Charakterisierung und Differenzierung der embryonalen Stammzellinie vom Rhesusaffen R366.4

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.-Biologin Kristin Schwanke
geboren am 11.09.1976 in Einbeck

2007

Referent: Professor Doktor Ulrich Martin

Korreferent: Professor Doktor Walter Müller

Tag der Promotion: 23. März 2007

Zusammenfassung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zählen zu den häufigsten Todesursachen in den industrialisierten Ländern. Im Hinblick auf die mangelhafte endogene Regenerationsfähigkeit des Herzens, erscheint die Entwicklung neuer zelltherapeutischer Ansätze unter Verwendung von Stammzellen als besonders viel versprechende Ergänzung klassischer Therapieformen. Während das postulierte kardiale Differenzierungspotential adulter Stamm- und Vorläuferzellen unterdessen als sehr zweifelhaft erscheint, wurde eine robuste *in vitro* Differenzierung zu Herzmuskelzellen für murine und humane embryonale Stammzellen (ESC) eindeutig gezeigt. Im Gegensatz zu murinen und humanen ESCs, bieten embryonale Stammzellen nicht-humaner Primatenspezies wie z.B. ESCs des Rhesusaffen (RESCs) die Möglichkeit, notwendige präklinische allogene Transplantationsmodelle zu etablieren. Eine effiziente und robuste kardiale Differenzierung von RESCs konnte bis dato jedoch nicht gezeigt werden. Vorrangiges Ziel der Promotion war es deshalb, ein System zur effizienten kardialen Differenzierung der RESC Linie R366.4 als Grundlage für weiter führende Transplantationsmodelle aufzubauen.

Nach der Etablierung eines Kultivierungssystems für RESCs, erfolgte zunächst eine allgemeine Charakterisierung der verwendeten Stammzellinie. Undifferenzierte Stammzellkulturen wurden mittels RT-PCR und Immunhistologie auf die Expression von Pluripotenzmarkern überprüft. Des Weiteren wurden zur Überprüfung der genetischen Stabilität G-Banden Karyogramme angefertigt. Die Bildung von Zellderivaten der drei Keimblätter wurde nach Differenzierungsinduktion mittels RT-PCR analysiert. Aufbauend auf den gewonnenen Erkenntnissen wurden Variationen des Differenzierungsprotokolls durchgeführt. Nach der Austestung des Differenzierungsverhaltens der RESCs auf den Einsatz verschiedener Chargen FBS, wurden Kokultivierungsexperimente der Stammzellen mit OP9 und END-2 Zellen durchgeführt.

Obwohl sich bei initialen Differenzierungsexperimenten die Bildung neuroektodermaler Zellderivate aus den RESCs als ausgesprochen dominant darstellte, konnte nach der Optimierung der Kulturbedingungen die robuste und gut reproduzierbare Differenzierung funktioneller Herzmuskelzellen etabliert werden. Die Effizienz der Bildung kontrahierender „*Embryoid Bodies*“ (EBs) lag dabei bei ca. 18% und war somit mit dem humanen System vergleichbar. Semi-quantitative RT-PCR Analysen demonstrierten die Expression von Markergenen für Endoderm, Mesoderm, kardiales Mesoderm und Herzmuskelzellen. Während des Differenzierungsverlaufs entsprach das Expressionsmuster dem der embryonalen Herzentwicklung *in vivo*. Über Immunhistologie und Elektronenmikroskopie konnte die Expression der muskelspezifischen Proteine sarkomerisches α-Aktinin, Troponin T, Titin und Connexin 43, sowie die Ausbildung quergestreifter Myofibrillen nachgewiesen werden. Die Überprüfung der Funktionalität erfolgte elektrophysiologisch durch Multi Elektroden Arrays. So konnte eine elektrische Koppelung zwischen differenzierten Zellen und die für Kardiomyozyten typische Stimulation als Reaktion auf β-adrenerge Agonisten dargestellt werden. Darüber hinaus gelang die Entwicklung eines neuartigen auf einer Kokultur mit den induktiven Zellinien OP9 und END-2 basierenden Differenzierungsprotokolls, das eine bislang für Primaten-ESCs nicht beschriebene Effizienz der Bildung von Herzmuskelzellen zu 95% kontrahierenden EBs förderte. Variationen dieser Arbeitsvorschriften führten außerdem zur Entwicklung eines Protokolls für die Transdifferenzierung von RESCs zu trophoektodermalen Zellen, die trophoblastenspezifische Markergene exprimierten und Blastozysten-ähnliche Strukturen bildeten.

Im Rahmen der Promotion konnte somit trotz der Prädisposition der verwendeten RESC Stammzellinie R366.4 auf eine neuroektodermale Differenzierungsrichtung weltweit erstmalig eine robuste Differenzierung von RESCs zu funktionellen Herzmuskelzellen erzielt werden. Darüber hinausgehend wurde ein neuartiges Kokultivierungsprotokoll zur kardialen Differenzierung mit einer auch für humane ESCs bisher nicht beschriebenen Effizienz entwickelt. Des Weiteren gelang es mit der effizienten Differenzierung von RESCs zu trophoektodermalen Zellen ein System zu etablieren, welches zukünftig die Analyse der frühen Plazentabildung und der maternal-fetalen Immunbiologie erleichtern wird.

Schlagworte: Embryonale Stammzellen des Rhesusaffen, Pluripotenz, Differenzierung, Kardiomyozyten

Abstract

Diseases of the cardiovascular system are leading causes of death in the industrialised countries. With regard to the insufficient endogenous regenerative capacity of the heart, the development of new therapeutic approaches based on stem cells seems promising to complement conventional therapies. Whereas the postulated cardiac differentiation potential of adult stem cells meanwhile appears disputable, the robust *in vitro* differentiation of murine and human embryonic stem cells (ESC) has already been shown unequivocally. In contrast to murine and human ESCs, embryonic stem cells of non-human primate species, e.g. rhesus monkey embryonic stem cells (RESC), allow for the required establishment of preclinical allogeneic transplantation models. An efficient and robust cardiac differentiation of RESCs was not reported so far. Hence, the main aim of this thesis was the establishment of an efficient cardiac differentiation system for the RESC line R366.4 as the basis for the development of future transplantation models.

After the establishment of an appropriate system for culturing the RESCs, a general characterisation of the used stem cell line was performed. Undifferentiated ESCs were analysed for the expression of markers for pluripotency by means of RT-PCR and immunohistology. Furthermore, karyograms were utilised to control for genetic stability. After inducing differentiation of the RESCs, the appearance of cell derivatives of the three germ layers were analysed via semiquantitative RT-PCR. Based on these findings, variations of the differentiation protocol were performed. After testing different batches of FBS with regard to the differentiation behaviour of the RESCs, co-culture experiments of the stem cells with OP9 and END-2 cells were carried out.

Although in initial differentiation experiments the formation of neuroectodermal cell derivatives appeared to be the default pathway of the RESC line R366.4, it was possible to change this commitment by establishing a protocol to robustly and reproducibly differentiate the RESCs to functional cardiomyocytes (CM). Differentiation of RESCs resulted in an average of 18% contracting embryoid bodies (EBs) and therefore was comparable to the human system. Semiquantitative RT-PCR analyses demonstrated expression of markers for endoderm, mesoderm, cardiac mesoderm and CMs, and corresponded to the expression pattern of the developing heart *in vivo*. Immunohistological and ultrastructural studies showed expression of CM-typical proteins, including sarcomeric α-actinin, troponin T, titin, connexion-43 and cross-striated muscle fibrils. Electrophysiological studies by means of multi-electrode arrays provided evidence of functionality, electrical coupling, and β-adrenergic signalling of the generated CMs. Moreover, the establishment of a novel coculturing system based on OP9 and END-2 cells was successful and resulted in a cardiac differentiation efficiency as high as 95% contracting EBs, so far not shown for primate ESCs. Variations of the differentiation protocol lead to a transdifferentiation of the RESCs into trophoblast cells expressing trophoectodermal markers and forming blastocyste-like structures.

Despite the predisposition of the RESCs to differentiate into neuroectodermal cell derivatives, within this thesis, it was possible to generate functional CMs from RESCs for the first time in the world. Furthermore, a novel differentiation protocol based on cocultivation was established, resulting in a cardiac differentiation efficiency so far not shown for primate species. In addition, the differentiation of RESCs into trophoblast cells will facilitate future in vitro analyses of the placenta formation and the maternal-fetal immunobiology.

Key Words: Rhesus monkey embryonic stem cells, pluripotency, differentiation, cardiomyocytes

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1 STAMMZELLEN 2
1.1.1 Frühe Embryogenese und embryonale Stammzellen 3
1.2 BILDUNG DES TROPHOEKTODERMS UND DER PLAZENTA 6
1.3 EMBRYONALENTWICKLUNG DES HERZENS 8
1.4 DIFFERENZIERUNG EMBRYONALER STAMMZELLEN 11
1.4.1 Kardiale Differenzierung von ESCs 11
1.4.1.1 Kardiale Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen 12
1.4.1.2 Kardiale Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen (HESCs) 14
1.4.2 Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Trophoblastenzellen 15
1.5 ZIELSETZUNG 17

2. MATERIAL UND METHODEN 18

2.1 MATERIAL 18
2.1.1 Geräte 18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien 18
2.1.3 Chemikalien 19
2.1.4 Kits 20
2.1.5 Enzyme 20
2.1.6 Molekulargewichtsmarker 20
2.1.7 Primärantikörper 20
2.1.8 Isotypen Negativkontrollen 21
2.1.9 Sekundärantikörper 21
2.1.10 Oligonukleotide 21
2.1.11 Zellinien und primäre Zellen 24
2.1.11.1 Embryonale Stammzellen aus dem Rhesusaffen, Linie R366.4 (RESC) 24
2.1.11.2 Murine embryonale Fibroblasten 24
2.1.11.3 OP9 Stromazellen 25
2.1.11.4 END-2 Zellen 25
2.1.12 Basalmedien, Medienzusätze und Lösungen zur Zellkultivierung 26
2.1.12.1 Basalmedien 26
2.1.12.2 Medienzusätze 26
2.1.12.3 Lösungen 26
2.1.13 Lösungen und Puffer 27
2.1.13.1 Molekularbiologie 27
2.1.13.2 Immunhistologie 27
2.1.13.3 Elektronenmikroskopie 27
2.2 METHODEN 28
2.2.1 Molekularbiologische Methoden 28
2.2.1.1 Phenol-Chloroform Extraktion 28
2.2.1.2 Präzipitation von Nukleinsäuren/ Natrium-Acetat-Fällung 28
2.2.1.3 Isolierung von Ribonukleinsäuren mit TriZol 28
2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäuren mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer 29
2.2.1.5 DNAse- Verdau 29
2.2.1.6 cDNA Synthese 30
2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 31
2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese 32
2.2.2 Methoden zur Zellkultivierung 33
2.2.2.1 Kultivierung adhärenter Zellen 33
2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen 33
2.2.2.3 Beschichtung von Zellkulturgefäßen 34
2.2.2.4 Zellzahlbestimmung 34
2.2.2.5 Nachweis von Mykoplasmen 35
2.2.2.5 Behandlung mit MycoKill™ AB 36
2.2.2.6 Isolierung embryonaler Mausfibroblasten 36
2.2.2.7 Inaktivierung primärer embryonaler Mausfibroblasten zur Herstellung einer Kultivierungsgrundlage (Feederzellen) für embryonale Stammzellen vom Rhesusaffen (RESC) 37
2.2.2.8 Kultivierung der RESCs 38

2.2.8.1 Passagieren ... 38
2.2.8.2 Einfrieren und Auftauen ... 39
2.2.2.9 Kardiale Differenzierung von RESCs ... 40
2.2.2.9.1 Kardiale Differenzierung durch induzierende Faktoren eines ausgetesteten Fetalen Kälberserums (FBS) ... 40
2.2.2.9.2 Kardiale Differenzierung durch Kokultivierung mit induzierend wirkenden Zellen ... 41
Inaktivierung von END-2 Zellen ... 41
Initiierung der Kokultivierung von RESCs und END-2 Zellen ... 41
Initiierung der Kokultivierung von RESCs und OP9 Stromazellen ... 42
Initiierung der Kokultivierung von RESCs, OP9 und END-2 Zellen ... 42
2.2.2.10 Differenzierung der RESCs zu trophoektodermalen Zellen ... 43
2.2.2.10.1 Differenzierung zu trophoektodermalen Zellen durch induzierende Faktoren des Fetalen Kälberserums (FBS) ... 43
2.2.3 Methoden zur Zellcharakterisierung ... 43
2.2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung ... 43
2.2.3.2 Elektronenmikroskopie ... 44
2.2.3.2.1 Kardial differenzierte RESCs ... 44
2.2.3.2.2 Trophoektodermale Zellen aus differenzierten RESCs ... 44
2.2.3.3 Elektrophysiologische Untersuchungen ... 45

3. ERGEBNISSE ... 46

3.1 CHARAKTERISIERUNG DER AUS DEM RHESUSAFFEN ISOLIERTEN EMBRYONALEN STAMMZELLINIE R366.4 (RESC R366.4) . 48
3.1.1 Koloniemorphologie undifferenzierter RESCs ... 48
3.1.2 Ultrastrukturelle Darstellung der RESCs ... 50
3.1.3 Untersuchungen zur genetischen Stabilität der RESCs ... 51
3.1.4 Nachweis der Aktivität Alkalischer Phosphatase (AP) in Kulturen der RESCs ... 52
3.1.5 Nachweis der Expression von Pluriptenzmarkerantigenen ... 52
3.1.5.1 *Stage Specific Embryonic Antigen* 4 (SSEA-4) ... 53
3.1.5.2 *Tumor Rejection Antigen* 1-60 (TRA-1-60) ... 54
3.1.5.3 Oct3/4 ... 54
3.1.6 Nachweis der Expression stammzellspezifischer Markergene durch RT-PCR ... 55
3.2 VERSUCHE ZUM DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL DER RESCS ... 56
3.2.1 Differenzierung unter Standard-Differenzierungsbedingungen in embryoid bodies (EBs) ... 56
3.2.1.1 Einfluss von *Serum Replacement* (SR) auf die Differenzierung der RESCs in EBs ... 56
3.2.1.2 Einfluss von Fetalem Kälberserum (FBS) auf die Differenzierung der RESCs in EBs ... 57

3.2.2 Allgemeine Charakterisierung des Differenzierungspotentials der RESCs ... 60
3.2.3 Austestung verschiedener fetaler Kälberseren (FBS) ... 64
3.2.4 Kardiale Differenzierung der RESCs ... 66
3.2.4.1 RT-PCR Analyse im zeitlichen Verlauf der kardialen Differenzierung ... 67
3.2.4.2 Immunhistologische Analyse kardial differenzierter RESCs ... 69
3.2.4.3 Ultrastrukturelle Darstellung der Differenzierung von RESCs zu funktionellen Kardiomyozyten. ... 71
3.2.4.4 Darstellung elektrophysiologischer Eigenschaften kardial differenzierter RESCs durch Multi Elektroden Arrays (MEAs) ... 74
3.2.5 Kardiale Differenzierung der RESCs durch Kokultivierung ... 77
3.2.5.1 Kokultivierung mit OP9 Stromazellen ... 77
3.2.5.2 Kokultivierung mit END-2 Zellen ... 78
3.2.5.3 Kokultivierung mit OP9 und END-2 Zellen ... 80
3.2.6 Differenzierung der RESCs Linie 366.4 zu trophoektodermalen Zellen ... 84
3.2.6.1 Morphologische Charakterisierung der zystenartigen Strukturen ... 85
3.2.6.2 Immunhistologische Analyse trophoektodermal differenzierter RESCs ... 86
3.2.6.3 RT-PCR Analyse auf die Expression trophoektodermaler Markergene im Verlauf der Differenzierung ... 89

4. DISKUSSION ... 90

4.1 CHARAKTERISIERUNG DER AUS DEM RHESUSAFFEN ISOLIERTEN EMBRYONALEN STAMMZELLINIE R366.4 (RESC) ... 91
4.2 EXPERIMENTE ZUM DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL DER RESCS ... 92
4.2.4 Kardiale Differenzierung der RESCs ... 94
4.2.5 Kardiale Differenzierung der RESCs durch Kokultivierung ... 98
4.2.5.1 Kokultivierung mit OP9 Stromazellen ... 99
4.2.5.1 Kokultivierung mit END-2 Zellen ... 100

4.2.5.3 Kokultur mit OP9 und END-2 Zellen 101
4.2.6 Differenzierung zu trophoektodermalen Zellen 102
5. PERSPEKTIVEN 104
6. LITERATURVERZEICHNIS 107
7. ABKÜRZUNGEN 116
8. LEBENSLAUF 117
8.1 VERZEICHNIS EIGENER VERÖFFENTLICHUNGEN 118
8.1.1 Bisherige Publikationen 118
8.1.2 Abstracts 118
9. DANKSAGUNG 120

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

ABB. 1: GEWINNUNG EMBRYONALER STAMMZELLINIEN. 3
ABB. 2: BILDUNG DES TROPHOEKTODERMS UND DER PLAZENTA IM MAUSEMBRYO. 7
ABB. 3: MORPHOGENESE DER ENTWICKLUNG DES SÄUGERHERZENS 8
ABB. 4: POSITIVE UND NEGATIVE REGULATORISCHE SIGNALE, DIE AUF DIE EMBRYONALE HERZENTWICKLUNG EINWIRKEN 10
ABB. 5: DARSTELLUNG DER MORPHOLOGIE VON KOLONIEN RHESUS EMBRYONALER STAMMZELLEN (RESCS) LINIE R366.4 24
ABB. 6: DARSTELLUNG DER MORPHOLOGIE PRIMÄRER EMBRYONALER MAUSFIBROBLASTEN. 24
ABB. 7: DARSTELLUNG DER MORPHOLOGIE MURINER OP9 STROMAZELLEN. 25
ABB. 8: DARSTELLUNG DER MORPHOLOGIE VON END-2 ZELLEN. 25
ABB. 9: PASSAGIEREN VON RESCS I. ABLÖSEN DER STAMMZELLKOLONIEN VON DEN FEEDERZELLEN MITTELS KOLLAGENASE TYP IV 38
ABB. 10: PASSAGIEREN VON RESCS II. AUSSAAT DER MECHANISCH ZERKLEINERTEN STAMMZELLKLUMPEN AUF NEUE FEEDERZELLEN. 39
ABB. 11: DARSTELLUNG DER MORPHOLOGIE AUFGETAUTER RESCS. 40
ABB. 12: MORPHOLOGIE DER VON PROF. DR. ITSKOVITZ-ELDOR ZUR VERFÜGUNG GESTELLTEN VOM RHESUSAFFEN STAMMENDEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN (RESC) NACH DEM AUFTAUEN 47
ABB. 13: VERGLEICHENDE MORPHOLOGIE UNDIFFERENZIERTER EMBRYONALER STAMMZELLEN VERSCHIEDENER SPEZIES 49
ABB. 14: UNTER STANDARDKULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN DIFFERENZIERTE RESCS ZEIGTEN HÄUFIG DIE ENTSTEHUNG VON NEURONALEN ROSETTEN IN DEN KOLONIEN 50
ABB. 15: ULTRASTRUKTURELLE DARSTELLUNG UNDIFFERENZIERTER RESCS DURCH TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE (TEM). 50
ABB. 16: G-BANDEN KARYOGRAMM ZUR DARSTELLUNG DES KARYOTYPS DER RESCS 51
ABB. 17: UNDIFFERENZIERTE RESCS ZEIGTEN EINE GROßE AKTIVITÄT DES ENZYMS ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP 52
ABB. 18: UNDIFFERENZIERTE RESCS ZEIGTEN EINE STARKE IMMUNREAKTIVITÄT GEGENÜBER ANTI-SSEA-4 53
ABB. 19: UNDIFFERENZIERTE RESCS ZEIGTEN EINE STARKE IMMUNREAKTIVITÄT GEGENÜBER ANTI-TRA-1-61 54
ABB. 20: UNDIFFERENZIERTE RESCS ZEIGTEN EINE AUSGEPRÄGTE IMMUNREAKTIVITÄT GEGENÜBER ANTI-OCT3/4 54
ABB. 22: NEURONALE DIFFERENZIERUNG DER RESCS IN EINEM SERUMFREIEN DIFFERENZIERUNGSMEDIUM 57
ABB. 23: FEHLENDE AUSBILDUNG VON EBS IN EINEM DURCH FBS SUPPLEMENTIERTEN DIFFERENZIERUNGSMEDIUM 58
ABB. 24: ERSTE DIFFERENZIERUNGSVERSUCHE UNTER VERWENDUNG EINES MIT FETALEM KÄLBERSERUM (FBS) SUPPLEMENTIERTEN DIFFERENZIERUNGSMEDIUMS RESULTIERTEN IN EINER PROMINENTEN NEURONALEN DIFFERENZIERUNG DER RESCS 59
ABB. 25: NACHWEIS DER NEUROEKTODERMALEN ANTIGENE S100 UND VIMENTIN IN KULTUREN DIFFERENZIERTER RESCS 59
ABB. 26: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ZUR DIFFERENZIERUNG NACH STANDARDDIFFERENZIERUNGSBEDINGUNGEN IN *EMBRYOID BODIES* (EBS) 60
ABB. 27: EINE FORTSCHREITENDE SPONTANE DIFFERENZIERUNG DER RESCS IN EBS FÜHRTE ZU EINER ABNAHME IN DER EXPRESSION VON PLURIPOTENZMARKERN. 61
ABB. 28: EINE DIFFERENZIERUNG DER RESCS IN EBS FÜHRTE DES WEITEREN ZU DER EXPRESSION VON MARKERGENEN DES ENDODERMS, MESODERMS UND EKTODERMS. 63
ABB. 29: EINFLUSS VERSCHIEDENER CHARGEN FETALER KÄLBERSEREN (FBS) AUF DAS DIFFERENZIERUNGSVERHALTEN DER RESCS IN EBS 64
ABB. 30: KARDIALE DIFFERENZIERUNG DER RESCS IN EINEM AUSGETESTETEN SERUM 65
ABB. 33: DIFFERENZIERUNGEN DER RESCS IN EINEM AUSGETESTETEN FBS FÜHRTEN ZU DER EXPRESSION VON MARKERGENEN DES ENDODERMS, MESODERMS, KARDIALEN MESODERMS UND KARDIOMYOZYTEN 68
ABB. 34: IMMUNHISTOLOGISCHE ANALYSE DER EXPRESSION MUSKELSPEZIFISCHER MARKER IN KARDIAL DIFFERENZIERTEN RESCS 69
ABB. 35: IMMUNHISTOLOGISCHE DARSTELLUNG FRÜHER KARDIOMYOZYTENVORLÄUFER UND CONNEXIN 43 (CX43) EXPRIMIERENDEN KARDIOMYOZYTEN IN KARDIAL DIFFERENZIERTEN RESCS 70
ABB. 36: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG VON KARDIOMYOZYTENVORLÄUFERZELLEN IN KULTUREN KARDIAL DIFFERENZIERTER RESCS 72
ABB. 37: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG FRÜHER KARDIOMYOZYTEN IN KULTUREN KARDIAL DIFFERENZIERTER RESCS 73
ABB. 38: NACHWEIS EINER SPONTANEN UND RHYTHMISCHEN ELEKTRISCHEN AKTIVITÄT DURCH MULTI ELEKTRODEN ARRAYS (MEAS) 74
ABB. 39: ELEKTRISCHE VERKNÜPFUNG ISOLIERT KONTRAHIERENDER AREALE DURCH BILDUNG EINES REIZÜBERTRAGENDEN GEWEBESTRANGES 75
ABB. 40: B-ADRENERGE STIMULATION KARDIAL DIFFERENZIERTER RESCS 76
ABB. 43: INITIIERUNG DER KOKULTIVIERUNG VON RESCS, OP9 STROMAZELLEN UND DER VE-ÄHNLICHEN ZELLINIE END-2 80
ABB. 45: INDUKTION EINER GERICHTETEN KARDIALEN DIFFERENZIERUNG DER RESCS DURCH KOKULTIVIERUNG MIT DEN BEIDEN ZELLINIEN OP9 UND END-2 82
ABB. 46: MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER DIFFERENZIERTEN RESCS IN KONTROLLANSATZ 1 84

ABB. 47: BILDUNG FLÜSSIGKEITSGEFÜLLTER STRUKTUREN IN KONTROLLANSATZ 1 85
ABB. 48: *IN VITRO* BILDUNG BLASTOZYSTENARTIGER STRUKTUREN IN KONTROLLANSATZ 1 86
ABB. 49: RESC-ABGELEITETE TROPHOBLASTEN ZEIGTEN EINE AUSGEPRÄGTE IMMUNREAKTIVITÄT GEGENÜBER CYTOKERATIN-ENDOA (TROMA-1) (D21) 87
ABB. 50: NEBEN DEN TROPHOBLASTENARTIGEN ZELLEN ENTHIELTEN DIE KULTUREN TROMA-1 POSITIVE, POLYNUKLEINE ZELLEN. 87
ABB. 51: END-2 ZELLEN ZEIGEN EINE AUSGEPRÄGTE IMMUNREAKTIVITÄT GEGENÜBER ANTI-AFP 88
ABB. 52: NACHWEIS DES TROPHOBLASTENSPEZIFISCHEN TRANSKRIPTIONSFAKTORS CDX2 IN DIFFERENZIERTEN RESCS4 88
ABB. 53: EXPRESSION TROPHOEKTODERMALER MARKERGENE IN DIFFERENZIERTEN RESCS 89

TABELLE 1: PRIMÄRANTIKÖRPER 20
TABELLE 2: OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE MULTIPLEX MYKOPLASMEN-PCR 21
TABELLE 3: OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE CHARAKTERISIERUNG DER RESCS / PLURIPOTENZMARKERGENE 22
TABELLE 4: OLIGONUKLEOTIDE ZUR CHARAKTERISIERUNG TROPHOEKTODERMALER ZELLDERIVATE 22
TABELLE 5 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE CHARAKTERISIERUNG DES DIFFERENZIERUNGSPOTENTIALS DER RESCS 22
TABELLE 6: PIPETTIERSCHEMA: DNASE-BEHANDLUNG VON RNA-PROBEN 29
TABELLE 7: PIPETTIERSCHEMA FIRST-STRAND CDNA-SYNTHESE MIT SUPER SCRIPT™ II RT 30
TABELLE 8: PIPETTIERSCHEMA FÜR EINEN POLYMERASE-KETTENREAKTIONS-ANSATZ 31
TABELLE 9: STANDARDPROGRAMM POLYMERASE-KETTENREAKTION 32
TABELLE 10: PIPETTIERSCHEMEN MYKOPLASMEN-PCR 35
TABELLE 11: PCR-PROGRAMME FÜR DIE MULTIPLEX-MYKOPLASMEN PCR 36
TABELLE 12: ZELLKULTURSCHALEN UND DIE DAZU GEHÖRIGEN ZELLZAHLEN 38
TABELLE 13: ZUR CHARAKTERISIERUNG UNDIFFERENZIERTER RESCS VERWENDETE MARKER 55
TABELLE 14: KONTROLLEXPERIMENTE ZUR KOKULTIVIERUNG DER RESCS MIT OP9 UND END-2 ZELLEN 83

1. Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zählen zu den häufigsten Todesursachen in den industrialisierten Ländern. Ein erheblicher Teil dieser Erkrankungen äußert sich in einem Verlust der kardialen Pumpleistung. So führt z.B. ein ischämischer Infarkt des Herzmuskels zu einem mehr oder weniger ausgeprägten Absterben funktioneller Kardiomyozyten. Abgestorbenes Herzmuskelgewebe wird in Folge durch Bindegewebszellen ersetzt [1, 2]. Die daraus resultierende Vernarbung des Herzmuskels, führt zu einer eingeschränkten Funktion des Herzens, und im Langzeitverlauf zu einer pathologischen Hypertrophie des Herzens. Augenscheinlich ist der Organismus aufgrund einer mangelnden endogenen Regenerationsfähigkeit nicht in der Lage, den akuten Verlust von Herzgewebe adäquat auszugleichen, um so das Myokard zu regenerieren. Neue therapeutische Ansätze versuchen eine Regeneration des Gewebes durch Zelltransplantationen zu erzielen. Ein anderer Ansatz ist der Ersatz des gebildeten Narbengewebes durch bioartifizielles Myokard, das mittels *Tissue Engineering* (TE) hergestellt wird. Eine Grundvoraussetzung sowohl für zelluläre Kardiomyoplastie, als auch für das myokardiale TE, ist das Vorhandensein ausreichender Mengen lebender und funktioneller Kardiomyozyten. Eine mögliche Zellresource stellen Stammzellen dar.

Im Gegensatz zu den kontrovers diskutierten Ergebnissen zum Reprogrammierungs- und Transdifferenzierungspotentials adulter Stammzellen [3-5], konnte eine robuste kardiale *in vitro* Differenzierung bislang nur für embryonale Stammzellen eindeutig gezeigt werden [6-8]. Zunächst als kardiale Differenzierung deklarierte Versuche mit adulten Stamm- und Progenitorzellen, basierten häufig auf Zellfusionsprozessen [9, 10] oder fanden nur in sehr geringem, für Zelltransplantationen nicht ausreichendem Maße, statt [11].

Im Rahmen der vorliegenden Promotion sollten neben der allgemeinen Charakterisierung der embryonalen Stammzellinie aus dem Rhesusaffen R366.4 und der Untersuchung des Differenzierungspotentials der Stammzellinie ein System zur robusten kardialen Differenzierung etabliert werden. RESCs und RESC-abgeleitete Kardiomyozyten ermöglichen, im Gegensatz zu HESCs, die Etablierung eines geeigneten Großtiermodells zur Erforschung therapeutischer Effekte und Risiken der auf embryonalen Stammzellen basierenden Zelltherapie myokardialer Schädigungen.

1.1 Stammzellen

Der Begriff Stammzellen vereint eine Gruppe von eukaryotischen Zellen, die keine oder nur eine geringe Differenzierung aufweisen [12]. Es sind nicht spezialisierte Ursprungszellen, die unter bestimmten Bedingungen verschiedenartige Zelltypen bilden können. Sie besitzen die Fähigkeit zur unbegrenzten Autoreproduktion und treten in Vertebraten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung des Organismus auf. Abhängig vom Zeitpunkt ihrer Isolierung unterscheidet man zwischen embryonalen, fetalen oder adulten Stammzellen [13]. Ihnen werden je nach Entwicklungspotential die Eigenschaften totipotent (Fähigkeit zur Bildung eines kompletten Organismus), pluripotent (Fähigkeit zur Differenzierung in Derivate der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm), multipotent (Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen) und uni- bzw. oligopotent (Fähigkeit zur Differenzierung in Zelltypen einer Linie) zugeordnet. Im Verlauf der Entwicklung eines Organismus und mit fortschreitender Spezialisierung der Zellen, nimmt das Differenzierungspotential der Stammzellen immer weiter ab [14].

Das Vorkommen totipotenter, undifferenzierter Zellen galt bisher auf ein sehr frühes embryonales Entwicklungsstadium, beim Menschen bis zum acht-Zellstadium, begrenzt. Die Zellen dieses frühen Embryonalstadiums weisen keine Einschränkungen in ihrem Differenzierungspotential auf und können einen vollständigen Organismus bilden. Hierzu zählt neben der Bildung des prospektiven Embryos, auch die Differenzierung zu extraembryonalen Geweben wie z.B. die Plazenta. Nach bisheriger Lehrbuchmeinung kommt es nach dem Durchlaufen des Morulastadiums im Verlauf der Blastozystenbildung zum Verlust der Totipotenz [15]. Die resultierenden Zellen sind nicht mehr in der Lage aus sich selbst heraus einen vollständigen Organismus zu bilden. Die pluripotenten Zellen der inneren Zellmasse der Blastozysten, dem so genannten Embryoblasten, können noch zu allen Zelltypen des eigentlichen Embryos differenzieren und waren nach dem bis vor kurzem gültigen Kenntnisstand jedoch nicht mehr in der Lage, extraembryonale Zellen der Trophoblastenlinien zu bilden. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung differenzieren die Zellen des Embryoblasten zu den drei Keimblättern Mesoderm, Endoderm und Ektoderm und bilden so alle embryonalen Gewebe. Multipotente Stammzellen, wie z.B. hämatopoetische Stammzellen des blutbildenden Systems, besitzen wie alle Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (engl., „*self-renewal*“) und können zu zwei oder drei Zelltypen differenzieren. Die Fähigkeit unipotenter Zellen beschränkt sich auf die Fähigkeit zur Bildung von Zellen des gleichen Typus. Ein Beispiel sind dermale Fibroblasten.

1.1.1 Frühe Embryogenese und embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen, ESCs) sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse präimplantierter Blastozysten isoliert werden [16, 17]. Bei der Maus finden sich diese Zellen etwa vom dritten bis zum fünften Tag nach der Befruchtung der Oozyte durch das Spermium, beim Menschen hingegen zwischen dem vierten und siebten Tag. Im Gegensatz zu der transienten Entwicklungsperiode im Embryo, lassen sich ES-Zellen unter den geeigneten Bedingungen *in vitro* unbegrenzt kultivieren und ermöglichen so die Etablierung von Zellinien. Hierbei zeigen sie ein ausgeprägtes Proliferationspotential.

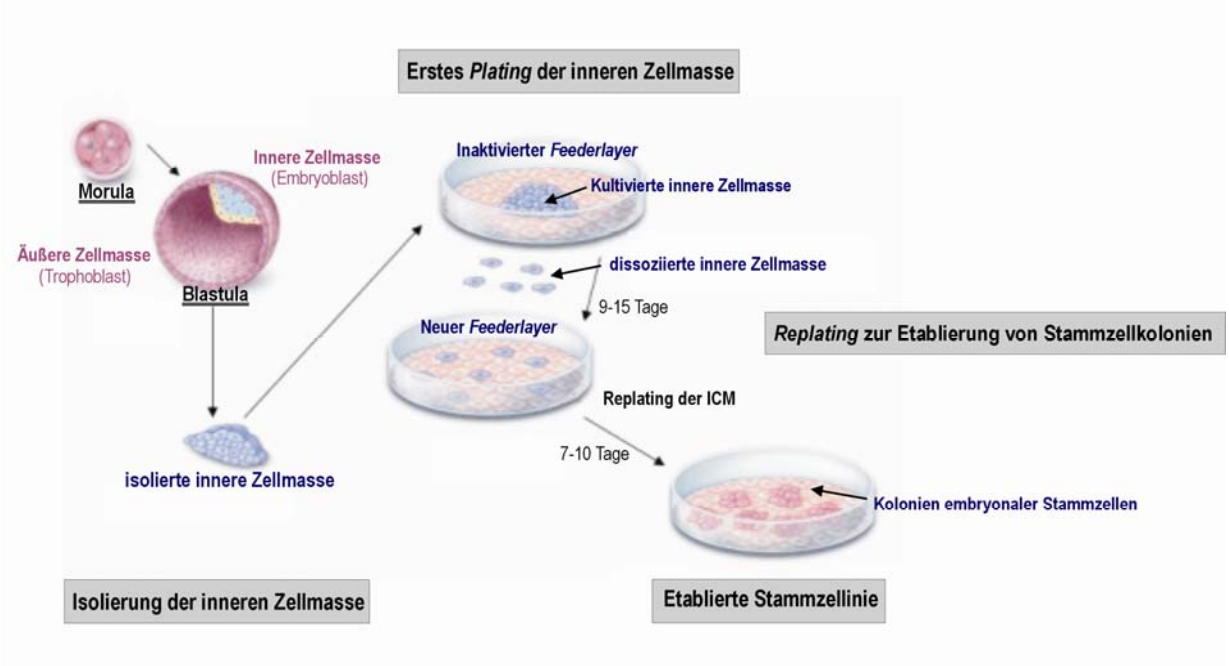

Abb. 1: Gewinnung embryonaler Stammzellinien. Embryonale Stammzellen finden ihren Ursprung in der inneren Zellmasse (ICM) von präimplantierten Blastozysten. Zu ihrer Gewinnung wird die ICM aus der Blastula isoliert und auf inaktivierten murinen Fibroblasten kultiviert. Eine etablierte Kultur erhält man nach der mehrfachen Dissoziation und Überführung der Zellaggregate auf neue Fibroblasten.

Die Kultivierungsbedingungen der ESCs differieren abhängig von der jeweiligen Spezies, aus der sie isoliert wurden [18]. Um einer etablierten Stammzellinie den Status der Pluripotenz zu zugestehen, müssen bestimmte Charakteristika erfüllt werden. So sind undifferenzierte ESCs je nach Spezies durch die Expression einer Vielzahl von Pluripotenzmarkern charakterisiert. Hierzu zählen auf molekularer Ebene die Expression des Oct-4-Gens (*octamer binding gene* 4) [19], Nanog [20], Sox2 (*SRY-box containing gene* 2) [21, 22] und Rex-1 [23, 24]. Des Weiteren kennzeichnen die speziesabhängige Expression der Oberflächenantigene SSEA-3, SSEA-4, SSEA-1 (*stage specific embryonic antigen* 3/4/1), TRA-1-60 und TRA-1-81 (*tumor rejection antigen* 1-60/1-81) [25], sowie eine große Aktivität der Enzyme Alkalische Phosphatase [26] und Telomerase [27] undifferenzierte ESCs.

Die Pluripotenz von ESCs lässt sich mit Hilfe verschiedener Experimente demonstrieren und überprüfen: So führt eine Injektion von undifferenzierten ESCs in immundefiziente SCID-Mäuse aufgrund des großen Differenzierungspotentials der Zellen zu der Ausbildung von Teratomen [28]. Diese Tumore enthalten die verschiedensten Derivate der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Das Einbringen embryonaler Stammzellen in Blastozysten führt zu einer Entwicklung von chimären Organismen [29]. Aufgrund ihrer Pluripotenz können ESCs auch *in vitro* als Reaktion auf bestimmte Differenzierungsstiumuli spontan oder gerichtet in Derivate der drei Keimblätter differenzieren [30]. Dieses Differenzierungspotential variiert zwischen den etablierten Stammzellinien [30] und ist gegenüber der *in vivo* Differenzierung eingeschränkt [31, 32].

Die erste embryonale Stammzellinie wurde in den frühen achtziger Jahren aus einer murinen Blastozyste von Evans et *al*. isoliert und als Stammzellinie *in vitro* etabliert [16, 28]. Im Verlauf der nachfolgenden Jahre konnten für murine ESCs viele Erkenntnisse über die Kultivierungsbedingungen, den Bedarf an Wachstumsfaktoren und der Expression stammzellspezifischer Markergene gesammelt werden. 1996 gelang es Thomson et *al.* die erste ES-Zellinie einer Primatenspezies aus einer Blastozyste vom Rhesusaffen zu etablieren [33]. Nach der Isolierung der ersten humanen ES-Zellinie 1998 durch Thomson et *al.* [34], sind nunmehr achtzehn ES-Zellinien aus nicht humanen Primaten und vierundsechzig humane Stammzellinien gelistet (http://escr.nih.gov).

Anders als primäre adulte Stammzellen bieten embryonale Stammzellen viele Vorteile. Ihr pluripotenter Status ermöglicht eine Differenzierung in jede beliebige Körperzelle [35]. Im Gegensatz zu den meisten adulten Stammzellen, können sie unbegrenzt in Kultur gehalten werden und zeigen, verglichen mit adulten Stammzellen, eine ausgeprägtere genetische Stabilität [36]. Obwohl geeignete Techniken derzeit noch nicht verfügbar sind, sollte es möglich sein, aus ESCs große Zellmengen für therapeutische Anwendungen herzustellen. Die Expansion adulter Stammzellen stellt sich hingegen in der Regel als deutlich schwieriger dar. Bislang ist nicht bekannt, ob ein Erreichen benötigter Zellmassen durch die Isolierung und Kultivierung adulter Stammzellen jemals möglich sein wird. Dieses trifft insbesondere auf ältere Patienten zu. Trotz der unbestrittenen Vorteile embryonaler Stammzellen, sollen auch deren Nachteile nicht verschwiegen werden. Obwohl es nach den neuesten Erkenntnissen so scheint, als seien embryonale Stammzellen weitaus weniger immunogen als bislang angenommen [37], sind nach Transplantation von nicht autologen Stammzellen durch eine fehlende Immunkompatibilität Abstoßungsreaktionen zu erwarten. Das therapeutische Klonen würde die Möglichkeit bieten, dieses Problem zu umgehen. Bei dieser Methode würden einem Patienten zunächst somatische Zellen, wie zum Beispiel dermale Fibroblasten, entnommen. *In vitro* würde dann

ein Transfer des Zellkerns der Spenderzelle in eine befruchtete und entkernte Oozyte vorgenommen. Der entstehende Embryo würde sich im Verlauf der nächsten Tage zu einer Blastozyste entwickeln, deren Zellen das Genom des Spenders tragen. Anschließend wäre es nun möglich, aus der inneren Zellmasse zum Patienten autologe embryonale Stammzellen zu isolieren. Solche Zellen würden nach einer Transplantation nicht als fremdes Gewebe erkannt werden und somit nicht zu einer immunologischen Zellantwort führen. Das Verfahren des Zellkern-Transfers (engl., „*somatic cell nuclear transfer*“, SCNT) zum therapeutischen und reproduktiven Klonen wurde bereits erfolgreich in Tiermodellen durchgeführt [38]. Aufgrund des Embryonenschutzgesetzes ist diese Methode der Herstellung autologer Stammzellinien in Deutschland jedoch verboten. Die Erforschung alternativer Ansätze ist somit unumgänglich.

Eine alternative zu der ethisch kontrovers diskutierten Forschung an humanen ESCs, bietet die Arbeit mit ESCs nicht humaner Primaten. Das Genom des Rhesusaffen weist eine etwa 90%ige Genomhomologie zu humanen Stammzellen auf [39]. So wurden Primatenspezies lange vor der Forschung an embryonalen Stammzellen als Tiermodelle für humane Erkrankungen, Reproduktionsbiologie und Embryologie verwendet. Zudem unterstreichen vergleichende Studien zwischen murinen und humanen ES-Zellinien immer mehr das Vorhandensein von deutlichen Unterschieden zwischen den Zellinien beider Spezies [18]. Diese Unterschiede manifestieren sich schon rein optisch in einer unterschiedlichen Koloniemorphologie. Neben der voneinander abweichenden Expression von Oberflächenantigenen [25, 40], zeigen die Stammzellen z.B. unterschiedliche Reaktionen auf die Zugabe von Wachstumsfaktoren. So bedarf es für den Erhalt der Pluripotenz im Gegensatz zu murinen ESCs im humanen System nicht des Zytokins *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) [41]. Des Weiteren differenzieren humane ESCs spontan zu Trophoblasten-ähnlichen Zellen [34, 42]. Ein solches Verhalten konnte bei murinen Stammzellen nicht beobachtet werden [43, 44]. Das Vorhandensein von Abweichungen des Mechanismus der Telomeraseaktivität zwischen den beiden Spezies ist bereits bekannt [45], vergleichende Untersuchungen gibt es bislang noch nicht. Daten, die anhand muriner Systeme gewonnen werden, können somit nicht direkt auf Primatenzellen übertragen werden oder vice-versa. Dies gilt vor allen Dingen für die Ergebnisse bezüglich einer gerichteten kardialen Differenzierung.

Möglicherweise lassen sich Erkenntnisse über molekulare Mechanismen, die den jeweiligen Differenzierungsvorgängen zu Grunde liegen, auf die Differenzierung embryonaler Stammzellen übertragen. Schlüsselfaktoren könnten als Marker für den Differenzierungsstatus der ESCs verwendet werden. Des Weiteren wäre eine gerichtete Differenzierung der Stammzellen durch eine

Differenzierungsinduktion mit eben diesen Schlüsselfaktoren denkbar. Die ersten beiden, während der Embryonalentwicklung gebildeten Organe, sind die Plazenta und das Herz.

1.2 Bildung des Trophoektoderms und der Plazenta

Die Entwicklung der Blastozyste d5-d6 *post coitum* (p.c.) als Folge einer Zellspezialisierung, kennzeichnet die ersten Differenzierungsvorgänge in der Embryonalentwicklung von Säugern. Die äußere, epitheliale Zellschicht der Blastula, das Trophoektoderm, bildet den Ursprung der Trophoblastenzellinie [46], die im Verlauf der Plazentabildung den Hauptanteil darstellt, während die innere Zellmasse den gesamten Embryo, sowie einige extraembryonale Membranen hervorbringt. In diesem Stadium endet die autonome Entwicklung des Embryos und geht in eine maternale Versorgung über. Etwa 6-7 Tage nach der Befruchtung erfolgt die Einnistung der Blastozyste in die Uterusschleimhaut. Dieser Vorgang wird als Implantation bezeichnet und geht mit einer beginnenden Differenzierung des Trophoektoderms einher. Das polare Trophoektoderm, das der inneren Zellmasse aufliegt, geht in eine massive Zellteilung über und bildet den diploiden Trophoblasten des extraembryonalen Ektoderms. Die Zellen des Trophoektoderms, die keinen Kontakt zu der inneren Zellmasse aufweisen, verlieren ihre Zellteilungsaktivität und differenzieren zu postmitotischen Trophoblasten-Riesenzellen [47]. Durch zahlreiche Endoreduplikationen werden sie später polytän. Im weiteren Differenzierungsverlauf kommt es zur Ausbildung des Chorionektoderms und der Bildung der Allantois aus dem embryonalen Mesoderm. Nach der Adhäsion der Allantois, beginnt die Bildung der drei bis zum Ende der Schwangerschaft persistierenden Trophoblastensubpopulationen. Hierzu zählen das Labyrinth, Spongiotrophoblasten-und Trophoblasten-Riesenzellen. Im weiteren Verlauf der Plazentabildung entstehen aus ihnen der äußere Synzytiotrophoblast (ST) und der innere Cytotrophoblast (CT). Der Synzytiotrophoblast dringt in das Uterusepithel ein, das innerhalb der Dezidualreaktion durch Umwandlung des Endometriums in die Dezidua reagiert. Es kommt zu einer Infiltration zahlreicher Leukozyten des mütterlichen Organismus, sowie der Veränderung der extrazellulären Matrix. In der folgenden Phase der Gastrulation beginnen die Zellen in die Blastula einzuwandern und die primären Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm zu bilden. Im Synzytiotrophoblasten (ST) bilden sich extrazytoplasmatische Vakuolen, die sich zu Lakunen vereinen. Aufgrund seiner lytischen Aktivität wächst der ST vermehrt in die Gefäßwände der Uteruswand ein und das zirkulierende maternale Blut verteilt sich in den gebildeten Lakunen. Der ST umgibt nun die mütterlichen Kapillare. Ein feto-maternaler Grenzbereich entsteht. Es kommt zur Erweiterung des Lakunennetzwerkes und zur Ausbildung eines arteriellen Speichers und eines venösen Abflusssystems, aus dem der ST Nahrungsstoffe und Sauerstoff entnehmen kann.

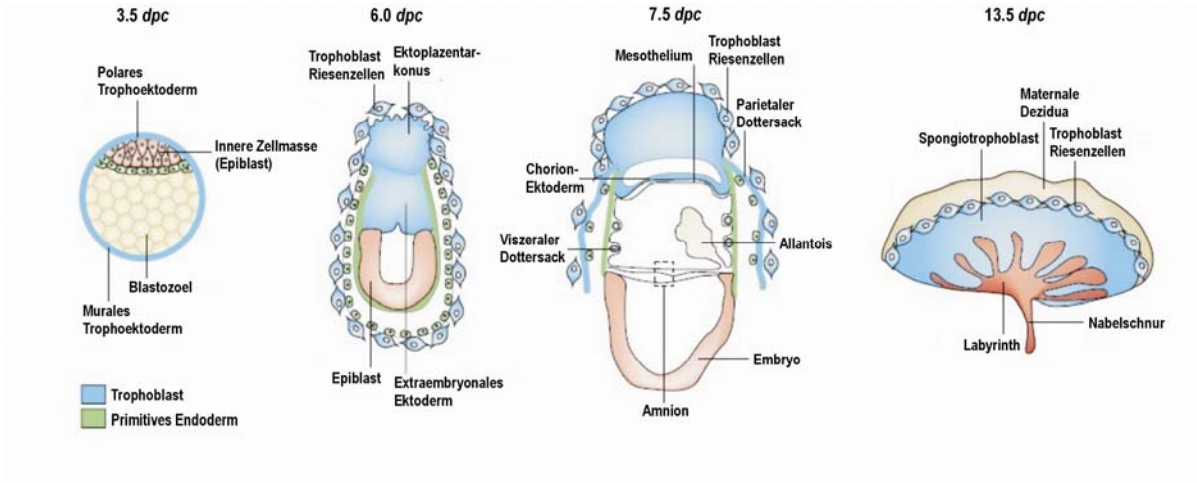

Abb. 2: Bildung des Trophoektoderms und der Plazenta im Mausembryo. Entwicklungsstadien des Mausembryos von Tag 3.5 bis Tag 13.5 *p.c.*. Dargestellt ist der Ursprung der extraembryonalen Linien und die Zellpopulationen der ausgereiften Plazenta (verändert nach [48]).

