z (%) = 277.1996 (80) [M+ CH₃CN + Na]⁺, 213.1982 (100) [M]⁺; mixture of acetonitrile/H₂O was used as a solvent.

HR-MS: 277.1529 (277.1528 calc. for C₁₁H₁₉N₁O₃ + CH₃CN + Na⁺); mixture of acetonitrile/H₂O was used as a solvent.

***trans*-(R)-4-(1-aminoethyl)cyclohexanecarboxylic acid (5*trans*)**

Mp 255 °C [Lit.^{4b} mp >290 °C]

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz): δ 1.16 (m, H-3a and H-5a), 1.18 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, CH₃), 1.37 (m, 1H, H-4), 1.45 (dq, 2H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ²J_{HH} = ³J_{HH} = 13 Hz, H-2a or H-6a), 1.46 (dq, 2H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ²J_{HH} = ³J_{HH} = 13 Hz, H-6a or H-2a), 2.01 (m, 2H, H-3e and H-5e), 2.05 (m, 2H, H-2e and H-6e), 2.18 (tt, 1H, ³J_{HH} = 3.5 Hz, ³J_{HH} = 12.3 Hz, H-1), 2.88 (quint, 1H, ³J_{HH} = 6.4 Hz, CHCH₃). Signals NH₂ and COOH were not observed in the spectrum.

¹³C-NMR (D₂O, 100 MHz): δ 18.9 (CH₃), 28.1 (CH₂), 28.3 (CH₂), 30.2 (2xCH₂), 43.7 (CH-4), 47.6 (CH-1), 51.4 (CHCH₃), 186.8 (C=O).

MS (+ESI): m/z (%) = 172.1392 (100) [M+H]⁺.

***trans*-(*R*)-4-(1-aminoethyl)cyclohexanecarboxylic acid hydrochloride (*5trans**HCl)**

Mp 254 °C [Lit.^{4b} mp >290 °C]

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz): δ 1.16 (dq, 2H, ³J_{HH} = 3.1 Hz, ²J_{HH} = ³J_{HH} = 13 Hz, H-3a and H-5a), 1.26 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, CH₃), 1.42 (dq, 1H, ³J_{HH} = 3.1 Hz, ²J_{HH} = ³J_{HH} = 13 Hz, H-2a or H-6a), 1.43 (dq, 1H, ³J_{HH} = 3.1 Hz, ²J_{HH} = ³J_{HH} = 13 Hz, H-6a or H-2a), 1.59 (dt, 1H, ³J_{HH} = 3.1 Hz, ³J_{HH} = 6.5 Hz, ³J_{HH} = 12.6 Hz, H-4), 1.83 (m, 2H, H-3e and H-5e), 2.05 (m, 2H, H-2e and H-6e), 2.35 (tt, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ³J_{HH} = 12.3 Hz, H-1), 3.22 (quint, 1H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, CHCH₃). Signals NH₂ and COOH were not observed in the spectrum.

¹³C-NMR (D₂O, 100 MHz): δ 14.9 (CH₃), 26.1 (CH₂), 27.2 (CH₂), 27.8 (CH₂), 27.9 (CH₂), 39.9 (CH-4), 42.5 (CH-1), 51.9 (CHCH₃), 181.0 (C=O).

MS (+ESI): m/z (%) = 172.1407 (100) [M+H]⁺.

HR-MS: 172.1334 (172.1338 calc. for C₉H₁₇N₁O₂ + H⁺).