Die verschiedenen Trophoblastensubpopulationen sind durch die Expression einer Vielzahl von Markergenen charakterisiert, die regulatorisch in die Bildung der Plazenta eingreifen. Zu den sehr frühen trophoektodermspezifischen Markern zählen *eomesodermin* (Eomes) und *caudal related protein* 2 (Cdx2) [49, 50]. Der nukleäre Faktor *estrogen related factor* (Err2) besitzt ebenfalls eine essentielle Rolle in der frühen Trophoblastendifferenzierung [51]. Die Differenzierung von Trophoblasten-Riesenzellen wird durch die antagonistisch wirkenden Transkriptionsfaktoren Hand1 und Mash2 reguliert [52, 53]. Die Funktion der Trophoblasten-Riesenzellen wird durch die Transkriptionsfaktoren GATA-2 und GATA-3 reguliert und Mutationen in diesen Genen führt zu einer verminderten Bildung der für Trophoblasten-Riesenzellen spezifischen Hormone PL-1 und Proliferin [54].

Der Beginn der Plazentabildung schließt die präembryonische Phase ab. Aus den primären Keimblättern entwickeln sich im weiteren Verlauf der als Embryogenese bezeichneten embryonalen Phase die verschiedenen Organe und Strukturen des Embryos. Das embryonale Herz ist die erste während der Embryonalentwicklung gebildete funktionelle Struktur des Embryos.

1.3 Embryonalentwicklung des Herzens

Die Entwicklung des Herzens erfolgt aus einer Zellvorläuferpopulation mesodermalen Ursprungs [55]. Die bilateral angeordneten Progenitorzellen wandern in das anteriore und anteriore/laterale primäre Herzfeld ein [56, 57], das sich im Weiteren durch räumliche Umverteilung der Zellen zu einem linearen Herzplexus, dem so genannten *cardiac crescent* entwickelt. Charakteristisch für diese frühen Herzzellen ist ihr kardiales Entwicklungspotential nach Explantation *in vitro* [58]. In niedrigeren Vertebraten wie Amphibien, beinhaltet diese Zellpopulation Zellen, die eigentlich nicht an der Ausbildung des Herzens beteiligt sind. Sie können aber diese Funktion übernehmen, wenn ursprüngliche Zellen aufgrund von Schädigungen dazu nicht in der Lage sind [59]. Im weiteren Verlauf der Embryogenese kommt es durch die ventrale Bewegung der Progenitorzellen zur Bildung des Herzschlauches. Dieser beginnt als bald zu pulsieren und faltet sich zur Herzschleife auf [60]. Durch die räumliche Umverteilung der Zellen kommt es durch eine parallele Anordnung der Atrien und Ventrikel zur Ausbildung der Herzkammern [61]. Das Herz hat nun die Morphologie eines adulten Organs angenommen. Organintern laufen bis zur Geburt weitere Prozesse der Komplettierung der Herzkammern und der Ausbildung der Septen ab.

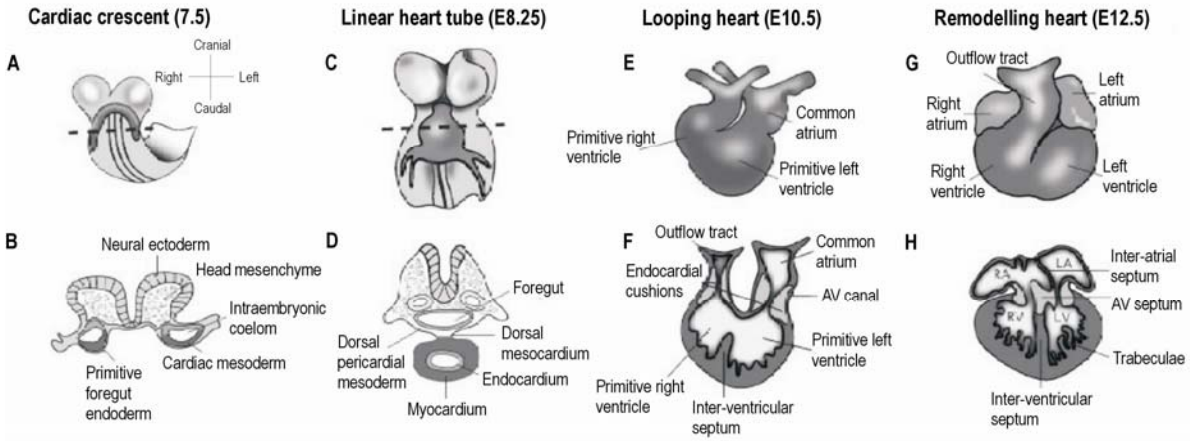

Abb. 3: Morphogenese der Entwicklung des Säugerherzens. Quelle [62].

Die Differenzierungsvorgänge während der embryonalen Kardiogenese, die sich morphologisch in der Bildung des Herzens manifestieren, unterliegen einer Vielzahl positiver und negativer regulatorischer Signale, die die Bildung des Herzens in einem definierten Bereich des anterioren lateralen Mesoderms induzieren. Neben dem positiven Einfluss des Endoderms, erfolgen negativ regulatorische Prozesse durch Freisetzung von Faktoren des Ektoderms. Diese begrenzen die Entstehung des Herzens auf die lateralen Bereiche des prekardialen Mesoderms. Auf der einen Seite könnten Erkenntnisse dieser molekularen Abläufe der Entwicklungsbiologie des Herzens für die *in vitro* Differenzierung embryonaler

Stammzellen zu Kardiomyozyten ausgesprochen nützlich sein, auf der anderen Seite stellt die Differenzierung von ESCs ein hervorragendes *in vitro* System dar, aus dem sich Erkenntnisse zur Embryonalentwicklung gewinnen lassen.

Eine bedeutende Rolle innerhalb der Herzentwicklung kommt dem Endoderm zu [63, 64]. Es sezerniert Faktoren, die eine Kardiogenese im kardialen Mesoderm induzieren. Als molekulare Signale für die Induktion des kardialen Mesoderms konnten *bone morphogenetic protein* (BMP)-Faktoren identifiziert werden. Neben der Expression von BMP2 im Endoderm, erfolgt die Expression von BMP4 im Ekto- und Mesoderm [65-67]. Für beide Proteine konnte gezeigt werden, dass sie kardiale Marker in nicht-kardiogenen Regionen des murinen Embryos und des Hühnchenembryos induzieren können [65, 68-70], wobei der Vorgang nach bisherigen Erkenntnissen konzentrationsabhängig zu sein scheint [64, 71]. Werden sie durch einen BMP-Antagonisten wie z.B. Noggin inhibiert, kommt es nicht zur Differenzierung der Zellen zu Kardiomyozyten [65, 72]. Die Rolle der BMP-Signale auf die Kardiogenese verdeutlicht sich durch eine gezielte Inaktivierung des BMP2-Gens in der Maus. Der Verlust führt zu der Ausbildung schwerer Defekte in der Herzentwicklung [73, 74]. Neben BMPs werden auch einige Mitglieder der FGF-Familie vom Endoderm sezerniert und sind an der Herzentwicklung beteiligt [71]. So ist es möglich durch eine Kombination von FGF4 und BMP2 eine kardiale Differenzierung in nicht kardialem Mesoderm des Hühnchens auszulösen [63, 75]. Des Weiteren zeigt FGF8 eine induktive Wirkung auf die kardiale Differenzierung [64]. Die Bildung des Herzens entstammt nicht nur allein den positiven Einflüssen der BMPs und anderen Induktoren, sondern auch repressiven Einflüssen, die aus dem axialen Mesoderm, der Neuralplatte und dem Notochord stammen, wie z.B. BMP-Antagonisten wie *Noggin* und *Chordin* [76]. Des Weiteren werden einige Mitglieder der *Wnt*-Familie zum Zeitpunkt der kardialen Induktion in der dorsalen Neuralplatte exprimiert [77]. Insbesondere Wnt8c und Wnt3a verhindern die Aktivierung kardialer Markergene [78, 79]. Eine Expression von Wnt-Antagonisten der Dickkopf und Frizzled-like Familien findet im angrenzenden Endoderm statt [78-80]. Sie können eine Kardiogenese in nicht kardialem Mesoderm induzieren [78, 79]. Werden Wnt-Signale in posterioren Mesodermexplantaten durch den sekretierten Wnt-Antagonisten *Crescent* inhibiert, werden die kardialen Markergen Nkx2.5 und GATA4 aktiviert und das posteriore Mesoderm differenziert sich zu kontrahierendem Herzmuskel [78]. Die Eingrenzung des Wnt/ β- Catenin Signalweges scheint somit essentiell für die Herzentwicklung zu sein, und die Balance zwischen Wnts und ihren Antagonisten nimmt eine entscheidende Funktion in der Formierung des Herzfeldes ein. Es gibt aber auch Wnts, die im Gegensatz zu den oben genannten Wnts den Wnt/ c-Jun-N-terminal-Kinase Signaleg (JNK) aktivieren. Dieser scheint konträr zum Wnt/ β- Catenin Signalweg z.B. mittels Wnt11 induzierend auf die Kardiogenese zu wirken [81]. Neben den bereits

genannten induzierenden Faktoren, gibt es eine weitere Anzahl von Signalmolekülen, die an der Herzentwicklung beteiligt zu sein scheinen. Hierzu zählen *Cripto-1* [82], *Nodal* , *Activi*n [68, 83], *platelet-derived growth factor* [68, 83] und C*erebrus* [84]. *Cripto-1* zählt zu der EGF-CFC Familie. Der Verlust seiner Funktionalität führt zu einer mangelnden Ausbildung kardialer Markergene. *Activin* und *platelet-derived growth factor* induzieren eine kardiale Differenzierung in verschiedenen Kontexten. *Activin* führt zu der Entstehung eines anterioren Charakters im Mesoendoderm. Es bildet so eine permissive Umgebung für eine BMP/FGF vermittelte Kardiogenese. *Cripto-1* ist ein Mitglied der TGFβ-Superfamilie und wirkt durch die direkte Inhibierung des BMP- und des Nodal-Signalweges.

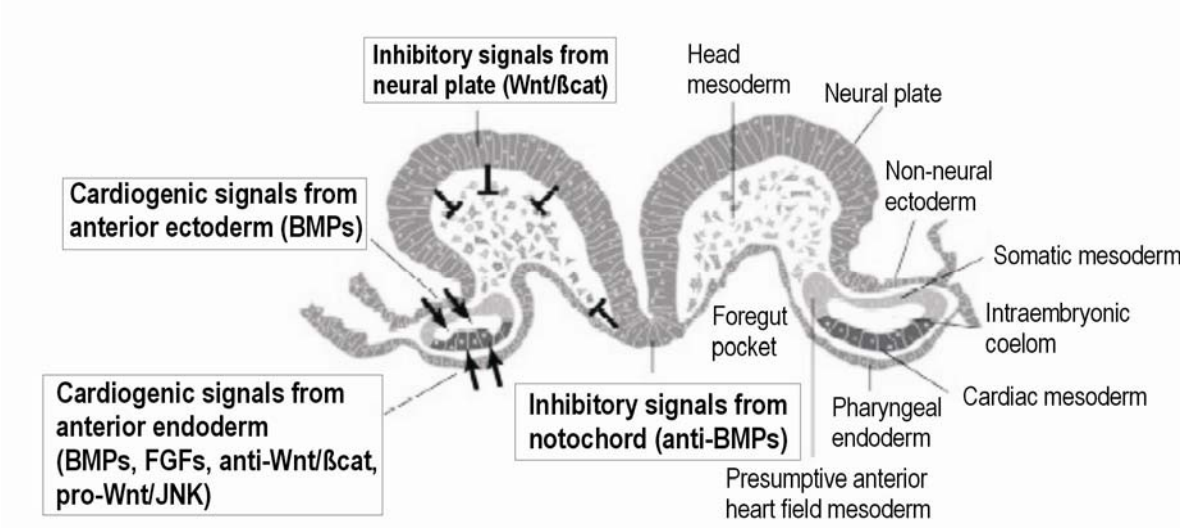

Abb. 4: Positive und negative regulatorische Signale, die auf die embryonale Herzentwicklung einwirken. Dargestellt ist ein murines Herz E7.5-E8.0. Die Pfeile kennzeichnen positiv wirkende Signale, die von dem Myokard benachbarten Geweben gebildet werden. Linien kennzeichnen negative wirkende Signale. Quelle [62].

1.4 Differenzierung embryonaler Stammzellen

Nach dem Entzug der zum Erhalt der Pluripotenz notwendigen Faktoren und dem optimalen Zusatz von Differenzierungsfaktoren, differenzieren embryonale Stammzellen *in vitro* in Zellderivate der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Die Differenzierungseinleitung kann auf unterschiedliche Art und Weise durchgeführt werden. Bei der klassischen Differenzierung embryonaler Stammzellen erfolgt die Differenzierungsinduktion in Form einer Suspensionskultur. Unter dem Einfluss von fetalem Kälberserum (FBS) bilden die Stammzellen die als e*mbryoid bodies* (EBs) bezeichneten Zellaggregate aus. Die EBs durchlaufen während der Suspensionskultivierung eine Art Zellreifung, die sich in unterschiedliche Differenzierungsschritte aufteilt [85]. Zunächst kommt es zu der Bildung einer in der Peripherie der Zellaggregate gelegenen endodermartigen Schicht, die den gesamten EB umgibt. Darunter entwickelt sich eine Zellschicht, die ektodermale Charakteristika aufweist. Die Reifung schließt mit der Bildung mesodermaler Zellen im EB-Inneren ab [6]. Die gesamte Entwicklung der Zellen in den EBs rekapituliert die *in vivo* Embryonalentwicklung, ist im Vergleich allerdings weniger organisiert. Zunächst kommt es ganz allgemein zu der Bildung von Vorläuferzellen, die im weiteren Differenzierungsverlauf zu terminal differenzierten Zelltypen ausreifen. Abhängig vom Zelltyp und der Spezies dauert dieser Reifungsprozess unterschiedlich lange an. Neben der durch FBS induzierten unkontrollierten Differenzierung embryonaler Stammzellen, existieren mittlerweile verschiedene Protokolle, die durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren, die Entstehung bestimmter Zelltypen fördern. Ein anderer Ansatz gezielt die Bildung bestimmter Zellen zu erreichen, ist, in der Regel basierend auf Erkenntnissen der Entwicklungsbiologie, die Kokultivierung mit induzierend wirkenden Geweben oder Zellinien.

1.4.1 Kardiale Differenzierung von ESCs

Nach der Isolierung der ersten murinen ES-Zellinie 1981 von Evans et *al*. [16], konnte 1985 zum ersten Mal eine kardiale Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen gezeigt werden [30]. Die Bildung kontrahierender Areale erwies sich als sehr robust und konstant reproduzierbar [8, 86]. Neben der Bildung von Kardiomyozyten differenzierten die Zellen in eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen. Als es Field et *al*. 1996 gelang ein Protokoll zur Aufreinigung ES-Zell abgeleiteter Kardiomyozyten zu etablieren [87], eröffneten sich neben der Grundlagenforschung an embryonalen Stammzellen neue Möglichkeiten zur Nutzung der differenzierten Zellen in klinischen Ansätzen zu therapeutischen Zwecken. Diese revolutionären Erkenntnisse führten Ende der neunziger Jahre zu einer Vielzahl von Studien mit dem Ziel ESC-abgeleitete Kardiomyozyten für therapeutische Zelltransplantationen zu nutzen.

Anfängliche Differenzierungsprotokolle muriner ESCs orientierten sich zunächst an dem Auftreten kardialer Anomalien in der Embryogenese und den damit in Zusammenhang gebrachten Faktoren. Die Zugabe verschiedener Substanzen, führte so in einem sehr einfachen Differenzierungssystem zu einer gesteigerten kardialen Differenzierung der murinen Stammzellen. Diese vergleichsweise einfachen Protokolle, konnten allerdings nicht auf embryonale Stammzellen aus Primatenspezies, wie zum Beispiel humane Stammzellen übertragen werden. Jüngste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass der *in vitro* Differenzierung von ESCs die gleichen komplexen Regulationsmechanismen wie der Embryonalentwicklung zu Grunde liegen. Neuere Differenzierungsprotokolle für embryonale Stammzellen aus Primatenspezies, versuchen nun einer *in vivo* Situation möglichst nahe zu kommen. Die Komplexität des Differenzierungsvorgangs, macht die Aufklärung der Details und die Gestaltung der Differenzierungsprotokolle allerdings sehr schwierig. Neben der bloßen Präsenz der Wachstumsfaktoren, spielen auch deren Konzentration und die zeitliche Komponente eine sehr große Rolle.

1.4.1.1 Kardiale Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen

Seit nunmehr zwei Jahrzehnten wird das kardiale Differenzierungspotential muriner embryonaler Stammzellen erforscht. Doetschman et *al.* waren die ersten, die 1985 das *in vitro* Differenzierungspotential zu Kardiomyozyten nachwiesen [30]. Die daraus resultierenden Zellen wurden umfangreich charakterisiert.

In der Regel erfolgt die Induktion einer kardialen Differenzierung muriner ESCs durch eine mehrtägige Suspensionskultivierung unter Ausbildung von EBs. Ein bis vier Tage nach dem Überführen der Zellaggregate auf adhäsive Zellkulturschalen, beginnen kardial differenzierte Areale spontan zu kontrahieren. Die Anzahl der kontraktilen Areale nimmt im zeitlichen Verlauf zu. Abhängig von den Kultivierungsbedingungen lassen sich lebende Kardiomyozyten bis zu einem Zeitraum von drei Monaten nachweisen. Die Kardiomyozyten in kontrahierenden Arealen weisen eine große Diversität auf und zeigen in der Regel Charakteristika von frühen embryonalen Herzmuskelzellen. Terminal ausdifferenzierte Zellen zeigen elektrophysiologische Eigenschaften von atrialen und ventrikulären Zellen sowie von Schrittmacherzellen. Neben Expression von herzspezifischen Markergenen wie GATA-4, Nkx2.5, Troponin I, Troponin T, ANF und Mlc, zeigten Zellen früher Differenzierungsstadien zunächst eine irreguläre Anordnung von Myofibrillen und Sarkomeren in kleinen rundlichen Zellen. Mit dem Reifungsprozess, der dem im nativen Gewebe gleicht, ordnen sich die zellulären Strukturen zu der für ausdifferenzierte Kardiomyozyten typischen Morphologie länglicher Zellen mit quergestreifter Muskulatur an.

Erste Protokolle zur Erhöhung der Effizienz der kardialen Differenzierung muriner ESCs orientierten sich vor allen Dingen an Erkenntnissen aus der Entwicklungsbiologie des murinen Herzens. So weisen zum Beispiel Mäuse, denen der Rezeptor für Retinolsäure, einem Vitamin A Derivat, fehlt, Missbildungen in der Anlage des Herzens auf. Basierend auf diesen Beobachtungen, gelang Wobus et *al.* 1997 durch die Zugabe von Retinolsäure zum Differenzierungsansatz die erste gerichtete Differenzierung von murinen ESCs zu Kardiomyozyten [88]. Nachfolgend konnte die Expression von NO-Synthase im entstehenden Herzfeld von Mäuseembryonen von E9.5 bis E14.5 nachgewiesen werden und auf die *in vitro* Differenzierung übertragen werden. Takahashi et *al.* überprüfte den Einfluss verschiedener Substanzen und kam zu dem Ergebnis, dass Ascorbinsäure induktiv auf eine kardiale Differenzierung wirkte [89]. Des Weiteren zeigte Befahr et *al.*, dass *transforming growth factor-β1* (TGF-β1), *bone morphogenetic protein 2* (BMP2) und BMP4 stimulierend und induzierend auf die myokardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen wirken [90]. Die resultierenden Herzmuskelzellen führten nach einer Transplantationen in geschädigte Areale des Herzens zu einer funktionellen Verbesserung. Neben der Reproduktion der Ergebnisse zum Einfluss von BMP2 und BMP4, zeigte Sachinidis zusätzlich die induktive Wirkung von *insulin-like grwoth factor*-1 und *fibroblast growth factors (*FGFs) [91, 92]. Erythropoetin und Dimethylsulfoxid (DMSO) zählen ebenfalls zu den Agenzien, die eine Entstehung von Zellen des kardialen Typus fördern [93].

Neben der Induktion der kardialen Differenzierung durch Chemikalien und Wachstumsfaktoren wurde unter anderem versucht, die komplexen Wechselwirkungen der Embryogenese durch Kokultivierung der Stammzellen mit induktivem Gewebe oder Zellinien nachzustellen. So erzielte Rudy-Reil 2004 durch die Kokultivierung muriner embryonaler Stammzellen mit dem anterioren prekardialen Endoderm und Mesoderm des Hühnchens eine Ausbeute von einhundert Prozent kontrahierenden EBs [94]. Eine Kokultivierung embryonaler Stammzellen mit OP9 Stromazellen wurde als Kultivierungssystem zur Differenzierung zu Zelltypen der hämatopoetischen Linie etabliert [95]. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten und hämatopoetische Zellen aus einem gemeinsamen Progenitor entstehen [96], so dass dieses System somit auch zur Bildung von Kardiomyozyten genutzt werden kann.
So gelang es eine Vielzahl an Protokollen zur gerichteten Differenzierung muriner ESCs zu Kardiomyozyten zu etablieren. Die Übertragung der Ergebnisse auf HESCs ist aufgrund der Unterschiede zwischen den Spezies nur bedingt möglich, so dass bislang unklar ist, ob sich diese Ergebnisse überhaupt auf ESCs aus Primatenspezies übertragen lassen.

1.4.1.2 Kardiale Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen (HESCs)

Nach der Isolierung der ersten humanen embryonalen Stammzellinie wurde sehr schnell das Potential zur Differenzierung in Derivate der drei Keimblätter nachgewiesen, so auch die Differenzierung zu kontrahierenden Kardiomyozyten [35, 97]. Die Differenzierung erfolgte ungerichtet unter Zusatz von FBS. Bereits etablierte Protokolle zur Erhöhung der Effizienz der kardialen Differenzierung muriner ESCs, ließen sich allerdings nicht auf die humanen Stammzellen übertragen. Der einzige bislang erschienene Bericht zur Steigerung der Differenzierungseffizienz stammt von Mummery et *al.*. Ihr gelang es 2003 durch die Kokultivierung humaner ESCs mit END-2 Zellen eine kardiale Differenzierung der Stammzellinie zu erreichen, die sie zuvor in durch FBS supplementierten Differenzierungsansätzen nicht beobachten konnte [98]. Neue Ergebnisse zeigen, dass die Induktion durch die END-2 Zellen in einem serumfreien System zu einer Steigerung der kardialen Differenzierung führt [99]. Verglichen mit der kardialen Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen, erfolgt die Differenzierung humaner Stammzellen heterogener, ineffizienter und der Entwicklungsprozess benötigt mehr Zeit.

Grundsätzlich erreichen aus HESCs gebildete Kardiomyozyten bisher nicht die gleiche funktionelle Reife, wie die aus murinen ESCs abgeleiteten Herzzellen. Bedenkt man die Unterschiede in der Dauer des Reifungsprozesses der Organismen und der Unterschiede im zeitlichen Ablauf der embryonalen Herzentwicklung beider Spezies, so ist die Tatsache nicht sehr verwunderlich. Während sich die *in vivo* Entwicklung des Herzens bei der Maus vor allem auf die ersten 12 Tage der Embryonalentwicklung konzentriert, benötigen die wichtigsten Vorgänge beim Menschen ca. 35 Tage. Auftretende Diversitäten können somit nicht nur durch unterschiedliche molekulare Steuerungsmechanismen und davon abhängig unterschiedliche Kulturnotwendigkeiten bedingt sein, sondern einfach auch in unterschiedlichen Entwicklungszeiträumen begründet liegen.

Im Verlauf der Differenzierung kommt es zu einer Reifung der gebildeten Kardiomyozyten, die der *in vivo* Entwicklung entspricht und durch verschiedene Charakteristika gekennzeichnet ist. Neben der Änderung des herzspezifischen Genexpressionsmusters von Herzvorläuferzellen zu reiferen Kardiomyozyten, zeigen ultrastrukturelle Analysen im Verlauf der Differenzierung eine zunehmende Organisation der Myofibrillen und der Sarkomere. Reifere aus ESCs-abgeleiteten Herzzellen zeigen die Bildung von herzspezifischen Ionenkanälen und *gap junctions*. Obwohl die differenzierten Zellen nicht bis zu einem adulten kardialen Phänotyp ausreifen, konnten Kardiomyozyten mit elektrophysiologischen Eigenschaften von atrialen und ventrikulären Zellen identifiziert werden. Die Funktionalität wurde durch positive chronotrope Reaktionen auf β-adrenerge Rezeptor Agonisten

(Isoproterenol) und negative chronotrope Reaktionen auf muskarine Rezeptor Agonisten (Charbachol) nachgewiesen [100].

1.4.2 Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Trophoblastenzellen

Durch die Isolierung der Zellen des extraembryonalen Ektoderms präimplantierten Blastozysten E6.5 p.c., gelang es Tanaka et *al*. 1998 die erste murine Trophoblastenstammzellinie (TS Zellen) zu etablieren [101]. Die Arbeitsgruppe generierte so ein auf murinen Zellen basierendes *in vitro* System zur Erforschung zellulärer Abläufe auf molekularbiologischer Basis, die während der Schwangerschaft und der Differenzierungsvorgänge bei der Plazentabildung ablaufen.

Etabliert wurde diese trophoektodermale Trophoblastenstammzellinie auf inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten in Trophoblasten Stammzellmedium unter dem Zusatz von FGF4 und Heparin. Die Stammzellen ließen sich über einen Zeitraum von sechs Monaten und 20 Passagen in augenscheinlich unverändertem Zustand kultivieren. Als Markergene für den relativ undifferenzierten Status der Zellen dienten *estrogen receptor related receptor β* (Errβ) [51], *caudal type homeobox related transcription factor* 2 (Cdx2) [49, 50], f*ibroblast growth factor receptor* 2 (FGFR2) [48] und e*omesodermin* (Eomes) [50]. Nach dem Entzug der Feederzellen und dem FGF-4, differenzierten die Zellen zu Trophoblasten-Riesenzellen (engl., *trophoblast giant cells*) [101], die die Markergene *mammalian achaete-scute homologue* 2 (Mash2) [52, 53], *placental lactogen*-1 (PL-1) [54] und *heart- and neural crest derivatives-expressed protein* 1 (Hand1) [102] exprimierten, aus. Nach der Injektion in Blastozysten waren sie in Chimären ausschließlich an der Ausbildung extraembryonaler Strukturen des materno-fetalen Grenzbereichs beteiligt.

Bisher gelang es jedoch nicht, die gewonnenen Ergebnisse zur Etablierung einer derartigen trophoektodermalen Stammzellkultur aus Blastozysten auf das humane System zu übertragen. Die einzige Alternative zur Erforschung von Grundlagen im humanen System boten bis vor Kurzem ausschließlich Zellen aus malignen, transformierten Geweben oder primäre plazentale Zellen [103]. Da sich die Isolierung humaner TS-Zellinien als schwierig erweist und Forschungsergebnisse aus Mausmodellen nur teilweise auf den Menschen übertragbar sind [25], war es notwendig, alternative Modelsysteme zu schaffen. Aus ESCs-abgeleitete Trophoblasten bieten ein viel versprechendes Alternativmodel. Nicht-humane primaten ESCs stellen hierbei ein gut auf den Menschen übertragbares System dar und ermöglichen präklinische Experimente in einem Großtiermodell.

Erste Berichte über die Differenzierung humaner ESCs zu Trophoblastenzellen publizierte Thomson et *al*. 2002 [104]. Durch die Zugabe von BMP4 wurde eine gerichtete Differenzierung von vier unterschiedlichen humanen Stammzellinien erzielt (H1, H7, H9 und H14). Die Wirkungsweise des BMPs wurde durch die Zugabe des BMP-Inhibitors *Noggin* aufgehoben und untermauerte so den funktionellen, induzierenden Aspekt des Proteins. Mittlerweile gibt es mehrere Publikationen, die das Transdifferenzierungspotential muriner und humaner embryonaler Stammzellen zu Zellen mit trophoektodermalen Eigenschaften belegen. Neben der spontanen Differenzierung von HESCs in einer Matrigel-Matrix [105], führten vor allen Dingen die Überexpression trophoektodermspezifischer (Cdx2, Eomes) [106] oder das *silencing* von epiblastspezifischen Genen (Oct3/4) [107] zu dem Nachweis von Trophoblastenmarkern. Die transdifferenzierten Trophoblasten entsprechen allerdings eher terminal differenzierten Zellen, die nach einiger Zeit in Kultur unter Ausbildung von Synzythien eine eingeschränkte Proliferation zeigen. Im Gegensatz hierzu gelang es kürzlich einer englischen Arbeitsgruppe, drei Cytotrophoblastenstammzellinien (CTBS) aus humanen ESCs zu etablieren [108]. Die Zellinien zeigten ein ausgeprägtes Proliferations- und entsprechendes Differenzierungsverhalten. Nach dem Entzug von FGF4 und Heparin differenzierten sie zu Cytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten. Eine Redifferenzierung zu embryonalen Stammzellen wurde nicht beobachtet.

Die Fähigkeit embryonaler Stammzellen durch entsprechende Stimuli in Trophoblastenzellen zu differenzieren, eröffnet der Forschung neue Möglichkeiten. So können zelluläre Mechanismen während der Schwangerschaft im humanen Modelsystem *in vitro* untersucht werden. Des Weiteren kann dieses System zur Klärung der Fragestellung der immunologischen Toleranz während der Implantation allogenen Gewebes im Verlauf der Schwangerschaft genutzt und auf eine klinische Anwendung übertragen werden.

1.5 Zielsetzung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zählen zu den häufigsten Todesursachen in den industrialisierten Ländern. Die mangelnde endogene Fähigkeit zur Regeneration akuter myokardialer Schädigungen führt zu einer eingeschränkten Funktion des Herzens und seiner Pumpleistung, die im Langzeitverlauf zu einer pathologischen Hypertrophie des Herzens führen. Neue therapeutische Ansätze versuchen die Funktion abgestorbener Herzmuskelzellen durch Zelltransplantationen zu ersetzen und so eine funktionelle Regeneration des Gewebes zu erzielen. Ein anderer Ansatz ist der Ersatz des gebildeten Narbengewebes durch bioartifizielles Myokard, das mittels *Tissue Engineering* (TE) hergestellt wird. Eine Grundvoraussetzung sowohl für zelluläre Kardiomyoplastie, als auch für das myokardiale TE, ist das Vorhandensein ausreichender Mengen lebender und funktioneller Kardiomyozyten. Eine mögliche Zellresource stellen Stammzellen dar. Im Gegensatz zu den kontrovers diskutierten Ergebnissen zum Reprogrammierungs- und Transdifferenzierungspotentials adulter Stammzellen, konnte eine robuste kardiale Differenzierung *in vitro* bislang nur für embryonale Stammzellen eindeutig gezeigt werden. Im Gegensatz zu murinen und humanen ESCs bieten ESCs nicht-humaner Primatenspezies die Möglichkeit notwendige präklinische Transplantationsmodelle zu etablieren.

Im Rahmen der vorliegenden Promotion sollte deshalb ein System zur robusten kardialen Differenzierung von embryonalen Stammzellen aus dem Rhesusaffen (RESC) etabliert werden. Die folgenden Aufgabenstellungen sollten bearbeitet werden:

1. Etablierung eines Kultivierungssystems für RESCs

Vor den Versuchen zum Differenzierungspotential der RESCs, stand zunächst der Aufbau eines geeigneten Kultivierungssystems der embryonalen Stammzellinie. Wie auch die Stammzellinie wurden die entsprechenden Protokolle von Herrn Prof. Itskovitz-Eldor (Haifa, Israel) zur Verfügung gestellt. Sie sollten als Basis für den Aufbau des Systems dienen.

2. Charakterisierung der RESCs

Nach der Etablierung des Kultivierungssystems, sollten die RESCs auf mehreren Ebenen charakterisiert werden. Neben dem Erhalt des pluripotenten Status, sollte das allgemeine Differenzierungspotential der Stammzellinie untersucht werden.

3. Induktion einer Kardiogenese in RESCs

Etablierung eines effizienten Systems zur kardialen Differenzierung der RESCs.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	(Agilent, Böblingen)
BioPhotometer	(Eppendorf, Hamburg)
Biofuge fresco	(Heraeus, Osterode)
Elektrische Pipettierhilfe Pipetus®	(Hirschmann, Eberstadt)
Geldokumentation E.A.S.Y.429 K	(Herolab, Wiesloch)
iCycler	(Bio-Rad, München)
Mikrowelle MW 4270 E	(Mettmann, Haustechnik)
Nikon EclipseTE300	(Nikon, Düsseldorf)
Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	(Nunc, Neerijse, Belgien)
Olympus Zellkulturmikroskop CK40	(Olympus, Hamburg
PipetteBIOHIT 1-10µl,20-200µl,100-1000µl	(BIOHIT, Helsinki, Finnland)
Sanyo CO_2 Inkubator MCO-20AIC	(Sanyo, Bad Nenndorf)
Spannungsgerät Power Pac 300	(Bio-Rad, München)
Sterilwerkbank HeraSafe	(Heraeus Instruments, Osterode)
Sterilwerkbank Heraeus LaminAir	(Heraeus Instruments, Osterode)
Trio-Thermoblock	(Biometra, Göttingen)
Vortexer MS1 Minishaker	(Ika-Works, Wilmington, USA)
Wasserbad GFL 1083	(Heraeus Instruments, Osterode)
Zentrifuge Megafuge 1.0	(Heraeus Instruments, Osterode)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

BD-Falcon™ Culture Slides	(BD Bioscience, Bedford, USA, Kat.354104)
Druckerpapier SONY UPP-110HD	(Sony, Tokyo, Japan)
Einweg Pipetten 1ml – 50ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Einweg Pipettenspitzen, gestopft	(Star Lab, Ahrensburg)
Sechs-Loch-Platten	(Nunc, Neerijse, Belgien, Kat.140675)
Zwölf-Loch-Platten	(Nunc, Neerijse, Belgien, Kat.150628)
Vierundzwanzig-Loch-Platten	(Nunc, Neerijse, Belgien, Kat.142475)
Gewebekulturschalen	(Greiner, Kremsmünster, Kat.664160)

Petrischalen	(Falcon/ Becton Dickinson, Kat.351029)
Einfrierröhrchen 1ml	(Greiner, Kremsmünster, Österreich, Kat.122278)
Einwegspritzen 10ml	(Braun, Melsungen, Kat.4606108V)
Einweg Infektionskanülen Gr.1	(Braun, Melsungen)
Falconröhrchen 15ml	(Greiner, Kremsmünster, Österreich, Kat.188271)
Falconröhrchen 50ml	(Greiner, Kremsmünster, Österreich, Kat.227261)
Kimtech Labortücher	(Kimberly-Clark®, England)
Spritzenfilter 0,45µm	(Nalgene, Neerijse, Belgien, Kat.190-2545)
Rotilabo® Spritzenfilter 0,22µm	(Roth, Karlsruhe, Kat.P666.1)
Sterilfilter Bottle Top 500ml	(Nalgene, Neerijse, Belgien, Kat.8-1020-05)
20µl Kalibrierte Pipetten	(Drummond Scientific Company, Kat.2-00-020)
Thermanox®Plastic Coverslips	(Nunc, Neerijse, Belgien, Kat.194950)

2.1.3 Chemikalien

Agarose NEEO Ultra Qualität	(Roth, Karlsruhe, Kat.2267.4)
Ampuwa	(MHH Apotheke, Hannover)
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	(Sigma, Deisenhofen, Kat.A-9418)
Bromphenolblau	(Sigma, Deisenhofen, Kat.B0126)
Chloroform	(Sigma, Deisenhofen, Kat.C2432)
Chloroform: Isoamylalkohol 24:1	(Sigma, Deisenhofen, Kat.C0549)
Desoxynukleotide	(Amersham, Freiburg, Kat2720705)
4,6-Diamino-2Phenylindol DAPI	(Sigma, Deisenhofen, Kat.D32670)
Dimethylsulfoxid DMSO	(Sigma, Deisenhofen, Kat.D2650)
Dithiothreitol DTT	(Sigma, Deisenhofen, Kat.D43815)
Essigsäure	(Sigma,Deisenhofen, Kat.380121)
Ethanol, absolut	(J.T. Baker, Deventer, Niederlande, Kat.8006)
Ethidiumbromid 10mg/ml	(Sigma, Deisenhofen, Kat.E46065)
Gelatine	(Sigma, Deisenhofen, Kat.G2500)
Glykogenlösung 20mg/ml	(BoehringerMannheim, Kat.901393)
Isoamylalkohol	(Merck, Darmstadt, 3202594319)
Isopropanol	(Sigma, Deisenhofen, Kat.I9516)
Magnesiumchlorid $MgCl_2$	(Sigma, Deisenhofen, Kat.M63063)
Mountingmedium Immu-Mount	(Thermo, Pittsburgh, USA, Kat.9990402)
Mitomycin C	(Sigma, Deisenhofen, Kat.M4287)

Natriumchlorid	(Sigma, Deisenhofen, Kat.16818)
Paraformaldehyd	(Sigma, Deisenhofen, Kat.158127)
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.15593-031)
Phosphate Buffered Saline Tabletten	(Sigma, Deisenhofen, Kat.P4417)
Roti®-Phenol/C/Iso	(Roth, Karlsruhe, Kat.A156.1)
Triton X-100	(Sigma, Deisenhofen, Kat.234729)
TRIZOL Reagent	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.15596-018)

2.1.4 Kits

ES Cell Characterization Kit (Chemicon, Temecula, USA, Kat. SCR001)

QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAgen, Hilden, Deutschland, Kat.51104)

2.1.5 Enzyme

DNAse I für Molekularbiologie	(Stratagene, La Jolla, USA, Kat.600031)
Red Taq™ Polymerase (250U)	(Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Kat.D568)
Reverse Transkriptase Superscript II	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.18064-014)
RNAse Block (40U/µl)	(Stratagene, La Jolla, USA, Kat.300151-51)
Kollagenase Typ IV	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.17104-019)

2.1.6 Molekulargewichtsmarker

SmartLadder™ (200bp-10.000bp)	(Eurogentec, Seraing, Belgien, Kat.MW-1700-10)
SmartLadder SF™ (100bp-1.000bp)	(Eurogentec, Seraign, Belgien, Kat.MW-1800-04)

2.1.7 Primärantikörper

Tabelle 1: Primärantikörper

Antigen	Spezies	Isotyp	Klon	Verd.	Hersteller
ANF	Kaninchen	IgG	T-4011	1:500	Bachem
α-Fetoprotein	Maus	IgG1	MAB995	1:300	R&D Systems
Connexin 43	Kaninchen	IgG	AB1728	1:25	Chemicon
Cytokeratin Endo-A	Ratte	IgG2a	TROMA-1	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank
MLC2v	Maus	IgG1	F109.3E1	1:10	Biocytex
Sarkomer,α-Actinin	Maus	IgG1	EA-53	1:800	Sigma
SSEA-3	Maus	IgM	MC-631	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank
SSEA-4	Maus	IgG3	MC-813-70	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank
Titin	Maus	IgM	MAB1553	1:100	Chemicon
Troponin T	Maus	IgG2a	CT3	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank

2.1.8 Isotypen Negativkontrollen

Kaninchen IgG1 Isotyp-Kontrolle (200µg/0,5ml) (Santa Cruz,Kalifornien, USA)

Kaninchen Vollserum-Kontrolle (eigene Herstellung)

Maus IgG1 Isotyp-Kontrolle (100µg/ml) (DAKO, Glostrup, Dänemark)

Maus IgM Isotyp-Kontrolle (100µg/ml) (DAKO,Glostrup, Dänemark)

Ratte IgG2A Isotyp-Kontrolle (500µg/ml) (R&D Systems, Minneapolis, USA)

2.1.9 Sekundärantikörper

Cy™2-conjugated*AffiniPure donkey anti-mouse IgG,Verdünnung 1:250 (Jackson ,Baltimore, USA)

Cy™3-conjugated*AffiniPure donkey anti-mouse IgG,Verdünnung 1:250 (Jackson, Baltimore, USA)

Cy™3-conjugated*AffiniPure donkey anti-mouse IgM,Verdünnung 1:250 (Jackson, Baltimore, USA)

Cy™2-conjugated*AffiniPure goat anti-rabbit IgG,Verdünnung 1:50 (Jackson, Baltimore, USA)

Cy™3-conjugated*AffiniPure goat anti-rabbit IgG,Verdünnung 1:300 (Jackson, Baltimore, USA)

2.1.10 Oligonukleotide

Sämtliche verwendete Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg nach gewünschter Sequenzvorlage synthetisiert. Zur Konstruktion der Primer benötigte Sequenzvorlagen wurden der online Pubmed-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen. Die Lieferung erfolgte im lyophylisiertem Zustand. Nach der Aufnahme in H_2O (Ampuwa), erfolgte die Langzeitlagerung der Primer mit einer Stock-Konzentration von 100pmol/µl bei -20°C. Vor ihrer Verwendung in PCR-Reaktionen wurden die Primer-Stocks 1:10 mit Ampuwa verdünnt.

Tabelle 2: Oligonukleotide für die Multiplex Mykoplasmen-PCR

Primerset „*outer*“ Mykoplasmen-PCR	
Oligonukleotid	Sequenz 5’-3’
Xe 49 Myco A	cgcctgagtagtacgtwcgc
Xe 50 Myco A	ygcctgrgtagtacattcgc
Xe 51 Myco A	cgcctgagtagtatgctcgc
Xe 52 Myco B	Gcggtgtgtacaarmcccga

Primerset „*nested*“ Mykoplasmen-PCR	
Oligonukleotid	Sequenz 5’-3’
Xe 53 Myco C	tggtgcayggttgtcgtcag
Xe 54 Myco D	gaacgtattcaccgcrrcata
Xe 55 Myco D	gaacgtattcaccgyagcgta
Xe 56 Myco D	gaacgtattcaccgcagtata
Xe 57 Myco D	gaacgtattcaccgcracatg

Tabelle 3: Oligonukleotide für die Charakterisierung der RESCs / Pluripotenzmarkergene

Oligonukleotid	Sequenz 5'- 3'	Ziel	Position	mRNA	T_A
Oct3/4 sense	tcttcaggagatatgcaaagca	gi 42560241	464	370bp	55°C
Oct3/4 ras	gaaagggaccgaggagtacagt		833		
Nanog sense	gtcccagtcaagaaacagaagac	gi 13376297	487	265bp	60°C
Nanog ras	agtagaggctggggtaggtagg		751		
Rex-1 sense	aaagcatctcctcattcatggt	gi 42476270	1026	175bp	50°C
Rex-1 ras	cgtacgcaaattaaagtccaga		1200		
Sox2 sense	atgcaccgctacgacgtga	gi 29826338	1016	437bp	55°C
Sox2 ras	cttttgcacccctcccattt		1452		

Tabelle 4: Oligonukleotide zur Charakterisierung trophoektodermaler Zellderivate

Oligonukleotid	Sequenz 5'- 3'	Ziel	Position	mRNA	T_A
Cdx2 sense	cctccgctgggcttcattcc	gi24431948	1360	301bp	60°C
Cdx2 ras	tgggggttctgcagtctttggtc		696		
hCGα sense	gcagttactgagaactcacaag	gi10800407	83	556bp	57°C
hCGα ras	gaagcatgtcaaagtggtatgg		639		
Eomes sense	tcaccccaacagagcgaagagg	gi23336960	1510	373bp	65°C
Eomes ras	agagatttgatggaaggggtgtc		1883		

Tabelle 5 Oligonukleotide für die Charakterisierung des Differenzierungspotentials der RESCs

Oligonukleotid	Sequenz 5'- 3'	Ziel	Position	mRNA	T_A
ß-actin sense	gacgaggcccagagcaagag	gi 15426604	238	785bp	55°C
ß-actin ras	atctccttctgcatcctgtc		1022		
Brachyury sense	cggaacaattctccaacctatt	gi 19743811	1382	357bp	55°C
Brachyury ras	gtactggctgtccacgatgtct		1738		
Mesp1 sense	ctcgtctcgtccccagact	gi 14149723	192	188bp	55°C
Mesp1 ras	agcgtgcgcatgcgcagtt		379		
FOG2 sense	tgctaccacccaagatgtgat	gi 10862688	2371	203bp	55°C
FOG2 ras	agccttttgggagacgtg		2573		
GATA-4 sense	ggaggaaggctctcactgcc	gi 1065568	1089	228bp	60°C
GATA-4 ras	gagtgggcctctcctgtg		1317		

Oligonukleotid	Sequenz 5'- 3'	Ziel	Position	mRNA	T_A
Nkx2.5 sense	tgccgccggagagctctctg	gi 4038730	83	576bp	58°C
Nkx2.5 ras	accgcgatcctgcgggcag		659		
Goosecoid sense	cgagaacctcttccaggagacc	gi 39795448	574	190bp	65°C
Goosecoid ras	cgacgacgacgtcttgttccac		763		
ANF sense	gaaccagaggggagagacaga	gi 178635	513	405bp	60°C
ANF ras	ccctcagcttgctttttaggag		1040		
TBX5 sense	agcagtgacttcctaccagaac	gi 31652233	1303	108bp	55°C
TBX5 ras	tgacattctgtgcagctccat		1411		
TBX20 sense	aggtaccgctacgcctac	gi 31652229	486	470bp	50°C
TBX20 ras	gtcagtgagcctggagga		893		
αMHC sense	aggatcctctcaacgagact	gi 27764860	1796	469bp	50°C
αMHC ras	gtgatcaatgtccagagagc		2265		
MLC2a sense	gaggagaatggccagcaggaa	gi 20380769	4	446bp	60°C
MLC2a ras	gcgaacatctgctccacctca		451		
MLC2v sense	aggaggccttcactatcatgg	gi 2460246	94	390bp	58°C
MLC2v ras	gtgatgatgtgcaccaggttc		484		
SPARC sense	ctgcagggagtggatttagatcac	gi 338312	55	923bp	65°C
SPARC ras	ctgcagaccatgagggcctggatc		978		
AFP sense	actccagtaaaccctggtgttg	gi 20379786	1501	255bp	55°C
AFP ras	gaaatctgcaatgacagcctca		1755		
HNF3β sense	gtccgactggagcagctactat	gi 4958949	232	172bp	55°C
HNF3β ras	cacgtacgacgacatgttca		403		
HNF4 sense	gcttggttctcgttgagtgg	gi 31077206	676	730bp	60°C
HNF4 ras	caggagcttatagggctcaga		1406		
Ttr sense	aaaaccagtgagtctggagagc	gi 18089144	243	153bp	55°C
Ttr ras	gttggctgtgaataccacctct		386		
SP-D sense	aacataggacctcagggcaag	gi 42476329	553	306bp	55°C
SP-D ras	ctgcctcagagaagcaacatct		858		

2.1.11 Zellinien und primäre Zellen

2.1.11.1 Embryonale Stammzellen aus dem Rhesusaffen, Linie R366.4 (RESC)

Durch Thomson et *al*. 1995 isolierte Embryonale Stammzellinie mit dem Karyotyp 42, XY, normal.

Kultivierung: Die Zellen wurden in Form von Zellverbänden (Kolonien) auf Feederzellen aus inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten kultiviert und entsprechend der Koloniegröße alle drei bis vier Tage 1:4-1:6 gesplittet.

Zellkulturmedium: 80% KnockOut-Dulbeccos Modified Eagle Medium (KO-DMEM), 20% *Serum Replacement*, 1mM L-Glutamin, 0.1mM β–Mercaptoethanol, 1% nicht-essentielle Aminosäuren und 4 ng/ml *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF).

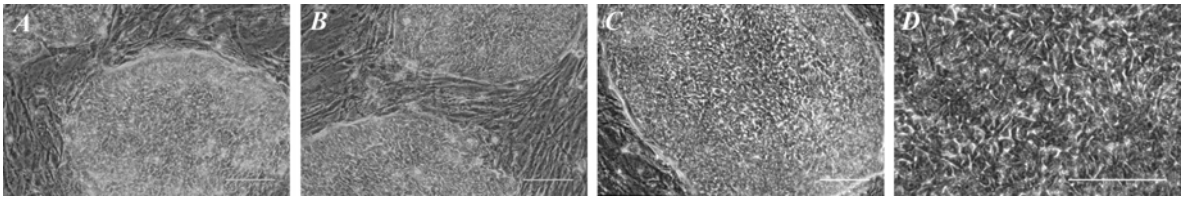

Abb. 5: Darstellung der Morphologie von Kolonien Rhesus embryonaler Stammzellen (RESCs) Linie R366.4. A.-D.) RESCs der Passage 18 auf einem *Feederlayer* aus inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten. Skalierung, 100µm.