***trans*-(*R*)-4-(1-aminoethyl)cyclohexanecarboxylic acid methyl ester (*6trans*)**

Methanolic HCl (1.25 N solution, 9.3 mL, 11.7 mmol, 2 equiv) was added to cyclohexanecarboxylic acid *5trans* (1 g, 5.84 mmol, 1 equiv) in dry methanol (20 mL) under an argon atmosphere. The mixture was refluxed for 2h then the solvent was removed under vacuum, chloroform (30 mL) and water (30 mL) were added. After addition of solid potassium carbonate (1 g), the mixture was extracted with chloroform (3 x 30 mL). The combined **organic layers** were dried over MgSO₄, filtered, concentrated under reduced pressure to afford methyl ester *6trans* (0.86 g, 80 %) as an oil.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.00 (m, 2H, H-3a and H-5a), 1.01 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, CH₃), 1.12 (m, 1H, H-4), 1.39 (dq, 1H, ³J_{HH} = 3.1 Hz, ²J_{HH} = ³J_{HH} = 13 Hz, H-2a or H-6a), 1.40 (dq, 1H, ³J_{HH} = 3.1 Hz, ²J_{HH} = ³J_{HH} = 13 Hz, H-6a or H-2a), 1.50 (bs, 2H, NH₂), 1.81 (m, 2H, H-3e and H-5e), 1.99 (m, 2H, H-2e and H-6e), 2.19 (tt, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ³J_{HH} = 12.3 Hz, H-1), 2.65 (quint, 1H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, CHCH₃), 3.62 (s, 3H, COOCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 20.9 (CH₃), 27.8 (CH₂), 27.9 (CH₂), 28.8 (CH₂), 27.9 (CH₂), 43.2 (CH-4), 44.4 (CH-1), 51.2 (COOCH₃), 51.4 (CHCH₃), 176.4 (C=O).

Isomerization attempt with the acid 5trans

Potassium *tert*-butoxide (0.1 g, 0.88 mmol, 3 equiv) was added to a solution of cyclohexanecarboxylic acid **5trans** (0.05 g, 0.29 mmol, 1 equiv) in ethanol (2 mL) and the mixture was refluxed for 2 d. Then the mixture was concentrated and the residue **dried overnight** under vacuum to afford the acid **5trans** (checked by ^1H - and ^{13}C -NMR).

Isomerization attempt with the ester 6trans

Potassium *tert*-butoxide (0.09 g, 0.81 mmol, 3 equiv) was added to a solution of methyl ester **6trans** (0.05 g, 0.27 mmol, 1 equiv) in ethanol (2 mL) and the mixture was refluxed for 2 d. Then the mixture was concentrated and the residue **dried overnight** under vacuum to afford the acid **5trans** (checked by ^1H - and ^{13}C -NMR).

trans-(R)-4-(1-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)cyclohexanecarboxylic acid (7)

Cyclohexanecarboxylic acid **5trans** (1 g, 5.84 mmol, 1 equiv) was dissolved in a mixture of water (30 mL) and THF (30 mL) at 0 °C. Then, sodium hydroxide (0.47 g, 11.7 mmol, 2 equiv) was added. After stirring for 30 min, *tert*-butyl dicarbonate (1.53 g, 7.01 mmol, 1.2 equiv) was added, the mixture was warmed to r.t and stirred for 2 d (checked by TLC, ethyl acetate-petroleum ether, 1:1). THF was removed under vacuum, the aqueous layer was acidified with HCl (1 N) to pH 4 and extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL). The **combined organic layers** were dried over MgSO_4 , filtered, concentrated under reduced pressure. The crude product **7** was purified by flash column chromatography (SiO_2 , ethyl acetate-petroleum ether, 1:1) to afford the Boc-acid **7** (1.4 g, 89 %) as white crystals.

^1H -NMR ($\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz): δ 1.08 (m, 2H, H-3a and H-5a), 1.10 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, CH_3), 1.32 (m, 3H, H-2a, H-4 and H-6a), 1.47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.88 (m, 2H, H-3e and H-5e), 2.05 (m, 2H, H-2e and H-6e), 2.22 (tt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 12$ Hz, H-1), 3.40 (quint, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, CHCH_3). Signals NH and COOH were not observed in the spectrum.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 18.3 (CH_3), 28.4 ($(\text{CH}_3)_3$), 27.7 (CH_2), 28.0 (CH_2), 28.5 (2 x CH_2), 42.7 (CH-4), 43.0 (CH-1), 50.4 (CHCH_3), 79.1 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$), 155.5 (NHC=O), 181.6 (C=O).

MS (-ESI): m/z (%) = 270.1447 (100) $[\text{M-H}]^-$.

HR-MS: 270.1705 (271.1705 calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_1\text{O}_4 - \text{H}^+$).

trans-tert-butyl (R)-1-((1-(1R,4R)-4-(pyridin-4-ylcarbamoyl)cyclohexyl)ethylcarbamate
(8)

a) Mukaiyama's coupling

1-Methyl-2-chloropyridinium iodide (1.13 g, 4.42 mmol, 1.2 equiv) was added to a stirred mixture of Boc-carboxylic acid **7** (1 g, 3.69 mmol, 1 equiv), 4-aminopyridine (0.36 g, 3.87 mmol, 1.05 equiv) and triethylamine (1.26 mL, 8.84 mmol, 2.4 equiv) in dichloromethane (50 mL) under an argon atmosphere at r.t. The reaction was stirred for 2 d (checked by TLC, dichloromethane-methanol, 95:5 and ethyl acetate-petroleum ether, 1:1). After completion of the reaction, water (50 mL) was added and the mixture extracted with dichloromethane (3 x 40 mL). The combined **organic layers** were dried over MgSO₄, filtered, concentrated under reduced pressure. The crude product **8** was purified by a column chromatography (SiO₂, dichloromethane-methanol, 95:5) to afford the amide **8** (1.24 g, 97 %) as yellow crystals.

b) TBTU-coupling

DIPEA (0.1 mL, 0.55 mmol, 1.5 equiv) and TBTU (0.14 g, 0.44 mmol, 1.2 equiv) were added successively to a stirred mixture of Boc-carboxylic acid **7** (0.1 g, 0.37 mmol, 1 equiv), 4-aminopyridine (0.04 g, 0.41 mmol, 1.1 equiv) in dichloromethane (5 mL) under an argon atmosphere at 0 °C. The reaction mixture was warmed to r.t. and checked by TLC (dichloromethane-methanol, 95:5 and ethyl acetate-petroleum ether, 1:1). After stirring for 2 d, water (5 mL) was added and the mixture extracted with dichloromethane (3 x 4 mL). The combined **organic layers** were dried over MgSO₄, filtered, concentrated under reduced pressure. The crude product **8** was purified by a column chromatography (SiO₂, dichloromethane-methanol, 95:5) to afford the amide **8** (0.11 g, 85 %) as yellow crystals.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.07 (m, 2H, H-3a and H-5a), 1.08 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, CH₃), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.43 (m, 3H, H-2a, H-4, H-6a), 1.85 (m, 2H, H-3e and H-5e), 2.02 (m, 2H, H-2e and H-6e), 2.33 (tt, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ³J_{HH} = 12 Hz, H-1), 3.48 (quint, 1H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, CHCH₃), 4.48 (bs, 1H, NH), 7.59 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 2 x Py-H), 8.44 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 2 x Py-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 18.6 (CH₃), 28.4 ((CH₃)₃), 28.4 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 31.8 (CH₂), 38.6 (CH), 42.7 (CH), 46.2 (CH), 79.1 (C-(CH₃)₃), 113.6 (Py-CH), 145.6 (Py-C), 150.4 (Py-CH), 155.6 (NHC=O), 175.3 (C=O).

MS (+ESI): m/z (%) = 349.2450 (50) [M+H]⁺, 348.2061 (100) [M]⁺.

HR-MS: 348.2288 (348.2287 calc. for C₁₉H₂₉N₃O₃ + H⁺).

Rho-Kinase inhibitor Y-27632 (1)

HYDROGEN CHLORIDE SOLUTION (1.0 M IN DIETHYL ETHER, 20.2 mL, 20.2 MMOL, 10 EQUIV) WAS ADDED DROPWISE TO A STIRRED MIXTURE OF AMIDE **8** (0.7 G, 2.02 MMOL, 1 EQUIV) IN DICHLOROMETHANE (30 mL) UNDER AN ARGON ATMOSPHERE AT 0 °C. THE REACTION WAS WARMED TO R.T. AND STIRRED FOR 2 D (CHECKED BY TLC, DICHLOROMETHANE-METHANOL, 95:5 AND 1:1). AFTER COMPLETION OF THE REACTION, THE SOLVENTS WERE EVAPORATED, DRIED OVERNIGHT UNDER VACUUM AND *RECRYSTALLIZED FROM A MIXTURE OF DIETHYL ETHER-METHANOL (CA 9:1) TO AFFORD* THE INHIBITOR **1** (0.61 G, 95 %) AS WHITE YELLOW CRYSTALS.