2.1.11.2 Murine embryonale Fibroblasten

Verwendung: Herstellung einer Kultivierungsgrundlage für embryonale Stammzellen (Feederzellen).

Kultivierung: Die Zellen wurden in adhärenter Form in unbeschichteten 100mm Gewebekulturschalen kultiviert. Bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen etwa alle 2-5 Tage 1:2-1:3 gesplittet oder durch die Behandlung mit Mitomycin C inaktiviert (siehe Seite 37).

Zellkulturmedium: DMEM, 10%FCS (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland, Kat.A15043, Lot.A04305-0360), 2mM L-Glutamin + 1% nicht-essentielle Aminosäuren

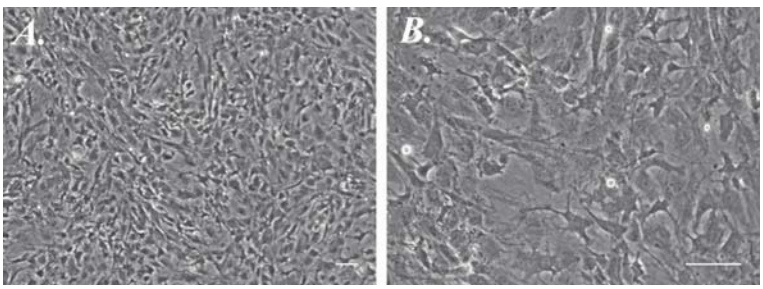

Abb. 6: Darstellung der Morphologie primärer embryonaler Mausfibroblasten. A.-B.) Inaktivierte embryonale Mausfibroblasten (Feederzellen). Darstellung eines Monolayers, wie er zur Kultivierung der embryonalen Stammzellen verwendet wurde. Skalierung, 100µm.

2.1.11.3 OP9 Stromazellen

Von T. Nakano et *al*. 1994 aus Knochenmark von Mäusen ((C57BL/6 x C3H)F2 -op/op) isoliert.

Verwendung: Induzierung einer kardialen Differenzierung der RESCs durch Kokultivierung.

Kultivierung: Die in ihrer Morphologie Fibroblasten-ähnlichen Zellen wurden in adhärenter Form in unbeschichteten 100mm Gewebekulturschalen kultiviert und vor Erreichen eines konfluenten Monolayers alle vier bis fünf Tage 1:3 gesplittet. Bei zu dichtem Wachstum differenzierten die Zellen zu adipösen Zellen aus. Dieses machte den Einsatz in Differenzierungsversuche unmöglich.

Zellkulturmedium*:* Alpha-MEM, 20% FBS (Pan Biotech GmbH, München, Deutschland, Kat.P30-3302, LOTP200709) + 2mM L-Glutamin.

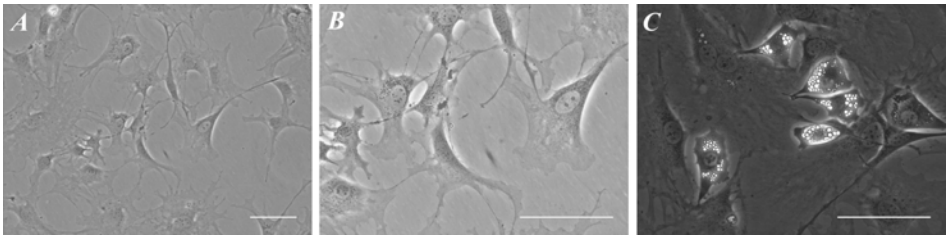

Abb. 7: Darstellung der Morphologie muriner OP9 Stromazellen. A.-B.) Monolayer aus undifferenzierten OP9 Zellen in der 15. Passage **C.)** Beginnende Differenzierung zu dicht gewachsener OP9 Zellen zu Adipozyten-ähnlichen Zellen. Skalierung, 100µm.

2.1.11.4 END-2 Zellen

Der Ursprung der Zellinie END-2 liegt in der murinen embryonalen Tumorzellinie P19. Mummery et *al.* differenzierte und charakterisierte sie 1991 mit Eigenschaften des Visceralen Endoderms (VE).

Verwendung: Induzierung einer kardialen Differenzierung der RESCs durch Kokultivierung.

Kultivierung: Die Zellen wurden in adhärenter Form in unbeschichteten 100mm Gewebekulturschalen kultiviert und alle drei bis vier Tage 1:6 gesplittet. Aufgrund einer Kontaktinhibition stellen sie ihr Wachstum bei erreichter Konfluenz ein.

Zellkulturmedium: DMEM:F12, 7,5% FBS, 2mM L-Glutamin + 1% MEM essentielle Aminosäuren

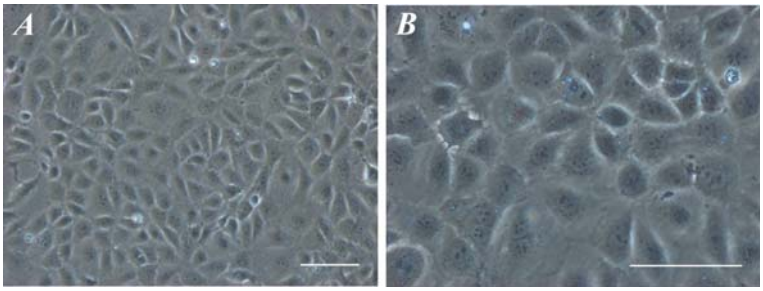

Abb. 8: Darstellung der Morphologie von END-2 Zellen. **A.,B.)** Monolayer aus END-2 Zellen in der 16. Passage. Skalierung, 100µm.

2.1.12 Basalmedien, Medienzusätze und Lösungen zur Zellkultivierung

2.1.12.1 Basalmedien

Alpha- Modified Eagle Medium (MEM)	(BioWhittaker, Walkersville, USA, Kat.BE12-169F)
D- Modified Eagle Medium (DMEM)	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.41965-039)
D-MEM: F12 (1: 1) + GlutaMax	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.31331-028)
DMEM für Kollagenase	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.21969-035)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.21980-032)
Knockout-DMEM	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.10829-018)

2.1.12.2 Medienzusätze

basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.13256-029)
β-Mercaptoethanol	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.31350-010)
Fötales Kälberserum	(PAA, Cölbe, Kat.A15-043, LOTA04305-0360, Perbio, Kat.CH30160.03 LOT CPB0054)
L-Glutamin 200mM	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.25030-024)
MEM Aminosäuren (50x)	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.11130-036)
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.11140-035)
Serum Replacement (SR)	(Invitrogen, Carlsbad, USA, Kat.10828-028)

2.1.12.3 Lösungen

Differenzierungsmedium A	80% IMDM, 20% Fötales Kälberserum (FBS), 1mM L-Glutamin, 0.1mM β-Mercaptoethanol und 1% nicht-essentielle Aminosäuren.
Differenzierungsmedium B	80% Alpha-MEM, 20% Fötales Kälberserum (FBS), 1mM L-Glutamin, 0.1 mM β-Mercaptoethanol und 1% nicht-essentielle Aminosäuren.
DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE (1x)	(PAA, Cölbe, Kat.H15-001)
Einfriermedium für Standardzellen	90% Fetales Kälberserum + 10% DMSO,
Einfriermedium für RESCs	30% KnockOut DMEM, 30% konditioniertes Rhesus ES Zellkulturmedium, 20% *Serum Replacement* + 20% DMSO
0,2%ig Kollagenaselösung	Kollagenase IV (Invitrogen, Kat.17104-019)in D-MEM
MycoKill™ AB *Antibiotic*	(PAA, Cölbe, Kat.P11-016)

Penicillin/Streptomycin (100x)	(PAA, Cölbe, Deutschland, Kat.P11-010)
Trypsin/EDTA (0,5%/0,2%) Lösung (10x)	(Biochrom AG, Berlin, Kat.L2153)
Trypanblau (0,4%ig)	(Sigma, Steinheim, Kat.T8154)

2.1.13 Lösungen und Puffer

2.1.13.1 Molekularbiologie

10x DNA Auftragspuffer	100mM EDTA, 2% SDS, 60% Glycerin, eine Spatelspitze Bromphenolblau
25x TAE-Puffer	1M Tris-Acetat, 25mM Essigsäure, 25mM EDTA, pH 8,0

2.1.13.2 Immunhistologie

Färbepuffer	1% BSA in PBS w/o
10x TBS	0,5M Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 1,625M NaCl; auf 4,0l mit H_2O auffüllen (pH 7,6)
TBS+-Puffer	95% 1x TBS; 0,025% Triton-X-100, 5% Serum des Tiers aus dem der Sekundärantikörper isoliert wurde

2.1.13.3 Elektronenmikroskopie

Moscona-Lösung	40g NaCl, 10g D-Glucose Monohydrat, 5g $NaHCO_2$, 1,5g KCL, 0,25g $NaH_2PO_4xH_2O$, 0,125g KH_2PO_4 add H_2O 5000ml, steril filtrieren.
Cacodylatpuffer 0,2M	21,4g DimethylarsinsäureNatriumsalz, 0,2g Magnesiumsulfat. $7H_2O$, 0,2g Calciumchlorid, auf 500ml mit H_2O auffüllen, pH 7,4
Fixierungslösung	Glutaraldehyd 2,5% in 0,1M Cacodylatpuffer

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Phenol-Chloroform Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde zur Entfernung von störenden Proteinen (wie zum Beispiel der DNAse während einer cDNA-Synthese) aus Nukleinsäurelösungen verwendet. Nach dem Auffüllen des Reaktionsansatzes auf 200µl wurde das gleiche Volumen (200µl) eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) zugesetzt und durch gründliches Vortexen mit der Probe vermischt. Zur Phasentrennung wurde anschließend für 1min. bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Die denaturierten Proteine sammelten sich während der Zentrifugation in der Phenolphase an, so dass die RNA-haltige obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Durch Zugabe von 200µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1), gründlichem Vortexen und Zentrifugation für 1min. bei 13.000rpm und 4°C wurde zur Entfernung von Phenolresten reextrahiert. Der wässrige Überstand wurde nochmals in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch eine Natrium-Acetat-Fällung aufgereinigt.

2.2.1.2 Präzipitation von Nukleinsäuren/ Natrium-Acetat-Fällung

Die Alkoholische-Fällung ist ein Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren. Zur Entfernung letzter Phenolreste nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion und zur Aufkonzentrierung von RNA und DNA wurde standardmäßig die Ethanolfällung mit Natriumacetat als monovalentem Salz durchgeführt. Hierzu wurden die Probenansätze zunächst mit H_2O (Ampuwa) auf ein Volumen von 100µl gebracht. Nach der Zugabe von 1/10 Volumen (10µl) Natriumacetat (3M, pH5,2) und dem 2,5fachen Volumen (250µl) eiskaltem 96%igen Ethanol, wurden die Nukleinsäuren für mindestens 30min. oder über Nacht bei -70°C präzipitiert. Optional wurde bei einem geringen Gehalt der Nukleinsäure für eine bessere Fällung 1µl Glycogenlösung (20mg/ml) als Trägersubstanz zugesetzt. Durch Zentrifugation für 30min. bei 13.000rpm und 4°C wurden die Nukleinsäuren zunächst sedimentiert und anschließend zur Entfernung letzter Salz- und Alkoholreste einmal mit 500µl eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde dann bei RT getrocknet und in einem adäquaten Volumen Ampuwa aufgenommen.

2.2.1.3 Isolierung von Ribonukleinsäuren mit TriZol

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung von TriZol der Firma Invitrogen. Nach der Abnahme des Zellkulturmediums wurden 0,5ml kaltes TriZol je Vertiefung einer Sechs-Loch-Platte zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 5min. bei RT wurde das Gemisch aus TriZol und

Zellen in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und mit 0,2ml Chloroform versetzt. Zur Mischung der Phasen wurde für 15sec. geschüttelt, anschließend für weitere 2-3min. bei RT inkubiert und zur Phasentrennung für 15min. bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde nun in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte nach Zugabe von 0,5ml Isopropanol und 1µl Glykogen-Lösung (20mg/ml) nach Inkubation für 10min. bei RT durch Zentrifugation für 10min. bei 13.000rpm und 4°C. Nach dem Waschen des Pellets mit 1ml 75%igem Ethanol wurde die RNA an der Luft getrocknet, anschließend in Ampuwa aufgenommen und zur Langzeitlagerung bei -80°C gelagert.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäuren mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem RNA 6000 Nano Chip unter der Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzers nach Herstellerangaben. Dabei wurde jeweils 1µl der zu analysierenden RNA-Lösung auf einen Chip aufgetragen. In einer im Chip enthaltenen Kapillare wurde die RNA elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Fluoreszenzmarkierung wurden die Fluoreszenzsignale zeitlich aufgelöst wieder gegeben und in Beziehung zu einer Standardprobe mit bekanntem RNA-Gehalt gesetzt. Auf diese Weise wurden die Konzentrationen der 18S und 28S-rRNA ermittelt. Die graphische Darstellung der Signale erlaubte außerdem Rückschlüsse auf die Qualität der RNA.

2.2.1.5 DNAse- Verdau

Ein DNAse-Verdau wurde zur Beseitigung potentieller Kontamination der isolierten Gesamt-RNA durch genomische DNA im Anschluss an RNA-Isolierungen durchgeführt.

Tabelle 6: Pipettierschema: DNAse-Behandlung von RNA-Proben

DNase-Behandlung von RNA-Proben	
5µg	RNA
1,5µl (50mM)	1M Tris-HCl-Lösung, pH 7,5
1,0µl (40U)	RNAse Block (40U/µl)
0,6µl (10mM)	0,5M $MgCl_2$
0,6µl (1mM)	0,05M DTT
1,0µl (10U)	RNAse freie DNAse (10U)

Add 30µl H_2O (Ampuwa)

Nach dem Vermischen der einzelnen Komponenten wurde der Ansatz für 15min. bei 37°C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss an den DNAse-Verdau wurde zur Reinigung der RNA von der DNAse eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

2.2.1.6 cDNA Synthese

Bei der Synthese von *complementary* DNA (cDNA) wird die Fähigkeit des viralen Enzyms Reverse Transkriptase Ribonukleinsäure in Desoxyribonukleinsäure umzuschreiben ausgenutzt. Das Verfahren ermöglicht so in Kombination mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Untersuchung von zellulären Genexpressionsmustern auf mRNA-Ebene und somit die Charakterisierung und Zuordnung der zu analysierenden Zellen.

Die cDNA-Synthese wurde standardmäßig mit der SuperScript™ II Reversen Transkriptase der Firma Invitrogen durchgeführt. Die SuperScript™ II Reverse Transkriptase ist eine modifizierte Variante der Wildtyp *moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* (M-MLV RT). Durch mehrere Punktmutationen konnte die RNAse H-Aktivität bei diesem Enzym deletiert werden. Dieses ermöglicht die Synthese längerer cDNA Produkte, sowie die Synthese einer größeren Menge an cDNA. Zur cDNA-Synthese sollten 1ng-5µg isolierte Gesamt-RNA bzw. 1ng-500ng aufgereinigte mRNA eingesetzt werden.

Tabelle 7: Pipettierschema First-Strand cDNA-Synthese mit Super Script™ II RT

First-Strand cDNA-Synthese mit Super-Script™ II RT	
1,5µl (750ng)	Gesamt-RNA (500ng/µl)
1,0µl	Oligo$(dT)_{12\text{-}18}$ Primer (500µg/ml)
1,0µl	dNTP-Mix (jeweils 10mM)
8,5µl	H_2O (Ampuwa)

Die cDNA-Synthese startete mit einer initialen Denaturierung der Proben bei 65°C für 5min..

Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert, sofort auf Eis gelagert und die folgenden Komponenten hinzugefügt:

4,0µl	5x First-Strand Buffer
2,0µl	0,1M DTT
1,0µl	RNAse-Block

Nach dem Vermischen der Komponenten wurden die Proben für 2min. bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe der Reversen Transkriptase wurde die cDNA-Synthese gestartet.

1,0µl (200U)	Super-Script™ II RT (200U/µl)

Die cDNA-Synthese erfolgte für 50min. bei 42°C. Zur Inaktivierung der Reaktion wurde im Anschluss für 15min. bei 70°C inkubiert. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

2.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Analyse von zellulären Genexpressionsmuster zur Charakterisierung und Zuordnung der Zellen erfolgte *in vitro* durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Innerhalb einer PCR-Reaktion werden im Verlauf von mehreren Abschnitten spezifische DNA-Sequenzen selektiv angereichert. Ihre Spezifität erreicht sie durch die verschiedenen zur Synthese der Amplifikate verwendeten Oligonukleotide, die als Primer bezeichnet werden. Primer sind kurze, sich je nach der zu amplifizierenden Sequenz, in ihrer Basenabfolge voneinander unterscheidende einzelsträngige *in vitro* synthetisierte Oligonukleotide, die nach einem Denaturierungsschritt (**I.Denaturierung**) an die komplementären Bereiche der Sequenz binden. Für die Amplifikation einer bekannten Nukleotidsequenz werden zwei Primer benötigt, deren Basenabfolge jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge komplementär ist. Hierbei flankieren sie die zu amplifizierende Region. Nach der Anlagerung der Oligonukleotidprimer (**II.Primer Annealing**) verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die Primer und synthetisiert aus freien Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) Kopien der Ausgangssequenz (**III. Primer Elongation**). Das mehrfache Durchlaufen, dieser in drei Schritte zu unterteilenden Reaktion, führt zu einer exponentiellen und selektiven Anreicherung der gewünschten Sequenz.
Zur Analyse von Genexpressionsmustern wurde aus Gesamt-RNA synthetisierte cDNA als DNA-Matrize eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass unter Verwendung der RedTaq-Polymerase speziesspezifische Amplifikate bekannter Größe synthetisiert wurden.

Tabelle 8: Pipettierschema für einen Polymerase-Kettenreaktions-Ansatz

Pipettierschema für einen Polymerase-Kettenreaktion-Ansatz	
1,0µl	cDNA
2,5µl	10x RedTaq™ PCR-Puffer
2,5µl	DMSO

1,0µl	(10mM)	dNTPs
1,0µl	(10pmol/µl)	Primer *sense*
1,0µl	(10pmol/µl)	Primer *reverse antisense*
0,5µl		$MgCl_2$ (25mM)
1,25µl RedTaq™ Polymerase (1,25U)		

Nach dem gründlichen Vermischen der einzelnen Komponenten wurde der PCR-Ansatz in einen Thermoblock überführt und das PCR-Programm wurde gestartet.

Das im Folgenden aufgeführte PCR-Programm wurde standardmäßig verwendet. Die Annealingtemperatur ($T_{Annealing}$) wurde den jeweiligen Schmelztemperaturen der verwendeten Primer angepasst und ist den Tabellen 3-5 auf den Seiten 22-23 zu entnehmen.

Tabelle 9: Standardprogramm Polymerase-Kettenreaktion

Standard-Programm Polymerase-Kettenreaktion		
Temperatur (T)	Zeit	Anzahl der Zyklen
94°C	1min.	1
94°C	1min.	35
$T_{Annealing}$	1min.	
72°C	1min.3osec.	
72°C	5min.	1
4°C	∞	

Die Auswertung der PCR-Reaktionen erfolgte anschließend durch Agarosegelelektrophorese

2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese

Zur Auswertung der PCRs wurden im Anschluss Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Die Elelektrophorese in einem Agarosegel ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Ladung in einem Spannungsfeld. Ausschlaggebend sind hierbei das Trennverhalten des Agarosegels und die Größe der DNA-Fragmente. Die Zugabe des nukleinsäureinterkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid zum Agarosegel und zum Laufpuffer ermöglichte das sichtbar machen der aufgetrennten Nukleinsäuren durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 254nm.

1,5g Agarose wurden mit 100ml 1xTAE-Puffer versetzt und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Vor der Zugabe von 5µl Ethidiumbromidlösung (0,5µg/ml) wurde die Agarose auf etwa 60°C abgekühlt und anschließend zur Polymerisation in eine Horizontalkammer mit eingehängtem Probenkamm gegossen. Nach der Überführung des Agarosegels in die mit 1xTAE-Laufpuffer (+ 0,5µg/ml Ethidiumbromid) befüllte Laufkammer, wurden die PCR-Proben und ein Molekulargewichtsmarker in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte nach dem Anlegen der Spannung von 130V für etwa 1h.. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde das Herolab-Photosystem verwendet.

2.2.2 Methoden zur Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank. Sämtliche verwendete Lösungen und Materialien wurden, soweit nicht vom Hersteller steril geliefert, den Materialien entsprechend durch Autoklavieren, Trockenhitze oder Sterilfiltration sterilisiert.

2.2.2.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Zu den innerhalb der Arbeit in adhärenter Form kultivierten Zellen gehörten die Zellinie END-2 und OP9, sowie primäre embryonale Mausfibroblasten Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 100mm Gewebekulturschalen in einem Inkubator für Säugerzellen bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit in 10ml der den Zellen entsprechenden Kulturmedien (siehe Seite 24-25). Zur Vermehrung und zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen und nach Zugabe von 3ml einer 0,05/0,2%igen Trypsin/EDTA-Lösung für 5min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 9ml Stoppmedium (DMEM mit 20% FBS). Anschließend wurden die abgelösten Zellen für 5min., 500xg bei 4°C pelletiert, in einem adäquaten Volumen resuspendiert und verdünnt auf neue Gewebekulturschalen ausgesät.

2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte im flüssigen Stickstoff. Zum *Einfrieren* wurden die Zellen nach Abnahme des Zellkulturmediums einmal mit PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen und anschließend für 5min. bei 37°C mit einer 0,05/0,2%igen Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Durch Zugabe des entsprechenden Volumens Stoppmedium (DMEM + 20% FBS) wurde die Reaktion abgestoppt und die abgelösten Zellen für 5min. bei 500xg und 4°C sedimentiert. Das Zellpellet wurde dann in 1ml auf Eis vorgekühltem Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) resuspendiert und in ein vorbereitetes Einfrierröhrchen überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte anschließend in einem Nalgene™ *Cryo*

1°C *Freezing Container* bei -80°C. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum *Auftauen* wurden die Zellen dem flüssigen Stickstoff entnommen, bei 37°C im Wasserbad bis zum Verbleiben eines kleinen Klumpen Eis angetaut und in 9ml eiskaltes Stoppmedium überführt. Nach Zentrifugation für 5min., 500xg bei 4°C wurden die Zellen in 10ml der den Zellen entsprechenden Medien resuspendiert und in 100mm Gewebekulturschalen ausgesät.

2.2.2.3 Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Die Beschichtung von Zellkulturgefäßen wurde zur Stabilisierung der Haftung der Zellen an den jeweiligen Gefäßwänden durchgeführt. Die in der Arbeit verwendete Beschichtungssubstanz war *porcine* Gelatine, die in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet wurde. Beschichtet wurden ausschließlich Mehr-Loch-Platten der Firma Nunc, hauptsächlich Sechs-Loch-Platten.

Zur Beschichtung mit **1%iger Gelatine** wurde die bei 4°C gelagerte Gelatine im Wasserbad verflüssigt. In jede Vertiefung einer Sechs-Loch-Platte wurden 0,5ml gegeben. Nach einer Inkubation für mindestens 30min. bei 37°C im Inkubator wurde die Gelatine abgenommen. Vor dem Gebrauch der Platten wurden diese einmal mit PBS (+ Ca^{2+}/ Mg^{2+}) gewaschen.

Zur Beschichtung mit **0,1%iger Gelatine** wurden 0,5ml der bei 4°C gelagerten Gelatine direkt in jede Vertiefung einer Sechs-Loch-Platte gegeben. Nach einer Inkubation für mindestens 30min. bei Raumtemperatur (RT) wurde die Gelatinelösung abgenommen. Vor der Nutzung der Platten wurden diese unter der Sterilwerkbank getrocknet.

2.2.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. 10µl der Zellsuspension wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 90µl Trypanblau versetzt. Trypanblau ermöglichte die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Lebende Zellen erschienen im Gegensatz zu toten Zellen, deren Cytoplasma vom Trypanblau blau angefärbt wurde, hell. Ein Tröpfchen der Suspension wurde unter das Deckgläschen der Kammer pipettiert und die lebenden Zellen in vier Großquadraten wurden ausgezählt. Die Zelldichte wurde anschließend nach der folgenden Formel berechnet:

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

N = Anzahl der gezählten Zellen [Zellen]
Q = Anzahl der ausgezählten Großquadrate
V_G = eingesetztes Gesamtvolumen (Trypanblau + Zellsuspension) [mL]
V_Z = Volumen der eingesetzten Zellsuspension [mL]
V_K = Kammervolumen über einem Großquadrat (= 10^{-4} mL)
x = Zelldichte [Zellen/ mL]

2.2.2.5 Nachweis von Mykoplasmen

Um mögliche Kontaminationen mit Mykoplasmen ausschließen zu können, wurden die verwendeten primären Zellen und Zellinien in einem zeitlichen Intervall von acht Wochen einem auf einer Multiplex-PCR basierendem Nachweis unterzogen. Durch die Zusammenstellung spezieller Oligonukleotid-kombinationen ist die Detektion von bis zu 15 der am häufigsten in der Zellkultur vorkommenden Mykoplasmenspezies möglich. Die Detektionsgrenze liegt bei 1-2 genomischen Kopien der für die 16S rRNA kodierenden Region. Für den Nachweis einer möglichen Kontamination, wurden die zu testenden Zellen für eine Woche ohne Mediumwechsel im Inkubator belassen.

Gewinnung der Proben

Zur Isolierung der genomischen DNA der Mykoplasmen wurde das QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Isolierung erfolgte aus Zellkulturüberstand und Zellen. Je Loch einer Sechs-Loch-Platte wurden 1ml Medium und 1/10 der Zellen verwendet. Das Medium wurde für 10min. bei 13.000xg und die Zellen für 10min. bei 600xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets jeweils in 200µl PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} resuspendiert und mit 20µl Protease-Lösung (600mAU/ml) versetzt. Durch die Zugabe von 200µl AL (Lysispuffer) und einer anschließenden Inkubation von 10min. bei 56°C wurden die Zellen lysiert. Nach der Zugabe von 200µl 96%igem Ethanol wurden die Suspensionen auf die im Kit enthaltenen Säulchen aufgetragen und für 1min. bei 6000xg zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulchen zweimal mit je 500µl AW1 (Waschpuffer) gewaschen und bei 16.000xg für 3min. zentrifugiert. Die DNA konnte dann mit je 200µl AE (Elutionspuffer) von den Säulchen eluiert werden.

Multiplex-PCR

Für die Mykoplasmen-PCR wurden je 5µl des Eluats verwendet. Die Analyse gliederte sich in zwei Abschnitte. Nach der Durchführung einer PCR mit dem „*outer*"-Primerset folgte der zweite Ansatz mit dem „*nested*"-Primerset. Als DNA-Matrize wurden hierbei 5µl der „*outer*"-PCR verwendet.

Tabelle 10: Pipettierschemen Mykoplasmen-PCR

Pipettierschema für die „*outer*" Mykoplasmen-PCR		Pipettierschema für die „*nested*" Mykoplasmen-PCR	
5,0µl	Eluat	5,0µl	Des „*outer*" PCR Ansatzes
5,0µl	10x PCR-Puffer incl. 1,1mM $MgCl_2$	5,0µl	10x PCR-Puffer incl. 1,1mM $MgCl_2$
5,0µl	Primer Mix *"outer"*	5,0µl	Primer Mix *"nested"*
1,0µl	dNTPs (10mM)	1,0µl	dNTPs (10mM)
0,5µl	Hot Star Taq Polymerase (5U/µl)	0,5µl	Hot Star Taq Polymerase (5U/µl)
Add 50µl $Aqua_{dest}$ (Ampuwa)		Add 50µl $Aqua_{dest}$ (Ampuwa)	

Tabelle 11: PCR-Programme für die Multiplex-Mykoplasmen PCR

Programm „*outer*“ Mykoplasmen-PCR		
Temperatur (T)	Zeit	Anzahl der Zyklen
90°C	10min.	1
94°C	30sec.	30
67°C	30sec.	
72°C	1min.	
72°C	10min.	1
4°C	∞	

Programm „*nested*“ Mykoplasmen-PCR		
Temperatur (T)	Zeit	Anzahl der Zyklen
90°C	10min.	1
94°C	30sec.	30
63°C	30sec.	
72°C	1min.	
72°C	10min.	1
4°C	∞	

Bei einer Kontamination durch Mykoplasmen wurde durch die PCR ein Fragment der Größe von 310-330bp synthetisiert. Die Auswertung des Tests erfolgte anschließend auf einem 1,5%igen Agarosegel.

2.2.2.5 Behandlung mit MycoKill™ AB

Nach dem Nachweis von Sequenzen des Mykoplasmen 16S rRNA-Gens, wurden die Zellen mit dem speziell zur Behandlung von Säugerzellen gegen Mykoplasmen entwickelten Antibiotikum MycoKill™ AB der Firma PAA behandelt. Das Antibiotikum wurde als gebrauchsfertige Lösung bezogen und laut Herstellerangaben 1:50 im Zellkulturmedium verdünnt. Die Zellen wurden dann in gewohnter Weise für drei Wochen in MycoKill™ AB-haltigem Medium kultiviert. Zur Überprüfung der vollständigen Dekontamination wurde nach zwei weiteren Wochen der Kultivierung ohne das Antibiotikum erneut auf Mykoplasmen getestet. Nach einem negativen Befund wurde dieser nach sechs darauf folgenden Kultivierungswochen wiederholt bestätigt. Von nun an wurden die Zellen als dekontaminiert angesehen. Eine Testung auf potentielle Infektionen wurde von nun an in regelmäßigen zeitlichen Abständen wiederholt.

2.2.2.6 Isolierung embryonaler Mausfibroblasten

Die murinen Fibroblasten wurden aus Embryonen d13 p. c. des Mausstammes ICR isoliert. Nach der Präparation der Embryonen aus dem Uterus, erfolgten zunächst das Abtrennen des Kopfes und der Gliedmaßen, sowie das Entfernen der visuell erkennbaren Anlagen des Herzkreislaufsystems. Der verbleibende Rest der Embryonen wurde in PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} überführt und zweimal in diesem gewaschen. Um eine optimale Zellausbeute zu erzielen, wurden die Gewebestücke zunächst in einem Volumen von 2ml einer 0,05/0,2%igen Trypsin/EDTA-Lösung auf Eis mit einer Schere zerschnitten. Nach der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes erfolgte der Zellverdau unter Rühren in einem Erlenmeyerkolben bei 37°C im Inkubator in einem Gesamtvolumen von 17ml der 0,05/0,2%igen

Trypsin/EDTA-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von 15min. wurde der Gewebeverdau durch Zugabe von 51ml Stoppmedium (DMEM + 20% FBS) beendet. Um die aus den Gewebestücken isolierten Zellen von den restlichen, unverdauten Gewebsstücken abzutrennen, wurde die Suspension anschließend durch ein 100µm Zellsieb filtriert. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit einer Dichte von 5 x 10^6 Zellen je 100mm unbeschichtete Gewebekulturschale ausgesät. Bei erreichter Konfluenz (etwa 2 bis 3 Tage nach der Isolierung) wurden die Zellen eingefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.7 Inaktivierung primärer embryonaler Mausfibroblasten zur Herstellung einer Kultivierungsgrundlage (Feederzellen) für embryonale Stammzellen vom Rhesusaffen (RESC)

Die primären murinen embryonalen Fibroblasten wurden als Kultivierungsgrundlage (Feederzellen) für die RESCs benötigt. Um ein Überwachsen der embryonalen Stammzellen durch die Feederzellen zu verhindern, wurden diese mit Mitomycin C inaktiviert. Da nur eine weitere Vermehrung verhindert wird, synthetisieren die Zellen weiterhin Faktoren, die zum Erhalt der Pluripotenz der embryonalen Stammzellen benötigt werden.

Nach dem Auftauen der zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen, wurden diese vor dem Gebrauch mindestens einmal passagiert. Das Passagieren sollte gewährleisten, dass sich die Zellen vollständig vom Stress des Einfrierens und Auftauens regeneriert hatten. Da es sich bei den verwendeten Fibroblasten um primäre Zellen handelte, wiesen diese nur eine eingeschränkte Zellteilungsaktivität auf, die bis zur vierten Passage voll ausgeschöpft war.

Zur Inaktivierung wurden die Zellen für mindestens zwei und maximal fünf Stunden in 5ml/100mm Gewebekulturschale eines Mitomycin C-haltigen Mediums (10µg/ml) inkubiert. Da Mitomycin C eine stark kanzerogene Substanz ist, die auch Einfluss auf das Wachstumsverhalten der embryonalen Stammzellen nimmt, war es wichtig, dass die Fibroblasten nach der Inkubation möglichst vollständig von der Chemikalie befreit wurden. Dieses geschah durch mehrfaches Spülen der Zellen in PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}. Nach dem Ablösen mit Trypsin und der Zentrifugation bei 500xg für 5min. und 4°C, wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen Zellkulturmedium resuspendiert und gezählt. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit einer Zelldichte von 40.000 Zellen/cm^2 in mit 1%iger Gelatine beschichtete Sechs-Loch-Platten (0,5x10^6 Zellen/Vertiefung). Vor der Verwendung als Feederzellen wurde das Zellkulturmedium mindestens einmal gewechselt. Die vorbereiteten Zellen wurden nicht länger als eine Woche zur Kultivierung der RESCs verwendet.

Tabelle 12: Zellkulturschalen und die dazu gehörigen Zellzahlen

Platte	Oberfläche je Vertiefung	Zellzahl je Vertiefung	Zellzahl/ Platte
60mm Platte	21cm^2	1,2 x 10^6 Zellen in 3ml Medium	1,2 x 10^6 Zellen
24 Loch-Platte	1,9cm^2	0,1 x 10^6 Zellen in 0,5ml Medium	2,4 x 10^6 Zellen
12 Loch-Platte	3,8cm^2	0,25 x 10^6 Zellen in 1ml Medium	3,0 x 10^6 Zellen
6 Loch-Platte	9,5cm^2	0,5 x 10^6 Zellen in 3ml Medium	3,0 x 10^6 Zellen

2.2.2.8 Kultivierung der RESCs

Die Kultivierung der RESCs erfolgte in Sechs-Loch-Platten der Firma Nunc auf mit Mitomycin C inaktivierten primären embryonalen Mausfibroblasten (Feederzellen, 40.000 Zellen/cm^2). Die spezielle Zusammensetzung des Mediums aus 80% KnockOut-DMEM, 20% *Serum Replacement*, 1mM L-Glutamin, 0,1mM β-Mercaptoethanol, 1% nichtessentielle Aminosäuren und 4ng/ml *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), sowie das Passagieren der Zellkolonien als eine Kombination aus enzymatischem und mechanischem Verfahren alle 3 bis 4 Tage, sollte das Ausdifferenzieren der embryonalen Stammzellen während der Kultivierung verhindern.

2.2.8.1 Passagieren

Das Passagieren der RESCs erfolgte durch eine Kombination aus enzymatischem Verdau und anschließender mechanischer Zerkleinerung der Stammzellkolonien. Für den enzymatischen Verdau wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch eine 0,2%igen Kollagenase IV-Lösung ersetzt. Je Vertiefung einer Sechs-Loch-Platte wurden 0,5ml der Lösung zu den RESCs gegeben und für 15min. im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit lösten sich die Kolonien von den Fibroblasten ab (**Abb.9**).

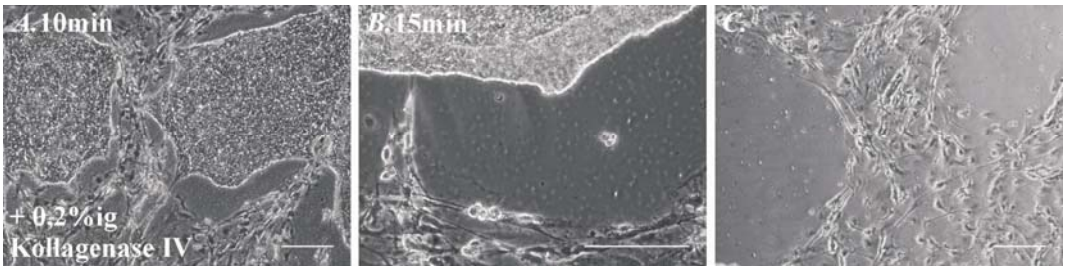

Abb. 9: Passagieren von RESCs I. Ablösen der Stammzellkolonien von den Feederzellen mittels Kollagenase Typ IV. Das Passagieren der RESCs beinhaltete eine Kombination aus enzymatischen Verdau und mechanischer Zerkleinerung der Stammzellkolonien. Zunächst wurde das Kultivierungsmedium durch das Kollagenasemedium ersetzt. **A.)** Nach einer Inkubation von 10min. in der 0,2%igen Kollagenaselösung, begannen sich die Stammzellkolonien von ihren Feederzellen abzulösen. **B.)** Das vollständige Ablösen der Kolonien war nach einer Inkubation von 15min. erreicht. Durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturplatte schwammen die Stammzellen ab und wurden mit dem Überstand in ein 15ml Falconröhrchen überführt. **C.)** Die Feederzellen verblieben vollständig auf der Plastikoberfläche der Platte. Bereiche, in denen zuvor RESC-Kolonien gewachsen waren, erschienen anschließend als Löcher im Monolayer. Skalierung, 100µm.

Nach Zugabe von 1ml Zellkulturmedium (siehe Seite 24) und durch leichtes Klopfen gegen die Platte, lösten sich die Stammzellkolonien vollständig ab und wurden anschließend mit dem Überstand in ein 15ml Falconröhrchen überführt (**Abb.9**). Da die Kollagenase durch die Zugabe des Mediums nicht, wie es zum Beispiel beim Passagieren mit Trypsin der Fall war, inaktiviert wurde, sondern lediglich verdünnt, war es wichtig, dass das anschließende Pelletieren der Stammzellkolonien in einer vorgekühlten Zentrifuge für 3min. bei 100xg und 4°C erfolgte. Das Pellet wurde in einem adäquaten Volumen Zellkulturmedium aufgenommen. Das Zerkleinern der Kolonien erfolgte mechanisch durch mehrmaliges Resuspendieren der Zellsuspension mit einer Pipette mit einem Fassungsvermögen von 100µl-1000µl. Die Kolonien wiesen bei ihrer Aussaat eine nahezu einheitliche Größe auf und hatten eine geschätzte Anzahl von 50-100 Zellen pro Zellklumpen (**Abb.10**).

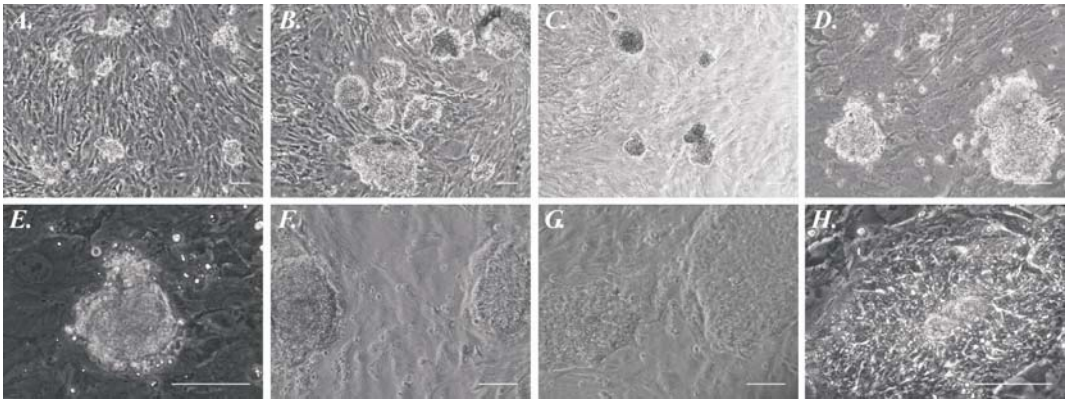

Abb. 10: Passagieren von RESCs II. Aussaat der mechanisch zerkleinerten Stammzellklumpen auf neue Feederzellen. Nach dem enzymatischen Verdau mit der Kollagenase Typ IV, wurden die Stammzellverbände mechanisch durch Pipettieren zerkleinert. **A.-B.)** Darstellung der Größe der zerkleinerten RESC-Kolonien bei ihrer Aussaat auf neue Feederzellen. **C.-E.**) Bereits innerhalb weniger Stunden adhärierten die Stammzellkolonien auf den Fibroblasten und wuchsen aus. **F.-H.)** Passagierte Stammzellkolonien 16h nach ihrer Aussaat. Skalierung, 100µm.

2.2.8.2 Einfrieren und Auftauen

Die Langzeitlagerung der embryonalen Stammzellen erfolgte im flüssigen Stickstoff. Zum **Einfrieren** wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch die 0,2%ige Kollagenase IV-Lösung ersetzt. Nach einer Inkubation für 15min. bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 im Inkubator wurden die Kolonien durch Zugabe von 1ml Wachstumsmedium und leichtem Klopfen gegen die Platte vom ihren Feederzellen abgelöst. Nach Zentrifugation für 3min. bei 100xg und 4°C wurde das Zellpellet vorsichtig in 0,5ml Wachstumsmedium resuspendiert. Im Gegensatz zum Passagieren sollten die Zellverbände beim Einfrieren möglichst groß belassen werden. Anschließend wurde das auf Eis vorgekühlte Einfriermedium (30% KnockOut DMEM, 30% konditioniertes Wachstumsmedium, 20% *Serum Replacement* + 20% DMSO) tropfenweise durch leichtes Schütteln des Falconröhrchens mit der Zellsuspension vermischt. Die Suspension wurde sofort in ein 1ml Einfrierröhrchen pipettiert und bis zur Überführung in eine Einfrierbox Nalgene™ *Cryo* 1°C *Freezing Container* auf Eis gelagert. Das

Einfrieren der Zellen erfolgte anschließend durch Absenken der Temperatur von 1°C pro Minute bei -80°C. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum **Auftauen** wurden die Zellaliquots dem Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37°C angetaut. Beim Verbleiben eines kleinen Eisklumpens wurde der Inhalt des Röhrchens mit einer 1ml Einwegplastikpipette durch einmaliges Auf- und Abpipettieren der Suspension gelöst und in ein 15ml Falconröhrchen überführt. Das auf 4°C gekühlte Medium wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension während des Zugebens immer wieder durch Klopfen gegen das Röhrchen mit dem Medium vermischt. Nach der Pelletierung der Zellen für 3min. bei 100xg und 4°C wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit einer 1ml Einwegplastikpipette in 1ml konditioniertem Kultivierungsmedium aufgenommen. Starkes Pipettieren sollte hierbei vermieden werden. Anschließend wurden die Zellen auf die vorbereiteten Feederzellen ausgesät (**Abb.11**). Stand zum Zeitpunkt des Auftauens kein konditioniertes Medium zur Verfügung, mussten die Zellen in frisch angesetztem Medium ausgesät werden. Die Effizienz fiel in diesem Fall etwas geringer aus.

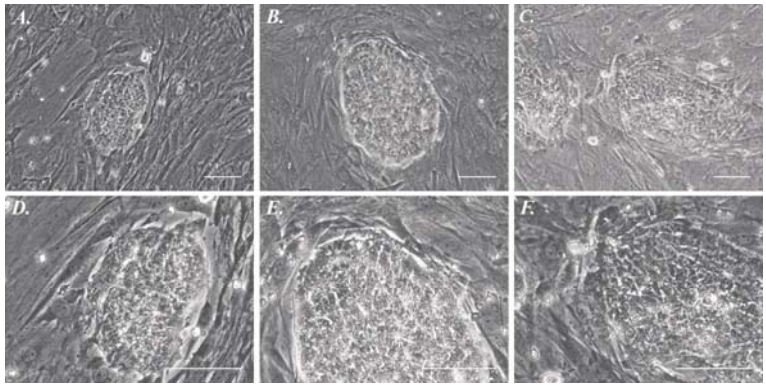

Abb. 11: Darstellung der Morphologie aufgetauter RESCs. Bereits einen Tag nach dem Auftauen eingefrorener Stammzellaliquots waren erste Kolonien angewachsen. Die Morphologien dieser Kolonien differierten stark. Ein erstes Passagieren nach dem Auftauen führte allerdings zur Entstehung eines einheitlichen Erscheinungsbildes mit der typischen Koloniemorphologie. **A.-B.,D.-E.)** Kolonien, die bereits nach den 24h die für undifferenzierte embryonale Stammzellen typische Koloniemorphologie aufwiesen. **C.,F.)** Kolonien mit einem atypischen Erscheinungsbild. Die Stammzellen in der Kolonie weisen auf einen undifferenzierten Status hin. Ein sich klar gegen die Fibroblasten abgrenzender Kolonierand ist noch nicht vorhanden. Nach dem ersten Passagieren werden diese Zellen ebenfalls die für embryonale Stammzellen typische Morphologie annehmen. Skalierung, 100µm.

2.2.2.9 Kardiale Differenzierung von RESCs

2.2.2.9.1 Kardiale Differenzierung durch induzierende Faktoren eines ausgetesteten Fetalen Kälberserums (FBS)

Um eine kardiale Differenzierung der RESCs zu induzieren, wurden die Stammzellkolonien zunächst wie zum Passagieren durch die Inkubation mit einer 0,02%igen Kollagenase IV-Lösung für 15min. bei 37°C von ihren Feederlzellen abgelöst. Nach Zugabe von 1ml Kultivierungsmedium und der Überführung in ein 15ml Falconröhrchen, wurde für 3min. bei 100xg und 4°C zentrifugiert.

Anschließend wurde das Zellpellet in Differenzierungsmedium A resuspendiert und etwa $1x10^6$ Zellen wurden auf eine Zwölf-Loch-Platte überführt. Um ein Adhärerieren der Stammzellen an der Plastikoberfläche zu verhindern, wurden die Vertiefungen zuvor mit 1%iger Agarose (angesetzt in IMDM, steril filtriert) überschichtet. Die sich in Suspension befindlichen embryonalen Stammzellen bildeten im Verlauf einer sieben tägigen Kultivierung e*mbryoid bodies* (EBs), die am siebten Tag der Differenzierung (d7) in mit 0,1%iger Gelatine beschichtete Sechs-Loch-Platten überführt wurden. Am darauf folgenden Tag (d8) waren die Zellaggregate festgewachsen und begannen flächig auszuwachsen. Eine mikroskopische Kontrolle der Kulturen erfolgte von nun an täglich.

2.2.2.9.2 Kardiale Differenzierung durch Kokultivierung mit induzierend wirkenden Zellen

Kokultivierung mit END-2 *Zellen*

Das Protokoll der kardialen Differenzierung der RESCs durch Kokultivierung mit END-2 Zellen, wurde in Anlehnung an ein von Mummery et *al.* für murine und humane embryonale Stammzellen etabliertes und publiziertes Protokoll angepasst. Hierbei wurde das System der direkten Kokultivierung der RESCs und END-2 Zellen verwendet. In diesem System wurden die RESCs auf einem Monolayer aus inaktivierten END-2 Zellen kultiviert. Um ein Überwachsen der embryonalen Stammzellen während des Versuchszeitraums zu verhindern, wurden die END-2 Zellen vor der Kokultivierung zunächst durch Mitomycin C (10µg/ml) inaktiviert.

Inaktivierung von END-2 Zellen

Die Inaktivierung durch Mitomycin C erfolgte in Anlehnung an das zur Inaktivierung von murinen embryonalen Fibroblasten verwendete Protokoll (Siehe Seite 37). Die Inkubation der END-2 Zellen in dem Mitomycin C-haltigen Medium wurde allerdings aufgrund der größeren Sensitivität der Zellen auf maximal zwei Stunden reduziert. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit einer Zelldichte von 80.000 Zellen/cm^2 in mit 1%iger Gelatine beschichtete Sechs-Loch-Platten. Vor der Verwendung der inaktivierten END-2 Zellen wurde das Zellkulturmedium zur Entfernung eventueller Mytomicinreste mindestens einmal gewechselt. Die Inaktivierung der endodermalen Zellen erfolgte jeweils einen Tag vor der Initiierung der Kokulturen.

Initiierung der Kokultivierung von RESCs und END-2 Zellen

Zur Einleitung der Differenzierung wurden die RESCs mit Kollagenase IV von ihren Feederzellen abgelöst, nach der Pelletierung in Differenzierungsmedium A aufgenommen und auf die vorbereiteten END-2 Zellen überführt (siehe Inaktivierung von END-2 Zellen). Die Zellkolonien wurden während des Vorgangs wenig pipettiert und dadurch möglichst groß belassen. Der Tag der

Differenzierungseinleitung wurde als Tag0 (d0) benannt. Die Kulturen wurden täglich auf ihre Morphologie und das Auftreten kontrahierender Areale untersucht.

Kokultivierung mit OP9 Stromazellen

Das Protokoll zur Induktion einer kardialen Differenzierung durch eine Kokultivierung der RESCs mit OP9 Stromazellen, wurde Veröffentlichungen zur Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen in Zellen des Hemangioblasten entnommen und entsprechend modifiziert. In dem verwendeten Protokoll wurden die RESCs über einen längeren Zeitraum auf einem Monolayer aus OP9 Zellen kultiviert. Eine Inaktivierung der OP9 Zellen war aufgrund ihres langsamen Wachstums nicht notwendig. Es wurden 50.000 Zellen/cm^2 in mit 1%iger Gelatine beschichtete 60 mm Zellkulturschalen ausgesät.

Initiierung der Kokultivierung von RESCs und OP9 Stromazellen

Zur Einleitung der Differenzierung wurden die RESCs mit Kollagenase IV von ihren Feederzellen abgelöst, nach der Pelletierung in Differenzierungsmedium B aufgenommen und auf die am Vortag ausgesäten OP9 Zellen überführt. Die Zellkolonien wurden während des Vorgangs wenig pipettiert und dadurch möglichst groß belassen. Der Tag der Differenzierungseinleitung wurde als Tag0 (d0) benannt. Die Kulturen wurden täglich auf ihre Morphologie und das Auftreten kontrahierender Areale untersucht.

Kokultivierung mit OP9 und End-2 Zellen

Das Protokoll zur Kokultivierung der RESC mit OP9 und END-2 Zellen wurde im Rahmen der Doktorarbeit etabliert. Es sollte die induzierenden Wirkungen der beiden Zellsorten miteinander kombinieren und gliederte sich in zwei Differenzierungsabschnitte.

Im ersten Abschnitt erfolgte die Einleitung der Differenzierung durch Kokultivierung der RESCs mit den OP9 Zellen in einer Suspensionskultur unter Ausbildung von EBs. Hierzu wurden die Stammzellen zunächst von ihren Feederzellen abgelöst, mit OP9 Zellen vermischt und anschließend in überschichtete Zwölf-Loch-Platten überführt. Der Tag der Differenzierungseinleitung wurde als Tag0 benannt (d0). Innerhalb einer zweitägigen Suspensionskultivierung bildeten sich EBs als Gemische der beiden Zellsorten aus. Diese bereits in einer Differenzierung initiierten Zellen wurden dann am zweiten Tag der Differenzierung (d2) auf einen Monolayer aus inaktivierten END-2 Zellen überführt. Nach einigen Tagen waren sie adhäriert, wuchsen allerdings vergleichsweise nur sehr wenig aus.

Initiierung der Kokultivierung von RESCs, OP9 und END-2 Zellen

Um eine Differenzierung der RESCs zu initiieren, wurden die Kolonien mittels Kollagenase IV von den Feederzellen abgelöst, etwa $1x10^6$ RESCs wurden in Differenzierungsmedium B aufgenommen, mit $5x10^5$ OP9 Zellen (Verhältnis 2:1) vermischt und auf eine Zwölf-Loch-Platten überführt. Ein

Adhärerieren der Zellen wurde durch das Überschichten der Wells mit 1%iger Agarose (angesetzt in IMDM, steril filtriert) verhindert. Innerhalb einer zweitägigen Kultivierung bildete das Zellgemisch pro Vertiefung der Zwölf-Loch-Platte je einen großen EB aus, der am zweiten Tag der Differenzierung (d2) auf inaktivierte END-2 Zellen überführt wurde (Inaktivierung END-2 Zellen siehe oben). Aufgrund der enormen Größe der EBs dauerte es einige Tage bis alle EBs vollständig auf den END-2 Zellen festgewachsen waren. Der Prozess des Anheftens wurde täglich überprüft und nach dem Adhärieren aller ausplattierter EBs, wurde täglich eine mikroskopische Kontrolle auf morphologische Veränderungen und kontrahierende Areale durchgeführt.

2.2.2.10 Differenzierung der RESCs zu trophoektodermalen Zellen

2.2.2.10.1 Differenzierung zu trophoektodermalen Zellen durch induzierende Faktoren des Fetalen Kälberserums (FBS)

Die Induktion der Differenzierung erfolgte durch Ablösen der Stammzellkolonien von ihren Feederzellen und der Überführung der Zellen in ein 15ml Falconröhrchen. Nach dem Pelletieren der Zellen für 3min. bei 100xg und 4°C wurden etwa $1x10^6$ RESCs in Differenzierungsmedium B aufgenommen und in eine mit 1%iger Agarose (angesetzt in IMDM, steril filtriert) überschichtete Zwölf-Loch-Platte überführt. Der Tag der Differenzierungseinleitung wurde als Tag0 (d0) benannt. Während einer zweitägigen Suspensionskultivierung bildeten sich je Vertiefung der Platte mehrere EBs, die am zweiten Tag der Differenzierung auf mit 1%iger Gelatine beschichtete Sechs-Loch-Platten überführt wurden. Die Kulturen wurden täglich auf ihre morphologischen Veränderungen untersucht.

2.2.3 Methoden zur Zellcharakterisierung

2.2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die Methode der Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht eine Charakterisierung und Zuordnung von Zellen auf Proteinebene. Für eine Färbung wurden die Zellen zunächst für 4-20min. bei Raumtemperatur (RT) in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und anschließend dreimal mit PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen. Durch eine im Anschluss durchgeführte Inkubation in einem TBS+ Puffer, der Serum des Tieres enthielt, aus dem der Sekundärantikörper stammte, sollte einer unspezifischen Bindung der Antikörper vorgebeugt werden. Inkubiert wurde für 20min. bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}, erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem in Färbepuffer verdünnten Primärantikörper für eine Stunde bei RT. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen und für 30min. mit dem in Färbepuffer verdünnten Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte durch eine 15min. Gegenfärbung mit einer DAPI-haltigen Lösung (1,7µg/ml). Für eine langfristige Lagerung wurden Gewebsschnitte auf Objektträgern

mit Mountingmedium benetzt und mit Deckgläschen eingedeckelt. Nach dem Trocknen der Präparate bei Raumtemperatur wurden sie zur endgültigen Lagerung bei 4°C aufbewahrt. Präparate in Mehr-Loch-Platten wurden zur Lagerung mit einem mit Antibiotikum versetzten PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} überschichtet und anschließend ebenfalls bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Elektronenmikroskopie

Das Verfahren der Elektronenmikroskopie ermöglicht eine ultrastrukturelle Darstellung von Zellen. Anhand des Vorhandenseins zellspezifischer Strukturen können die Zellen charakterisiert und zugeordnet werden.

Die elektronenmikroskopischen Analysen der differenzierten RESCs erfolgten in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Zellbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Kardiomyozyten) und dem Institut für Anatomie der Universität Essen (Trophoblasten-ähnliche Zellen).

2.2.3.2.1 Kardial differenzierte RESCs

Die Analyse der Ultrastruktur kardial differenzierter RESCs wurde von Frau Dr. S. Groos (Abteilung für Zellbiologie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt. Zur Darstellung der differenzierten Zellen wurden kontrahierende Areale mit einer modifizierten Glaskapillare ausgeschnitten, dreimal in PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen und für vier Stunden bei 4°C in einer Lösung aus 3% Glutaraldehyd und 0,1M Natriumcacodylate/HCl pH7,3 fixiert. Anschließend wurde über Nacht in 0,1M Natriumcacodylate/HCl pH 7,3 gewaschen und für eine Stunde und 30min. in einer 2%igen Osmiumtetraoxid-Lösung in 0,1M Natriumcacodylat bei 4°C postfixiert. Nach Dehydrierung durch wiederholtes Waschen in Ethanollösungen mit aufsteigender Konzentration, wurden die Zellen in Epoxy Resin eingebettet und in 70nm Proben geschnitten. Nach Kontrastierung mit Uranylacetat konnten die Zellen an einem Zeiss EM 10 CR Elektronenmikroskop analysiert und elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht werden.

2.2.3.2.2 Trophoektodermale Zellen aus differenzierten RESCs

Die Analyse der Ultrastruktur der zu trophoektodermalen Zellen differenzierten RESCs wurde von Frau Dr. I. von Ricklinghausen (Institut für Anatomie, Universität Essen) durchgeführt. Zur Darstellung der Zellen wurden die EBs am zweiten Tag der Differenzierung (d2) auf Thermanox®-Plättchen ausgesät. Am einundzwanzigsten Tag der Differenzierung (d21) wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Plättchen wurden einmal vorsichtig mit Moscona-Lösung gespült und anschließend mit 2,5%ig Glutaraldehyd (in 0,1M Cacodylatpuffer) 1-2 Stunden bei RT fixiert. Zur Entfernung der Fixierungssubstanz, wurden die Proben dreimal für 15min. mit 0,1M Cacodylatpuffer bei RT

gewaschen. Die vorbereiteten Proben wurden dann zur Weiterverarbeitung an Frau Dr. Ricklinghausen übergeben.

2.2.3.3 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die Überprüfung der Funktionalität der aus ESC-abgeleiteten Kardiomyozyten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Köln und wurde durch Herrn Dr. M. Reppel (Institut für Neurophysiologie, Universität zu Köln) durchgeführt. Die Bestimmung der extrazellulären Feldpotentiale erfolgte mittels **M**ulti **E**lektroden **A**rray (MEA) Daten-Akuisitionssystem der Firma Multi Channel Systems. Das MEA System ermöglichte die Bestimmung des Schlagverhaltens, die Bestimmung von Schlagfrequenzen sowie die Untersuchung des Verhaltens verschiedener Ionenkanäle in den kardial differenzierten Arealen. Hierzu wurden die kontrahierenden Bereiche zunächst mechanisch abgelöst und auf MEA-Platten überführt. Die MEA-Platten beinhalteten 60 Nitrid ummantelte Titan Gold Elektroden mit einem Durchmesser von jeweils 30µm, die in einem Gitternetz von 8x8 angeordnet waren. Der Abstand zwischen den einzelnen Elektroden betrug 200µm. Die Messungen wurden standardmäßig bei 39,0°C und 5kHz in einem serumfreien Medium durchgeführt. Wahlweise erfolgte der Zusatz von Isoproterenol Hydrochloride (ISO), das als Stimulans der β-adrenergen Signalkaskade eingesetzt wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend mit dem Programm MATLAB der Firma The Mathworks.

3. Ergebnisse

Vor dem eigentlichen Beginn der Versuche zum kardialen Differenzierungspotential der vom Rhesusaffen stammenden embryonalen Stammzellinie R366.4, stand zunächst der Aufbau eines geeigneten Kultivierungssystems und eine allgemeine Charakterisierung der embryonalen Stammzellinie. Sämtliche Materialien, Medien und Medienzusätze wurden entsprechend Arbeitsvorschriften der kooperierenden Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Itskovitz-Eldor, Haifa, Israel verwendet. Abwandlungen erfolgten erst später im zeitlichen Verlauf der Doktorarbeit. Die erste Isolierung von murinen embryonalen Fibroblasten, die als Feederzellen zur Kultivierung der embryonalen Stammzellen vom Rhesusaffen benötigt wurden, erfolgte ebenfalls basierend auf Protokollen aus Israel.

Nach einer Einarbeitung in die Kultivierung und Inaktivierung der Feederzellen, wurden die embryonalen Stammzellen vom Rhesusaffen (RESCs) in Kultur genommen. Hierbei handelte es sich um die ursprünglich von James Thomson isolierte Zellinie R366.4. Die RESCs wurden durch Herrn Prof. Itskovitz-Eldor zur Verfügung gestellt. Aufgetaut wurde ein Aliquot in der 16. Passage.

Das Auftauen der embryonalen Stammzellen erfolgte präzise nach den aus Israel erhaltenen Protokollen. Von Berichten anderer, mit embryonalen Stammzellen arbeitenden Arbeitsgruppen, war bekannt, dass embryonale Stammzellen von Primaten sehr empfindlich auf die Prozedur des Einfrierens und Auftauens reagieren und, dass nach dem Auftauen häufig eine sehr niedrige Überlebensrate zu beobachten ist. Aus diesem Grund, wurden die Stammzellen nach der Aussaat auf die Feederzellen unter Verzicht einer täglichen mikroskopischen Kontrolle zunächst für einige Tage im Inkubator belassen. Lediglich der Farbumschlag des Kulturmediums wurde als Indiz für die Verwertung des Mediums beobachtet. Als nach einigen Tagen eine leichte Verfärbung des Zellkulturmediums zu beobachten war, wurden die Zellen für eine mikroskopische Kontrolle aus dem Inkubator genommen. Die RESCs waren in Form von Zellaggregaten angewachsen und zeigten bereits die für embryonale Stammzellen aus Primatenspezies typische Koloniemorphologie (**Abb.12**). Von nun an wurde täglich das Zellkulturmedium gewechselt. Vier Tage nach dem Auftauen hatten die Stammzellkolonien eine Größe erreicht, die, um ein Ausdifferenzieren der Zellen zu verhindern, ein erstes Passagieren notwendig machte. Das Vorgehen erfolgte hierbei ebenfalls exakt nach den aus der israelischen Arbeitsgruppe erhaltenen Protokollen.
Vor der Verwendung der Stammzellen für Differenzierungsversuche, wurde zunächst ein Vorrat mit mehreren hundert Aliquots der Zellen in niedrigen Passagen angelegt.

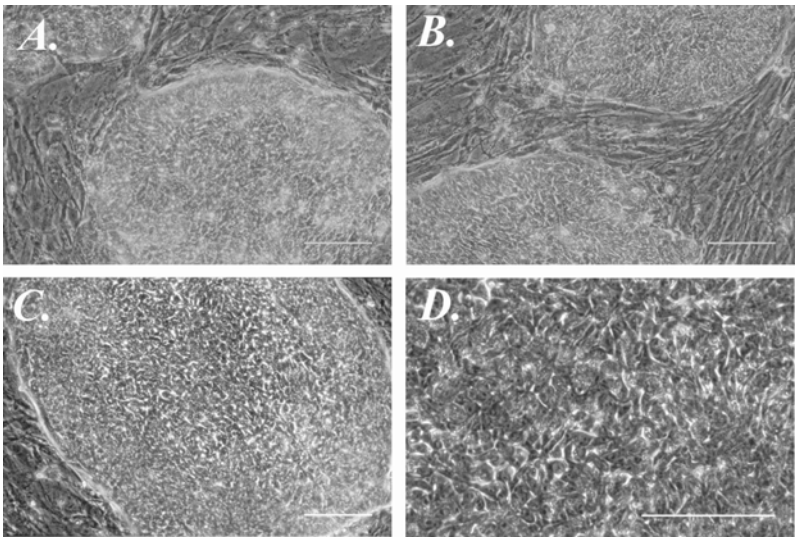

Abb. 12: Morphologie der von Prof. Dr. Itskovitz-Eldor zur Verfügung gestellten vom Rhesusaffen stammenden embryonalen Stammzellen (RESC) nach dem Auftauen. A.-D.) Koloniemorphologie früher Passagen der RESCs. Zum Zeitpunkt der Darstellung befanden sich die Stammzellen in der 18. Passage. Die Kultivierung der RESCs erfolgte auf Feederzellen aus inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten. Die Stammzellverbände wiesen die für embryonale Stammzellen typische Morphologie runder Kolonien mit klar erkennbarem Rand auf. Skalierung, 100µm.

Während des ersten Kultivierungszeitraums der RESCs wurde die Kultivierung der Zellen anhand der israelischen Protokolle etabliert. Erst im weiteren Verlauf der Doktorarbeit wurden eigenständig Variationen eingeführt, die zu einer Optimierung der Arbeitsvorschriften führten.

So wurde unter anderem die Kultivierung der Stammzellen in einem serumhaltigen Medium gegen die Kultivierung in einem serumfreien Medium ausgetestet. Das verwendet Fetale Kälberserum (FBS), sowie der Serumersatz (*Serum Replacement*, SR), waren auf eine Kultivierung undifferenzierter Stammzellen ausgetestet und als solche vom Hersteller deklariert. Um ein Ausdifferenzieren der RESCs unter den serumfreien Bedingungen zu verhindern, wurde dem Kultivierungsmedium das Zytokin *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) zugesetzt.

Es zeigte sich sehr schnell, dass ausschließlich die Verwendung des serumfreien Mediums zu einem Erhalt undifferenzierter RESC Kolonien führte (Die Beurteilung erfolgte in diesem Fall rein morphologisch). In dem durch FBS supplementierten Medium differenzierten die RESCs innerhalb kürzester Zeit aus und konnten trotz der Verwendung von Feederzellen nicht im undifferenzierten Zustand gehalten werden. In der Arbeitgruppe von Prof.Dr.Itskovitz-Eldor waren die embryonalen Stammzellen zuvor ausschließlich in SR kultiviert worden. Während dieser Zeit hatten sich die Zellen vermutlich an die serumfreien Bedingungen adaptiert. Die Gewöhnung an ein serumhaltiges Medium hätte über einen längeren Zeitraum erfolgen müssen. Da es allerdings keine Notwendigkeit für solch eine Gewöhnung gab, und die Verwendung des serumfreien Mediums standardisiertere Bedingungen schaffte, wurde darauf verzichtet.

Beim Erfahrungsaustausch mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Itskovitz-Eldor fiel allerdings auf, dass sich die Kultivierung der RESCs problematischer als in der israelischen Arbeitsgruppe darstellte. Die Zellen reagierten sensitiver auf den Vorgang des Passagierens und auch im täglichen Umgang wichen die Beobachtungen von denen der israelischen Arbeitsgruppe ab. Die kultivierten Zellen zeigten einen extrem hohen Mediumverbrauch, so dass ohne Ausnahme täglich das Kulturmedium gewechselt werden musste. Außerdem war es sehr schwierig die Stammzellen zu vermehren, da diese extrem empfindlich auf das Passagieren reagierten und bei jedem Passagieren ein Großteil der Zellen abstarb. Eine Erklärung für die Beobachtung eines so unterschiedlichen Verhaltens des gleichen Zelltypus, ist zum Beispiel die Kontamination der Kulturen mit Mykoplasmen. Ein Test zum Nachweis auf kontaminierende Mykoplasmen wurde durchgeführt. Der auf einer Multiplex-PCR basierende Test führte zu einem positiven Ergebnis der analysierten Zellen, so dass eine Behandlung der Stammzellen erfolgen musste. Die Dekontamination der RESCs wurde mit dem Antibiotikum MycoKill™ AB der Firma PAA durchgeführt. Von den behandelten Zellen wurde ein weiterer Zellstock angelegt. Alle folgenden Differenzierungsversuche wurden mit den behandelten Stammzellen durchgeführt, anschließende Mykoplasmentests waren negativ.

3.1 Charakterisierung der aus dem Rhesusaffen isolierten embryonalen Stammzellinie R366.4 (RESC R366.4)

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden die RESC auf mehreren Ebenen charakterisiert: durch eine lichtmikroskopische Beurteilung der Koloniemorphologie, eine ultrastrukturelle Darstellung embryonaler Stammzellkulturen (Transmissionselektronenmikroskopie/TEM), durch die Analyse der genetischen Stabilität (G-Banden Karyogramm), durch eine Genexpressionsanalyse von Pluripotenzmarkern (RT-PCR), dem Nachweis der Enzymaktivität Alkalischer Phosphatase (Enzymaktivitätstest) und durch den immunhistologischen Nachweis der Oberflächenantigene *Stage Specific Embryonic Antigen*-3 (SSEA-3), *Stage Specific Embryonic Antigen*-4 (SSEA-4), *Tumor Rejection Antigen*-1-60 (TRA-1-60), *Tumor Rejection Antigen*-1-81 (TRA-1-81) und dem Transkriptionsfaktor Oct3/4.

3.1.1 Koloniemorphologie undifferenzierter RESCs

Der Verlust der Pluripotenz embryonaler Stammzellen ist unter anderem durch morphologische Veränderungen der Stammzellkolonien charakterisiert und tritt sehr schnell als Reaktion der Zellen auf nicht optimale Kultivierungsbedingungen auf. Im undifferenzierten Zustand haben die Zellen ein großes Kern-Zytoplasma-Verhältnis. In ihren Zellverbänden liegen sie ohne erkennbare Orientierung in

unregelmäßiger Anordnung vor. Die Kolonien wachsen nahezu kreisrund in abgeflachter großflächiger Form und besitzen typischerweise einen klar erkennbaren Rand (**Abb.13**).

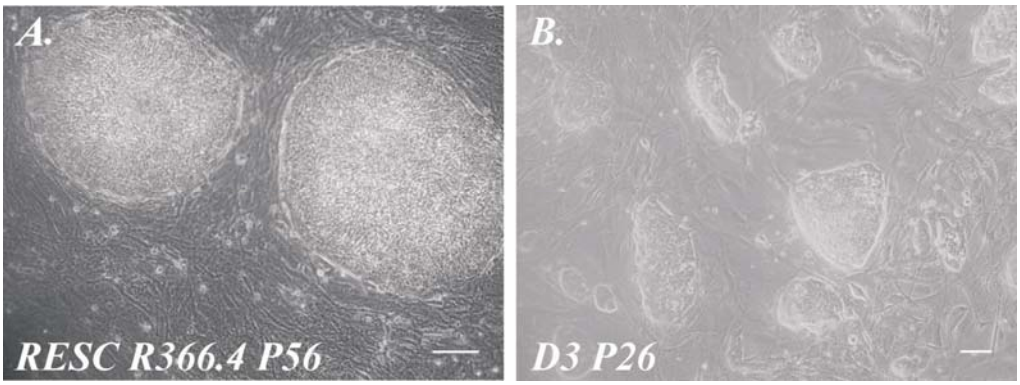

Abb. 13: Vergleichende Morphologie undifferenzierter embryonaler Stammzellen verschiedener Spezies. A.) Undifferenzierte RESCs Linie 366.4 in der 56. Passage. **B**) Undifferenzierte murine embryonale Stammzellen der Linie D3 in der 26. Passage. **A.-B.**) Die Stammzellen beider Spezies wuchsen in Form von kreisrunden Zellverbänden. In undifferenziertem Zustand hatten sie einen klaren Rand, durch den sie als Zellverband zu erkennen waren. Im Gegensatz zu den D3 Zellen, deren Kolonien eher dreidimensional in vier bis zehn Zellschichten wuchsen, wuchsen die RESCs in stark abgeflachter Form in zwei bis vier Zellschichten. Kolonien muriner ES-Zellen wiesen geringere Durchmesser als die der primaten ES-Zellen auf. Skalierung, 100µm.

Die Einschätzung der Qualität der embryonalen Stammzellen anhand ihrer Koloniemorphologie erfolgte täglich. In der alltäglichen Handhabung der Zellen kam ihr der größte Stellenwert zu. Anhand der Beurteilung der Morphologie und der Größe der embryonalen Stammzellkolonien, wurden alle weiteren Entscheidungen zur Bearbeitung der Zellen und den Einsatz in Differenzierungsversuche getroffen. Zu Beginn der Etablierung des Systems waren die Kulturen noch vermehrt mit differenzierten Kolonien durchwachsen. Der Anteil der undifferenzierten Kolonien stieg nach der erfolgreichen Mykoplasmenbehandlung und im Verlauf der Optimierung der Protokolle jedoch deutlich an.

Innerhalb der Expansionskultur differenzierte embryonale Stammzellkolonien zeigten neben der Entstehung klar erkennbarer Strukturen in den Kolonien bevorzugt die Bildung neuronaler Rosetten. Solche Strukturen beruhen auf der vermehrten einheitlichen Ausrichtung differenzierter Stammzellen. Mit fortschreitender Differenzierung kam es über den Verlust der Kolonieränder hin zur kompletten Aufgabe der für embryonale Stammzellen typischen Koloniemorphologie (**Abb.14**). Zu den möglichen Ursachen für den Verlust der Pluripotenz zählten neben der nicht sachgemäßen Passagierung, kleinste Abweichungen in der Zusammensetzung des Zellkulturmediums und Schwankungen in den vorbereiteten Feederzellen wie z.B.: zu dünn ausgesäte oder zu alte Fibroblasten.

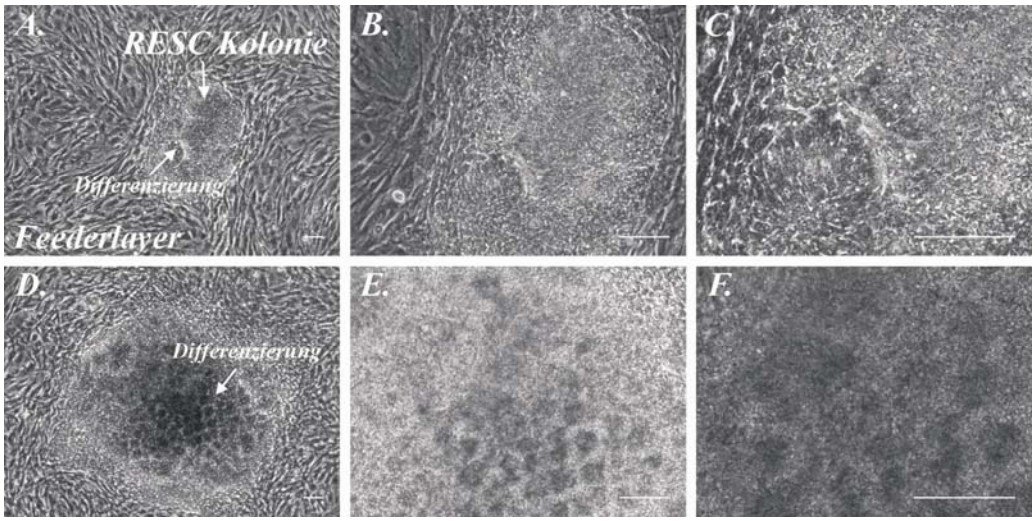

Abb. 14: Unter Standardkultivierungsbedingungen differenzierte RESCs zeigten häufig die Entstehung von neuronalen Rosetten in den Kolonien. Kleinste Abweichungen in den Kultivierungsbedingungen der RESCs führten zu Differenzierungen in den Stammzellkolonien, die mit morphologischen Veränderungen einhergingen. Neben der vermehrten Ausrichtung der Zellen, kam es in den Kolonien hauptsächlich zu der Bildung neuronaler Rosetten. **A.-C.**) Eine geordnete Ausrichtung der differenzierten Zellen führte zur Ausbildung klar erkennbarer Strukturen in den Kolonien (Siehe Pfeil). **D.-F.**) Das Auftreten neuronaler Rosetten deutete ebenfalls auf Differenzierungsvorgänge hin (Siehe Pfeil). Skalierung, 100µm.

3.1.2 Ultrastrukturelle Darstellung der RESCs

Die ultrastrukturelle Darstellung der RESCs erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) in Zusammenarbeit mit und durchgeführt von Herrn PD Dr. A. Schmiedl (Abteilung für angewandte Anatomie, Medizinische Hochschule Hannover). Die TEM erfolgte einmalig zur Verdeutlichung der ultrastrukturellen Morphologie undifferenzierter Stammzellkulturen.

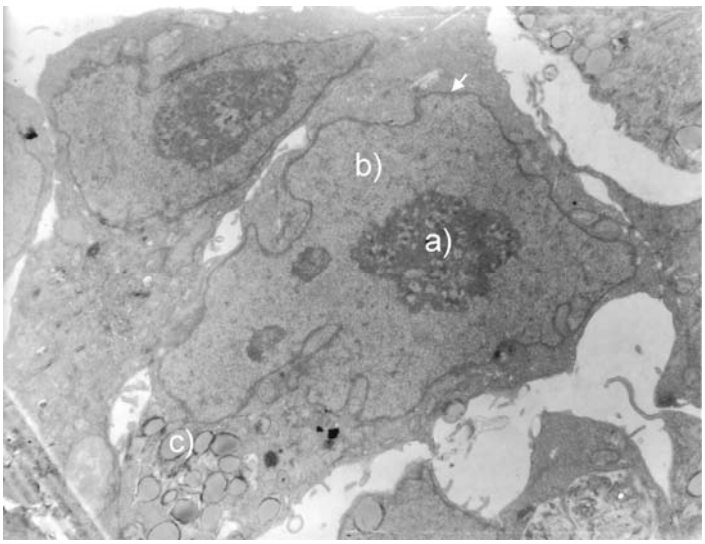

Abb. 15: Ultrastrukturelle Darstellung undifferenzierter RESCs durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Dargestellt ist eine undifferenzierte embryonale Stammzelle nach 65 Passagen unter den innerhalb der Doktorarbeit standardisierten Kultivierungsbedingungen. a.) Nukleolus b.) Nukleus c.) Lipidvesikel. Originalvergrößerung: 2000x.

Zum Zeitpunkt der Darstellung befanden sich die Zellen in der 65. Passage. Die lichtmikroskopisch als undifferenzierte Kultur beurteilten Stammzellen zeigten das Vorkommen morphologisch verschiedener Zelltypen. Den größten Anteil bildeten undifferenzierte embryonale Stammzellen mit großem Kern-Zytoplasma-Verhältnis und gut ausgebildeten Organellen (**Abb.15**).

Sie nahmen abhängig von ihrer Position in den Zellverbänden unterschiedliche ultrastrukturelle Morphologien an. In der Kolonieperipherie lagen polare epitheloide Zellen. Die Zellen in der Mitte der Zellverbände waren polygonal und erinnerten morphologisch an Zellen der inneren Zellmasse (ICM). Zwei weitere Zelltypen stellten Zellen mit beginnender Differenzierung und ausdifferenzierte Zellen dar. Eine beginnende Differenzierung zeigte sich durch ausgeprägte Raue Endoplasmatische Reticulae (RER) und große Golgi-Komplexe mit sekretorischen Vesikeln. Ausdifferenzierte Zellen formten kompakte Kolonien mit der typischen Zellmorphologie spezialisierter Zellen.

3.1.3 Untersuchungen zur genetischen Stabilität der RESCs

Die Analyse der genetischen Stabilität erfolgte durch die Darstellung der Chromosomen in Form von G-Banden Karyogrammen. Angefertigt wurden die Karyogramme von Herrn Prof. Dr. Miller (Abteilung Humangenetik, Medizinische Hochschule Hannover). Der bekannte Karyotyp der RESC Stammzellinie R366.4 konnte als 42, XY, normal bestätigt werden (**Abb.16**). Unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen konnten bis zur 70. Passage keine chromosomalen Anomalien nachgewiesen werden. Spätere Passagen wurden nicht getestet. Auch wurden keine weiterführenden Methoden zur Untersuchung der genetischen Integrität durchgeführt.

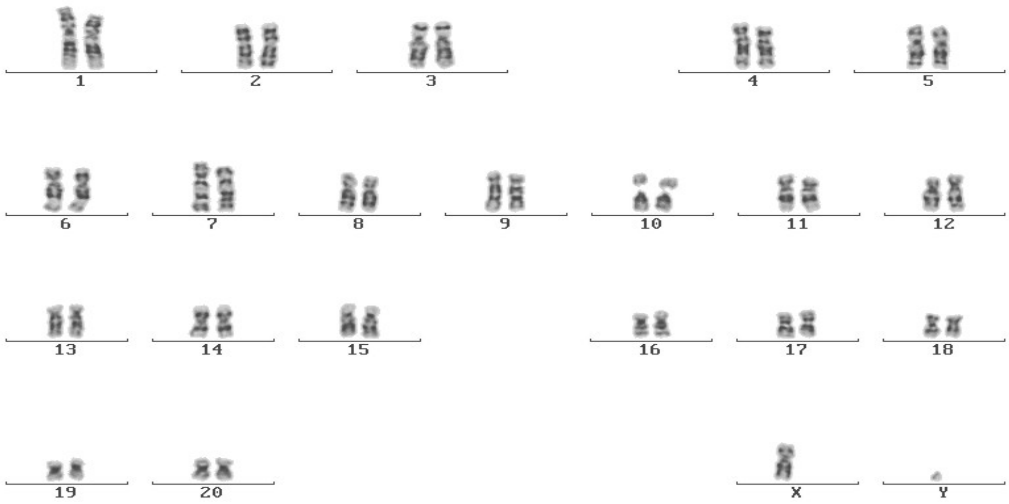

Abb. 16: G-Banden Karyogramm zur Darstellung des Karyotyps der RESCs. Karyogramm der RESC Linie R366.4 mit dem Karyotyp, 42, XY, normal. Dargestellt sind die 20 Autosomenpaare und die zwei Geschlechtschromosomen XY.

3.1.4 Nachweis der Aktivität Alkalischer Phosphatase (AP) in Kulturen der RESCs

Das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) wird in allen eukaryonten Zellen exprimiert. Mit einem Aktivitätsoptimum im alkalischen pH-Bereich, spaltete es Phosphatreste von phosphoryliertem Serin, Threonin oder Tyrosin an Proteinen ab. Undifferenzierte pluripotente Stammzellen sind durch eine besonders hohe Aktivität des Enzyms charakterisiert. Eine Abnahme in dieser Aktivität deutet auf Differenzierungsvorgänge in den Stammzellen hin.

Der Nachweis der Aktivität der AP erfolgte unter Verwendung des ES Cell Characterization Kits (Chemicon, Temecula, USA). Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen, mussten die embryonalen Stammzellen für mindestens fünf Tage kultiviert werden. In diesem Zeitraum wurden die Zellen nicht passagiert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Durch die Umsetzung eines im Kit enthaltenen Substrates, kam es zu einer violetten Anfärbung der undifferenzierten Zellen in den Stammzellkolonien. Einige wenige Zellverbände zeigten durch eine schwache Anfärbung eine verminderte Aktivität. Diese Beobachtung korrelierte mit dem Verlust der für undifferenzierte embryonale Stammzellen typischen Koloniemorpholgie. Der größere Teil der Zellen zeigte die für pluripotente Stammzellen typische violette Anfärbung (**Abb.17**). Während der Etablierung des Kultivierungssystems der RESCs wurde der Nachweis der Aktivität der AP mehrfach durchgeführt. Der Zustand von RESC-Kulturen wurde als zufrieden stellend bewertet, wenn der Anteil der AP positiven Kolonien (starke violette Anfärbung) bei mindestens 90% lag.

Abb. 17: Undifferenzierte RESCs zeigten eine große Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase (AP). A.-C.) Visuelle Darstellung der Aktivität Alkalischer Phosphatase (AP) in RESCs durch Färbung mit dem *ES Cell Characteriztion Kit* (Chemicon, Temecula, USA). Vor der Färbung wurden die Zellen zunächst für fünf Tage unter standardisierten Bedingungen kultiviert. **A.-B.**) Die abgebildeten Stammzellen zeigten danach eine ausgeprägte Enzymaktivität, die durch die starke violette Anfärbung der Kolonien verdeutlicht wurde. Die Zellen dieser Kolonien waren eindeutig als undifferenziert zu bewerten. **C.)** Erscheinungsbild einer als differenziert bewerteten Kolonie. Skalierung, 100µm.

3.1.5 Nachweis der Expression von Pluriptenzmarkerantigenen

Der Status pluripotenter Stammzellen kann zusätzlich durch die Expression einer Anzahl von Oberflächenantigenen und den Nachweis von mit der Pluripotenz assoziierten Transkriptionsfaktoren analysiert werden. Primaten ESCs sind durch die Expression der Oberflächenantigene S*tage Specific Embryonic Antigen* 3 (SSEA-3) und S*tage Specific Embryonic Antigen 4* (SSEA-4) charakterisiert. Bei

zunehmender Differenzierung der Zellen kommt es zu einer verminderten Expression der beiden Antigene und zu einem Anstieg in der Expression des Antigens SSEA-1. Undifferenzierte Primaten ESCs exprimieren des Weiteren die Keratansulfat Proteoglykane T*umor Rejection Antigen* 1-60 (TRA-1-60), T*umor Rejection Antigen* 1-81 (TRA-1-81) und den Transkriptionsfaktor Oct3/4.

Zum Nachweis des Erhalts der Pluripotenz unter den etablierten Kultivierungsbedingungen, wurde die Immunreaktivität der Stammzellen gegenüber den monoklonalen Antikörpern anti-SSEA-3 (Hybrodima Bank, Iowa, USA), anti-SSEA-4 (Hybridoma Bank, **Abb.18**), anti-TRA-1-60 (Chemicon, **Abb.19**), anti-TRA-1-81 (Chemicon) und anti-Oct3/4 (Chemicon, **Abb.20**) untersucht.

3.1.5.1 *Stage Specific Embryonic Antigen* **4 (SSEA-4)**

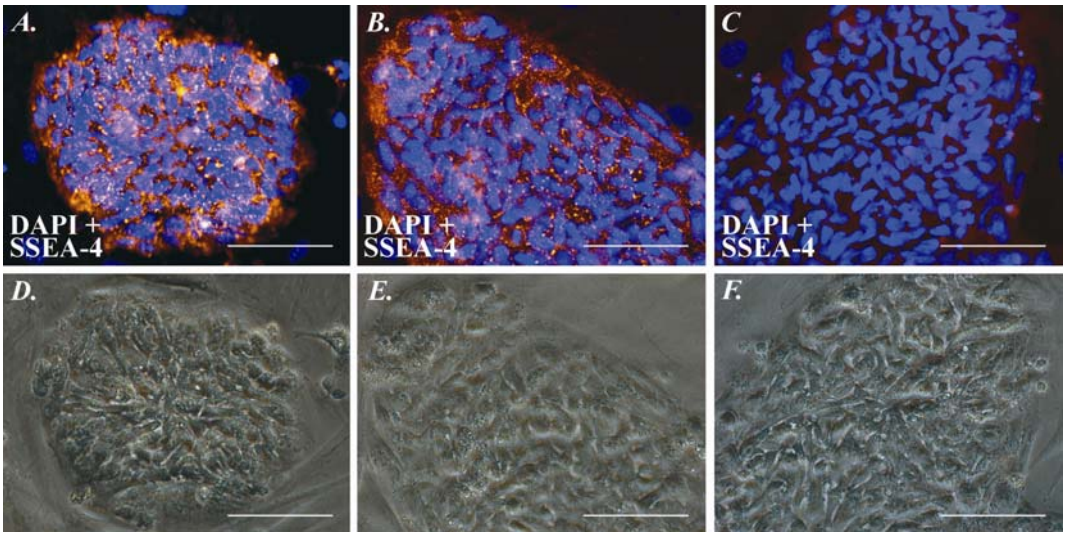

Abb. 18: Undifferenzierte RESCs zeigten eine starke Immunreaktivität gegenüber anti-SSEA-4. A.-F.) Nachweis der Expression des Oberflächenantigens SSEA-4 auf undifferenzierten RESCs unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (A.-B. rot, D.-E. korrespondierende Phasenkontrastbilder, Klon MC-813-70, Hybridoma Bank). Die Stammzellen zeigten eine ausgeprägte Immunreaktivität gegen anti-SSEA-4. **C., F.)** Korrespondierende Isotypen Negativkontrolle. Die Gegendarstellung der Zellkerne erfolgte durch die Anfärbung mit DAPI. Skalierung, 100µm.

3.1.5.2 *Tumor Rejection Antigen* 1-60 (TRA-1-60)

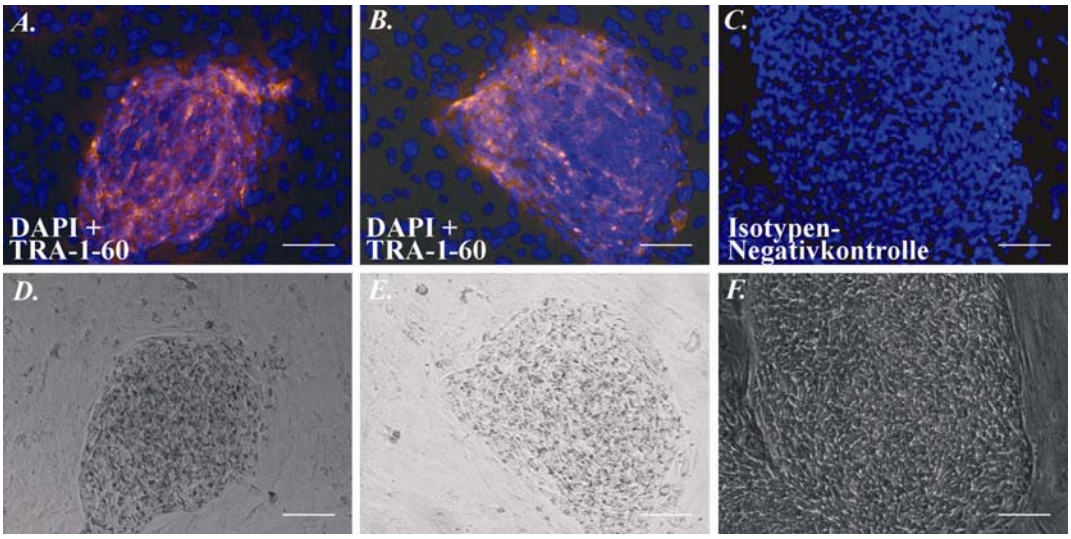

Abb. 19: Undifferenzierte RESCs zeigten eine starke Immunreaktivität gegenüber anti-TRA-1-61. A.-F.) Nachweis der Expression des Oberflächenantigens TRA-1-60 auf undifferenzierten RESCs unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (A.-B. rot, D.-E. korrespondierende Phasenkontrastbilder, Klon MAB 4360, Chemicon). Die Stammzellen zeigten eine ausgeprägte Immunreaktivität gegen anti-TRA-1-60. **C., F.)** Korrespondierende Isotypen Negativkontrolle. Die Gegendarstellung der Zellkerne erfolgte durch die Anfärbung mit DAPI. Skalierung, 100µm.

3.1.5.3 Oct3/4

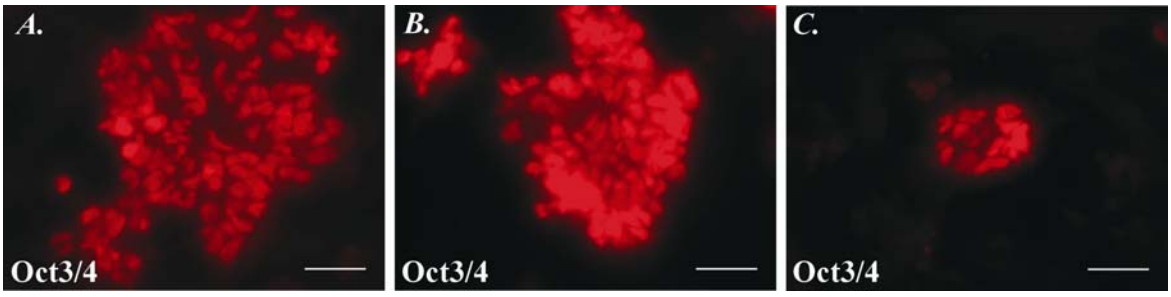

Abb. 20: Undifferenzierte RESCs zeigten eine ausgeprägte Immunreaktivität gegenüber anti-Oct3/4. A.-C.) Nachweis der Expression des Transkriptionsfaktors Oct3/4 unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (Klon, MAB4305, Chemicon). Die Färbungen der RESCs wurden im kollaborierenden Labor in Israel angefertigt und freundlicherweise von Dr. M. Amit zur Verfügung gestellt. Skalierung, 100µm.

Die RESCs zeigten eine ausgeprägte Immunreaktivität mit den Antikörpern SSEA-4 (**Abb.18**), TRA-1-60 (**Abb.19**) und Oct3/4 (**Abb.20**). Der Nachweis der Oberflächenantigene SSEA-3 und TRA-1-81 führte jeweils zu einer geringen Immunreaktivität. Diese Beobachtungen deckten sich jedoch mit Beschreibungen in der Literatur. Wie von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, wurde das Oberflächenantigen SSEA-1 nicht von den RESCs exprimiert.

3.1.6 Nachweis der Expression stammzellspezifischer Markergene durch RT-PCR

Zur Überprüfung der Expression stammzellspezifischer Markergene wurden RT-PCRs durchgeführt. Zu den nachzuweisenden Pluripotenzmarkern zählten *Oct-3/4*, *Nanog*, *forkhead box D3* (FoxD3), *telomerase reverse transcriptase* (TERT) und *SR Y containing gene 2* (Sox2). Für die Genexpressionsanalyse wurden undifferenzierte RESCs wie zum Passagieren von ihren Feederzellen abgelöst, RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Um das Auftreten falsch positiver Signale durch kontaminierende Feederzellen zu vermeiden, waren sämtliche verwendeten Oligonukleotide speziesspezifisch konzipiert worden. Durch die semiquantitative Methode der RT-PCR wurde eine Expression der Pluripotenzmarker Oct3/4, Nanog, Sox-2, FoxD3 und TERT nachgewiesen (**Abb.21**). Über die Höhe der Expression konnte keine Aussage gemacht werden.

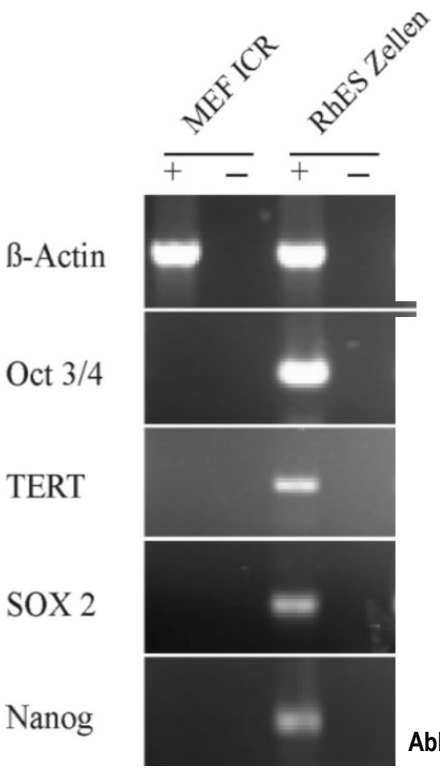

Abb. 21: Nachweis der Expression von Pluripotenzmarkergenen in undifferenzierten RESCs

Zusammenfassend konnte durch den Nachweis der Aktivität Alkalischer Phosphatase (AP), dem Nachweis der Oberflächenantigene SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 und TRA-1-80 und der Expression der Pluripotenzmarker Oct3/4, Nanog, Sox-2, FoxD3 und TERT das typische Expressionsmuster undifferenzierter primaten ES-Zellen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Zur Charakterisierung undifferenzierter RESCs verwendete Marker

Marker	RT-PCR	Immunhistologie	Enymaktivitätstest
Stage specific embryonic antigen-1 (SSEA-1)		-	
Stage specific embryonic antigen -3 (SSEA-3)		+	
Stage specific embryonic antigen -4 (SSEA-4)		+	
Tumor rejection antigen-1-60 (TRA-1-60)		+	
Tumor rejection antigen -1-81 (TRA-1-81)		+	
Alkalische Phosphatase (AP)			+
Oct3/4	+	+	
Nanog	+		
Sox-2	+		
FoxD3	+		
TERT	+		

+ = nachweisbar, - = nicht nachweisbar

3.2 Versuche zum Differenzierungspotential der RESCs

Die Untersuchung des Differenzierungspotentials der RESCs, erfolgte im Verlauf der Doktorarbeit durch verschiedene induktiv wirkende Differenzierungsstimuli. Zunächst sollte die Bildung spontan auftretender kontraktiler Areale durch Einleitung der Versuche unter Standard-Differenzierungsbedingungen in e*mbryoid bodies* (EBs) in unterschiedlichen Differenzierungsmedien miteinander verglichen werden. So wirkt eine Differenzierung in *Serum Replacement* (SR) im Gegensatz zu der Differenzierung in einem FBS supplementierten Differenzierungsmediums aufgrund der fehlenden Wachstumsfaktoren nur bedingt stimulierend und induzierend. Ergebnisse, die durch das FBS erzielt werden, gelten aufgrund der großen Diversitäten in der Zusammensetzung einzelner Chargen, nur für das jeweilig verwendete und ausgetestete Serum. Des Weiteren sollte eine gerichtete Differenzierung der RESCs durch Kokultivierungen mit den Zellinien OP9 und END-2 durchgeführt werden.

3.2.1 Differenzierung unter Standard-Differenzierungsbedingungen in e*mbryoid bodies* (EBs)

Vor der Einleitung der Differenzierungsversuche, erfolgte die morphologische Begutachtung der Stammzellkulturen. Es wurden ausschließlich Zellen in Versuche eingesetzt, die morphologisch den gesetzten Qualitätskriterien entsprachen.