Mp 258 °C [Lit.^{1d} mp 286-287 °C for bis-hydrochloride monohydrate and 276 °C for bis-hydrochloride ½ hydrate]

$[\alpha]_D^{20}$ -11.5 (c 0.5, MeOH) [Lit.^{1b} $[\alpha]_D$ +4.3 (c 1, MeOH); Lit.^{1d} $[\alpha]_D$ +4.6 (c 1, MeOH)].

IR (film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2858, 2028, 1713, 1639, 1609, 1573, 1502, 1480, 1386, 1312, 1292, 1246, 1176, 1139, 1039, 929, 826.

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 400 MHz): δ 1.27 (dq, 2H, ³*J*_{HH} = 3.4 Hz, ²*J*_{HH} = ³*J*_{HH} = 13 Hz, H-3a or H-5a), 1.28 (dq, 2H, ³*J*_{HH} = 3.4 Hz, ²*J*_{HH} = ³*J*_{HH} = 13 Hz, H-5a or H-3a), 1.33 (d, 3H, ³*J*_{HH} = 6.8 Hz, CH₃), 1.62 (m, 3H, H-2a, H-4, CH-6a), 1.95 (m, 2H, H-3e and H-5e), 2.13 (m, 2H, H-2e and H-6e), 2.57 (tt, 1H, ³*J*_{HH} = 3.4 Hz, ³*J*_{HH} = 11.9 Hz, H-1), 3.20 (quint, 1H, ³*J*_{HH} = 6.8 Hz, CHCH₃), 8.25 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 7.2 Hz, 2 x Py-H), 8.64 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 7.2 Hz, 2 x Py-H). Signals NH and NH₂ were not observed in the spectrum.

¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 100 MHz): δ 16.8 (CH₃), 28.5 (CH₂), 29.8 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.4 (CH₂), 42.7 (CH-4), 47.5 (CH-1), 54.0 (CHCH₃), 116.7 (Py-CH), 144.0 (Py-CH), 156.4 (Py-C), 178.9 (C=O).

MS (+ESI): *m/z* (%) = 248.1512 (100) [M+H]⁺.

MS (-ESI): *m/z* (%) = 282.1715 (100) [M+Cl]⁻.

HR-MS: 248.1763 (248.1763 calc. for C₁₄H₂₁N₃O₁ + H⁺).

The spectroscopic data of the Rho-Kinase inhibitor Y-27632 (**1**) were in full agreement with the commercial available compound.

References:**1. Rho-Kinase inhibitor Y-27632**

- a) K. Gingras, H. Avedissian, E. Thouin, V. Boulanger, C. Essagian, L. McKerracher, W.D. Lubell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, **2004**, 4931-4934
- b) D. Belotti, J. L. Peglion, J. Cossy, *Lett. Org. Chem.* 2, **2005**, 634-636
- c) M. Arita, T. Saito, H. Okuda, H. Sato, M. Uehata, US Patent, **1995**, Nr: 5,478,838
- d) T. Muro, T. Seki, M. Abe, J. Inui, H. Sato, US Patent, **1991**, Nr: 4,997,834

2. N-acylation: (R)-N-(1-phenylethyl)acetamide

- a) see 1c
- b) K. Gollnick, S. Kögler, D. Maurer, *J. Org. Chem.* 57, **1992**, 229 - 234
- c) M.-J. Kim, W.-H. Kim, K. Han, K.C. Yoon, *Org. Lett.* 9, **2007**, 1157 - 1159

3. Friedel-Crafts acylation: (R)-N-(1-(4-acetylphenyl)ethyl)acetamide and Haloform reaction: (R)-4-(1-acetamidoethyl)benzoic acid