3.2.1.1 Einfluss von *Serum Replacement* (SR) auf die Differenzierung der RESCs in EBs

Die ersten Experimente zum Differenzierungsverhalten wurden analog zu publizierten Protokollen zur Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen durchgeführt. Die Stammzellen wurden wie zum Passagieren von ihren Feederzellen abgelöst, in Differenzierungsmedium in bakteriologische Petrischalen überführt und für sieben Tage in Suspension kultiviert. Der Tag der Versuchseinleitung wurde als d0 bezeichnet, alle weiteren Tage wurden fortlaufend nummeriert. Das Differenzierungsmedium entsprach dem zur Kultivierung verwendeten Medium ohne Zusatz des Zytokins *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). Es enthielt ausschließlich SR, FBS wurde nicht zugesetzt. In den sieben Tagen der Kultivierung bildeten sich aus den embryonalen Stammzellen die als e*mbryoid bodies* (EB) bezeichneten dreidimensionalen Zellaggregate aus. Die Zellen in den EBs wirkten während der Differenzierung morphologisch sehr homogen und die Zellverbände als solche zeigten nicht die in der Literatur beschriebene Ausbildung viszeralen Endoderms und Reifung der Zellaggregate zu zystischen EBs. Nach der Überführung der EBs auf Sechs-Loch-Platten am siebten Tag der Differenzierung (d7) wurde lediglich ein sehr geringer Teil adhärent. Die adhärierten EBs zeigten nach einigen Tagen der Kultivierung, rein morphologisch, bevorzugt die Entstehung von

neuronalen Zelltypen als Derivate des Ektoderms (**Abb.22**). Der größere Teil der EBs verblieb jedoch ohne festzuwachsen im Zellkulturmedium und wurde bei nachfolgenden Medienwechseln mit dem verbrauchten Medium abgenommen.

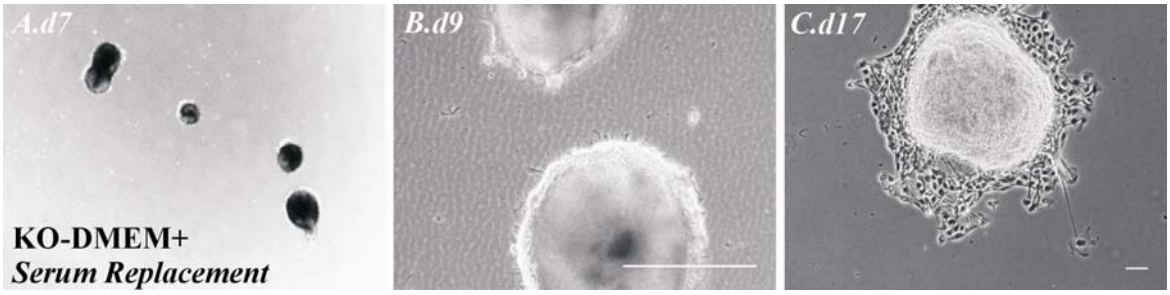

Abb. 22: Neuronale Differenzierung der RESCs in einem serumfreien Differenzierungsmedium. Zur Versuchseinleitung wurden die Stammzellen von ihren Feederzellen abgelöst, in einem serumfreien Medium aufgenommen und in bakteriologische Petrischalen überführt. Während der Suspensionkultivierung bildeten sich *embryoid bodies* (EBs), die am siebten Tag der Differenzierung (d7) auf Sechs-Loch-Platten überführt wurden. **A.)** EBs am siebten Tag der Differenzierung (d7). Die Zellen in den EBs wirken sehr homogen. Zystische Strukturen wurden nicht gebildet. **B.)** Zwei Tage nach dem Überführen der EBs in Sechs-Loch-Platten (d9) war ein Teil festgewachsen. Die differenzierten Zellen wuchsen aus den EBs aus. **C.)** Innerhalb der nächsten Tage zeigte sich eine prominente Differenzierung der RESCs in neuronale Zelltypen. Skalierung, 100µm.

Für die Versuche zur Untersuchung des Einflusses von FBS auf das Differenzierungsverhalten der RESCs, wurde das Protokoll in einigen Bereichen modifiziert. So wurde zunächst der Serumersatz SR durch FBS ersetzt. Im Gegensatz zum SR enthält FBS eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, die induzierend wirken und je nach Zusammensetzung und Konzentration der Zytokine die Entstehung bestimmter Zelltypen fördern. Zusätzlich wurde als neues Grundmedium das Basalmedium IMDM ausgewählt. Im Vergleich zu DMEM beinhaltet IMDM eine zusätzliche Vielzahl an Aminosäuren und Vitaminen.

3.2.1.2 Einfluss von Fetalem Kälberserum (FBS) auf die Differenzierung der RESCs in EBs

Nach Veränderungen in der Zusammensetzung des Differenzierungsmediums, wurden weitere Differenzierungen nach dem bereits verwendeten Protokoll durchgeführt. Die Stammzellen wurden von ihren Feederzellen abgelöst, in dem neuen Differenzierungsmedium in bakteriologische Petrischalen überführt (d0) und für sieben Tage kultiviert (d7). Bereits am ersten Kultivierungstag (d1) zeigte sich, dass es durch das Festwachsen der embryonalen Stammzellen an den Plastikschalen nicht zur Ausbildung von EBs kommen konnte. Die RESCs differenzierten in ungewünschter Weise in Form eines Monolayers zu epitheloiden Zellen aus (**Abb.23**).

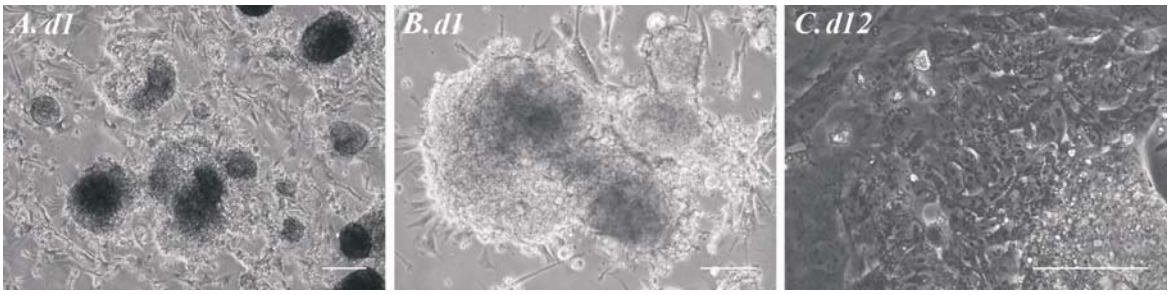

Abb. 23: Fehlende Ausbildung von EBs in einem durch FBS supplementierten Differenzierungsmedium. Zur Versuchseinleitung wurden die Stammzellen von ihren Feederzellen abgelöst, in einem serumhaltigen Medium aufgenommen und in bakteriologische Petrischalen überführt. Die Ausbildung und Reifung von EBs wurde durch das Festwachsen der RESCs während der Suspensionkultivierung verhindert. **A.)** Bereits am ersten Tag der Differenzierung (d1) waren die Zellen an den bakteriologischen Petrischalen adhäriert und begannen auszuwachsen. **B.)** Vergrößerte Darstellung der in A. abgebildeten, festgewachsenen Zellklumpen. **C.)** Innerhalb der nächsten Tage differenzierten die Stammzellen weiter aus. Skalierung, 100µm.

Lediglich ein kleiner Teil der Stammzellen verblieb zunächst im Überstand, wuchs aber nach der Bildung EB-ähnlicher Strukturen innerhalb der nächsten Tage der Suspensionskultur ebenfalls an der Plastikoberfläche fest. Die Vielzahl der im FBS enthaltenen Faktoren hatte das Adhärieren und das Festwachsen der Zellverbände gefördert. Die Verwendung des serumhaltigen Mediums erforderte somit eine alternative Methode zur Suspensionskultur in den bakteriologischen Platten.

Eine Möglichkeit zur Lösung des Problems schien die Verwendung von Agarose zur Überschichtung der Plastikoberflächen zu sein. Agarose, die sonst zu Zwecken der Agarosegelelektrophorese innerhalb molekularbiologischer Arbeiten verwendet wurde, wurde in dem Basalmedium des Differenzierungsmediums (IMDM) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und anschließend zur Plattenbeschichtung steril in Zwölf-Loch-Platten überführt. Nach einer Austestung von verschiedenen Agarosekonzentrationen, wurde die Agarose 1%ig verwendet. Die abgelösten Stammzellen wurden dann im Differenzierungsmedium A aufgenommen und in die mit Agarose vorbereiteten Platten überführt. Die embryonalen Stammzellen verblieben während der siebentägigen Kultivierung im Zellkulturmedium und bildeten in Suspension Embryonalkörperchen aus. Ein Absterben der RESCs während der Suspensionskultivierung in den überschichteten Platten wurde nicht beobachtet, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Agarose keinen negativen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Stammzellen nahm. Im Verlauf der siebentägigen Kultivierung kam es im Vergleich zu den im serumfreien Medium differenzierten RESCs zu morphologischen Veränderungen der EBs. Diese durchliefen während der Suspensionskultivierung einen Reifungsprozess und wirkten nun nicht mehr in sich homogen. Eine Bildung zystischer Strukturen konnte beobachtet werden. Am siebten Tag der Differenzierung (d7) wurden die EBs auf Sechs-Loch-Platten überführt und für einige weitere Tage kultiviert.

Trotz der morphologischen Veränderungen der gebildeten EBs unter Verwendung des neuen Differenzierungsmediums und Anpassung des Protokolls, differenzierte der größte Teil der

Stammzellen erneut in Derivate des Ektoderms. Neben einigen wenigen anderen Zelltypen zeigten sich hauptsächlich neuronale Zellen (**Abb.24, Abb.25**).

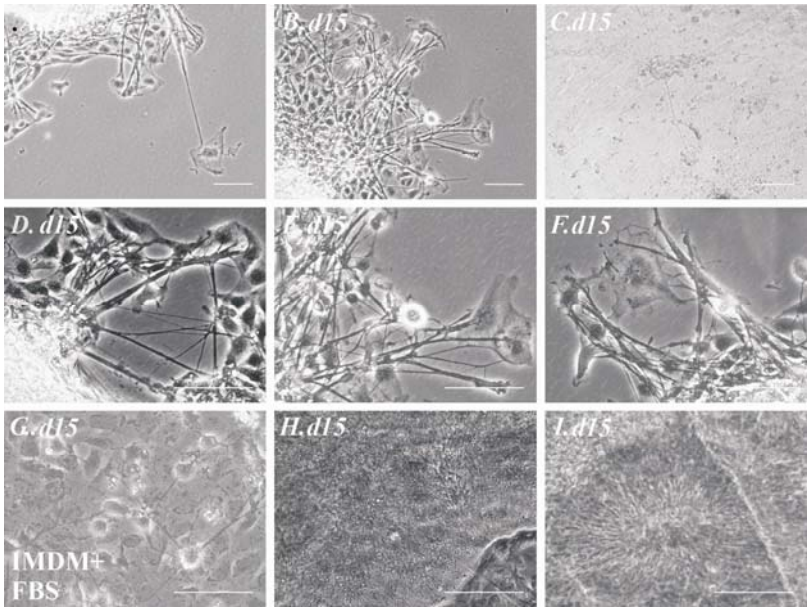

Abb. 24: Erste Differenzierungsversuche unter Verwendung eines mit fetalem Kälberserum (FBS) supplementierten Differenzierungsmediums resultierten in einer prominenten neuronalen Differenzierung der RESCs. Die Differenzierungseinleitung erfolgte wie in Abb.26 dargestellt. Nach dem Überführen der EBs auf Sechs-Loch-Platten, zeigte sich im weiteren Verlauf der Kultivierung morphologisch die prominente Bildung von Derivaten des Ektoderms. A.-I.) Dargestellt sind verschiedene neuronale Zelltypen (Gliazellen und Neuronen) acht Tage nach dem Ausplattieren der EBs (d15). Skalierung, 100µm.

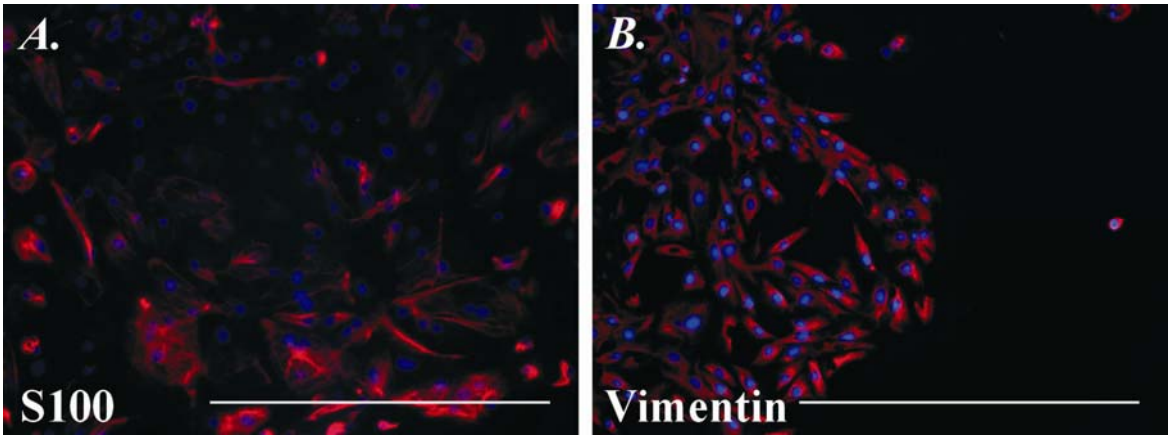

Abb. 25: Nachweis der neuroektodermalen Antigene S100 und Vimentin in Kulturen differenzierter RESCs. A.) Nachweis der Expression von anti-S100 in differenzierten RESCs. **B.**) Nachweis der Expression von anti-Vimentin in differenzierten RESCs. Die Färbungen der neuronal differenzierten RESCs wurden von Frau Dr. C. Radtke angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Skalierung, 100µm.

Die Differenzierungen wurden mehrfach mit dem gleichen Ergebnis der prominenten Differenzierung in Derivate des Ektoderms reproduziert (**Abb.26**). Es stellte sich nun die Frage, ob die verwendete embryonale Stammzellinie R366.4 prinzipiell in der Lage war, neben Derivaten des Ektoderms in Derivate des Endoderms und des Mesoderms zu differenzieren. Eine allgemeine Charakterisierung des spontanen Differenzierungsverhaltens musste vor weiteren Differenzierungsversuchen folgen.

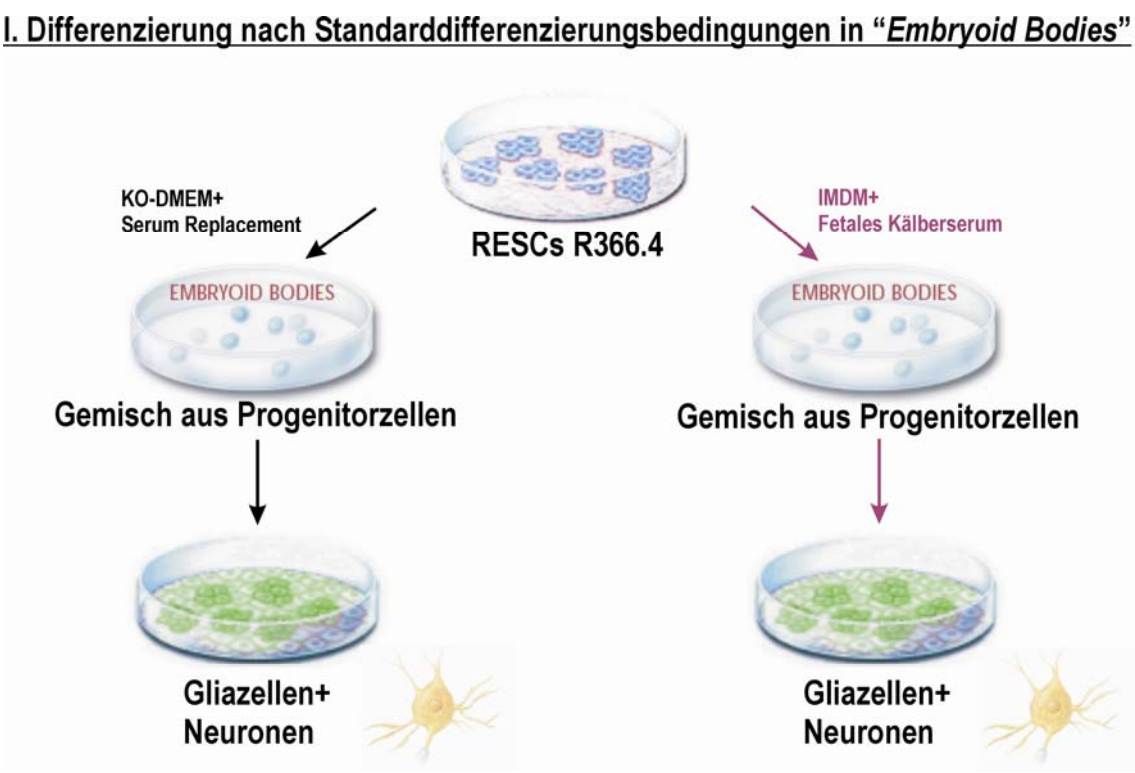

Abb. 26: Schematische Darstellung zur Differenzierung nach Standarddifferenzierungsbedingungen in *embryoid bodies* (EBs). Verglichen wurde die Differenzierung der RESCs unter serumfreien Bedingungen mit der Differenzierung in einem durch Serum supplementierten Medium. Zur Differenzierungsinduktion wurden die Stammzellen von ihren Feederzellen abgelöst und zunächst für sieben Tage in Suspension kultiviert. In diesem Zeitraum kam es zu der Ausbildung der als EB bezeichneten Strukturen. Am siebten Tag der Differenzierung (d7) erfolgte das Ausplattieren der Zellaggregate auf adhäsive Schalen. Nach einigen weiteren Tagen der Kultivierung wurden die Versuchsansätze ausgewertet.

3.2.2 Allgemeine Charakterisierung des Differenzierungspotentials der RESCs

Spontane Differenzierungen der RESCs in einem serumfreien Medium und in einem mit FBS supplementierten Medium führten rein morphologisch zu den gleichen Ergebnissen. In beiden Fällen kam es zu der prominenten Entstehung neuronaler Zelltypen. Publikationen über primaten embryonale Stammzellinien belegen, dass einige der etablierten Linien trotz postulierter Pluripotenz bevorzugt in bestimmte Richtungen, z.B. zu ektodermalen Zellderivaten, differenzieren. Innerhalb von Differenzierungen wird durch diese Limitation die Bildung bestimmter Zelltypen einzelner Keimblätter bevorzugt. Zur Überprüfung des Differenzierungspotentials der verwendeten Stammzellinie, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR. Zur Darstellung von Veränderungen im Expressionsmuster, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten eines Differenzierungsversuches RNA isoliert. Die Aufreinigung erfolgte aus undifferenzierten RESCs und EBs unterschiedlicher Reifungsstadien (d2, d4, d7 und d17). Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und die Proben mittels PCR ausgewertet. Um das Auftreten falsch positiver Ergebnisse durch kontaminierende Feederzellen ausschließen zu können, waren sämtliche

verwendete Oligonukleotide speziesspezifisch. Die korrespondierenden murinen Sequenzen wurden nicht amplifiziert. Als Marker für die drei Keimblätter dienten gängige Gene, die anhand der Embryonalentwicklung ausgewählt wurden. Die Darstellung der Differenzierung in einem zeitlichen Verlauf von siebzehn Tagen, zeigte zunächst eine Abnahme in der Expression der Pluripotenzmarker Oct 3/4 und Nanog. Da Sox2 nicht nur in undifferenzierten Zellen, sondern auch in der neuroektodermalen Linie exprimiert wird, deutet die gesteigerte Expression auf eine zunehmende ektodermale Differenzierung der RESCs im Verlauf der Differenzierung hin (**Abb.27**).

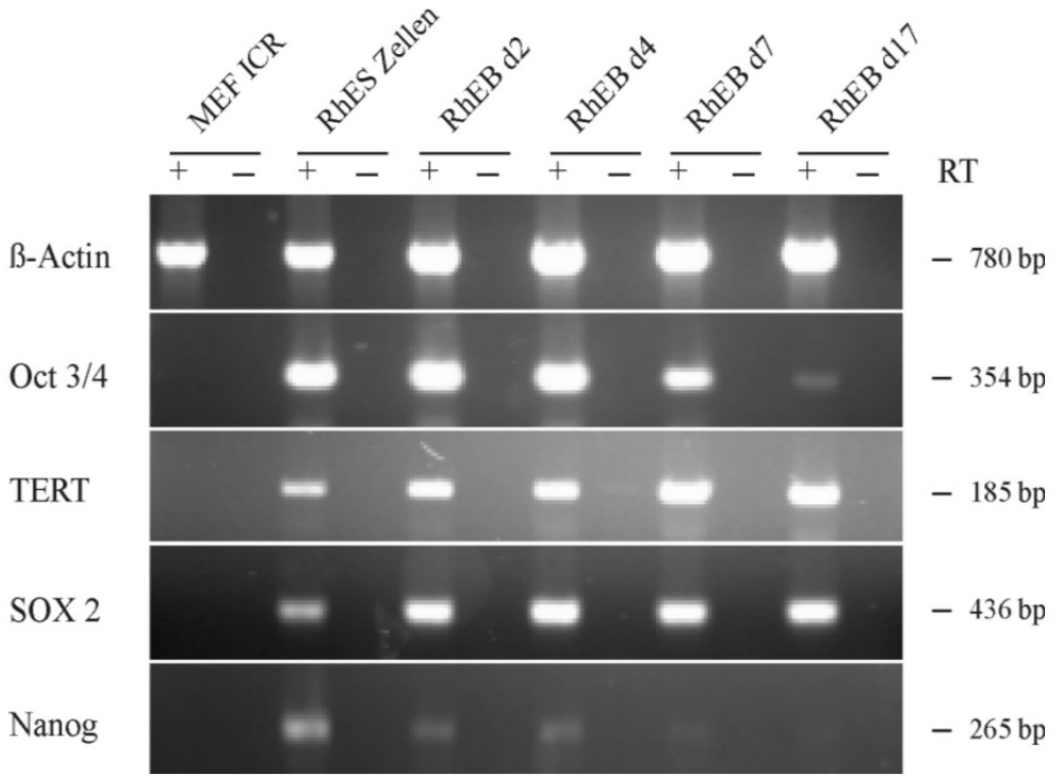

Abb. 27: Eine fortschreitende spontane Differenzierung der RESCs in EBs führte zu einer Abnahme in der Expression von Pluripotenzmarkern.

Mit der Auswertung der keimblattspezifischen RT-PCRs konnte die Expression von Markergenen des Endoderms, Mesoderms und Ektoderms nachgewiesen werden (**Abb.28)**. Die Genexpressionsanalyse eines durch Faktoren in der verwendeten Charge FBS induzierten Differenzierungsversuches, zeigte eine Differenzierung der Stammzellen in Derivate des Endoderms, Mesoderms und Ektoderms. Der Nachweis erfolgte semiquantitativ mittels RT-PCR. Sowohl sehr frühe als auch spätere Markergene der jeweiligen Keimblätter konnten nachgewiesen werden und zeigten so die Entstehung von Vorläuferzellen bis hin zu reiferen Zelltypen im fortgeschrittenen Differenzierungstatus. Des Weiteren wurde die Expression von Proteinen untersucht, die bekanntermaßen einen induzierenden Effekt auf

eine kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen besitzen. Hierzu zählen BMP2 und Wnt11. Als Markergene für frühes Mesendoderm diente *brachyury* (T), secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), *hepatocyte nuclear factor* 3β/4 (HNF3β/4), *α- fetoprotein* (AFP), *transthyretin* (Ttr) und *surfactant protein* A/B/C (SP-A/B/C) dienten als endodermale Marker. Für einen Nachweis der Differenzierung zu Derivaten des Ektoderms wurde die Expression von *fibroblast growth factor* 5 (FGF5), *Sox2*, *Nestin*, *βIII-Tubulin* und *Pax6* untersucht. Die Differenzierung zu kardialem Mesoderm wurde durch die Marker friend of *GATA* 2 (*FOG-2*), *Nkx2.5*, *Tbx5* und *Tbx20* in die Analyse eingeschlossen. *Myosin light chain* 2 (atrial, Mlc2a), *atrial natriuretic factor* (ANF) und *α-myosin heavy chain* (αMHC) dienten als Markergene für Kardiomyozyten. Keines der keimblattspezifischen Markergene wurde in den undifferenzierten RESCs exprimiert. Im Verlauf der fortschreitenden Differenzierung bildeten sich Derivate aller drei Keimblätter. Auf mRNA-Ebene ließen sich somit keine Limitationen im Differenzierungspotential der RESC Linie R366.4 nachweisen. Eine bevorzugte Entstehung von Derivaten des Ektoderms konnte durch die gewählte Methode nicht bestätigt werden. Eine Bildung von mesodermalen Vorläuferzellen, kardialem Mesoderm und Kardiomyozyten wurde durch die Expression der verwendeten Markergene verdeutlicht. Das Fehlen der Expression bestimmter Markergene belegt allerdings nicht, dass die Zellinie grundsätzlich nicht in der Lage ist, die betreffenden Zelltypen zu bilden. Tatsächlich kommt hier der Auswahl der Differenzierungsbedingungen eine große Bedeutung zu. Die Bildung neuronaler Zellen wie Neuronen und Gliazellen schien somit morphologisch prägnant zu sein, eine Entstehung von Derivaten des Endoderms und Mesoderms wurde jedoch nicht vollkommen unterdrückt. Die verwendete RESC Linie R366.4 konnte anhand der RT-PCR Ergebnisse als pluripotent bewertet werden. Limitationen in der Differenzierung zu Derivaten der drei Keimblätter wurden nicht bestätigt. Vielmehr schienen letzte entscheide Schritte in der Entstehung funktioneller Herzmuskelzellen zu fehlen oder blockiert zu sein.

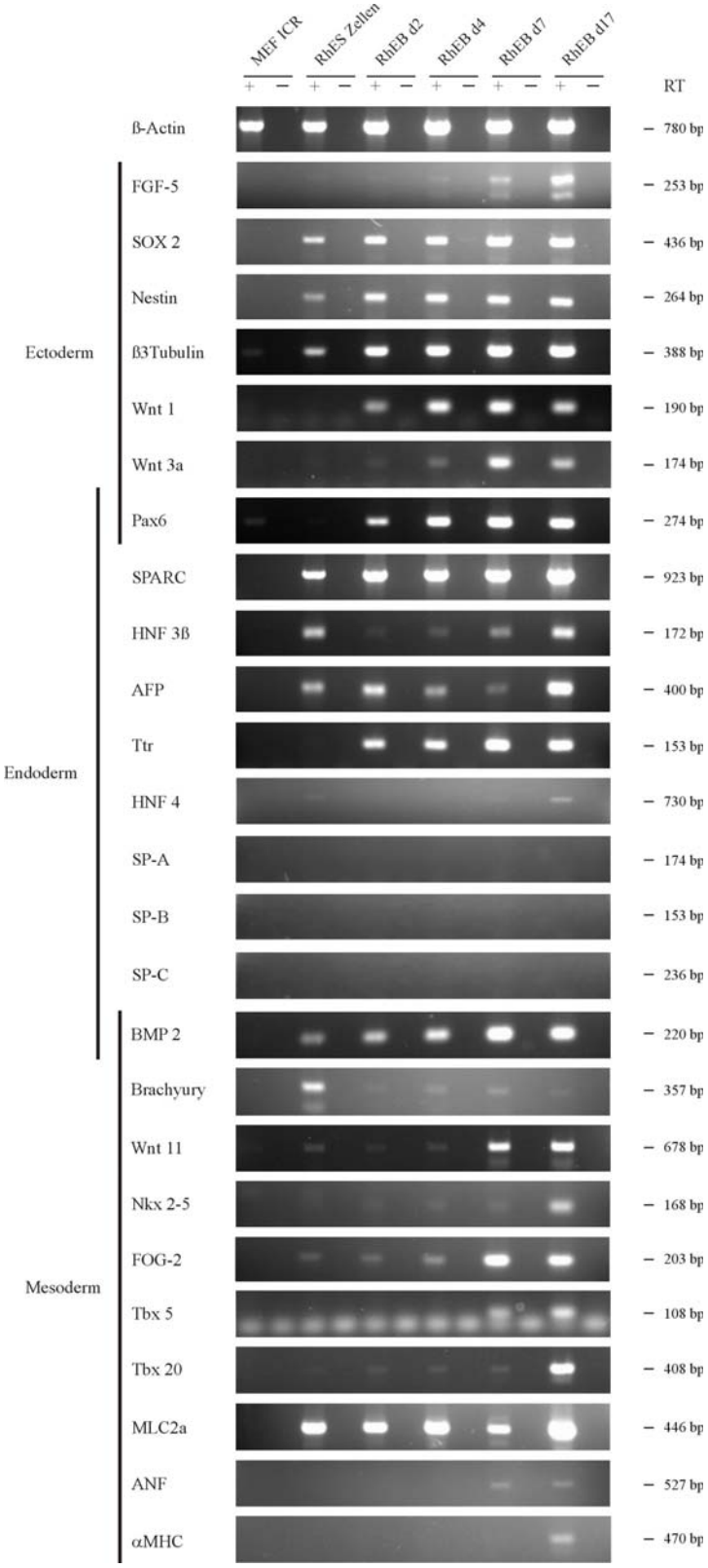

Abb. 28: Eine Differenzierung der RESCs in EBs führte des Weiteren zu der Expression von Markergenen des Endoderms, Mesoderms und Ektoderms.

3.2.3 Austestung verschiedener fetaler Kälberseren (FBS)

Nach der Auswertung der Ergebnisse zum allgemeinen Differenzierungspotential der RESCs wurde nach Variationsmöglichkeiten in dem verwendeten Protokoll zur Differenzierung der Stammzellen gesucht, die möglicherweise eine Entstehung mesendodermaler Zellen und funktioneller Kardiomyozyten förderten. Aufgrund der großen Unterschiede in der Zusammensetzung und Konzentration von Wachstumsfaktoren wurde entschieden, zunächst verschiedene Fetale Kälberseren auf ihren Einfluss in der Differenzierungsinduktion der Stammzellen zu untersuchen. Es wurden sechs Seren unterschiedlicher Chargen von Invitrogen (Carlsbad, USA), PAA Laboratories (Cölbe, Deutschland) und HyClone (Logan, USA) getestet. Schon während der siebentägigen Suspensionskultivierung zeigten sich in den EBs der verschiedenen Ansätze morphologisch signifikante Unterschiede. Ein Teil der Zellverbände wirkte in sich homogen, einige entwickelten zystische Strukturen und wieder andere schienen in ihrer Peripherie einen morphologisch homogenen Zelltypus zu entwickeln, der einer in der Literatur beschriebenen Bildung viszeralen Endoderms entsprach [109]. Die Entwicklung der verschiedenen EB-Morphologien war spezifisch für die verwendeten Seren. Nach der Überführung der EBs auf Sechs-Loch-Platten verstärkten sich die morphologischen Unterschiede zunehmend. Insbesondere zwei der sechs Differenzierungsansätze zeigten nicht das gewohnte Bild der prominenten Differenzierung in neuronale Zelltypen. Am neunten Tag der Differenzierung (d9) kam es in einem der beiden Versuchsansätze zur Ausbildung kontrahierender Areale (**Abb.29**).

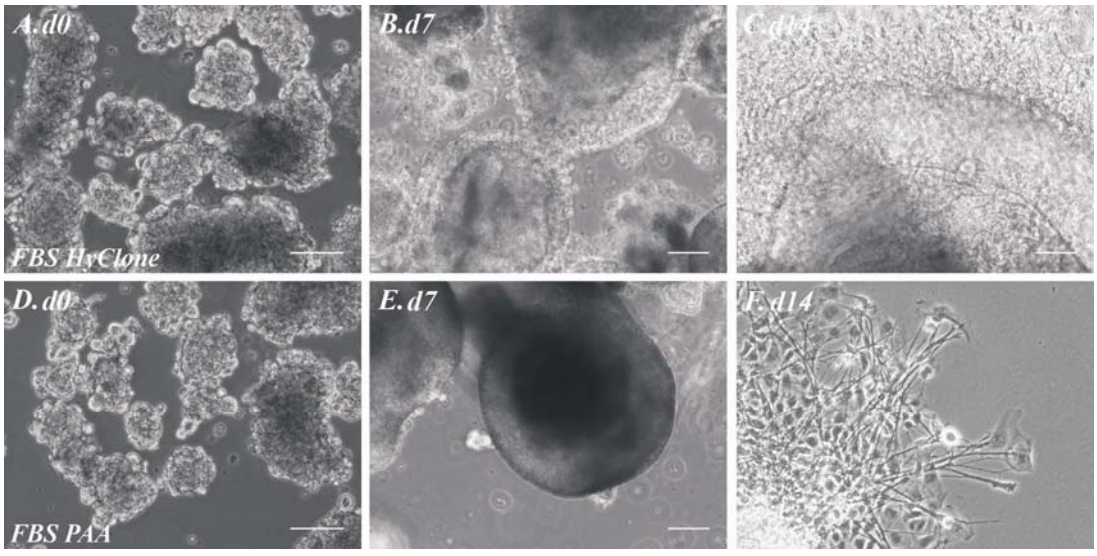

Abb. 29: Einfluss verschiedener Chargen fetaler Kälberseren (FBS) auf das Differenzierungsverhalten der RESCs in EBs. A.,D.) Darstellung der Größe der Stammzellen zu Beginn der Differenzierungseinleitung (d0). **B.,E.)** Morphologisch unterschiedliche EBs in Ansätzen mit verschiedenen Chargen FBS am siebten Tag der Differenzierung (d7). **C.,F.)** Manifestierung der unterschiedlichen EB-Morphologien durch die Differenzierung zu unterschiedlichen Zelltypen (d14). **A.-C.)** FBS der Firma HyClone, das eine kardiale Differenzierung der Zellen induzierte. **D.-F.)** Durch FBS geförderte neuronale Differenzierung der Stammzellen in einem Serum des Herstellers PAA. Skalierung, 100µm.

Die restlichen vier Seren der Austestung führten zu der bereits bekannten Differenzierung in Neuronen und Gliazellen. Das Ergebnis der Serumaustestung wurde zweimal mit gleichen Ergebnissen reproduziert. Das FBS, welches zu der kardialen Differenzierung der RESCs geführt hatte, wurde für alle weiteren Differenzierungen verwendet. Eine wichtige Erkenntnis der Austestung war, dass ein, die kardiale Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen der Linie D3 induzierendes FBS, nicht zu einer kardialen Differenzierung der RESCs führte.

Erste Differenzierungsversuche der RESCs unter der Verwendung eines durch *Serum Replacement* supplementierten Mediums führten zu einer ausschließlichen Differenzierung in neuronale Zelltypen. Veränderungen des Differenzierungsprotokolls und der Zusatz von FBS führten zunächst rein morphologisch zu den gleichen Ergebnissen. Eine Genexpressionsanalyse erbrachte den Beweis einer allgemeinen Differenzierung in Derivate der drei Keimblätter und auch die spezielle Differenzierung in mesendodermale Vorläuferzellen, kardiales Mesoderm und Kardiomyozyten konnte nachgewiesen werden. Da es während der Differenzierungsversuche nicht zur Bildung kontrahierender Areale kam, schienen letzte finale Schritte in der Entstehung funktioneller Kardiomyoyzten zu fehlen oder durch inhibierend wirkende Faktoren blockiert zu sein. Durch die Austestung unterschiedlicher Chargen FBS gelang es letztendlich, ein Serum zu finden, das die spontane Differenzierung der RESCs zu Kardiomyozyten induzierte. Dieses Serum der Herstellers HyClone enthielt die für eine Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu kontrahierenden Kardiomyozyten notwendigen Wachstumsfaktoren in der benötigten Konzentration (**Abb.30**).

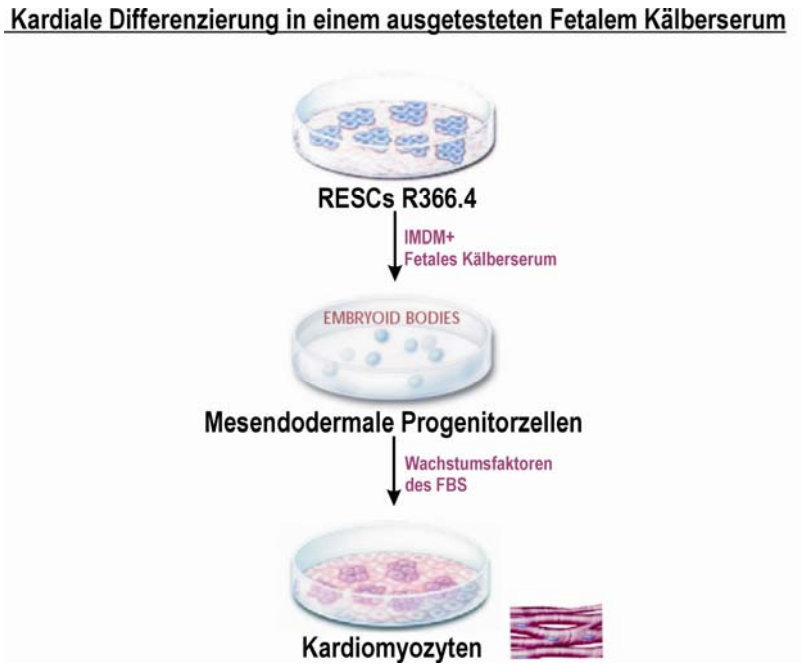

Abb. 30: Kardiale Differenzierung der RESCs in einem ausgetesteten Serum. Durch die Austestung verschiedener FBS, konnte die spontane Bildung kontrahierender Areale in EBs erreicht werden. Durch die im Serum enthaltene Kombination und Konzentration an Faktoren, wurde die *in vitro* Kardiogenese der RESCs komplimentiert.

3.2.4 Kardiale Differenzierung der RESCs

Die kardiale Differenzierung der RESCs erfolgte nach dem in Abb.13 dargestellten Protokoll unter Verwendung des getesteten FBS der Firma HyClone. Die RESCs wurden von ihren Feederzellen abgelöst, in Differenzierungsmedium A überführt, für sieben Tage in Suspension kultiviert und am siebten Tag der Differenzierung (d7) ausplattiert. Im Verlauf der weiteren Kultivierung waren erste kardial differenzierte Areale einen Tag nach dem Ausplattieren (d8) zu beobachten (**Abb.31**).

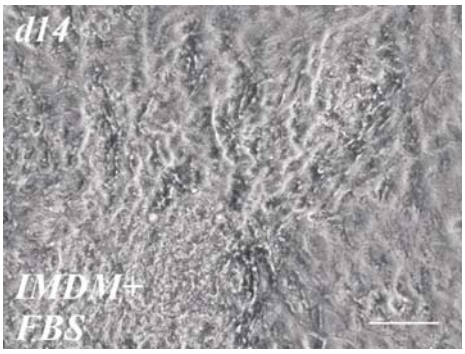

Abb. 31: Morphologie eines kontrahierenden Areals kardial differenzierter RESCs. Kardial differenzierte RESCs am vierzehnten Tag (d14) einer spontanen Differenzierung. Das kontrahierende Areal lag in der Peripherie eines ausgewachsenen EBs. Die zugehörige Videodatei ist auf CD beigefügt. Skalierung, 100µm. Aus Schwanke *et al.*, Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32.

Die Bereiche kontrahierten unregelmäßig mit einer geringen Frequenz und reagierten sehr schnell auf geringste Abweichungen von der im Inkubator vorherrschenden Temperatur von 37°C mit dem Einstellen ihrer Kontraktionen. Im zeitlichen Verlauf der Differenzierung wurden die Schlagfrequenzen beständiger und pendelten sich bei 42 ± 23 Kontraktionen pro Minute ein (n=6). Die Anzahl der kontraktilen Areale nahm im Differenzierungsverlauf stetig zu und erreichte am fünfzehnten Tag mit 18% ein Maximum. Der Auswertungszeitraum der Versuche belief sich auf einunddreißig Tage. In dieser Zeitspanne konnte keine signifikante Abnahme der Anzahl kontrahierender EBs beobachtet werden (**Abb.32**). Die kardial differenzierten Areale variierten in ihrer Form und Position in den EBs. Sie wiesen Unterschiede in ihrer Größe und Morphologie auf. Einige waren in zystischen Strukturen platziert und wieder andere entstanden in der Peripherie der ausgewachsenen Zellen. Eine maximale Anzahl von drei schlagenden Arealen pro EB wurde beobachtet. Eine Aussage über die Anzahl der entstehenden Kardiomyozyten konnte nicht getroffen werden. Ein Protokoll zur Vereinzelung der Zellen aus differenzierten EBs befand sich zum Zeitpunkt der Versuche in der Etablierungsphase.

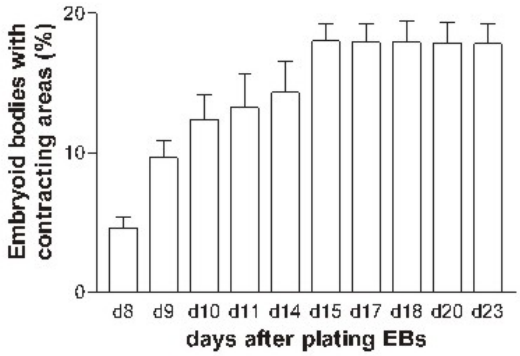

Abb. 32: Zunahme der kontrahierenden Areale im zeitlichen Verlauf einer Differenzierungsreihe. Die Zunahme des Auftretens kontrahierender Areale korrelierte mit der fortschreitenden Differenzierung der Zellen in den EBs. Aus Schwanke *et al.*, Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32.

3.2.4.1 RT-PCR Analyse im zeitlichen Verlauf der kardialen Differenzierung

Eine Charakterisierung des Genexpressionsmusters der kardial differenzierten RESCs wurde mittels semiquantitativer RT-PCR durchgeführt. Im Verlauf einer Differenzierung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (d2, d4, d7 und 17) RNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und analysiert. Um falsch positive Ergebnisse durch die embryonale Mausfibroblasten ausschließen zu können, waren sämtliche zur PCR verwendeten Oligonukleotide speziesspezifisch. Murine Sequenzen wurden nicht amplifiziert. Die Wahl der nachzuweisenden Gene erfolgte entsprechend ihres Auftretens während der Embryonalentwicklung. Im Verlauf der embryonalen Herzentwicklung entstehen zunächst mesendodermale Vorläuferzellen, die erst zu Mesoderm, dann zu kardialem Mesoderm und anschließend zu frühen Kardiomyozyten differenzieren. Wegen des postulierten Einflusses des Endoderms auf diese Entwicklung, wurden auch entsprechende endodermal Markergene in die Analyse einbezogen. Zum Nachweis der unterschiedlichen zellulären Entwicklungsstadien, entscheidender Schlüsselfaktoren und früher Kardiomyozyten, wurde eine Vielzahl von Markergenen verwendet. Zum Nachweis der Entstehung frühen Mesendoderms wurde die Expression von *brachyury* (T) und *goosecoid* überprüft. *Mesoderm posterior factor* (Mesp1) stand für die weitere Entwicklung der Vorläuferzellen zu Mesoderm. Die Entstehung des Endoderms wurde durch den Nachweis von *hepatocyte nuclear factor 3 β* (HNF3β), *hepatocyte nuclear factor 4* (HNF4), *transthyretin* (Ttr), *secreted protein acidic and rich in cysteine* (SPARC), *α feto protein* (AFP) und *surfactant protein D* (SP-D) gezeigt. Friend of GATA 2 (FOG-2), GATA-4, NKx2.5, Tbx5 und Tbx20 wurden zum Nachweis der Differenzierung zu kardialem Mesoderm verwendet. Als Marker für frühe Kardiomyozyten dienten *atrial natriuretic factor* (ANF), myosin light chain 2 (atrial und ventricular) (Mlc2a/ Mlc2v) und *alpha myosin heavy chain* (α-MHC).

Die Auswertung der Genexpressionsanalyse zeigte, dass bereits in „undifferenzierten" Stammzellkulturen der RESCs einige endodermale und mesodermale Marker exprimiert wurden. Hierzu zählten SPARC, AFP, HNF3β, Ttr, brachyury, goosecoid, Mesp1, GATA-4, FOG-2 und Mlc2a und Mlc2v. Eine mögliche Erklärung ist, dass die undifferenzierten embryonalen Stammzellen zu einem geringen Teil mit differenzierten Zellen durchwachsen waren. Die Analyse der Stammzellen am zweiten Tag der Differenzierung brachte ähnliche Ergebnisse. Ein leichter Anstieg der Expression von AFP, Ttr und *brachyury* wurde durch eine Zunahme in der Bandenintensität sichtbar. Obwohl die Auswertung einer semi-quantitativen RT-PCR in Bezug auf Zu- und Abnahmen in Bandenintensitäten vorsichtig zu bewerten ist, zeigen die Daten einen Anstieg in der Expression verschiedener endodermaler und mesodermaler Marker (SPARC, AFP, HNF3β, Ttr, *brachyury*, Mesp1, FOG-2, GATA-4 und Mlc2a). Die Expression des mesendodermalen Markers *goosecoid* nahm bei Erreichen des vierten Tages der Differenzierung ab. Andere Marker für Endoderm, kardiales Mesoderm und

Kardiomyozyten konnten hingegen ab d4 nachgewiesen werden (HNF4, SP-D, Nkx2.5, Tbx5, Tbx20, ANF und α-MHC) (**Abb.33**).

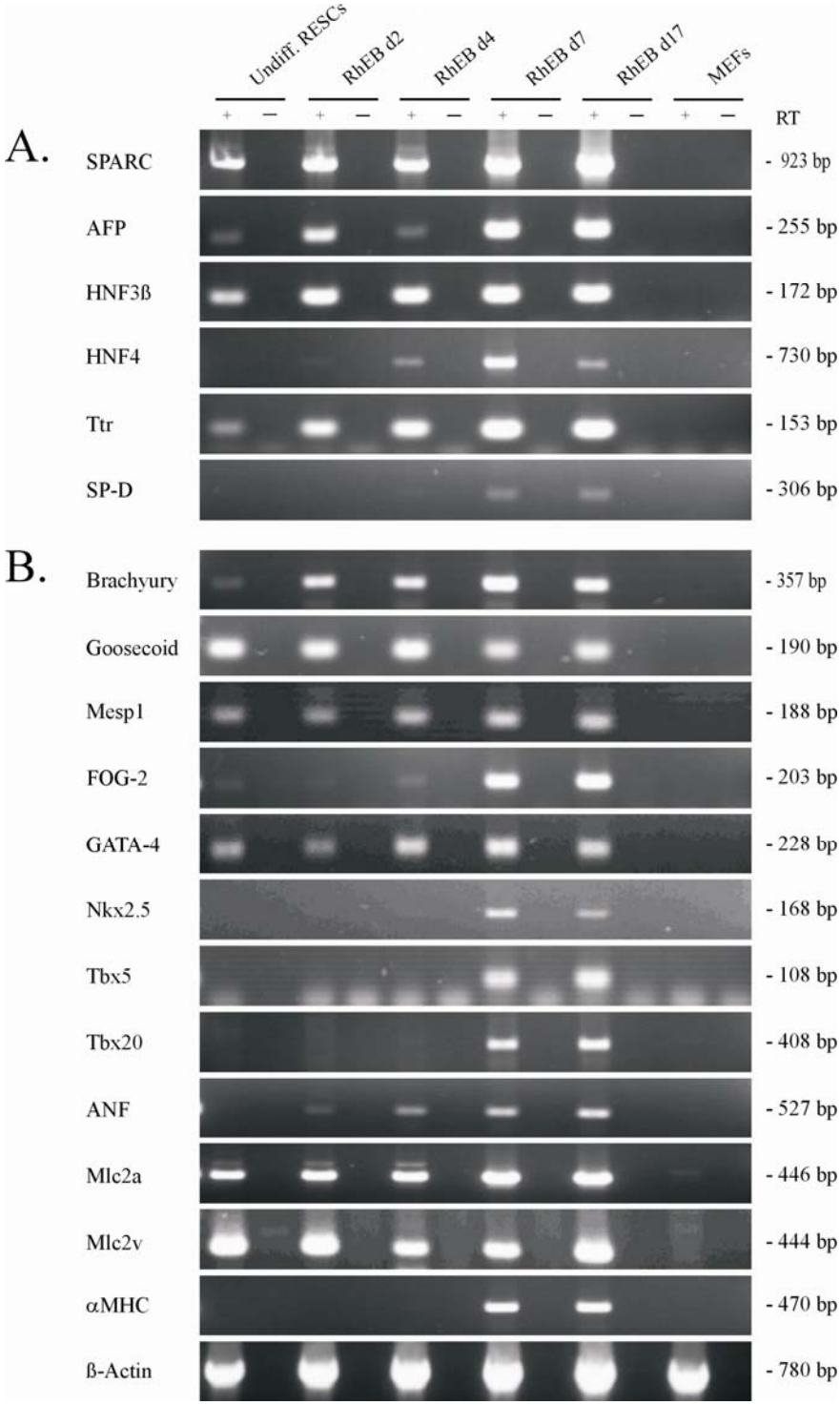

Abb. 33: Differenzierungen der RESCs in einem ausgetesteten FBS führten zu der Expression von Markergenen des Endoderms, Mesoderms, kardialen Mesoderms und Kardiomyozyten. Die Auswertung der Differenzierungsversuche erfolgte durch semiquantitative RT-PCR. Analysiert wurde die Expression der Markergene in undifferenzierten RESCs und in Stammzellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien (d2, d4, d7 und d17). Als Kontrolle für die Speziesspezifität der verwendeten Oligonukleotide wurden Feederzellen (MEF) als Kontrolle mitgeführt. **A.)** Expression von Markergenen des Endoderms **B.)** Expression von Markergenen des Mesoderms, kardialen Mesoderms und Kardiomyozyten. Aus Schwanke *et al.*, Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32.

3.2.4.2 Immunhistologische Analyse kardial differenzierter RESCs

Für die immunhistologische Analyse der Differenzierungsansätze wurden RESC-abgeleitete Kardiomyozyten am einundzwanzigsten Tag einer Differenzierung (d21) mit Antikörpern gegen muskelpezifische Proteine inkubiert. Die aus den embryonalen Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten zeigten eine Immunreaktivität gegenüber anti-sarkomerisches α-Aktinin, anti-Titin, anti-Troponin T und anti- Myosin leichte Kette 2, ventrikulär (Mlc2v).

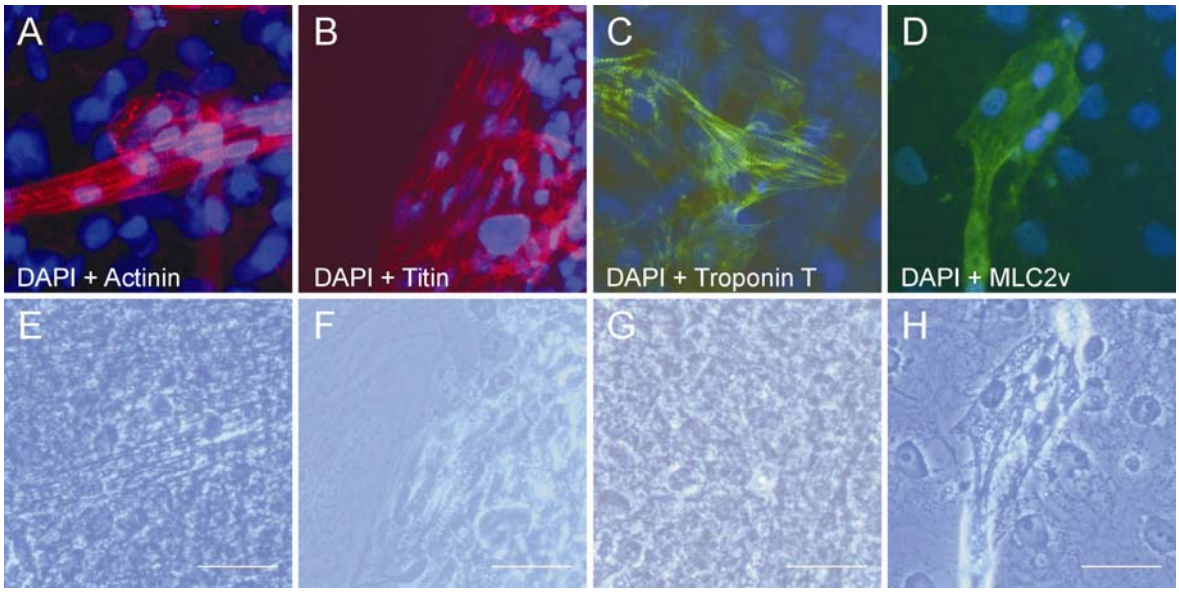

Abb. 34: Immunhistologische Analyse der Expression muskelspezifischer Marker in kardial differenzierten RESCs. Darstellung von RESC-abgeleiteten Kardiomyozyten am einundzwanzigsten Tag einer Differenzierung (d21). **A.)** anti-sarkomerisches α-Aktinin (rot, Klon EA-53, Sigma) **B.)** anti-Titin (rot, Klon MAB 1553, Chemicon) **C.)** anti-Troponin T (grün, Klon CT3, Hybridoma Bank) **D.)** anti-Mlc2v (grün, Klon F109.3E1, Biocytex). **E.-H.)** Korrespondierende Phasenkontrastbilder. Die Gegendarstellung der Zellkerne erfolgte durch die Anfärbung mit DAPI. Skalierung, 100µm. Aus Schwanke *et al.*, Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32.

Neben Kardiomyozyten, die bereits den herzspezifischen Phänotyp quergestreifter Muskulatur aufwiesen (**Abb.34**), zeigten Zellen unterschiedlicher Morphologien eine Immunreaktivität mit den verwendeten Antikörpern (**Abb.35**). Den größten Teil bildeten große kompakt geformte Zellen ohne offensichtliche Querstreifung. Lediglich in einigen Randbereichen zeigte sich eine beginnende Orientierung der Muskelfasern unter Bildung der quergestreiften Morphologie. Möglicherweise repräsentierten sie kardiale Vorläuferzellen oder sehr frühe Kardiomyozyten. Kleinere Zellen mit triangulärer oder quadrangulärer Form besaßen eine ausgeprägtere Querstreifung, die sich in den Randbereichen der Zellen manifestierte und auf reifere Kardiomyozyten hin deutete (**Abb.35**). Der immunhistologische Nachweis von ventrikulärem *myosin light chain* 2 (Mlc2v) Proteinen zeigte eine beginnende Entstehung von Kardiomyozytensubtypen (**Abb.34**). Die RT-PCR Ergebnisse zur Genexpression vom *atrial natriuertic factor* (ANF) konnten durch die Methode der Immunfluoreszenz auf Proteinebene nicht bestätigt werden. ANF wurde nicht detektiert. Eine Verbindung der Kardiomyozyten und Kardiomyozytenvorläufer untereinander konnte durch den immunhistologischen

Nachweis des herzspezifischen *gap junction* Proteins Connexin 43 gezeigt werden (**Abb.35**). Das Expressionsmuster des Transmembranproteins änderte sich im Verlauf der Zellreifung. Frühe Kardiomyozyten zeigten ein stark ausgeprägtes Expressionsmuster, dass sich über die gesamten Zellperipherie erstreckte (**Abb.35A, 35D**). Reifere Kardiomyozyten hingegen wiesen eine auf bestimmte Areale limitierte Expression auf.

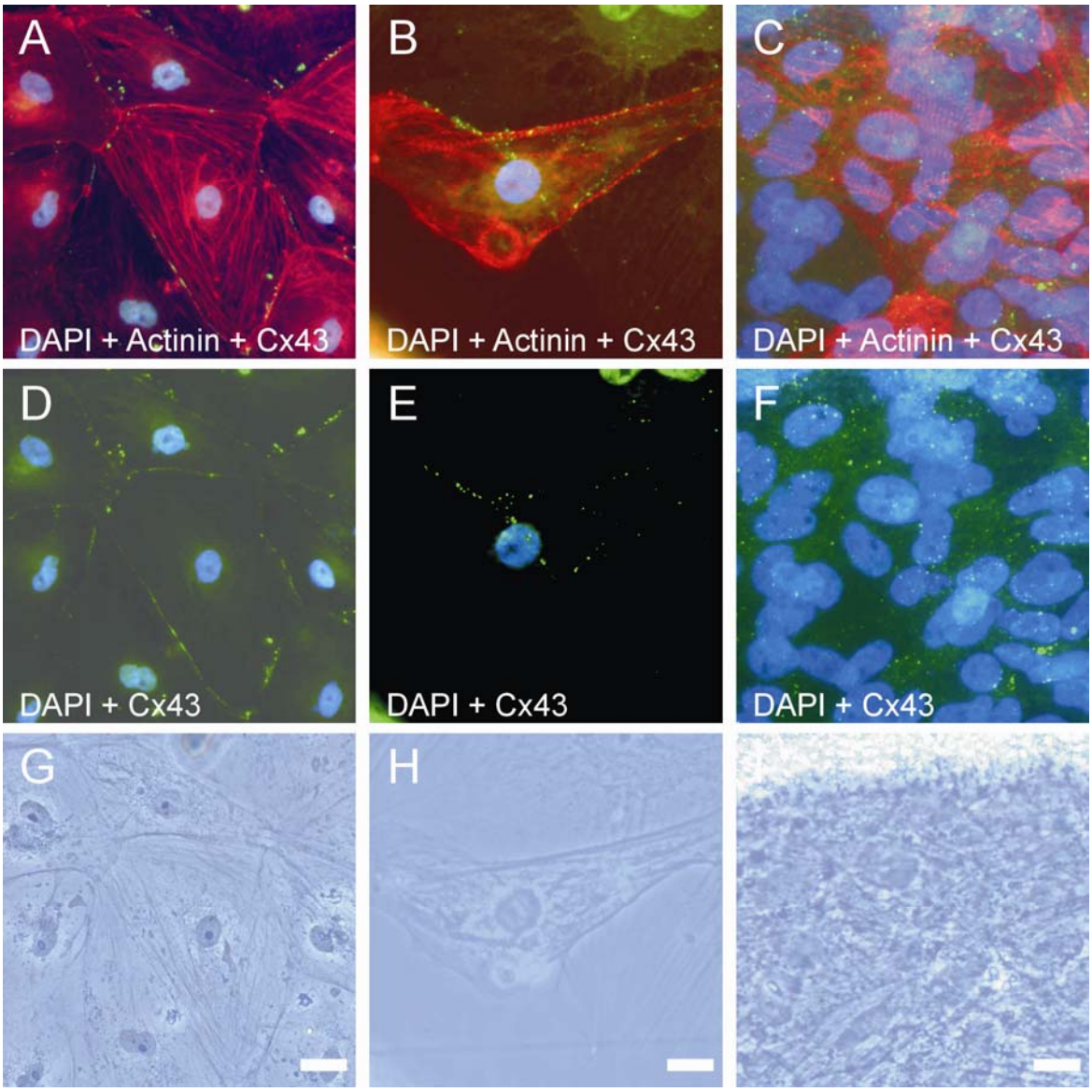

Abb. 35: Immunhistologische Darstellung früher Kardiomyozytenvorläufer und Connexin 43 (Cx43) exprimierenden Kardiomyozyten in kardial differenzierten RESCs. Darstellung RESC-abgeleiteter Kardiomyozyten am einundzwanzigsten Tag der Differenzierung (d21). **A.-C.)** anti-sarkomerisches α-Aktinin (rot, Klon EA-53, Sigma) und anti-Connexin 43 (grün, Chemicon), **D.-F.)** anti-Connexin 43 (grün, Chemicon), **G.-I.)** Korrespondierende Phasenkontrastbilder. Skalierung, 100µm. Aus Schwanke *et al.*, Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32.

3.2.4.3 Ultrastrukturelle Darstellung der Differenzierung von RESCs zu funktionellen Kardiomyozyten.

Die ultrastrukturelle Darstellung der RESC abgeleiteten Kardiomyozyten erfolgte in Zusammenarbeit und unter Durchführung von Frau Dr. S. Groos (Abteilung für Zellbiologie, Medizinische Hochschule Hannover). Kontrahierende Areale kardial differenzierte RESCs wurden am dreiundzwanzigsten Tag der Differenzierung (d23) aus ausgewachsenen EBs ausgeschnitten, in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und zur Analyse an Frau Dr. Groos übergeben. Nach der Probenvorbereitung erfolgte die elektronenmikroskopische Auswertung der Ultradünnschnitte. Da die zu analysierenden kardial differenzierten Zellen zuvor nicht aufgereinigt worden waren, enthielt die Präparation eine Mixtur unterschiedlicher Zelltypen. Den größten Anteil bildeten Fibroblasten-ähnliche Zellen mit Lipideinschlüssen und Zellen, die große Mengen an membranlosen Zelleinschlüssen, die als Glykogenpartikel identifiziert wurden, enthielten. Eine detailliertere Analyse der Zellen identifizierte die letzteren als Kardiomyozyten, mit embryonaler Morphologie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (**Abb.36, Abb.37**). Eine große zelluläre Aktivität manifestierte sich durch einen aktiven Kern, der sehr hell erschien und in dem die DNA in der dekondensierten Form des Euchromatins vorlag. Des Weiteren war das Zytoplasma nicht elektronendicht. Die Ribosomen zeigten eine polyribosomale Anordnung statt der Assoziation mit dem Endoplasmatischen Reticulum. Die, die Zellen umgebende, Basalmembran war in einigen Bereichen unterbrochen (**Abb.37B**) und zeigte zur Erzeugung eines mechanischen Haltes der Zellen die Ausbildung von Hemidesmosomen als Verbindung von Zytoskelettelementen und Basallamina. Die Verankerung benachbarter Zellen erfolgte durch die Ausbildung von Verbindungen des „Adherens Typus“ (A*dherens Junctions*) über zytoplasmatische Aktinfilamente. So schienen sich Elemente des Zytoskeletts, hauptsächlich Mikrofilamente mit einem Durchmesser von 6nm und Filamente mit einem Durchmesser von 12nm (vermutlich Myosin) in unterschiedlichen Stadien der Organisierung an diesen Zellverbindungen auszurichten und mit ihnen verbunden zu sein. (**Abb.36C**). In einigen wenigen Zellen waren die Mikrofilamente bereits zu Myofibrillen, den kontraktilen Elementen der Herzmuskelzellen, angeordnet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine regelmäßige Anordnung elektronendichter und elektronendurchlässiger Banden, A-Banden (anisotrop) mit dicken Bündeln von Myosinfilamenten und den in den I-Banden (isotrop) auftretenden dünnen Aktinfilamenten begrenzt durch Z-Banden, in Form von Sarkomeren (**Abb.37B**). Die Länge der Sarkomere ließ auf einen kontrahierten Status der vorliegenden Filamente schließen.

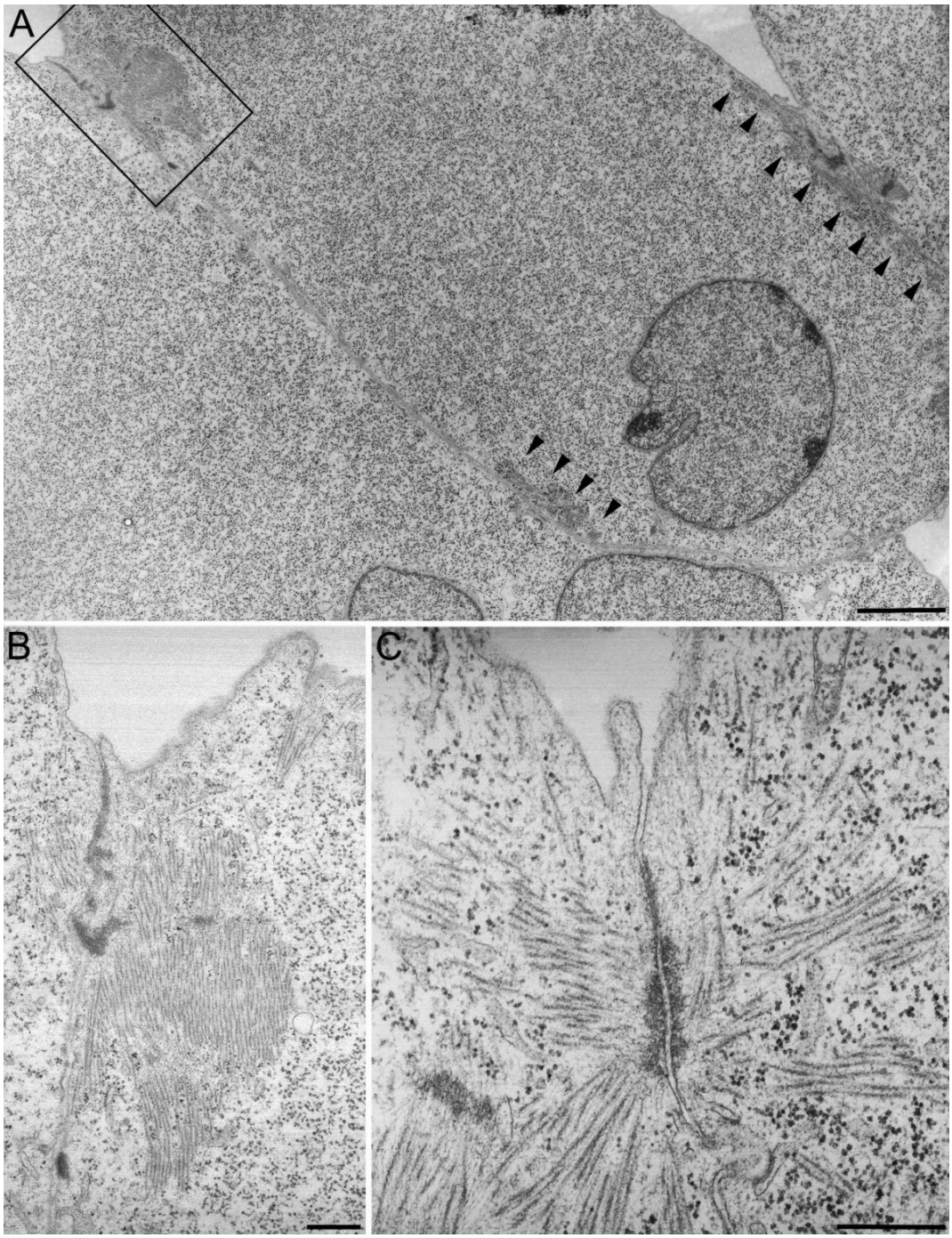

Abb. 36: Elektronenmikroskopische Darstellung von Kardiomyozytenvorläuferzellen in Kulturen kardial differenzierter RESCs. Darstellung früher Differenzierungsstadien sich entwickelnder Kardiomyozyten (Kardiomyozytenvorläuferzellen) am dreiundzwanzigsten Tag einer Differenzierung (d23). Die elektronenmikroskopische Analyse erfolgte an kontrahierenden Arealen ausgewachsener EBs, die zur Analyse ausgeschnittenen wurden. **A.**) Abbildung von drei benachbarten Zellen mit der Morphologie embryonaler Kardiomyozytenvorläufer. Die DNA des Zellkerns liegt in der aktiven, dekondensierten Form des Euchromatins vor, im Zytoplasma sind Glykogenpartikel eingeschlossen, die Ribosomen liegen als Polyribosomen vor. **B.)** Vergrößerte Abbildung des eingerahmten Abschnittes aus A. Benachbarte Zellen zeigten in einigen Bereichen der Plasmamembran eine erhöhte Elektronendichte. Dies lässt auf Zellverbindungen des „Adherens Typus" schließen. In beiden Zellen finden sich in der Nähe der Zell-Zellverbindungen dünnere und dickere Filamente des Zytoskeletts. **C.)** Vergrößerte Abbildung einer Zell-Zellverbindung, mit zusammenlaufenden Myofilamenten. Skalierung, A.) 2,5µm, B.,C.) 0,5µm. Aus Schwanke *et al.*, Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32.

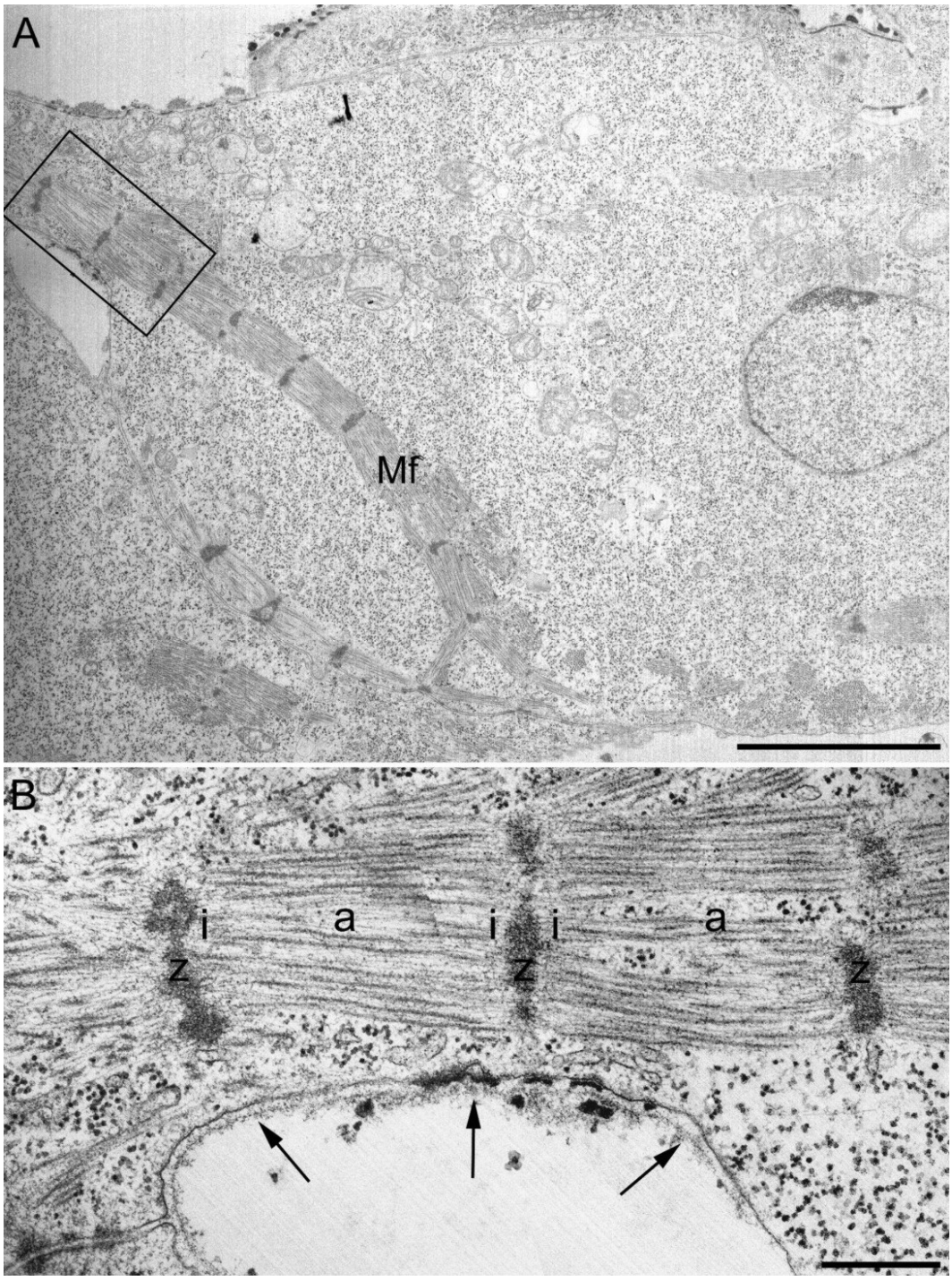

Abb. 37: Elektronenmikroskopische Darstellung früher Kardiomyozyten in Kulturen kardial differenzierter RESCs. Darstellung früher Kardiomyozyten am dreiundzwanzigsten Tag einer Differenzierung (d23). Die elektronenmikroskopische Analyse wurde an ausgeschnittenen Arealen ausgewachsener kontrahierender EBs durchgeführt **A.)** Darstellung einer Zelle mit Filamenten des Zytoskeletts, die sich in Form von Myofibrillen (Mf) angeordnet haben. **B.)** Vergrößerte Abbildung des eingerahmten Bereiches in A.. In den Sarkomeren waren die Z-Banden (z), A-Banden (a) und I-Banden (i) deutlich zu erkennen. Einige Bereiche der Basalmembran zeigten die Ausbildung von Hemidesmosom-ähnlichen Strukturen. Skalierung, A.) 2,5µm, B.) 0,5µm. Aus Schwanke *et al.*, Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32.

3.2.4.4 Darstellung elektrophysiologischer Eigenschaften kardial differenzierter RESCs durch Multi Elektroden Arrays (MEAs)

Die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neurophysiologie der Universität Köln unter der Leitung von Prof. Dr. Hescheler. Das dort zur Bestimmung extrazellulärer Feldpotentiale von Herzmuskelzellen etablierte System der Multi Elektroden Arrays (MEAs) wurde zur Analyse der Aktionspotentiale der kardial differenzierten Zellen verwendet. Kontrahierende Areale wurden aus ausgewachsenen EBs ausgeschnitten und auf MEAs transferiert. Die MEAs hatten eine Fläche von 2,5 Quadratmillimetern, auf denen 60 Elektroden (jede 30µm groß) in einem gleichmäßigen Viereckraster angeordnet waren. Die Anordnung des Rasters ermöglichte die zeitliche und räumliche Zuordnung der gemessenen elektrischen Signale. Die Bestimmung der extrazellulären elektrischen Aktivitäten der Kardiomyozyten führte nach der Auswertung mittels ANOVA (*Analysis Of VAriance*) zu der Darstellung typischer kardialer Feldpotentiale. Diese entsprachen denen in anderen Studien bestimmten Feldpotentialen kardial differenzierter humaner embryonaler Stammzellen und nativer embryonaler Kardiomyozyten (**Abb.38**).

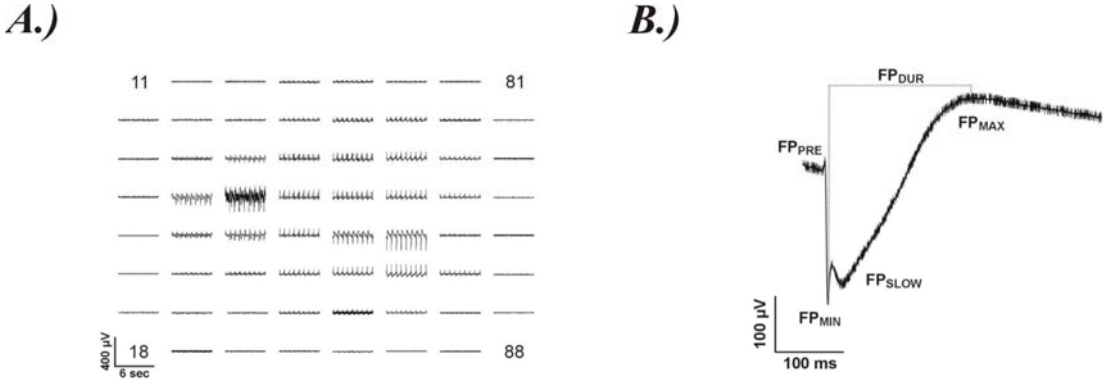

Abb. 38: Nachweis einer spontanen und rhythmischen elektrischen Aktivität durch Multi Elektroden Arrays (MEAs). A.) Abbildung einer 8x8 Übersicht einer durch 60 MEA Elektroden detektierten extrazellulären Spannungsänderung ausgeschnittener kardial differenzierter Areale **B.)** Repräsentative Kurve eines detektierten Feldpotentials (FP). Das in die einzelnen Komponenten FP_{PRE}, FP_{MIN}, FP_{SLOW}, FP_{MAX} und FP_{DUR} aufzuteilende FP, zeigte eine charakteristische Morphologie. Aus Schwanke *et al.*, Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32.

Neben der Erzeugung von Aktionspotentialen spezifischer Morphologien, ist vor allen Dingen die Weiterleitung der elektrischen Signale von Zelle zu Zelle ein besonderes Charakteristikum von Kardiomyozyten. Zur Analyse der Generierung und Weiterleitung elektrischer Impulse der dreidimensionalen kontraktilen Bereiche wurden jeweils zwei voneinander unabhängig kontrahierende Areale ausgeschnitten und zusammen auf ein Elektronengitter eines MEAs transferiert. In einigen Fällen kam es hierbei im Verlauf der weiteren Kultur zu der Ausbildung einer Gewebebrücke, die die beiden Bereiche miteinander verband. Die Aufzeichnung der elektrischen Signale dieser eher komplexen kardialen Strukturen durch das MEA System führten reproduzierbar zu dem morphologisch

typischen Aufbau, der der P-Welle und dem QRS-Komplex von Elektrokardiogrammen (EKG) ähnelten (**Abb.39**). Eine kleine durch das Areal an der #34 Elektrode hervorgerufene P-ähnlichen Welle (**Abb.39C**) bedingte die Entstehung eines QRS-ähnlichen Komplexes, der dem Bereich an der #65 Elektrode zugeordnet werden konnte (**Abb.39B**). Die Reizübertragung zwischen den beiden Bereichen erfolgte durch den zwischen den kontrahierenden Arealen ausgebildeten Gewebestrang (**Abb.39B**). Dieser Effekt wurde auch unter Kontrollbedingungen beibehalten (0.16±0.005s, n=4). Das erste kontrahierende Areal an der #34 Elektrode hatte augenscheinlich eine Schrittmacherfunktion übernommen und rief so ein kontinuierliches Kontrahieren des zweiten Areals an der #65 Elektrode hervor.

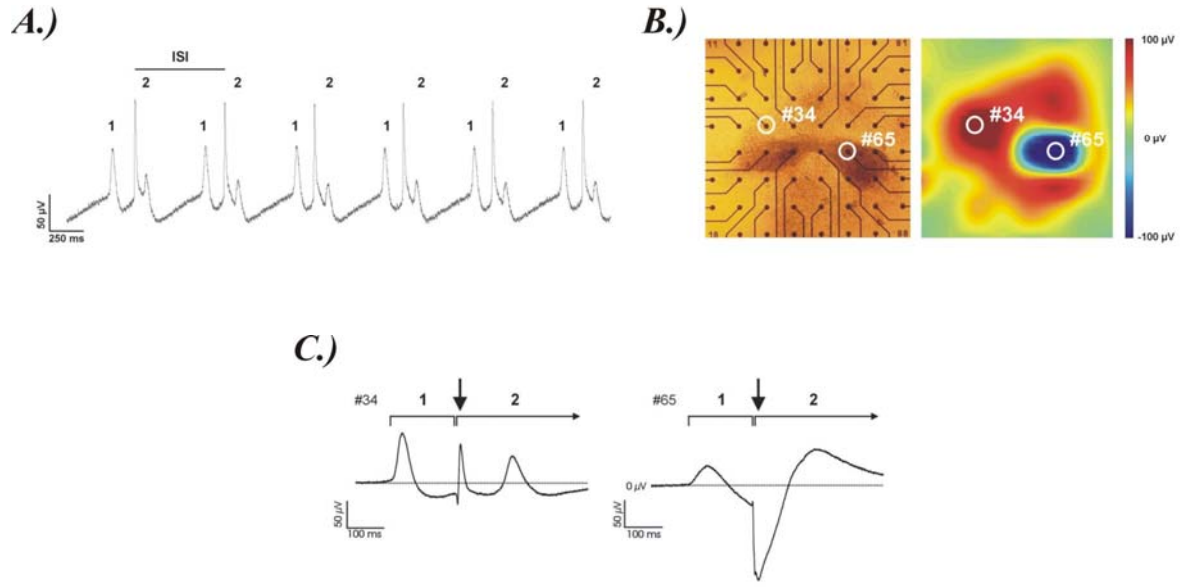

Abb. 39: Elektrische Verknüpfung isoliert kontrahierender Areale durch Bildung eines reizübertragenden Gewebestranges. A.) Kopplung kontrahierender Areale. **B.)** Darstellung der Aktivität von RESC-abgeleiteten Kardiomyozyten. Verteilung der FP Amplitude einer Gruppe von RESCs mit zwei spontan kontrahierenden Arealen, die sich in der Nähe der #34 und #65 Elektrode befanden. Im linken Teil des Bildes ist der gebildete Gewebestrang deutlich zu erkennen. Die Abbildung spiegelt den Beginn der zweiten Phase wieder Dies ist in **C.)** durch einen Pfeil gekennzeichnet. Darstellung der zu den Arealen #34 und #65 gehörigen FPs. Aus Schwanke *et al.*, Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32.

Als weiteren Identitäts- und Funktionalitätsnachweis der kardial differenzierten RESCs konnte eine positive chronotrope Reaktion auf die Zugabe von einem β-adrenergen Rezeptor Agonisten beobachtet werden. Die Zugabe von 1µM Isoproterenol (ISO) führte zu einer Steigerung der Kontraktionsfrequenz (**Abb.40A**), so dass die elektrischen Signale (engl., *spikes*) der Zellaggregate deutlich schneller ausgesendet wurden. Nach dem Zusetzen der Adrenalin strukturell sehr ähnlichen Substanz, nahm die Dauer der einzelnen *spikes* ab und resultierte in einer Reduktion des *inter-spike interval* (ISI). Der Anstieg in der Schlagfrequenz der RESC abgeleiteten Kardiomyozyten dauerte bis zum Auswaschen der Substanz an und kehrte anschließend zu den Kontrollbedingungen zurück (**Abb.40C**).

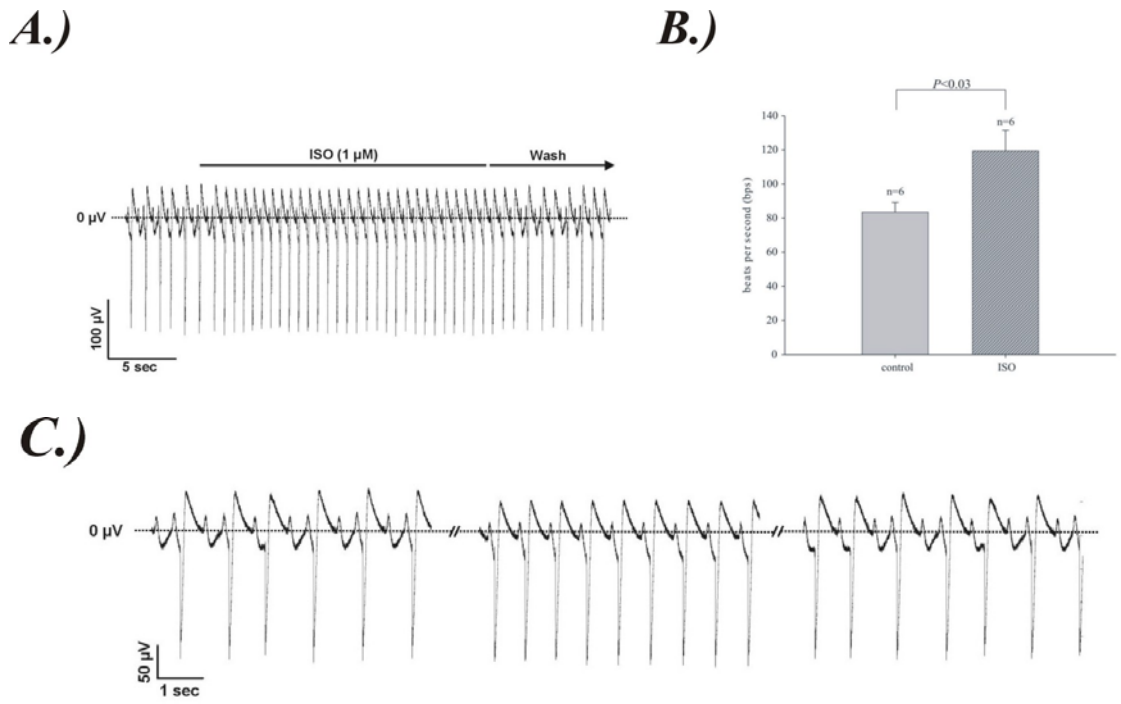

Abb. 40: β-adrenerge Stimulation kardial differenzierter RESCs. A.) Darstellung der FPs kardial differenzierter RESCs nach Zugabe von 1µM Isoproterenol (ISO). Die Zugabe von ISO führte zu einer Steigerung der Kontraktionsfrequenz. Dieses resultierte in einer Abnahme des *inter spike intervals* (ISI). Das Auswaschen des Agens führte zu einer Rückführung zu den Kontrollbedingungen. **B.)** Mittels ANOVA durchgeführte statistische Auswertung von A.). **C.)** Vergrößerte Abbildung von A.). Darstellung der Änderung des ISI unter Zugabe von ISO. Links: Kontrollbedingungen, Mitte: maximale Steigerung der Kontraktionsfrequenz nach der Zugabe von 1µM Isoproterenol, Rechts: Eintreten der Kontrollbedingungen nach dem Auswaschen des Agens. Aus Schwanke *et al.*, Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32.

Ein weiteres Charakteristikum von Herzmuskelzellen ist neben der chronotropen Reaktion auf die Zugabe von β-adrenergen Rezeptor Agonisten, eine damit in Zusammenhang stehende Veränderung der Aktivität der in der Plasmamembran von Kardiomyozyten positionierten L-Typ Ca^{2+}-Kanäle. Durch diese sich in einer Erhöhung der Schlagfrequenz äußernden Aktivierung, kann anhand der Morphologie des FP_{SLOW}-Bereiches in den aufgezeichneten Feldpotentialen eine direkte Aussage über die dementsprechende Aktivität der L-Typ Ca^{2+}-Kanäle gemacht werden. Die Zugabe von Iso führte wie erwartet zu einem signifikanten Anstieg in der FP_{SLOW}-Amplitude, so dass sich die Reizleitungsgeschwindigkeit zwischen den beiden kontrahierenden Arealen stark reduzierte (0,144±0,001s, n=3, P<0,05) (**Abb.41**). Zusätzlich zu der indirekt erzielten Veränderung der Aktivität der L-Typ Ca^{2+}-Kanäle durch die Zugabe von ISO, wurde ein direkter Einfluss durch den L-Typ Ca^{2+}-

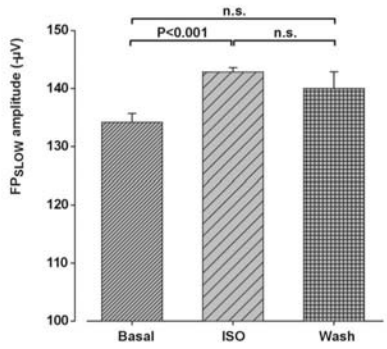

Abb. 41: Auswirkungen der Zugabe von ISO auf FP_{SLOW}

Kanal-Agonisten Bay-K 8644 untersucht. Eine Konzentration von 10µM Bay-K 8644 führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg in der FP_{SLOW}-Amplitude der aufgezeichneten Feldpotentiale.
Die Funktionalität der aus RESCs abgeleiteten Kardiomyozytenvorläuferzellen und reiferen Kardiomyozyten wurde eindeutig durch die verwendeten Methoden nachgewiesen. Des Weiteren wurde ein System etabliert, das erstmalig eine kardiale Differenzierung der primaten Stammzellinie 366.4 ermöglichte. Die Ergebnisse wurden in *Stem Cells*, Juni 2006 veröffentlicht.
Ein nächster Schritt war nun die Etablierung eines Kultivierungssystems, mit dem die bisherige Effizienz der kardialen Differenzierung der embryonalen Stammzellen von 18% kontrahierenden EBs deutlich erhöht werden konnte. Einige in der Literatur beschriebene Systeme, die zu einer gesteigerten Effizienz der Bildung kontrahierender Areale im Verlauf der Differenzierung embryonaler Stammzellen führen, basieren auf der Kokultivierung der RESC Zellen mit induzierend wirkenden Zellinien.

3.2.5 Kardiale Differenzierung der RESCs durch Kokultivierung

Innerhalb der Embryonalentwicklung sind die ersten mesendodermalen Vorläuferzellen eine auch als Hemangioblast beschriebene transiente Progenitorzellsubpopulation, die durch die Expression von *brachyury* (T) und Flk-1 *(Kdr)* charakterisiert ist [110, 111]. Im weiteren Verlauf der Entwicklung differenziert ein Teil dieser Subpopulation zu hämatopoetischen, endothelialen und Vorläuferzellen glatter Muskelzellen. *In vitro* wurde ein Potential dieser Progenitorzellen zur Differenzierung zu kardialem Mesoderm und zu reifen Kardiomyozyten nachgewiesen. Signalmoleküle, die durch viszerales (VE) und parietales (PE) extraembryonales Endoderm freigesetzt werden, wie zum Beispiel BMP2 , Activin A [110], SPARC [112] und Wnt-Inhibitoren wie *Dkk-1*, *Frizzled-8/Fc*, konnten als Induktoren dieser speziellen Entwicklung der ESCs identifiziert werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen erfolgte die Etablierung von Kokultivierungssystemen, die die induzierende Wirkung extraembryonaler Zellinien auf die Differenzierung mesendodermaler Vorläuferzellen zu kardialem Mesoderm und reifen Kardiomyozyten nutzen. Zu den bereits etablierten Systemen zählen die Kokultivierung von ESCs mit OP9 Stromazellen [37, 95, 113, 114] und END-2 Zellen, einer viszeralem Endoderm ähnlichen Zellinie [98].

3.2.5.1 Kokultivierung mit OP9 Stromazellen

Die murine Stromazellinie OP9 wurde 1994 von Nishikawa et *al*. aus *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF)-defizienten Mäusen isoliert. Die Kokultivierung embryonaler Stammzellen mit dieser murinen Zellinie ist ein bereits sehr gut charakterisiertes System zur Differenzierung von Stammzellen in Zelltypen mesodermalen Ursprungs. Neben der Bildung hämatopoetischer Zellen konnte eine effiziente kardiale Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen gezeigt werden. Die

Kokultivierung rekapituliert hierbei die *in vivo* Embryonalentwicklung mit einer beginnenden Differenzierung in mesodermale Vorläuferzellen (FLK-1$^+$), aus denen im weiteren Verlauf der Kultivierung Endothelzellen, Kardiomyozyten und hämatopoetischen Zelltypen entstehen.
Die Kokultivierung der RESCs wurde wie von Vodyanik et *al*. 2005 beschrieben eingeleitet [115]. Die Stammzellen wurden von ihren Feederzellen abgelöst, in Differenzierungsmedium B überführt und auf OP9 Stromazellen ausgesät. Es erfolgte keine Vordifferenzierung der RESCs durch Ausbildung von EBs. Das Differenzierungsmedium enthielt zusätzlich das auf die Bildung kontrahierender Areale abgestimmte FBS. Die Versuchansätze (n=4) wurden in einem Zeitraum von achtzehn Tagen täglich mikroskopisch ausgewertet und auf die Entstehung kontrahierender Areale überprüft.
Am ersten Tag der Differenzierung (d1) waren alle ausgesäten RESCs auf den OP9 Zellen adhäriert. Im Verlauf der nächsten Kultivierungstage (d2-d4) nahmen die embryonalen Stammzellen eine epitheloide Morphologie an und wuchsen in Form von Monolayern sehr stark aus. Die Aggregation der Zellen in Form von Kolonien ging sehr rasch verloren. Die OP9 Zellen wurden durch das vermehrte Wachstum der Stammzellen überwachsen und waren als solche nicht mehr eindeutig zu erkennen. Um den fünften Tag der Differenzierung (d5) bildeten sich in den epitheloiden Kolonien einige wenige zystische Strukturen aus. Die Entstehung kontrahierender Areale konnte während des gesamten Kultivierungszeitraums nicht beobachtet werden (**Abb.42**). Weitere Kokultivierungsversuche wurden nicht durchgeführt.

3.2.5.2 Kokultivierung mit END-2 Zellen

Die Zellinie END-2 wurde 1991 von Mummery et *al*. aus der murinen embryonalen Karzinomazellinie P19 etabliert. Die Zellen zeigen viele Eigenschaften von viszeralem Endoderm (VE). Die Induktion einer kardialen Differenzierung embryonaler Stammzellen durch Kokultivierung mit END-2 Zellen wurde bereits für murine und humane ESCs publiziert. Eine Steigerung der induzierenden Wirkung der END-2 Zellen wurde durch die Verwendung eines serumfreien Mediums während der Kokultivierungsversuche erreicht. Eine genaue Charakterisierung der induzierenden Wirkung des Systems fand bisher nicht statt.

Die Kokultivierung der RESCs wurde, wie von Mummery et *al*. 2003 beschrieben, eingeleitet [116, 117]. Die Stammzellen wurden wie zum Passagieren von ihren Feederzellen abgelöst, in Differenzierungsmedium A überführt und auf einen inaktivierten Monolayer aus END-2 Zellen ausgesät. Die Induktion der Differenzierung erfolgte ab d0 durch die Kokultur mit den END-2 Zellen. Es erfolgte keine Vordifferenzierung der RESCs durch Ausbildung von EBs. Das Differenzierungsmedium enthielt zusätzlich das auf die Bildung kontrahierender Areale abgestimmte

FBS. Die Versuchansätze (n=3) wurden in einem Zeitraum von einundzwanzig Tagen täglich mikroskopisch ausgewertet und auf die Entstehung kontrahierender Areale überprüft.

Am ersten Tag nach der Initiierung der Kokultur (d1) waren alle ausgesäten RESCs auf dem Monolayer aus END-2 Zellen adhäriert. Im Verlauf der nächsten Kultivierungstage (d2-d5) wuchsen die Stammzellkolonien unwesentlich flächig aus und behielten so eine Kolonie-ähnliche dreidimensionale Morphologie bei, so dass eine Zuordnung in Zellaggregate erfolgen konnte. Um den sechsten Tag der Differenzierung (d6) manifestierte sich die Differenzierung der RESCs zu epitheloiden Zellen, die im weiteren Verlauf der Differenzierung in einigen Bereichen zu zystischen Strukturen differenzierten. Diese morphologischen Veränderungen entsprachen den publizierten Beobachtungen von Mummery et *al*. Erste kontrahierende Areale konnten am elften Tag der Differenzierung (d11) beobachtet werden. Ihre Bildung korrelierte mit dem Vorhandensein der zystischen Strukturen. Am einundzwanzigsten Tag der Differenzierung lag die Effizienz mit der die RESCs kardial differenzierten bei 13% kontrahierender Areale (**Abb.42**). Mummery et *al.* konnte 2003 durch die Kokultivierung der humanen Stammzellinie hES2 eine kardiale Differenzierung erzielen, die zuvor im Verlauf einer spontanen Differenzierung der Zellinie nicht erreicht werden konnte. Die Effizienz mit der die HESCs zu Kardiomyozyten differenzierten lag bei 35±10% kontrahierenden Arealen. Im Gegensatz hierzu führte die Induktion der END-2 Zellen im Falle der RESCs zu keiner Verbesserung der Effizienz der kardialen Differenzierung (18% bei FBS supplementierter Differenzierung versus 13% bei Kokultivierung mit END-2 Zellen). Die Ergebnisse von Mummery et *al*. konnten somit nicht auf die RESCs übertragen werden. Weitere Kokultivierungsversuche in einem serumfreien Differenzierungsmedium wurden nicht durchgeführt.

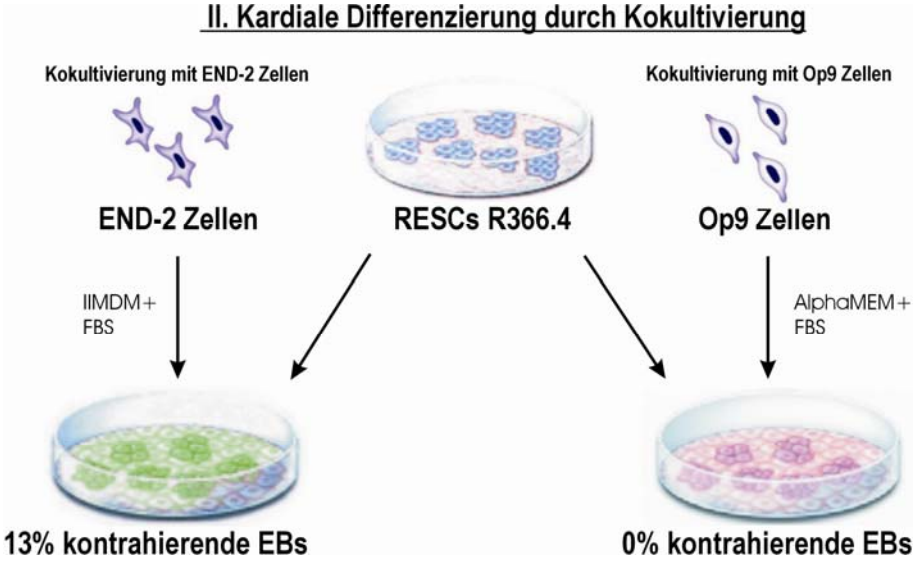

Abb. 42: Induktion einer gerichteten kardialen Differenzierung der RESCs durch Kokultivierung mit den Zellinien OP9 oder END-2. Zur Initiierung der jeweiligen Kokultur wurden die RESCs wie zum Passagieren von ihren Feederzellen abgelöst und auf einen Monolayer aus OP9 bzw. END-2 Zellen überführt. Die Auswertung der Versuche erfolgte rein optisch anhand der Bildung kontrahierender Areale.

3.2.5.3 Kokultivierung mit OP9 und END-2 Zellen

Die Ergebnisse zu den Kokultivierungsversuchen der RESCs mit der OP9 Stromazellinie und der VE-ähnlichen Zellinie END-2 führten zu der Überlegung, die induzierenden Wirkungen der beiden Zellinien in einer zeitlichen Abfolge miteinander zu kombinieren.