- a) see 1c
- b) T. Hanano, K. Adachi, Y. Aoki, H. Morimoto, Y. Naka, M. Hisadome, T. Fukuda, H. Sumichika, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, **2000**, 881-884

4. cis and trans (R)-4-(1-aminoethyl)cyclohexanecarboxylic acid

- a) see 1c
- b) S. Isoda, M. Hirata, *Chem. Pharm. Bull.* 27, **1979**, 2735-2742

5. Methyl ester + isomerization

- a) see 1c
- b) F.R. Jensen, L.H. Gale, J.E. Rodgers, *J. Am. Chem. Soc.* 90, **1968**, 5793-5799
- c) K. Drandarov, A. Guggisberg, M. Hesse, *Helv. Chim. Acta* 85, **2002**, 979-989

6. Boc protection

- a) C.M. Svahn, F. Merenyi, L. Karlson, L. Widlund, M. Grälls, *J. Med. Chem.* 29, **1986**, 448-453
- b) I.M. Pastor, P. Västilä, H. Adolfsson, *Chem. Eur. J.* 9, **2003**, 4031-4045
- c) D.M. Shendage, R. Fröhlich, G. Haufe, *Org. Lett.* 6, **2004**, 3675-3678

7. Carboxamide via Mukaiyama's coupling

- a) see 1b
- b) E. Bald, K. Saigo, T. Mukaiyama, *Chem. Lett.* **1975**, 1163-1166

ZENTRUM ANGEWANDTE CHEMIE

Institut für Technische Chemie

Prof. Dr. Thomas Scheper

Institut für Technische Chemie, Callinstr. 3, 30167 Hannover

Partner in der Forschung

1 1
1 0 2
1 0 0 4

Leibniz
Universität
Hannover

Recombinant Human basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, FGF-2)

Solution, Sterile

Product Description Sheet

Batch No.	FB241109
Quantity	2 mg × 10
Description	Recombinant Human basic FGF (FGF-2) produced in <i>E. coli</i> is a single, non-glycosylated, polypeptide chain containing 155 amino acids and having a molecular weight of 17.2 kDa.
Amino Acid Sequence^[1]	MAAGSI TTLP ALPEDGGSGA FPPGHFKDPK RLYCKNGGFF LRI HPDGRVD GVREKSDPHI KLQLOAEERG VVSI KGVCAN
(Translated from plasmid DNA sequences)	RYLAMKEDGR LLASKCVTDE CFFFERLESN NYNTYRSRKY TSWYVALKRT GOYKLGSKTG PGQKAI LFLP MSAKS
Production	Produced in <i>E. coli</i> and purified by sequential chromatography ^[2] .
Purity	≥ 98% as determined by SDS-PAGE and RP-HPLC
Sterility	Filtered through a 0.20µm sterile filter.
Endotoxin	Less than 0.01ng/µg (0.1EU/µg) as determined by LAL test.
Activity	The ED ₅₀ is 0.1 ng/mL*
Formulation	Supplied as a solution with a bFGF concentration of 1.7 mg/ml (determined by UV spectroscopy at 280 nm, using 0.938** as the extinction coefficient for a 0.1% solution) in 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, together with 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 3 mM DTT.
Storage	The solution can be stored under sterile conditions at 4 °C for 2-7 days or at -20 °C to -70 °C in a manual defrost freezer for 12 months. For further dilutions it is recommended to use sterile PBS

(Phosphate -buffered saline) buffer adding with 0.1% BSA (Bovine serum albumin) or HSA (human serum albumin) and store aliquots at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Usage

This material is offered by the Institute for Technical Chemistry, University of Hannover to laboratories for further evaluation purposes. Non-hazardous.

References

1. W.Knoerzer,et al.,1989. Expression of synthetic genes encoding bovine and human basic fibroblast growth factor (bFGFs) in *Escherichia coli*.*Gene*.75:21-30.
2. A.Seeger.et al.,1996. Two-step chromatographic procedure for purification of basic fibroblast growth factor from recombinant *Escherichia coli* and characterization of the equilibrium parameters of adsorption. *J Chromatogr A*. 746(1):17-24.