Yamashita et *al.* zeigte 2005, dass für einen positiven induzierenden Effekt der OP9 Zellen ein Zell-Zell-Kontakt mit den embryonalen Stammzellen notwendig ist. Durch das Kokultivierungssystem konnte neben der Induktion der Bildung von Flk-1$^+$ Zellen, die Umwandlung von Flk-1$^-$ in Flk-1$^+$ Zellen als Marker für mesodermale Vorläuferzellen gezeigt werden. Des Weiteren konnte Yamashita et *al*. keine kardiale Differenzierung durch Faktoren wie BMP2 und BMP4 induzieren. Die Zugabe des Wnt-Inhibitors *Dkk-1* zu unterschiedlichen Zeitpunkten führte zu verschiedenen Resultaten. Wurde der Inhibitor in frühen Versuchstadien der Kokultivierung zugesetzt (d0-d2), kam es zu einer reduzierten kardialen Differenzierung. Im Gegensatz hierzu führte eine spätere Gabe (d3-d4) zu einer gesteigerten Effizienz der Bildung kontrahierender Areale [96].

Anhand dieser Erkenntnisse, wurde die Induktion der Differenzierung der RESCs in mesodermale Vorläuferzellen zunächst durch die Kokultivierung mit der Stromazellinie initiiert und im weiteren Verlauf der Kultivierung wurde der induzierende Effekt der VE-ähnlichen Zellinie END-2 genutzt.

Um eine Differenzierung der RESCs zu induzieren, wurden die Kolonien von ihren Feederzellen abgelöst, in Differenzierungsmedium B aufgenommen, mit OP9 Zellen vermischt und in mit Agarose überschichtete Zwölf Loch-Platten überführt. Innerhalb einer zweitägigen Suspensionskultivierung (d0-d2) bildete das Gemisch aus Zellen pro Vertiefung der Zwölf-Loch-Platte je einen großen EB aus, der am zweiten Tag der Differenzierung (d2) auf inaktivierte END-2 Zellen überführt wurde (**Abb.43**).

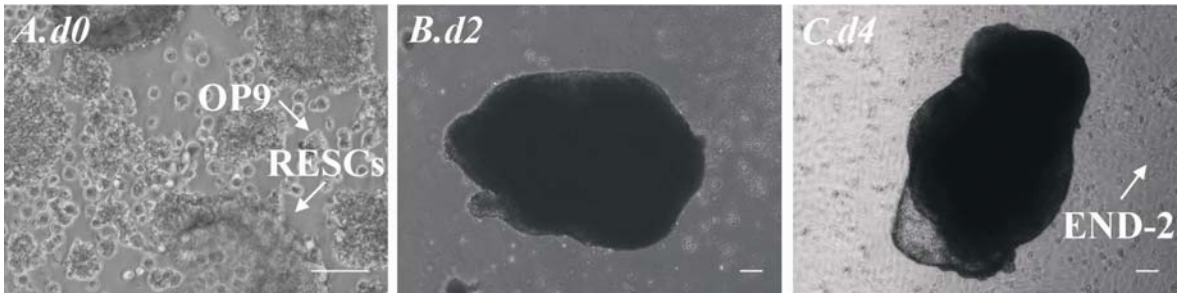

Abb. 43: Initiierung der Kokultivierung von RESCs, OP9 Stromazellen und der VE-ähnlichen Zellinie END-2. A.) Tag der Differenzierungseinleitung (d0) durch Vermischung von RESCs und OP9 Zellen in einem Verhältnis von 2:1. **B.**) Ausbildung eines einzelnen EBs pro Vertiefung einer Zwölf-Loch-Platte. Dargestellt am zweiten Tag der Differenzierung (d2). **C.**) Bei der Aussaat der EBs auf inaktivierte END-2 Zellen am zweiten Tag der Differenzierung (d2) wies der größte Teil der Zellaggregate bereits zystische Strukturen auf. Skalierung, 100µm.

Drei Tage nach dem Ausplattieren der Zellaggregate (d5) waren alle ausgesäten EBs auf den END-2 Zellen festgewachsen. Im Verlauf der Kultivierung wuchsen die differenzierten Zellen kaum aus den Zellverbänden aus. Die ausgewachsenen Zellen hatten eine epitheloide Morphologie und bildeten im Laufe der Zeit einige zystische Strukturen aus (**Abb.44**).

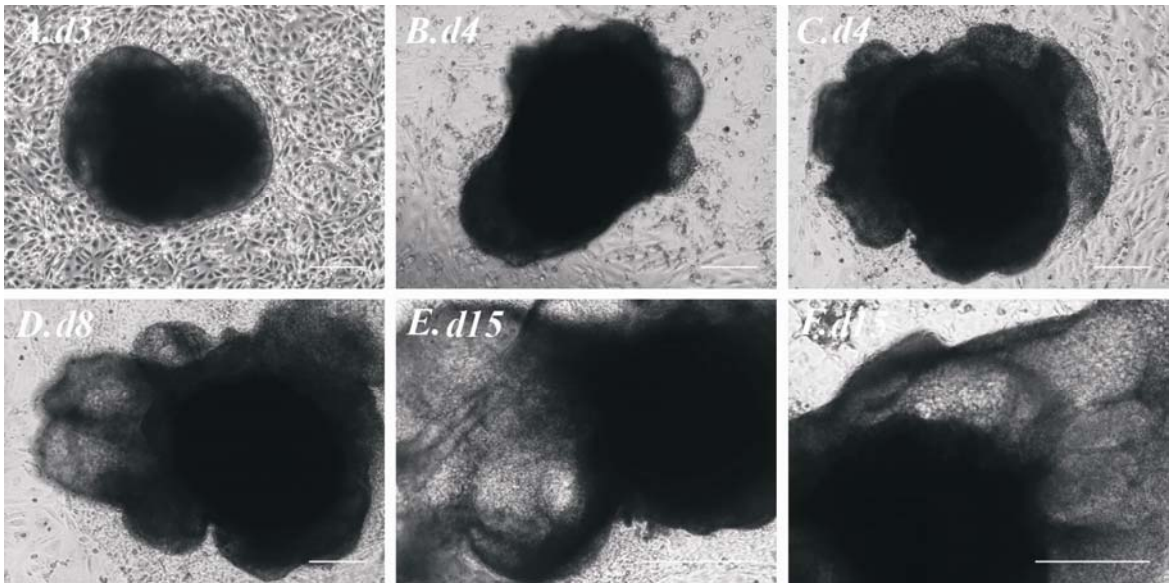

Abb. 44: Effiziente kardiale Differenzierung durch Kokultivierung der RESCs mit OP9 und END-2 Zellen. A.) Zellaggregat aus RESCs und OP9 Zellen einen Tag nach der Aussaat auf inaktivierte END-2 Zellen. **B.-C.**) Der größte Teil der EBs hatte während der Suspensionskultivierung zystische Strukturen ausgebildet. **D.-F.**) Erste kontrahierende Areale waren am achten Tag der Differenzierung (d8) zu beobachten und korrelierten häufig mit dem Vorhandensein zystischer Strukturen in den EBs. Im Verlauf der Kultivierung wuchsen epitheloide Zellen aus den Zellverbänden aus. Skalierung, 100µm.

Am achten Tag der Differenzierung (d8) begannen einige Bereiche in den EBs zu kontrahieren (**Abb.44**). Wie auch bei der spontanen durch FBS induzierten Differenzierung kontrahierten die Bereiche zunächst unregelmäßig mit geringer Frequenz und reagierten sehr schnell durch das Einstellen ihrer Kontraktionen auf geringste Abweichungen von der im Inkubator vorherrschenden Temperatur. Im zeitlichen Verlauf der Differenzierung wurden die Schlagfrequenzen beständiger und die Anzahl der kontraktilen Areale der ausgewachsenen Zellaggregate nahm im Differenzierungsverlauf stetig zu. Sie erreichte am zwölften Tag (d12) mit 90% kontrahierender EBs ein Maximum (n=12 EBs). Durch die vermehrte Bildung kontrahierender Bereiche in den EBs schien es, als ob die Zellverbände als eine Einheit schlugen.

Der Auswertungszeitraum des Versuchs belief sich auf einundzwanzig Tage. Die Charakterisierung der Versuchsansätze basierte ausschließlich auf der morphologischen Bestimmung der gebildeten kontraktilen Areale. Im Gegensatz zu der separaten Kokultivierung der RESCs mit den OP9 und END-2 Zellen, die nicht zu den erhofften Ergebnissen der Steigerung der Effizienz der Entstehung von Kardiomyozyten geführt hatte, konnte durch eine Kombination der beiden Systeme die Bildung kontraktiler Areale von 18% auf 95% angehoben werden. Damit ist das neu etablierte Differenzierungssystem deutlich effizienter als alle bisher für primaten embryonale Stammzellen ,einschließlich humaner ESCs, publizierte Protokolle (**Abb.45**).

Um die Methoden der spontanen Differenzierung und durch Kokultivierung erzielten Differenzierung direkt miteinander vergleichen zu können, muss anstelle einer Bestimmung kontraktiler Areale das Auszählen der gebildeten Kardiomyozyten folgen. Die Vereinzelung differenzierter Zellen aus ausgewachsenen EBs stellte allerdings bisher ein sehr großes Problem dar. Die gebildeten Zellen zeigen eine ausgeprägte Bildung einer extrazellulären Matrix, die die Zellen untereinander verbindet. Ein Protokoll zur Lösung des Problems befand sich zum Zeitpunkt der Versuche in der Etablierungsphase.

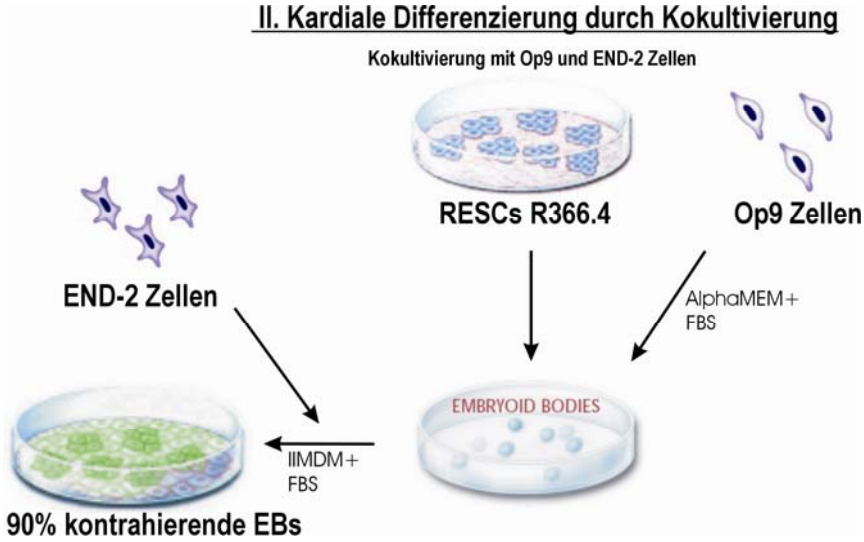

Abb. 45: Induktion einer gerichteten kardialen Differenzierung der RESCs durch Kokultivierung mit den beiden Zellinien OP9 und END-2. Zur Initiierung der Kokultur wurden die RESCs wie zum Passagieren von ihren Feederzellen abgelöst und mit OP9 Zellen (in einem Verhältnis von 2:1) in eine Suspensionskultur überführt. Am zweiten Tag der Differenzierung (d2) wurden die gebildeten EBs auf einen Monolayer aus END-2 Zellen überführt. Die Auswertung der Versuche erfolgte rein optisch anhand der Bildung kontrahierender Areale.

Nichtsdestotrotz wurden weitere Experimente durchgeführt, um den zu Grunde liegenden Mechanismus der extrem effizienten Differenzierung zu erklären. Neben dem Einfluss der zur Kokultur verwendeten Zellinien OP9 und END-2, stellte die Größe der in Suspension gebildeten EBs einen wichtigen Versuchsparameter dar. Miki et *al.* zeigte bereits 1999, dass die Größe der Zellaggregate zum Zeitpunkt der Differenzierung Auswirkungen auf die Reifung der EBs und als Folge davon der Entstehung bestimmter Zelltypen hat. Erst ab einer bestimmten Größe der Zellverbände kommt es zur Ausbildung VE-ähnlicher Zellen in der äußeren Peripherie der Aggregate, die im weiteren Verlauf der Kultivierung durch freigesetzte Faktoren insbesondere auf eine mesodermale Differenzierung induzierend wirken. Da durch die Kokultivierung mit OP9-Zellen im Vergleich zum Standard-Differenzierungsprotokoll extrem große EBs generiert wurden, lag es nahe, den Einfluss der EB-Größe innerhalb des OP9-END-2-Induktionsprotokolls zu untersuchen (Siehe Tabelle 14).

In diesem Zusammenhang wurden die folgenden Versuchsansätze durchgeführt:

Tabelle 14: Kontrollexperimente zur Kokultivierung der RESCs mit OP9 und END-2 Zellen

Kontrollansatz	**Fragestellung**
RESC+OP9 (Verhältnis 2:1) **Diffrenzierungsinduktion:** d0-d2 Suspensionskultur **Weitere Differenzierung:** ab d2 Kultivierung auf END-2	OP9-END2-Induktionsprotokoll zur effizienten kardialen Differenzierung der RESCs R366.4
1. RESC+OP9 (Verhältnis 2:1) **Differenzierungsinduktion:** d0-d2 Suspensionskultur **Weitere Differenzerung:** ab d2 Kultivierung auf 0,1%iger Gelatine	Welchen Einfluss hat die Stromazellinie OP9 auf die effizient kardiale Differenzierung?
2. RESC **Differenzierungsinduktion:** d0-d2 Suspensionskultur **Weitere Differenzierung:** ab d2 auf END-2	Welchen Einfluss hat die Zellinie END-2 auf die effiziente kardiale Differenzierung?
3. RESC **Differenzierungsinduktion:** d0-d2 in *Hanging Drop* (**groß**) **Weitere Differenzierung:** ab d2 Kultivierung auf END-2	Welchen Einfluss hat die initiale Größe der EBs auf die weitere kardiale Differenzierung auf END-2?
4. RESC **Differenzierungsinduktion: d0-d2** in *Hanging Drop* (**groß**) **weitere Differenzierung:** ab d2 Kultivierung auf 0,1%iger Gelatine	Welchen Einfluss hat die initiale Größe der EBs auf die kardiale Differenzierung?
5. RESC **Differenzierungsinduktion**: in *Hanging Drop* (**klein**) **Weitere Differenzierung:** ab d2 Kultivierung auf END-2	Welchen Einfluss hat die initiale Größe der EBs auf die weitere kardiale Differenzierung auf END-2?
6. RESC **Differenzierungsinduktion:** in *Hanging Drop* (**klein**) **Weitere Differenzierung:** ab d2 Kultivierung auf 0,1%iger Gelatine	Welchen Einfluss hat die initiale Größe der EBs auf die kardiale Differenzierung?

Die Versuche wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation ausgearbeitet, in Zusammenarbeit mit Frau Diplom Biotechnologin Ruth Olmer durchgeführt und dreimal reproduziert. Es zeigte sich, dass es in den Versuchsansätzen 3.-6. nicht, oder nur sehr sporadisch, zu der Ausbildung von kontrahierenden Arealen kam. Die Effizienz ging somit gegen 0% kontrahierende Areale. Die Effizienz mit der es zur Ausbildung kontrahierender Areale im Versuchsansatz 1. kam betrug 16%. Dieses entspricht in etwa der erreichten Effizienz in Ansatz 2. von 13% kontrahierenden Arealen. Die Auswertung der Kontrollansätze zeigte somit, dass in dem OP9-END2-Induktionsprotokoll weder die Zellinien für sich, noch die Größe der EBs alleine zu der erhöhten Effizienz der kardialen Differenzierung der RESCs führten. Lediglich die Kokultivierung der RESCs als eine zeitliche und räumliche Kombination der beiden Zellinien OP9 und END-2 in Verbindung mit dem durchgeführten Differenzierungsprotokoll führten zu der gesteigerten kardialen Differenzierung der embryonalen Stammzellen.

3.2.6 Differenzierung der RESCs Linie 366.4 zu trophoektodermalen Zellen

Während des Kultivierungszeitraums von einundzwanzig Tagen kam es im Kontrollansatz 1. zunächst zu der vermehrten Bildung von epitheloiden Zellen (**Abb.46**), die sich4 im weiteren Verlauf der Differenzierung zu flüssigkeitsgefüllten Strukturen (Zysten) entwickelten. Diese konnten zuvor nicht in Kulturen ausdifferenzierter RESCs beobachtet werden (**Abb.47**). Zystische Strukturen werden von unterschiedlichen Epithelzelltypen gebildet. Die Ausbildung der Zysten erfolgt durch einen gesteuerten Flüssigkeitstransport. Solche Prozesse sind auch für frühe trophoektodermale Zellen beschrieben, wo sie die Grundlage für die Blastozystenbildung darstellen.

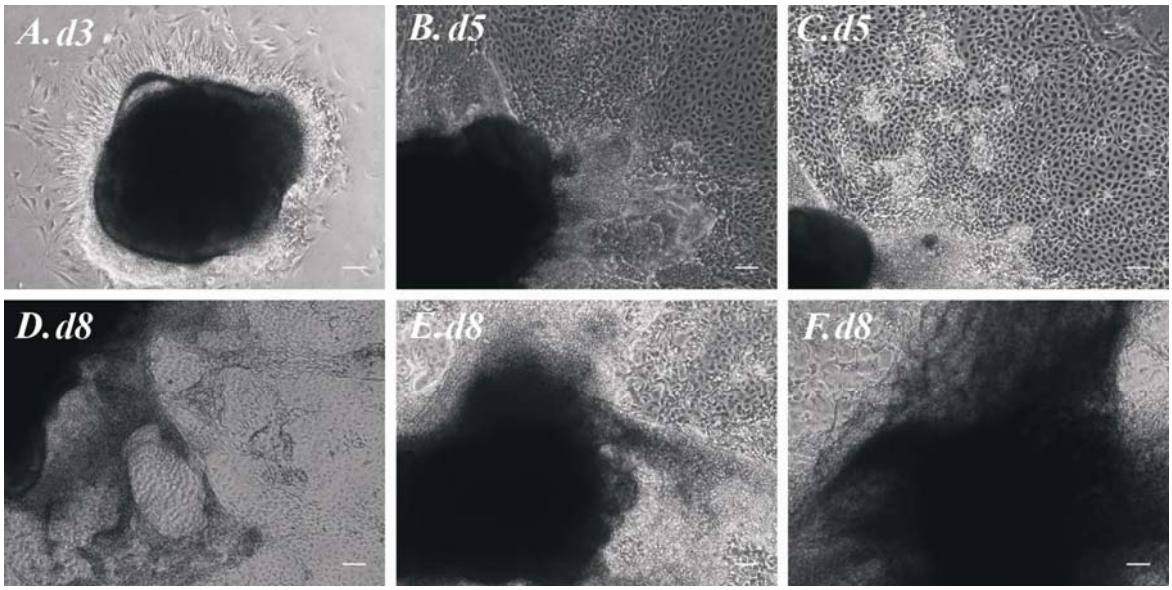

Abb. 46: Morphologische Veränderungen der differenzierten RESCs in Kontrollansatz 1. Die Einleitung der Differenzierung erfolgte durch eine zweitägige Suspensionskultivierung von RESCs und OP9 Zellen mit anschließender Kultivierung auf 0,1%iger Gelatine. **A.**) Bereits am ersten Tag der nach dem Ausplattieren der EBs (d3) waren alle EBs adhärent und begannen auszuwachsen. **B.-F.**) Im Verlauf der nächsten Kultivierungstage bildeten sich zunächst vermehrt epitheloide Zellen, die im Verlauf der Differenzierung zu zystischen Strukturen differenzierten. Skalierung, 100µm.

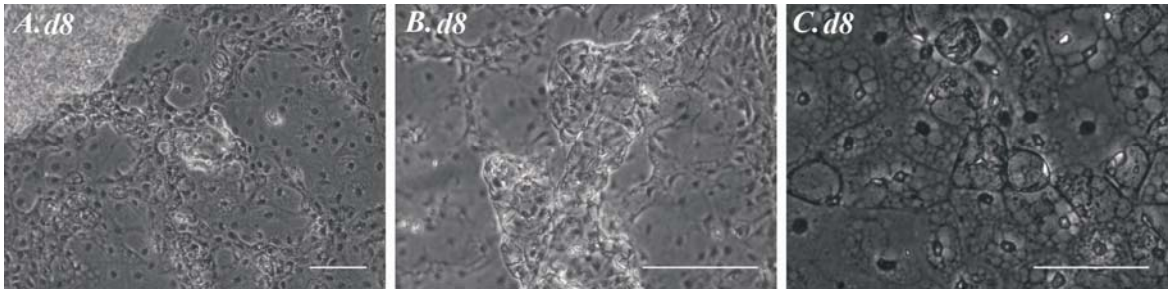

Abb. 47: Bildung flüssigkeitsgefüllter Strukturen in Kontrollansatz 1. A.-C.) Am achten Tag der Differenzierung (d8) kam es zu der Bildung erster flüssigkeitsgefüllter Strukturen, deren Anteil im weiteren Verlauf der Kultivierung drastisch zunahm. Skalierung 100µm.

3.2.6.1 Morphologische Charakterisierung der zystenartigen Strukturen

Die Bildung zystenartiger Strukturen wurde zunächst im Zusammenhang mit Kokultivierungsversuchen der RESCs, OP9 Stromazellen und END-2 Zellen im Rahmen der Versuche zur effizienten kardialen Differenzierung beobachtet. Im Gegensatz zu dem Protokoll unter Standard-Differenzierungsbedingungen wurden die EBs zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt ausplattiert. Eine Ausreifung der Zellen in den Zellaggregaten wurde durch den verkürzten von sieben auf zwei Tage Zeitraum der Suspensionskultivierung frühzeitig unterbrochen. Das Ausplattieren der EBs des Kontrollansatzes 1. als ein Gemisch aus RESCs und OP9 Zellen (siehe Tabelle 14) am zweiten Tag der Differenzierung (d2) auf 0,1%ige Gelatine, führte ab dem achten Tag der Differenzierung (d8) zu der Bildung von blasenartigen Strukturen. Im weiteren Verlauf der Differenzierungen kam es des Weiteren zu der Ausbildung von Monolayern von Zellen, die einzelne zystische Gebilde formten. Eine Widerholung der Versuche ohne OP9 Zellen, führte zu einer Reproduktion der Ergebnisse. Die Art der Differenzierung als Resultat des induzierenden Einflusses der Stromazellen wurde somit ausgeschlossen.

Die zystenbildenden Zellen nahmen in den Kulturen verschiedenen Morphologien an. Zum einen wuchsen sie in Form von Monolayern und zum anderen bildeten sie Strukturen, deren Morphologie optisch an Blastozytsen mit einer äußeren Zellmasse (Trophoektoderm) und einer inneren Zellmasse (Embryoblast) erinnerte. Die Strukturen waren meist polar mit den Monolayern verbunden und konnten durch Bewegungen der Zellkulturplatte mit dem Zellkulturmedium bewegt werden (**Abb.48**). Ihre Größe variierte stark. Sowohl kleinere als auch größere derartige Strukturen waren in den Kulturen enthalten. Das Auftreten der blasigen Strukturen konnte ab dem achten Tag der Differenzierungen (d8) beobachtet werden. Während des Kultivierungszeitraums behielten sie ihre Morphologie bei. Optische Veränderungen konnten innerhalb der mikroskopischen Auswertung nicht festgestellt werden. Die Anzahl der im Monolayer wachsenden Zellen nahm im zeitlichen Verlauf zu.

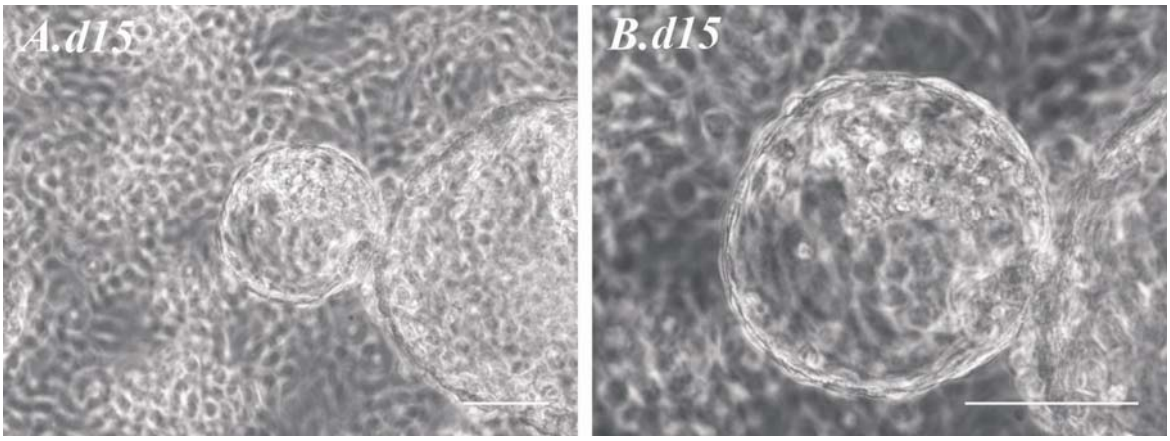

Abb. 48: *In vitro* **Bildung blastozystenartiger Strukturen in Kontrollansatz 1**. **A.-B.)** Neben der Entstehung von flüssigkeitsgefüllten Strukturen, die in Form von Monolayern wuchsen, kam es zu der Bildung blastozystenartiger Strukturen, die eine Morphologie mit einer äußeren und inneren Zellmasse aufwiesen.

3.2.6.2 Immunhistologische Analyse trophoektodermal differenzierter RESCs

Bereits 2002 wurde von Thomson et *al.* berichtete, dass humane embryonale Stammzellen die Fähigkeit aufwiesen, in Trophoblasten zu differenzieren. Die Differenzierung erfolgte gerichtet unter dem Einfluss von BMP4 und konnte für vier Stammzellinien gezeigt werden. Des Weiteren gelang es Harun et *al*. 2006 die ersten Cytotrophoblastenstammzellinien aus HESCs zu etablieren. Basierend auf diesen Erkenntnissen, war es nahe liegend, die generierten Zysten bildenden Zellen auf die Expression von Trophoblastenmarkern zu untersuchen.

Für die immunhistologische Analyse der Differenzierungsansätze wurden die Versuchsansätze am einundzwanzigsten Tag einer Differenzierung mit den Antikörpern anti-*Cytokeratin-EndoA* (TROMA-1) (**Abb.49, Abb.50**) und *caudal type homeobox transcription factor* 2 (Cdx2) (**Abb.51**) gegen trophoektodermspezifische Proteine inkubiert.
Zelltypen verschiedener Morphologien zeigten eine Immunreaktivität gegenüber dem TROMA-1 Antikörper. Die, durch die Färbung hervorgerufene, Kontrastierung des Zytoskeletts verdeutlichte den strukturellen Aufbau der in den Monolayern vorliegenden trophoblastenartigen Zellen (**Abb.49**). Es handelte sich um runde Zysten mit einem im die Zyste umgebenden Zellkorpus gelegenem Zellkern (dargestellt durch eine Kernfärbung mit DAPI). Da TROMA-1 ebenfalls ein Marker für extraembryonales Endoderm ist, wurde mit einem endodermspezifischen Antikörper gegengefärbt. Die TROMA-1 positiven Zelltypen zeigten keine Immunreaktivität gegenüber anti-*alpha fetoprotein* (AFP) und konnten somit eindeutig der trophoektodermalen Linie zugeordnet werden. Die Überprüfung der Funktionalität des anti-AFP Antikörpers erfolgte durch die Anfärbung von END-2 Zellen (**Abb.51**).

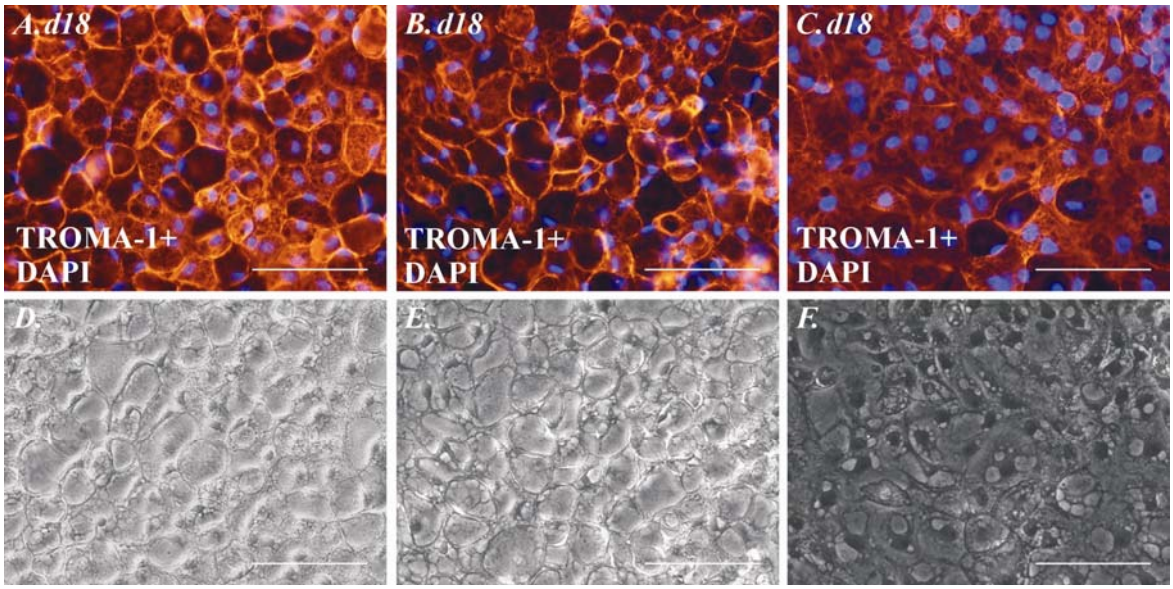

Abb. 49: RESC-abgeleitete Trophoblasten zeigten eine ausgeprägte Immunreaktivität gegenüber Cytokeratin-EndoA (TROMA-1) (d21). A.-C.) Nach einer zweitägigen Suspensionskultivierung in Differenzierungsmedium A wurden die EBs auf 0,1%ige Gelatine ausplattiert. Im Laufe der weiteren Kultivierung bildeten sich neben blastozystenartigen Strukturen ab dem achtzehnten Tag (d18) Monolayer aus trophoblastenartigen Zellen aus. Die Zellen zeigten eine ausgeprägte Immunreaktivität gegenüber anti-TROMA-1. Eine anti-Alpha Fetoprotein (AFP) Färbung führte zu keiner Reaktion (D.-F. korrespondierende Phasenkontrastaufnahmen). Skalierung 100µm.

Neben den trophoblastenartigen Zellen waren polynukleine Zellen positiv für anti-TROMA-1 (**Abb.49**). Möglicherweise repräsentierten sie multinukleare Trophoblasten-Riesenzellen oder andere Trophoblastensubtypen, die durch eine weiter schreitende Differenzierung der Trophoblasten gebildet werden. Diese *in vitro* Differenzierung von Trophoblasten Stammzellen (TS) tritt z.B. als Folge des Fehlens von FGF4 im Zellkulturmedium auf.

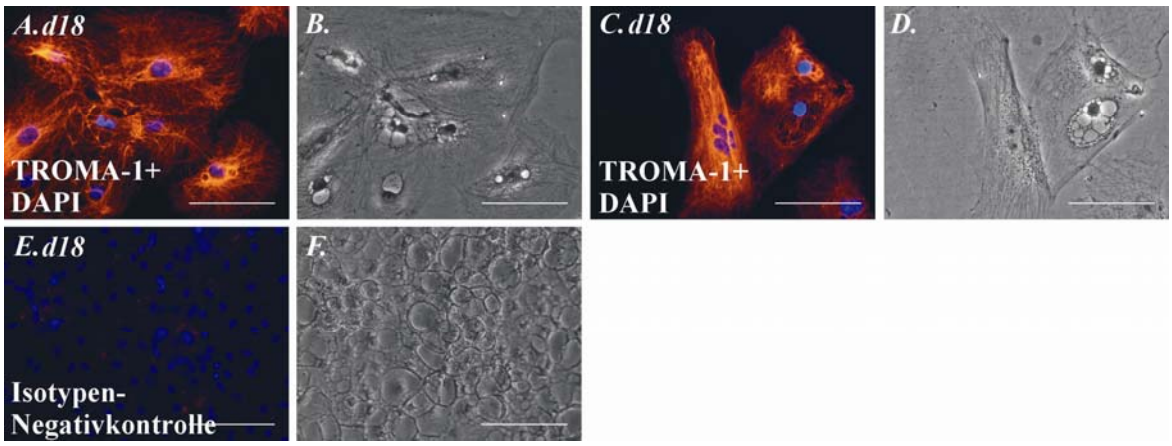

Abb. 50: Neben den trophoblastenartigen Zellen enthielten die Kulturen TROMA-1 positive, polynukleine Zellen. A., C.) Zellen, die mehrere Zellkerne enthielten zeigten ebenfalls eine Immunreaktivität gegenüber anti-TROMA-1 (B., D., korrespondierende Phasenkontrastaufnahmen). **E.-F.**) Isotypen Negativkontrolle. Skalierung 100µm.

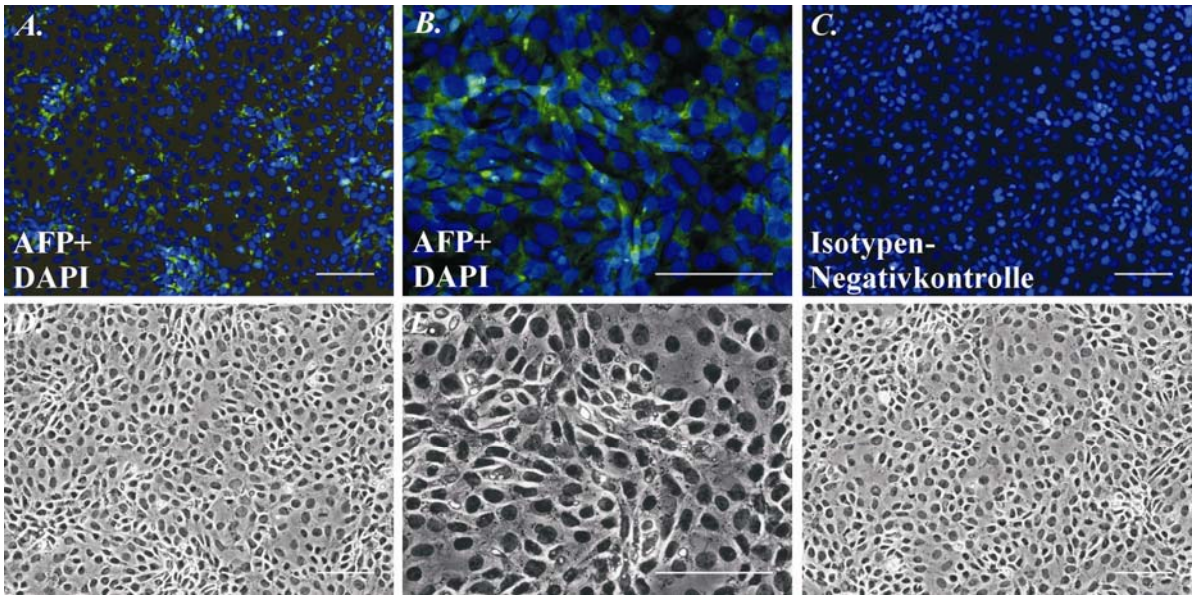

Abb. 51: END-2 Zellen zeigen eine ausgeprägte Immunreaktivität gegenüber anti-AFP. A.-B.) Nachweis der Expression von AFP in END-2 Zellen unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (A.-B. grün, D.-E. korrespondierende Phasenkontrastbilder, Klon MAB1368, R&D Systems). **C.,F.**) Korrespondierende Isotypen Negativkontrolle. Die Gegendarstellung erfolgte durch die Anfärbung mit DAPI. Skalierung, 100µm.

In Vorbereitung auf elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden Trophoblasten am einundzwanzigsten Tag (d21) fixiert und entsprechend vorbereitet. Die Cdx2-Färbung der RESC abgeleiteten Trophoblasten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Denker (Institut für Anatomie, Universität Essen). Dazu wurden Ultradünnschnitte angefertigt und mit einem trophoektodermspezifischen anti-Cdx2 Antikörper inkubiert. Die oberste Schicht der Zellen zeigte eine ausgeprägte Immunreaktivität gegenüber dem verwendeten Antikörper (**Abb.52**). Analysiert wurden Randbereiche der differenzierten Kulturen, die keine zystischen Strukturen enthielten.

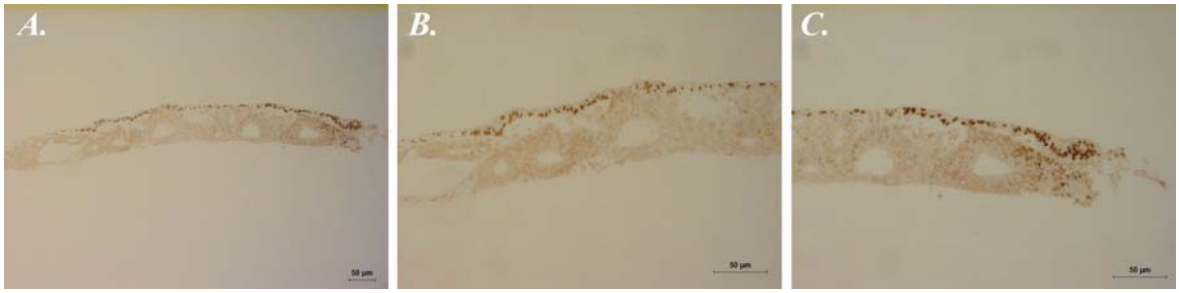

Abb. 52: Nachweis des trophoblastenspezifischen Transkriptionsfaktors Cdx2 in differenzierten RESCs4. A.-C.) Die Ultradünnschnitte zeigen, dass einige Zellen in der oberen Zellschicht eine Immunreaktivität gegenüber anti-Cdx2 aufweisen.

3.2.6.3 RT-PCR Analyse auf die Expression trophoektodermaler Markergene im Verlauf der Differenzierung

Im Rahmen der Doktorarbeit konnten lediglich erste Analysen zu der Expression trophoektodermaler Markergene durchgeführt werden. Überprüft wurde die Expression von *chorionischem gonadotropin* (alpha, αhCG), *caudal type homeobox transcription factor 2* (Cdx2) und *eomesodermin* (Eomes). Die zur Analyse verwendeten Oligonukleotide waren speziesspezifisch. Die korrespondierenden murinen Sequenzen wurden nicht amplifiziert. Abgeglichen wurde die Expression am fünfzehnten und einundzwanzigsten Tag der Differenzierung (RhEBd15, RhEBd21) gegen undifferenzierte RESCs (RESCs) und kardial differenzierte Kulturen (RhEBd21¤). Bereits in undifferenzierten RESCs konnte eine schwache Expression des chorionischen Gonadotropins detektiert werden, die im Verlauf der kardialen Differenzierung und mehr noch in der Differenzierung zu Zelltypen trophoektodermaler Linien zunahm. Dieses Ergebnis spiegelte sich in dem Expressionsmuster von Cdx2 wieder. Eine Expression von Eomes zeigten ausschließlich die Differenzierungsansätze der trophoektodermalen Linien (**Abb.53**).

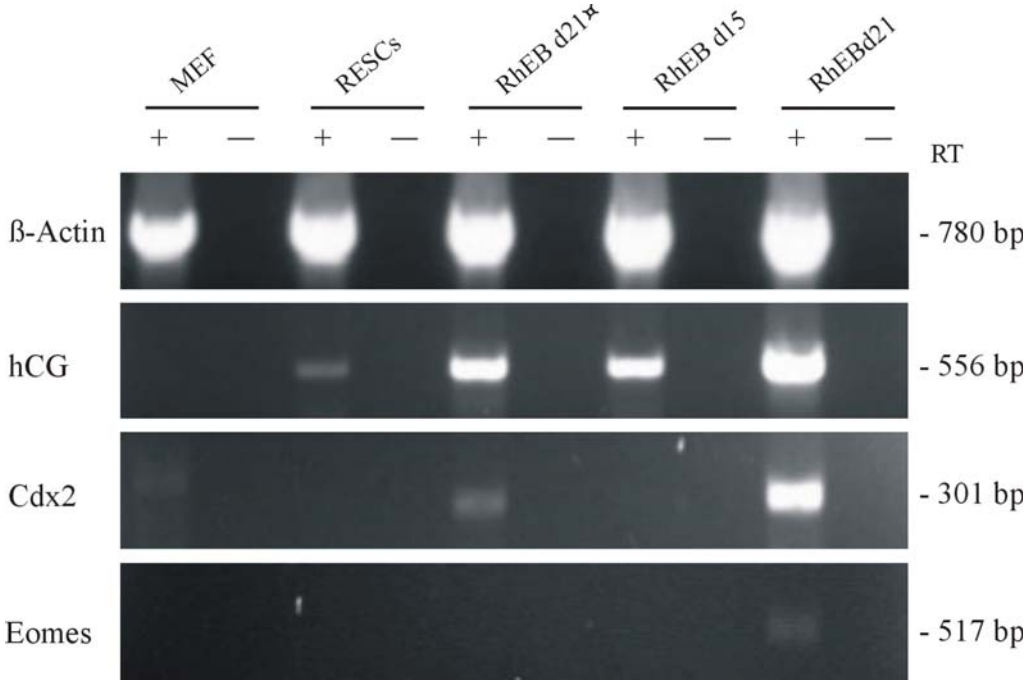

Abb. 53: Expression trophoektodermaler Markergene in differenzierten RESCs. Vergleichend dargestellt ist die Expression trophoektodermaler Marker in kardial differenzierten RESCs und Kulturen mit trophoblastenartigen Zellen. Abgeglichen wurde gegen undifferenzierte RESCs.

4. Diskussion

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems zählen zu den häufigsten Todesursachen in den industrialisierten Ländern. Zur Umsetzung myokardialer Zelltherapien fehlen bislang geeignete und in ausreichendem Umfang verfügbare Zellquellen.

Obwohl ethisch nicht unumstritten, stellen embryonale Stammzellen eine der potentiellen Zellquellen zur Restauration geschädigten Myokards oder angeborener Anomalien des Herzens dar. Darüber hinaus bieten sie sich als hervorragendes Modellsystem für das Studium der Herzentwicklung und Herzregeneration an.

Während viele der im Hinblick auf potentielle klinische Anwendung relevanten Fragestellungen an humanen embryonalen Stammzellen untersucht werden können, müssen andere Untersuchungen z.B. zu immunologischen Aspekten oder zum Risiko der Teratombildung in allogenen Transplantationsmodellen analysiert werden.

Hier bieten sich embryonale Stammzellen vom Rhesusaffen (RESC) als Alternative an. RESCs ähneln HESCs in vielen Bereichen. Sie exprimieren dieselben Markergene undifferenzierter pluripotenter Stammzellen, zeigen ein vergleichbares Kultur- und Differenzierungsverhalten und weisen ebenfalls eine hohe genetische Stabilität auf. RESCs und RESC-abgeleitete Kardiomyozyten ermöglichen im Gegensatz zu HESCs die Etablierung allogener Transplantationsmodelle für eine auf embryonalen Stammzellen basierende Zelltherapie.

Einen großen Bereich der vorliegenden Promotion nahm zunächst der Aufbau eines geeigneten Kultivierungssystems der RESCs ein. Die Kultivierung embryonaler Stammzellen von Primaten wie zum Beispiel humane embryonale Stammzellen oder auch embryonale Stammzellen aus dem Rhesusaffen stellt sich deutlich schwieriger dar, als die Kultur muriner embryonaler Stammzellen. Die Zellen reagieren mit erhöhter Sensitivität auf kleinste Schwankungen in der Zusammenstellung der Kulturmedien und auf Änderungen der Protokolle zur Zellkultivierung. Im Verlauf der Promotion erfolgten Optimierungen der ursprünglichen israelischen Protokolle, die den Umgang mit den RESCs erleichterten und so die Basis für alle weiteren Versuche schufen.

Ausschlaggebend für die erfolgreiche Optimierung war unter anderem die Detektion eines Mykoplasmenbefalls der verwendeten RESCs. Verbunden mit einer erfolgreichen Mykoplasmenbehandlung führte er zu einer dramatischen Verbesserung des Kultivierungsverhaltens der Zellen.

Kontaminationen durch die kleinsten sich selbst replizierenden Prokaryonten stellen ein großes, häufig vernachlässigtes Problem bei der Kultivierung von Zellen dar. Etwa 4 bis 92% aller Zellkultureinrichtungen sind kontaminiert [118]. Mehr als 90% dieser Kontaminationen werden durch die Spezies *Mycoplasma orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini* und *Acholeplasma laidlawii* hervorgerufen. Obwohl Mykoplasmen in Zellkulturüberständen Titer von 10^7-10^8 Keimen/ml erreichen können, bewirken sie häufig keine auffälligen visuellen Veränderungen der Zellkulturen. Da die Größe dieser Prokaryonten unter der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops liegt, sind die Infektionen lichtmikroskopisch leider nicht erkennbar. Trotz des unscheinbaren Verhaltens, kommt es in befallenen Kulturen zu einer Verarmung von basischen Aminosäuren im Zellkulturmedium, was unter anderem zu einer Destabilisierung der Chromosomen führt. Die Folge davon sind Mikrokernabspaltungen, Anfälligkeiten der Zellen für Mutationen und Transformationen, sowie das vorzeitige Auslösen von Apoptose. Mykoplasmen können auch Antigenpräsentationen verhindern und Signaltransduktionen auslösen.

Die innerhalb der Promotion verwendete Methode zum Nachweis von Sequenzen des 16S rRNA-Gens von Mykoplasmen basierte auf einer sensitiven Multiplex PCR, die bei einer Nachweisgrenze von 1-2 genomischen Kopien 15 der häufigsten Mykoplasmenspezies detektierte [119]. Wahrscheinlich ist, dass bereits die aus Israel zur Verfügung gestellten RESCs von Mykoplasmen kontaminiert waren und die von der israelischen Arbeitsgruppe durchgeführten Mykoplasmentests nicht in der Lage waren, die betreffenden Mykoplasmenspezies zu detektieren. Da sich Mykoplasmen rasch in Zellkulturbeständen ausbreiten, wäre es allerdings auch denkbar, dass sich die Stammzellen erst während der Kultur im eigenen Labor infizierten. Als potentielle Infektionsquelle kommen neben anderen kontaminierten Zellen auch verunreinigte Produkte zur Zellkultivierung wie z.B. FBS und Trypsin in Frage. Da diese Produkte nach neuen Standards vor ihrem Vertrieb routinemäßig getestet werden, stellen die verwendeten kommerziellen Medienbestandteile jedoch vermutlich nicht die tatsächliche Kontaminationsquelle dar.

4.1 Charakterisierung der aus dem Rhesusaffen isolierten embryonalen Stammzellinie R366.4 (RESC)

Die verwendete RESC Linie R366.4 wurde 1995 von Thomson et *al.* isoliert. Neben den generellen Details über die Stammzellinie wie z.B. einem normalen 42XY Karyotyp, existieren keine publizierten Daten zur Charakterisierung der ESCs betreffend Kultivierungsverhalten, der genetischen Stabilität und des *in vitro* Differenzierungspotentials. Publikationen zu der Stammzellinie beschreiben ausschließlich die Differenzierung zu neuronalen Zellderivaten [120-123]. So wurde eine stabile Differenzierung zu Nestin-positiven Progenitorzellen [121], Astrozyten (GFAP positiv), Oligendrozyten

(O4 positiv) und Neuronen (NeuN positiv) gezeigt [41, 121, 124, 125]. Eine Differenzierung zu Derivaten der drei Keimblätter, wurde bis *dato* ausschließlich *in vivo* über Bildung von Teratomen nachgewiesen [126].

Im Gegensatz zu murinen ESCs sind ESCs verschiedener nicht-humaner Primatenspezies wie z.B. des Rhesusaffen den humanen ESCs bezüglich ihrer Expression von Pluripotenzmarkern sehr ähnlich. Die Charakterisierung der RESCs erfolgte auf mehreren Ebenen anhand von in der Literatur beschriebenen Markern für undifferenzierte Primaten ESCs. Unter Beibehalt der etablierten Kultivierungsbedingungen, zeigten die RESCs die für undifferenzierte ESCs typische Kolonie- und Zellmorphologie mit einem großen Kern-Zytoplasmaverhältnis. Des Weiteren exprimierten die Zellen die Pluripotenzmarkergene Nanog, Oct4, Sox2, TERT. Im Gegensatz zu der ausgeprägten Reaktion gegenüber anti-SSEA-4 und anti-TRA-1-60, zeigten die Stammzellen eine reduzierte Immunreaktivität gegenüber anti-SSEA-3 und anti-TRA-1-61. Dieses Ergebnisse entsprechen nicht dem Verhalten von HESCs [18] decken sich aber mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (nicht publizierte Daten). Die Stammzellen zeigten einen stabilen Karyotyp, und zeigten eine große Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Da sämtliche angewendete Nachweismethoden nicht quantitativ durchgeführt wurden, sind die Aussagen über den pluripotenten Status der Kulturen mit Vorsicht zu beurteilen. Die Tatsache, dass morphologisch als undifferenziert beurteilte Kulturen sehr wohl einen gewissen Anteil an differenzierten Zellen beinhalten, verdeutlichten die RT-PCR Analysen zum Differenzierungspotential der Stammzellinie. Bleibt der Anteil der differenzierten Zellen unter einer kritischen Grenze, so setzen sich die undifferenzierten Zellen durch ihre im Vergleich zu andifferenzierten Zellklonen, schnellere Proliferation während der weiteren Kultivierung immer wieder durch.