Research use only. Not for diagnostic or in vivo use.

* The ED₅₀ is determined by a dose-dependent cell proliferation assay using NIH-3T3 fibroblast cell line.

** This value was calculated from the amino acid sequence on the ExPASy server using the ProtParam program(www.expasy.org).

9. LEBENS LAUF

Ruth Maria Olmer, Diplom Biotechnologin

Promotion

2005 - 2010

Promotion an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover zum Thema: Charakterisierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen aus Nabelschnurblut und Expansion in skalierbarer Suspensionskultur, angefertigt in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe –LEBAO-, Medizinische Hochschule Hannover

Diplomarbeit

02/2005

Diplomarbeit am Max Planck Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg zum Thema: Kultivierung von MDCK Zellen und Influenza A Virus Produktion im Wave Bioreaktor

Studium

1999 - 2005

Studium der Molekularen Biotechnologie, Technische Fakultät, Universität Bielefeld

Schulbildung

1990- 1999

Gymnasium St. Michael Paderborn, Abitur Mai 1999

1986 -1990

Grundschule Lichtenau

Abstracts

Human OCT3/4 promotor dependent lentiviral transgene expression for simplified monitoring of primate embryonic stem cell cultures.

3rd International Congress on Regenerative Biology and Medicine – BIOSTAR 2008 and 3rd Congress of the German Society of Stem Cell Research

Ruth Olmer, Alexandra Haase, Sylvia Merkert, Kristin Schwanke, Eric Hayes, Wei Cui, Ulrich Martin

Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult fibroblasts and cord blood derived endothelial cells

3rd International Congress on Regenerative Biology and Medicine – BIOSTAR 2008 and 3rd Congress of the German Society of Stem Cell Research

A. Haase, K. Schwanke, R. Olmer, T. Schnick, J. Meyer, K. Miller, S. Schubert, J. Beier, U. Martin

Non-human primate embryonic stem cell derived cardiomyocytes for the establishment of an in vitro pharmacological screening system.

3rd International Congress on Regenerative Biology and Medicine – BIOSTAR 2008 and 3rd Congress of the German Society of Stem Cell Research

Kristin Schwanke, Ruth Olmer, Michael Reppel, Eric Hayes, Filomain Nguemo, Moritz Haustein, Stephanie Wunderlich, Jürgen Hescheler, Ulrich Martin

Expansion of primate embryonic stem cells in suspension monitored by human OCT3/4 promotor dependent transgene expression

Dutch-German Joint Meeting of Molecular Cardiology 2009 Hamburg

Ruth Olmer, Alexandra Haase, Sylvia Merkert, Kristin Schwanke, Eric Hayes, Wei Cui, Ulrich Martin

Expansion of undifferentiated human iPS and humane ES cells in suspension culture using a largely defined medium

5th International Meeting of the Stem Cell Network NRW 2009, Aachen

Ruth Olmer, Alexandra Haase, Sylvia Merkert, Kristin Schwanke, Eric Hayes, Wei Cui, Ulrich Martin

Differentiation of human cord blood derived induced pluripotent stem (iPS) cells into functional cardiomyocytes

5th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, 2009, Aachen

Alexandra Haase, Ruth Olmer, Kristin Schwanke, Stephanie Wunderlich, Sylvia Merkert, Christian Hess, Ina Gruh, Robert Zweigerdt, Johann Meyer, Stefan Wagner, Lars S. Maier, Thomas Meyer, Dong Wook Han, Silke Glage, Konstantin Miller, Phillip Fischer, Hans R. Schöler, Ulrich Martin

Differentiation of human cord blood derived induced pluripotent stem (iPS) cells into functional cardiomyocytes

Heart Failure Winter Meeting Les Diablerets, Schweiz 2009

Alexandra Haase, Kristin Schwanke, Ruth Olmer, Ina Gruh, Robert Zweigerdt, Philipp Fischer, Johann Meyer, Thomas Meyer, Dong Wook Han, Sylvia Merkert, Christian Hess, Stephanie Wunderlich, Konstantin Miller, Tilmann Schnick, Hans Schöler & Ulrich Martin

Expansion of undifferentiated human iPS/ES cells in suspension culture using a largely defined medium

Meeting of the International Society of Stem Cell Research, 2009, Barcelona

Ruth Olmer, Alexandra Haase, Sylvia Merkert, Kristin Schwanke, Robert Zweigerdt, Wei Cui, Ulrich Martin

Differentiation of human cord blood-derived induced pluripotent stem (iPS) cells into functional cardiomyocytes

Meeting of the International Society of Stem Cell Research, 2009, Barcelona

Alexandra Haase, Ruth Olmer, Kristin Schwanke, Stephanie Wunderlich, Sylvia Merkert, Christian Hess, Ina Gruh, Robert Zweigerdt, Johann Meyer, Stefan Wagner, Lars S. Maier, Thomas Meyer, Dong Wook Han, Silke Glage, Konstantin Miller, Phillip Fischer, Hans R. Schöler, Ulrich Martin

Vorträge**Generation cultivation and differentiation of induced pluripotent stem (iPS) cells from human cordblood**

5th International Meeting of the Stem Cell Network NRW 2009, Aachen

Long term expansion of undifferentiated human iPS cells in suspension culture

Combined Meeting of the ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT 2009 Hannover

Publikationen

Long term expansion of undifferentiated human iPS and ES cells in suspension culture using a defined medium. Ruth Olmer, Alexandra Haase, Sylvia Merkert, Wei Cui, Chen Ran, Andreas Kirschning, Thomas Scheper, Silke Glage, Konstantin Miller, Eliza C. Curnow, Eric S. Hayes, Ulrich Martin. *Stem Cell Research In Press*

Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier LS, Han DW, Glage S, Miller K, Fischer P, Schöler HR, Martin U. *Cell Stem Cell*. 2009 Oct 2; 5(4):434-41

Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. Genzel Y, Olmer RM, Schäfer B, Reichl U. *Vaccine*. 2006 Aug 28; 24(35-36):6074-87.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ulrich. Martin für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, für seine große Unterstützung, die vielen Ratschläge, Anregungen und Ermutigungen. Danke Uli!

Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich herzlich für die Übernahme der Begutachtung meiner Promotion.

Für alle hilfreichen Anregungen, aufbauenden Gespräche und vor allem für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Robert Zweigerdt bedanken. Danke!

Allen Mitarbeitern des LEBAO danke ich für die große Unterstützung und die Gespräche, die sich zum Glück nicht nur um die Arbeit drehen mussten. Danke für die schöne Zeit!

Dr. Kristin Schwanke, Dr. Stephanie Wunderlich und Sandra Menke möchte ich für die Unterstützung bei den ersten „Gehversuchen“ mit ES Zellen danken. Arigato Kristin!

Ganz besonders möchte ich Sandra Menke, Dr. Christian Hess und Alexandra Haase danken für das „zur Seite stehen“! Danke für Eure Hilfsbereitschaft und Eure unermüdlichen und erfolgreichen Aufmunterungen!

Sarah Schubert danke ich herzlich für ihre Unterstützung im Labor!

Bei Sylvia Merkert möchte ich mich für das kritische Lesen der ersten Entwürfe bedanken!

Den „PhD“ Mädels danke ich für die „Diskussionen“ in kleiner Runde, die vielen Aufmunterungen beim „Endspurt“ und den Spaß, den wir auch neben der Arbeit hatten!

Dr. Julia Massier danke ich für die hilfreichen Anmerkungen beim Verfassen der Arbeit, vor allem aber für die tolle Zeit in Bielefeld, Berlin, Dresden, Magdeburg, Hannover, Paderborn, Paris... Dankeschön!

Meiner Familie, meinen Freunden und vor allem meinen Eltern danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung!

DANKE!

ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation

„Charakterisierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen aus Nabelschnurblut und Expansion in skalierbarer Suspensionskultur“

selbstständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover im April 2010

Ruth Olmer