4.2 Experimente zum Differenzierungspotential der RESCs

Bereits während der ersten eigenen Differenzierungsexperimente wurde klar, wieso bisher nur Daten zur Differenzierung der R366.4 Zellinie in neuroektodermale Linien publiziert worden waren. Ähnlich wie viele humane ESC-Linien differenziert die R366.4 Linie spontan in diese Richtung, während mesendodermale Differenzierungen ohne aktive Induktion kaum zu beobachten sind. So zeigen die verwendeten RESCs auch während der Kultivierung auf Feederzellen bei suboptimalen Kulturbedingungen eine ausgeprägte Tendenz zur Bildung neuronaler Rosetten [125].

Sowohl unter serumfreien Bedingungen als auch in einem serumhaltigen Medium wurde dementsprechend vor allem die Bildung neuroektodermaler Zellen beobachtet. Da die Entwicklung mesodermaler Zellderivate und kardialen Mesoderms *in vivo* durch sezernierte Signale des Ektoderms

blockiert wird, wurde im Folgenden neben der Analyse der Expression von mesodermalen Markern auch weiterhin eine Analyse ektodermaler Schlüsselgene durchgeführt. Da verschiedene vom Endoderm sezernierte Faktoren die Differenzierung zu Kardiomyozyten fördern, wurden auch endodermale Markergene in die Untersuchungen eingeschlossen.

Wie aufgrund des Erscheinens neuronaler Strukturen erwartet, konnte für die große Mehrzahl der (neuro-)ektodermalen Marker eine im Verlauf der Differenzierung zunehmend starke Expression nachgewiesen werden. Daneben wurden auch einzelne endodermale und mesodermale Faktoren wie z.B. *secreted protein acidic and rich in cysteine* (SPARC) oder *bone morphogenetic protein* 2 (BMP2) durchaus in erheblichem Maße exprimiert. Andere für Kardiomyozytendifferenzierungen bedeutende Marker bzw. induzierende Faktoren wie z.B. *brachyury*, Nkx-2.5, Tbx5 oder *alpha myosin heavy chain* (αMHC) waren kaum detektierbar oder erschienen erst sehr spät im Differenzierungsverlauf.

So konnte in den Differenzierungsansätzen erst am siebzehnten Tag (d17) eine sehr schwache Expression des herzspezifischen Transkriptionsfaktors Nkx-2.5 nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu wird Nkx-2.5 in der Embryonalentwicklung sehr früh im primären Herzfeld exprimiert [127]. Neben weiteren Transkriptionsfaktoren ist Nkx-2.5 für die Spezifizierung kardialer Zellen verantwortlich [128]. Im Kontrast hierzu steht die Expression des in der Embryonalentwicklung erst nach Nkx-2.5 an Bedeutung erlangenden Faktors *friend of GATA-2* (FOG-2) [129, 130]. Obwohl die Ergebnisse der semiquatitativen RT-PCR-Analysen sicherlich mit Vorsicht zu beurteilen sind, konnte FOG-2 schon früher und stärker exprimiert als Nkx-2.5 nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass in den Kulturen keine normale, zeitlich gestaffelte Induktion der kardialen Differenzierung stattgefunden haben kann.

Das eigentlich als kardiales Markergen bekannte atriale *myosin light chain* 2 *(*Mlc2a) wurde erstaunlicherweise bereits in undifferenzierten RESCs exprimiert. Unklar ist, wieso dieses Gen in den undifferenzierten RESCs nachgewiesen werden konnte. Da auch ein zweites Primerpaar, welches nach Datenbankvergleichen genauso wie das ursprüngliche verwendete Primerpaar spezifisch für Mlc2a sein sollte, die gleichen Ergebnisse erbrachte, kann eine Kreuzreaktion mit verwandten Gensequenzen als unwahrscheinlich gelten. Möglicherweise stellt die detektierte Mlc2a-Expression ein Zellkulturartefakt dar.

Die *in vitro* Differenzierung von ESCs zu mesodermalen Vorläuferzellen über kardiales Mesoderm bis hin zu funktionellen kontrahierenden Kardiomyozyten unterliegt den gleichen regulierenden Mechanismen wie die embryonale Herzentwicklung *in vivo* [131]. Aufgrund der Tatsache, dass eine Reihe von Faktoren, die als essentiell für die Kardiomyozytendifferenzierung angesehen werden [132-134], in den Differenzierungsansätzen nicht, nur sehr schwach oder sehr spät exprimiert wurden,

war es nicht verwunderlich, dass eine Ausreifung zu kontraktilen Kardiomyozyten nicht stattfand. Auch die Expression von αMHC als Marker für reife, kontraktile Kardiomyozyten [135, 136] erfolgte erst sehr spät im Differenzierungsverlauf.

Nachdem alle initialen Differenzierungsversuche in Hinblick auf die kardiale Differenzierung erfolglos verlaufen waren, wurde die verwendete Charge FBS variiert. Die initial durchgeführten Differenzierungsansätze erfolgten alle unter der Verwendung ausschließlich einer Charge FBS. Da es sich bei FBS um ein tierisches Produkt handelt, unterliegt es in seiner Zusammensetzung von Charge zu Charge starken Schwankungen, die einen großen Einfluss auf die Differenzierungsinduktion von ESCs haben können. Die Austestung verschiedener Chargen FBS führte letztendlich zur Identifizierung eines Serums, welches die Differenzierung der RESCs über mesodermale Vorläuferzellen bis hin zu kontrahierenden Kardiomyozyten ermöglichte [137].

4.2.4 Kardiale Differenzierung der RESCs

Unter der Verwendung dieser speziellen, die Kardiogenese induzierenden, Charge FBS konnte im Verlauf der Differenzierung ein Genexpressionsmuster vergleichbar dem für murine und humane ESCs publizierten nachgewiesen werden [7, 138-140]. Dieses ähnelte dem Expressionsmuster der embryonalen Herzentwicklung *in vivo* [61]. So erfolgte zunächst die Expression früher kardialer Transkriptionsfaktoren wie Nkx-2.5, Mesp-1, GATA-4, Tbx5, Tbx20 und FOG-2 [141], die im weiteren Differenzierungsverlauf die Reifung zu kontrahierenden Herzmuskelzellen induzierten und mit der die Expression der herzspezifischen Marker αMHC [135] und ANF [61] einherging. Im Gegensatz hierzu wurde wie in voran gegangenen Differenzierungsversuchen die atriale Isoform des *myosin light chain* (Mlc2a) und darüber hinaus die ventrikuläre Isoform (Mlc2v) bereits in undifferenzierten RESCs exprimiert. Die Expression von Mlc2v, das zunächst im gesamten Herzen exprimiert wird [128], deutet somit zu dem frühen Zeitpunkt des Differenzierungsverlaufs, zu dem die Analyse durchgeführt wurde, nicht zwangsweise auf die Bildung ventrikulärer Herzzellen hin. Die Spezifizierung auf den Ventrikel erfolgt erst im weiteren Verlauf der Herzentwicklung [61]. Wie die ventrikuläre erfährt auch die atriale Isoform des Proteins Mlc2 ihre Spezifizierung auf das Atrium erst im fortschreitenden Verlauf der Kardiogenese. Neben einer anfänglichen Expression im gesamten embryonalen Herz, wurde die Expression von Mlc2v auch für Skelettmuskelzellen beschrieben [142]. Der Nachweis beider Proteine in undifferenzierten ESCs wurde bereits im humanen System beschrieben [98, 143]. Möglicherweise handelt es sich hierbei wie bereits erwähnt um Zellkulturartefakte.

Die Analyse der Proteinexpression der differenzierten Zellen erfolgte durch Inkubation kontrahierender Areale mit muskelspezifischen Antikörpern, die an verschiedene Komponenten der kontraktilen

Muskelfilamente banden. So zeigten die differenzierten Kardiomyozyten eine ausgeprägte Immunreaktivität gegenüber anti-sarkomerischem α-Aktinin, anti-Troponin T und anti-Titin, wodurch die Querstreifung der Filamente des kontraktilen Zellapparates verdeutlicht wurde. Der Nachweis einer niedrigen ANF-Expression auf mRNA Ebene, konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Es ist denkbar, das die Expression des ANF zu niedrig ist, um eine sichtbare Immunfluoreszenz hervorzurufen oder, dass die Expression des ANF lediglich auf sehr wenige Zellen beschränkt ist, die durch die verwendete immunhistologische Methode nicht detektiert wurde.

Neben dem muskelspezifischen quergestreiften Phänotyp ausgereifter Kardiomyozyten zeigten verhältnismäßig große Zellen ohne erkennbare Querstreifung eine ausgeprägte Immunreaktivität gegenüber anti-sarkomerischen α-Aktinin. Es ist wahrscheinlich, dass die Differenzierungsansätze eine Mischung aus Kardiomyozytenvorläufern und Kardiomyozyten früherer Entwicklungsstadien, wie bereits für das murine und humane System beschrieben [8, 144], enthielten. Diese Annahme wird durch die elektronenmikroskopische Analyse der ESC-abgeleiteten Kardiomyozyten untermauert. So ist die in den Differenzierungsansätzen vorherrschende Ultrastruktur eines elektronendichten Zytoplasmas einhergehend mit der polyribosomalen Anordnung der Ribosomen anstelle einer Assoziation mit dem Endplasmatischen Reticulum typisch für einen frühen embryonalen Kardiomyozytenphänotyp. Kardiomyozyten, die diesen frühen Entwicklungsstadien zugeordnet wurden, zeigten eine beginnende Anordnung zellulärer Mikrofilamente, die häufig mit Zellverankerungen den „Adherens Junctions“ assoziiert waren. Die Organisation der Filamente zu Myofibrillen war in diesen frühen Zellen nicht zu finden. Im Gegensatz hierzu zeigten Elemente des Zytoskeletts reiferer Kardiomyozyten eine regelmäßige Anordnung zu sarkomerischen Strukturen, die durch Z-Banden begrenzte A-Banden (anisotrop) und I-Banden (isotrop) umfassten. Aufgrund der immunhistologischen und elektronen-mikroskopischen Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den unterschiedlichen auftretenden Erscheinungsbildern neben Herzmuskelzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien um unterschiedliche Kardiomyozytensubtypen handelt, die den bei Differenzierungen von murinen ESCs auftretenden Zellmustern entsprechen [8]. Im Gegensatz zu der Morphologie früher, aus murinen ESCs-abgeleiteten Kardiomyozyten, wiesen die α-Aktinin positiven Zellen ohne erkennbare Querstreifung in den Differenzierungsansätzen der RESCs jedoch ein kleines Kern-Zytoplasmaverhältnis auf. Weiterführende Experimente werden notwendig sein, um eine vergleichende Studie bezüglich der Bildung verschiedener Kardiomyozytensubtypen aus ES-Zellen verschiedener Spezies durchzuführen.

In Anbetracht des synchronen Kontrahierens der gebildeten Kardiomyozyten in den kardial differenzierten Arealen, war es nicht erstaunlich, die Expression von Connexin 43 (Cx43) als

Hauptbestandteil herzspezifischer Zell-Zellverbindungen, den so genannten *gap junctions*, nachweisen zu können. Im Gegensatz zu den eher unorganisiert wirkenden Zellen ohne Querstreifung, zeigten die reiferen, bereits quergestreiften Kardiomyozyten tendenziell eine geringere Immunreaktivität. Eine Quantifizierung der Expression von *gap junction* Proteinen wurde allerdings nicht durchgeführt. Weitere Experimente werden notwendig sein, um die Expression von Cx43 näher zu bestimmen.

Um die Funktionalität der gebildeten Kardiomyozyten zu überprüfen, wurden detaillierte elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Mit Hilfe des MEA Systems wurden extrazelluläre elektrische Aktivitäten kontrahierender Zellaggregate aufgezeichnet und ausgewertet. Die Verwendung des MEA System bietet den Vorteil, dass die spontan auftretenden elektrischen Aktivitäten, die ausschließlich in Bereichen aktiver Kardiomyozyten aufgezeichnet werden, ohne Schädigung der gemessenen Zellen isoliert dargestellt und in Feldpotentiale (FP) übersetzt werden können. Obwohl die aufgezeichneten FPs nicht nur von der elektrischen Aktivität der kontrahierenden Zellen abhängig sind, sondern auch von dem Abstand der Zellmembranen zur messenden Elektrode, ist es prinzipiell möglich, die aufgezeichneten Feldpotentialmorphologien verschiedenen Kardiomyozytensubtypen zuzuordnen. Im Fall der RESCs konnten aufgrund fehlender Kontrollen adulter oder fetaler Herzmuskelzellen vom Rhesusaffen diesbezüglich leider keine Erkenntnisse gewonnen werden.
Der immunhistologische Nachweis des *gap junction* Proteins Cx43 als notwendige Vorraussetzung der Reizweiterleitung elektrischer Aktivitäten zwischen benachbarten Zellen, wurde durch die MEA Messungen funktionell bestätigte. So führte das Ausplattieren zweier voneinander unabhängig kontrahierender Zellaggregate im Kulturverlauf zu der Ausbildung einer physikalischen Zellverbindung, die zu einer eben solchen Reizweiterleitung in der Lage war. Die MEA-Aufzeichnungen dieser sehr komplexen Strukturen, zeigten reproduzierbar die typische Morphologie von Elektrokardiogrammen (EKG).

Als weiteren Nachweis der Identität und Funktionalität der ESC-abgeleiteten Kardiomyozyten und als Abgrenzung gegen andere Muskelzelltypen, die ebenfalls messbare elektrische Signale produzieren, wie z.B. Skelettmuskelzellen, wurde das Verhalten der Zellen auf den β-adrenergen Agonisten Isoproterenol (ISO) untersucht. Die differenzierten Herzmuskelzellen zeigten das gleiche Verhalten wie HESC-abgeleitete Kardiomyozyten. Sie reagierten auf eine β-adrenerge Stimulation mit einer erhöhten Kontraktionsfrequenz, die bis zum Auswaschen der Substanz beibehalten wurde. Das zusätzliche Vorhandensein von Skelettmuskelzellen kann durch diesen Nachweis allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die elektrophysiologischen Untersuchungen der kardial differenzierten

RESCs belegen ebenfalls, dass es innerhalb des Auswertungszeitraums der Differenzierungsansätze lediglich zu einer Bildung früher embryonaler Herzmuskelzellen kam.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen der vorliegenden Promotion durch die Etablierung eines durch Serum induzierten Differenzierungssystems erstmals die Bildung kardialen Mesoderms und eine Ausreifung der kardialen Vorläuferzellen zu funktionellen Herzmuskelzellen aus ES-Zellen vom Rhesusaffen beschrieben wurde. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass vermeintlich vorgegebene Differenzierungsrichtungen embryonaler Stammzellinien durch das Setzen entsprechender Differenzierungsstimuli umkehrbar und durchaus beeinflussbar sind. Da die Entwicklung kontrahierender Kardiomyozyten aus ESCs *in vitro* vermutlich den gleichen regulierenden Mechanismen wie die der *in vivo* embryonalen Herzentwicklung unterliegt, ist davon auszugehen, dass durch das verwendete FBS für eine kardiale Differenzierung essentiellen Faktoren in einer physiologischen Komposition und Konzentration bereitgestellt wurden.

Das etablierte Modell stellt eine wichtige Grundlage für weiter führende *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen zur detaillierten Analyse der, der kardialen Differenzierung zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen dar. Basierend auf dem etablierten System kann nun die kardiale Differenzierung optimiert und die Bildung von Kardiomyozytensubtypen analysiert werden.

Die Ergebnisse wurden in der Juniausgabe von *Stem Cells* (Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32) veröffentlicht [137].

4.2.5 Kardiale Differenzierung der RESCs durch Kokultivierung

Die im Rahmen der Promotion durchgeführten Differenzierungsexperimente mit RESCs führten zu einem Anteil von 18% kontrahierenden EBs und lagen damit deutlich unter der Effizienz optimierter muriner Systeme [86]. Auf der anderen Seite entspricht dieser Anteil durchaus den mit HESCs erzielten Ergebnissen [7, 143]. Denkt man an einen späteren klinischen Einsatz der ESC-abgeleiteten Herzmuskelzellen, so ist die Verfügbarkeit großer Zellmengen für therapeutische Anwendungen notwendig. Neben des „*proof of concept*" der spontanen kardialen Differenzierung der verwendeten Zellinie R366.4, ist somit eine möglichst effiziente, gerichtete Bildung von Kardiomyozyten unumgänglich. Neben der durch Serum induzierten, wenig zielgerichteten Differenzierung von ESCs, gibt es mittlerweile eine Reihe induktiver Kokultivierungssysteme, die eine spezifischere Differenzierung von Stammzellen ermöglichen sollen [94, 98]. Kokultivierungssysteme zwischen ESCs und induktiv wirkenden Zellen oder Geweben sollen *in vitro* die *in vivo* vorherrschenden physiologischen Umgebungen bei der Differenzierung zu bestimmten Zellderivaten nachahmen. In Hinblick auf die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen durchlaufen die Zellen während dieses Vorgangs zeitlich gestaffelt mehrere Entwicklungsstadien. Zunächst kommt es zu der Bildung mesodermaler Vorläuferzellen, die dann zu dem so genannten kardialen Mesoderm differenzieren, bevor sie im weiteren Verlauf zu Herzmuskelzellen ausreifen. Diese Modellsysteme basierten bislang allerdings hauptsächlich auf der Verwendung muriner ESCs. Für eine Bildung früher mesodermaler Vorläuferzellen bis hin zur Reifung kontrahierender Herzmuskelzellen, zeigten sich insbesondere zwei Kokultivierungssysteme als effizient:

1. Die Kokultivierung von ESCs mit der Stromazellinie OP9 induziert die Bildung von frühen mesendodermalen Vorläuferzellen, die den *vascular endothelial growth factor,* VEGF Rezeptor (FLK-1$^+$) exprimieren [96, 145]. Neben der Differenzierung zu hämatopoetischen und vaskulären Zellderivaten [37, 111, 146], zeigen die als Hemangioblast beschriebenen Progenitorzellen [111] im murinen System ebenfalls die Eigenschaften zur Kardiogenese [96, 113, 147] und zur Bildung endodermaler Zellderivate [110].
2. Die Kokultivierung von ESCs mit der Zellinie END-2 induziert die Differenzierung von mesodermalen Zellderivaten zu Herzmuskelzellen und wurde bereits für murine ESCs [116], murine ECs [117, 148] und HESCs beschrieben [98]. Eine Vielzahl der an der Herzentwicklung beteiligten induktiven Faktoren werden von endodermalen Zellen gebildet [133]. Welche Faktoren in diesem System von den END-2 Zellen gebildet und sezerniert werden, ist bislang allerdings unbekannt.

Während der initialen Differenzierungsexperimente wurde die Bildung mesendodermaler Vorläuferzellen aus RESCs durch den Nachweis der Expression des mesendodermalen Markers brachyury belegt. Die Auswertung der semi-quantitativen RT-PCR zeigte die Bildung nicht unerheblicher Mengen der entsprechenden mRNA, die bis zum siebzehnten Versuchstag (d17) konstant blieb. Allerdings führte die augenscheinlich relativ effiziente Bildung mesendodermaler Vorläuferzellen unter den generellen Differenzierungsbedingungen nicht automatisch zu einer ebenfalls effizienten Bildung von Herzmuskelzellen. Im Kontrast zur *Brachyury*-Expression steht die eher schwache Expression des frühen herzspezifischen Transkriptionsfaktors Nkx-2.5 [128], die die niedrige kardiale Differenzierungseffizienz von 18% kontrahierenden EBs widerspiegelt [111]. Ob tatsächlich die Differenzierung zu mesendodermalen Vorläuferzellen, die weitere Ausreifung von kardialem Mesoderm oder sogar erst die Bildung von Kardiomyozyten den limitierenden Schritt darstellt, konnte anhand der semiquantitativen RT-PCR-Daten nicht entschieden werden.
Als Konsequenz wurden sowohl Kokulturen mit OP9 oder END-2 Zellen als auch die Kombination beider Systeme ins Auge gefasst.

4.2.5.1 Kokultivierung mit OP9 Stromazellen

Die Kokultivierung der RESCs mit den OP9 Stromazellen erbrachte zunächst nicht das erhoffte Ergebnis. Zu keinem Zeitpunkt der Differenzierungsversuche konnte eine Entstehung kontrahierender Areale beobachtet werden. Als Ursache sind verschiedene Gründe denkbar: nach ihrer Aussaat wuchsen die ausgesäten RESCs mit der für undifferenzierte Stammzellen typischen unverminderten Proliferationsgeschwindigkeit weiter. Dieses führte während des Kultivierungsverlaufs zu einem Überwachsen der Stromazellen, so dass sich das Verhältnis der beiden Zelltypen immer weiter zu Gunsten der RESCs verschob. Möglicherweise reichte die induktive Wirkung der nur sehr langsam proliferierenden OP9 Zellen für eine solch große Anzahl an Stammzellen nicht aus, um eine Differenzierung zu induzieren. Wahrscheinlicher erschien jedoch, dass das generelle Fehlen von kontraktilen Arealen auf dem Fehlen molekularer Signalen basierte, die für das vollständige Ablaufen des kardialen Differenzierungsweges benötigt werden [112, 132-134, 149]. Möglicherweise wurde durch die Veränderung des auf EBs basierenden Differenzierungsprotokolls und die Differenzierung der RESCs in Form eines Monolayers, die Bildung endodermaler Zellen inhibiert und für eine Kardiogenese essentielle Faktoren konnten nicht bereitgestellt werden (es wurden keine immunhistologischen oder molekularbiologischen Nachweise für diese Vermutung durchgeführt, die Annahmen beruhen lediglich auf der morphologischen Beurteilung der Differenzierungsansätze). Zu diesem Zeitpunkt konnte außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass Spezieskompatibilitäten die induktive Wirkung muriner OP9 Zellen auf die RESCs verhinderten.

4.2.5.1 Kokultivierung mit END-2 Zellen

Als Konsequenz der Ergebnisse, der initialen Kokultivierungsexperimente der RESCs mit den OP9 Zellen, wurden weitere Experimente im Kokultivierungssystem mit den Endoderm-ähnlichen END-2 Zellen durchgeführt. Die durch Mummery *et al.* beschriebene effiziente kardiale Differenzierung der HESC Linie hES2 konnte nicht direkt auf die verwendeten R366.4 übertragen werden. Neuesten Ergebnissen zu dem auf END-2 Zellen basierenden Kokultivierungssystem zu Folge, erhöht eine Senkung des Serumanteils im Differenzierungsmedium die Bildung kontrahierender Areale [99]. Ein solches Differenzierungsverhalten wurde unter serumfreien Bedingungen bereits für Skelettmyoblasten beschrieben [150] und spricht für die Annahme, dass sowohl induzierende als auch inhibierende Faktoren im Serum enthalten sein können. Je nach Charge des verwendeten Serums kommt es zu Variationen in deren Zusammensetzung und Konzentration. Diese Annahme deckt sich mit den innerhalb der Promotion gewonnenen Erkenntnissen zur spontanen Differenzierung der RESCs [137]. Ob bestimmte Faktoren induzierend oder inhibierend wirken, hängt oft vom Differenzierungsstatus der Zellen und der Konzentration der Faktoren ab [64, 71]. Das System der spezifischen kardialen Differenzierung von HESCs von Mummery *et al.* basiert auf der Kokultivierung von END-2 Zellen mit der humanen Stammzellinie hES2. Eine durch Serum induzierte kardiale Differenzierung dieser Stammzellinie wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt. Mummery *et al.* konnte diese Ergebnisse jedoch nicht reproduzieren. Möglicherweise enthält das von Mummery *et al.* zur Differenzierung verwendete FBS Faktoren, die inhibierend auf die Bildung von Herzmuskelzellen wirken. Bei der Kokultivierung der HESCs mit den END-2 Zellen wurde durch eine Senkung des Serumanteils augenscheinlich die Konzentration der inhibierend wirkenden Faktoren gesenkt, so dass die Kardiogenese der hES2 Zellen nicht weiter inhibiert wurde. Im Falle des im Rahmen der Promotion auf seine kardiogenen Eigenschaften ausgetesteten FBS, wurde durch die im Serum enthaltenen Faktoren eine spontane Kardiogenese induziert [137]. In den Kokultivierungsexperimenten der RESCs mit den END-2 Zellen könnte der Anteil einzelner Komponenten durch zusätzlich von den endodermalen Zellen sezernierten Faktoren möglicherweise Konzentrationen erreicht haben, die anstelle der induktiven Wirkung zu konträren Effekten führte und so die Verminderung der spontan auftretenden kontrahierenden Areale von 18% kontrahierenden EBs (spontane Differenzierung, [137]) auf 13% kontrahierende EBs (END-2 Kokultivierung) begründet. Solche konzentrationsabhängigen Effekte wurden z.B. für BMP2 gezeigt.

Da die Experimente betreffend der Kokultivierung erst in der letzten Phase der Promotion erfolgten, konnten von den Differenzierungsversuchen in beiden Kokultivierungssystemen keine Genexpressionsanalysen angefertigt werden. Mit diesem Hintergrund ist es zurzeit nicht möglich

festzulegen, auf welcher Ebene die Differenzierung und die Entwicklung zu Herzmuskelzellen blockiert wurden. Wie aufgrund der voneinander unabhängig durchgeführten Kokultivierungsexperimente anzunehmen, schien sich die Blockade allerdings auf mehreren Entwicklungsebenen zu befinden. Aus diesem Grund wurden beide Kokultivierungssysteme miteinander kombiniert. Systeme, die induktive Fähigkeiten verschiedener Zellinien oder Gewebe miteinander kombinieren, wurden in der Literatur bis dato nicht beschrieben.

4.2.5.3 Kokultur mit OP9 und END-2 Zellen

Die Differenzierung in dem kombinierten Kokultivierungssystem erfolgte zeitlich gestaffelt und ist in zwei Differenzierungsabschnitte zu unterteilen. Der erste Abschnitt beinhaltete die durch OP9 Kokultur angestrebte vermehrte Bildung mesendodermaler Vorläuferzellen. Im zweiten Teil der Differenzierung sollten von END-2 Zellen freigesetzte Faktoren die weitere kardiale Differenzierung unterstützen.

Die Bildung mesendodermaler Progenitorzellen erfolgt nach der Differenzierungsinduktion durch OP9 Zellen in einem sehr frühen Zeitfenster, so dass im murinen System brachyury$^+$/FLK-1$^+$ Zellen bereits achtundvierzig Stunden nach Versuchsbeginn nachweisbar sind [110, 111, 146]. Als notwendige Vorraussetzung hierfür gilt ein direkter Zell-Zellkontakt zwischen OP9 Zellen und ESCs [96]. Im Rahmen des Protokolls wurde diese äußerst wichtige Erkenntnis durch die Vermischung beider Zellsorten bei der Bildung von EBs mit einbezogen. Sie bietet gegenüber der Differenzierung in Form von Monolayern einige Vorteile. Zum einen ist der direkte Kontakt der ESCs mit den Stromazellen gewährleistet, zum anderen können notwendige Differenzierungsprozesse, die ausschließlich während der Differenzierung in Zellaggregaten ablaufen, stattfinden. Um eine Differenzierung der mesendodermalen Vorläuferzellen zu Zellen der kardialen Linie zu fördern, wurden die EBs am zweiten Tag durch das Überführen auf END-2 Zellen der induktiven Wirkung endodermaler Zellen ausgesetzt. Die Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Initiierung der Kokultivierung mit den END-2 Zellen erfolgte basierend auf Berichte, denen zufolge der Zeitpunkt der Zugabe der vom Endoderm sezernierten Wnt-Inhibitoren einen entscheidenden Einfluss auf das Schicksal einer möglichen kardialen Differenzierung von FLK-1$^+$ Zellen hat [96]. So führt eine frühe Zugabe (d0 bis d1) des Wnt-Antagonisten *Dkk-1* in Differenzierungsansätzen zu einer Repression der Bildung kardialer Areale, eine spätere Gabe hingegen (d2-d3) fördert die Entstehung von Herzmuskelzellen [145]. Diese Ergebnisse belegen einen zeitlich eingrenzbaren negativen Einfluss auf die Bildung früher mesodermaler Zellen. Sind kardiale Vorläuferzellen allerdings bereits durch vorherige Differenzierungsabläufe vorhanden, kehrt sich die inhibierende zu einer induktiven Wirkung um.

Im Rahmen der Promotion gelang durch die Kombination zweier, in ihrer induktiven Wirkungsweise aufeinander aufbauenden, Zellinien die Etablierung eines neuartigen zeitlich und räumlich in zwei Differenzierungsabschnitte zu unterteilenden Protokolls, das eine bisher weder für humane noch für nicht-humane Primaten-ESCs beschriebene Effizienz einer kardialen Differenzierung von 95% kontrahierenden EBs zur Folge hat [7, 139].

Da die Etablierung des Systems und die darauf beruhenden Ergebnisse der gesteigerten kardialen Differenzierung der RESCs erst in der letzten Phase der Promotion erzielt wurden, konnten zur Charakterisierung der gebildeten Zellderivate und Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen zunächst nur initiale Versuche durchgeführt werden. Die Auswertungen beruhen lediglich auf morphologischen Beobachtungen und Auszählungen der kontrahierenden EBs.
Eine wichtige Erkenntnis ist, dass für das Gelingen der Experimente vor allen Dingen die verwendeten induzierenden Zellen ausschlaggebend waren. Um eine optimale Wirkung der END-2 Zellen zu gewährleisten, wurden diese maximal bis zur 19. Passage für Differenzierungsversuche eingesetzt. Die Beobachtung einer nachlassenden induzierenden Wirkung der Zellen, stammte aus Berichten anderer Arbeitsgruppen. Bei der Wahl der OP9 Stromazellinie wurde eine Sublinie mit beschriebener kardial-induzierender Wirkung in die Differenzierungsversuche eingesetzt [96, 113].

4.2.6 Differenzierung zu trophoektodermalen Zellen

Im Rahmen der Experimente zur kardialen Differenzierung wurden offensichtlich auch eine ganze Reihe anderer Zelltypen von den RESCs gebildet. So ließen rein morphologische Beobachtungen, die bei der Beurteilung von Kontrollexperimenten erfolgten, eine Transdifferenzierung von RESCs zu trophoektodermalen Zellen vermuten. In den Differenzierungsansätzen kam es zu der Bildung eines auffällig hohen Anteils an zystischen, flüssigkeitsgefüllten Strukturen, die in Monolayern angeordnet waren (**Abb.3.37**). Des Weiteren bildeten sie Strukturen, die optisch an frühe Blastozysten mit einer äußeren Zellmasse (Trophoektoderm) und einer inneren Zellmasse (Embryoblast) erinnerten (**Abb.3.38**) sowie eine Vielzahl polynuklearer Zellen.

Die spontane Transdifferenzierung von Primaten-ESCs wurde bereits mehrfach beschrieben [105, 108, 151]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang jedoch nicht bekannt. Neben der einzigen beschriebenen gerichteten Transdifferenzierung durch die Zytokine BMP2 und BMP4 im humanen System [104] oder dem *knockout* der Pluripotenzmarkergene Oct3/4 und Nanog im murinen System [107] sind keinerlei induktiv wirkende Faktoren bekannt.

Die Differenzierungen der RESCs zu trophoektodermalen Zellderivaten erfolgten in dem gleichen FBS, mit dem erfolgreich die Kardiogenese der RESCs induziert wurde. Die Transdifferenzierung der RESCs zu Trophoblastenzellen unterstützt die Hypothese, dass die verwendete Charge FBS das Zytokin BMP2 in größeren Konzentrationen enthielt. Neben seiner Kardiogenese induzierenden Wirkung in den spontanen Differenzierungsansätzen, führte die END-2 vermittelte Zunahme der Zytokinkonzentration zu dem bereits beschriebenen gegenteiligen Effekt des Signalmoleküls. Im Gegensatz zu der spontanen auf EBs basierenden Differenzierung, bei der die RESCs für sieben Tage in Suspension reifen konnten, führte der Effekt des BMPs bei den unreiferen, zwei Tage alten Zellaggregaten zu der beschriebenen Transdifferenzierung.

Eine erste Analyse des Genexpressionsmusters der differenzierten Zellen, führte zum Nachweis der trophoektodermspezifischen Transkriptionsfaktoren Cdx2, Eomes und des von Trophoblastenzellen sezernierten Hormons αhCG. Auf Proteinebene verdeutlichte eine Immunreaktivität gegenüber den trophoektodermspezifischen Antikörpern anti-TROMA-1 und anti-Cdx2 die Transdifferenzierung der Zellen [49]. Eine Klassifizierung von Trophoblastensubpopulationen wie z.B. Trophoblasten-Riesenzellen oder Synzytiotrophoblasten konnte im zeitlichen Rahmen der Promotion leider nicht mehr durchgeführt werden.

Die für HESCs publizierten Ergebnisse einer spontanen Bildung von ESC-abgeleiteten Trophoblastenzellen und Trophoblastensubtypen [104, 105, 108, 151], scheinen somit nach den ersten präliminären Daten dieser Promotion auf die verwendete RESC Linie R366.4 übertragbar zu sein.

Eine weitere Charakterisierung der differenzierten trophoektodermalen Zellen ist dringend notwendig. Sie könnte weitere Aufschlüsse über das Differenzierungspotential der RECS und der Trophoblastenzellen liefern. Die Etablierung von Trophoblastenstammzellinien aus RESCs, wie es kürzlich im humanen System gelang [108], würde ein geeignetes Modell zur Erforschung von Entwicklungsvorgängen während der Implantation und der damit in Zusammenhang stehen feto-maternalen-Toleranz schaffen.

5. Perspektiven

Die im Rahmen der Promotion gesetzten Ziele konnten vollständig erfüllt werden. Nach der Etablierung eines Kultivierungssystems der embryonalen Stammzellinie aus dem Rhesusaffen R366.4 und deren Charakterisierung, wurde trotz der Prädisposition der verwendeten Stammzellinie auf eine neuroektodermale Differenzierungsrichtung erfolgreich ein System zur robusten Differenzierung zu funktionellen Herzmuskelzellen etabliert. Darüber hinaus wurde ein Kokultivierungssystem entwickelt, das eine auch bislang für HESCs nicht beschriebene Effizienz der Bildung von ESC-abgeleiteten Herzmuskelzellen induziert.

Die erfolgten Optimierungsarbeiten verdeutlichten dabei die Abhängigkeit der Differenzierungsergebnisse vom verwendeten FBS: von den sechs ausgetesteten FBS-Chargen induzierte lediglich ein Serum eine kardiale Differenzierung der RESCs. Die Erkenntnis über diese gravierenden Unterschiede zwischen den FBS Chargen, wirft die Frage nach der jeweiligen Zusammensetzung bzw. dem Fehlen essentieller Signalmoleküle auf. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Schlegelber (Abteilung für Zell- und Molekularpathologie, MHH) sollen nachfolgend Proteomanalysen der verwendeten FBS-Chargen die Identifikation der induzierenden Faktoren ermöglichen. Erste initiale Experimente zeigten bereits signifikante Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der einzelnen Chargen.

Des Weiteren sollen die dem Kokultivierungssystem zu Grunde liegenden Mechanismen der gesteigerten kardialen Differenzierung der RESCs identifiziert werden. Zusätzlich zu den im Rahmen der Promotion bereits durchgeführten initialen Experimenten ist geplant, das Genexpressionsmuster und die Freisetzung potentieller Induktoren während der kardialen Differenzierung näher zu untersuchen. Neben den bereits verwendeten Markergenen werden weitere wichtige Schlüsselfaktoren wie z.B. Flk-1 in die Analyse eingeschlossen. Eine Umstellung der semiquantitativen RT-PCRs auf Real-Time PCRs wird darüber hinaus eine Quantifizierung und detailliertere Auswertung der Analysen ermöglichen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, sollte es so möglich sein, notwendige Signalmoleküle zu identifizieren.

Auch sollen weitere potentielle Kardiogenese-Induktoren auf ihre Wirkung auf die Differenzierung der RESCs getestet werden. Hierzu zählen neben Ascorbinsäure, für die eine stimulierende Wirkung auf die Bildung kontrahierender Herzmuskelzellen aus murinen ESCs, HESCs und mesenchymalen Stammzellen bereits beschrieben wurde [89, 99, 152], vor allen Dingen Faktoren, die essentiell für den

Ablauf der embryonalen Herzentwicklung zu sein scheinen wie z.B. BMP2/4, Wnt11, FGF8 und Wnt-Antagonisten (*Dkk-1*). Es ist denkbar, dass eine Kombination einzelner Faktoren mit dem auf OP9 und END-2 Zellen basierenden etablierten Kokultivierungsprotokoll zu einer noch effizienteren und spezifischeren kardialen Differenzierung der RESCs führen wird.

Zusätzlich zu der weiteren Arbeit an der Optimierung der spezifischen kardialen Differenzierungsprotokolle, ist eine Charakterisierung der RESC-abgeleiteten Kardiomyozytensubtypen angestrebt. Im murinen System konnte neben der Bildung von Schrittmacher- und Purkinje-ähnlichen Zellen auch die Differenzierung zu atrialen und ventrikulären Herzmuskelzellen gezeigt werden. Vorraussetzung für eine solche Analyse des Phänotyps der gebildeten Herzmuskelzellen ist die Etablierung eines Protokolls zur Dissoziation ausgewachsener EBs. Sie wird zurzeit im Rahmen einer weiteren Promotion durchgeführt. Um eine potentielle Reifung der frühen Entwicklungsstadien der ESC-abgeleiteten Kardiomyozyten zu untersuchen, ist eine Ausweitung des Versuchszeitraums von siebzehn Tagen auf 60 Tage angedacht.

Denkt man an einen späteren klinischen Einsatz der differenzierten Herzmuskelzellen, so ist die Verfügbarkeit großer aufgereinigter Zellmengen unabdingbar. Um das Risiko der Teratombildung durch persistierende Stammzellen auszugrenzen, müssen die differenzierten Kardiomyozyten zuvor aufgereinigt werden. Hierzu sollen durch die Transduktion mit bereits in der eigenen Arbeitsgruppe hergestellten SIV-abgeleiteten Viren, stabile transgene RESC Linien etabliert werden. Neben Vektoren mit ubiquitären Promotoren, die nach Transduktion eine Identifizierung Virus-tragender ESCs ermöglichen, sollen auch Viren mit herzspezifischen Promotoren, die in Kardiomyozyten eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Puromycin vermitteln, angewendet werden.

Zur Überprüfung der *in vivo* Integrität der aufgereinigten RESC-abgeleiteten Herzmuskelzellen und der Restauration nach kardialen Schädigungen, ist es möglich, ein bereits im eigenen Institut etabliertes Infarktmodell in der SCID-Maus zu nutzen.

Des Weiteren soll auch die Entwicklung eines Bioreaktorsystems zur Kultivierung und zur kardialen Differenzierung der RESCs im großen Maßstab erfolgen. Im großen Maßstab differenzierte Zellen sind eine essentielle Grundlage für das kardiale Tissue Engineering, zur Etablierung eines präklinischen Großtiermodells, sowie für die Entwicklung eines geplanten pharmakologischen Testsystems.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hescheler (Institut für Neurophysiologie, Universität zu Köln) und Prof. Itskovitz-Eldor (Haifa, Israel) sollen außerdem die für die Stammzellen des Rhesusaffen gewonnen Erkenntnisse auf das System der HESCs übertragen werden.

Eine detaillierte Charakterisierung des Systems zur Bildung trophoektodermaler Zellen wird darüber hinaus neue Erkenntnisse über die zugrunde liegende Mechanismen der Transdifferenzierung von ESCs liefern. Angestrebt sind eine ausführliche Analyse des Genexpressionsmusters im Differenzierungsverlauf, sowie die Analyse der Bildung von Trophoblastensubtypen. Außerdem sollen in weiterführenden Experimenten die immunologischen Eigenschaften der trophoektodermalen Zellen und damit im Zusammenhang stehend die Möglichkeit einer Toleranzinduktion basierend auf das RESCs generierten Trophoblasten ausführlich untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Lutgens E, D.M., de Munick ED, Debets J, Leenders P, Smits JF, *Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes.* Cardiovasc Res, 1999. **41**: p. 586-593.
2. Nakatsuji S, Y.J., Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S, *In vivo responses of macrophages and myofibroblasts in the healing following isoproterenol-induced myocardial injury in rats.* Virchows Arch, 1997. **430**: p. 63-69.
3. Prockop DJ, *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.* Science, 1997. **276**: p. 71-74.
4. Makino S, F.K., Myoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, *Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.* J. Clin. Invest., 1999. **103**: p. 697-705.
5. Fukuda K, *Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering.* Artif Organs, 2001. **25**: p. 187-193.
6. Boheler KR, C.T., Tweedie D, Yang HT, Anisimov SC, Wobus AM, *Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes.* Circ Res, 2002. **91**: p. 189-201.
7. Kehat I, K.-K.D., Snir M, *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functionl properties of cardiomyocytes.* J Clin Invest, 2001. **108**: p. 407-414.
8. Hescheler J, F.B., Lentini S, Maltev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K, *Embryoni stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis.* Cardiovasc Res, 1997. **36**: p. 149-162.
9. Zhang S, W.D., Estrov Z, Raj S, Willerson JT, Yeh ET, *Both cell fusionand transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo.* Circulation, 2004. **110**: p. 3803-3807.
10. Gruh I, B.J., Blomer U, Schmiedl A, Schmidt-Richter I, Kruse MI, Haverich A, Martin U, *No evidence of transdifferentiation of human endothelial progenitor cells into cardiomyocytes after coculture with neonatal rat cardiomyocytes.* Circulation, 2006. **113**: p. 1326-1334.
11. Badorff C et al., *Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes.* Circulation, 2003. **107**: p. 1024-1032.
12. Potten CS, *Stem Cells.* Academic Press, 1997.
13. AM, W., *Potential of embryonic stem cells.* Mol Aspects Med, 2001. **22**: p. 149-164.
14. Young HE, B.A.J., *Adult stem cells.* Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol., 2004. **276**: p. 75-102.
15. Donovan PJ, G.J., *The end of the beginning for pluripotent stem cells.* Nature, 2001. **414**: p. 92-97.
16. Evans Mj, K.M., *Etsablishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.* Nature, 1981. **292**: p. 154-156.
17. Martin GR, *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA, 1981. **78**: p. 7634-7638.
18. Ginis I, L.Y., Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter M, Itskovitz-Eldor J, Rao M, *Differences between human and mouse embryonic stem cells.* Dev. Biol., 2004. **269**: p. 360-380.

19. Schöler HR, H.A., Balling R, Suzuki N, Gruss P, *A family of octamer proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline specific expression of an Oct factor.* EMBO J, 1989. **8**: p. 2543-2550.
20. Cavaleri F, S.H., *Nanog: a new recruit to the stem cell orchestra.* Cell, 2003. **113**: p. 551-552.
21. Avilion AA, N.S., Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R, *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function.* Genes Dev, 2003. **17**: p. 126-140.
22. Cai J, W.Y., Mirua T, Pierce JL, Lucero MT, Albertine KH, Spangrude GJ, Rao MS, *Properties of fetal multipotent neural stem cells.* Dev. Biol., 2002. **251**: p. 221-240.
23. Ben-Shushan E, T.J., Gudas LJ, Bergman Y, *Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein.* Mol Cell Biol, 1998. **18**: p. 1866-1878.
24. Rosfjord E, R.A., *The octamer motif present in the Rex-1 promoter binds to the Oct-1 and Oct-3 expressed by EC cells and ES cells.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1994. **203**: p. 1795-1802.
25. Henderson JK, D.J., Baillie HS, *Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonig atigens.* Stem cells, 2002. **20**: p. 329-337.
26. Berstine EG, H.M., Grandchamp S, *Alakline phosphatase activity in mouse teratoma.* Proc Natl Acad Sci USA, 1973. **70**: p. 3899-3903.
27. Armstrong L, L.M., Lincoln J, Cairns PM, Hole N, *mTERT expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells.* Mech Dev, 2000. **97**: p. 109-116.
28. Evans Mj, K.M., *Pluripotential cells grown directly from normal mouse embryos.* Cancer Surv, 1983. **2**: p. 185-208.
29. Beddington RSP, R.E., *An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo.* Development, 1989. **105**: p. 733-737.
30. Doetschmann TC, E.H., Katz M, Schmidt W, Kemler R, *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and Myocardium.* J Embryol Exp Morphol., 1985. **87**: p. 27-45.
31. Gardner RL, B.F., *Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells.* Int. J. Dev. Biol., 1997. **41**: p. 235-243.
32. Rathjen PD, L.J., Whyatt LM, Bettess MD, Rathjen J, *Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy.* Reprod. Fertil. Dev., 1998. **10**: p. 31-47.
33. Thomson JA, K.J., Golos TG, Dorning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP, *Isolation of a primate embryonic stem cell line.* Proc Natl Acad Sci USA, 1995. **92**: p. 7844-7848.
34. Thomson JA, I.-E., Shapiro SS, Waknitz MA, Schwiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM, *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.* Science, 1998. **282**: p. 1145-1147.
35. Reubinoff BE, P.M., Fong CY, Trounson A, Bongso A, *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro.* Nat. Biotechnol., 2000. **18**: p. 399-404.
36. Maitra A, e.a., *Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells.* Nat Genet, 2005. **37**: p. 1099-1103.
37. Priddle H, J.D., Burridge PW, Patient R, *Hematopoiesis from human embryonic stem cells: Overcoming the immune barrier in stem cell therapies.* Stem cells, 2006. **24**: p. 815-824.

38. Hwang WS, R.Y., Park JH,, *Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst.* Science, 2004. **303**: p. 1669-1674.
39. Clark AG, G.S., Nielsen R, *Inferring nonneutral evolution from human-chimp-mouse orthologous gene trios.* Science, 2003. **302**: p. 1960-1963.
40. Draper J, P.C., Thomson J, Andrews PW, *Surface antigens of human embryonic stem cells: changes on differentiation in culture.* J Anat, 2002. **200**: p. 249-258.
41. Pau FK-Y, W.D., *Derivation and characterization of monkey embryonic stem cells.* Reprod. Biol. Endocrinol., 2004. **16**: p. 41-51.
42. Odrico JS, K.D., Thomson JA, *Multinineage differentiation from human embryonic stem cell lines.* Stem Cells, 2001. **19**: p. 193-204.
43. Niwa H, M.J., Smith AG, *Quantitative expresion of Oct3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.* Nat Genet, 2000. **24**: p. 372-376.
44. Rossant J, *Stem cells from the mammalian blastocyst.* Stem cells, 2001. **19**: p. 477-482.
45. Forsyth NR, W.W., Shay JW, *Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, turn it off agian.* Differentiation, 2002. **69**: p. 188-197.
46. Gardner RL, J.M., *An investigation of inner cell mass and trophoblast tissues following their isolation from the mouse blastocyst.* J. Embryol. Exp. Morphol., 1972. **28**: p. 279-312.
47. Barlow PW, S.M., *The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy.* J. Embryol. Exp. Morphol., 1972. **27**: p. 447-65.
48. Rossant J, C.J., *Placental development: lessons from mouse mutants.* Nat Rev Genet, 2001. **2**: p. 538-48.
49. Chawengsaksophak K, J.R., Hammond VE, Kontgen F, Beck F, *Homeosis and intestinal tumors in Cdx2 mutant mice.* Nature, 1997. **386**: p. 333-339.
50. Russ AP, W.S., Colledge WH, Aparicio SA, Carlton MB, Pearce JJ, Barton SC, Surani MA, Ryan K, Nehls MC, Wilson V, Evans MJ, *Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation.* Nature, 2000. **404**: p. 95-99.
51. Luo J, S.R., Bader JA, Matthyssen A, Rossant J, Giguere V, *Placental abnormalities in mouse embryos lacking orphan nuclear receptor ERR-beta.* Nature, 1997. **388**: p. 778-782.
52. Scott IC, A.-C.L., Riley P, Reda D, Cross JC, *The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms.* Mol Cell Biol, 2000. **20**: p. 530-541S.
53. Kraut N, S.L., Chen CM, Tapscott SJ, Groudine M, *Requirement of the mouse I-mfa gene for placental development and skeletal patterning.* EMBO J, 1998. **17**: p. 6276-6288.
54. Ma GT, L.D., *GATA-2 restricts prolactin-like protein A expression to secondary trophoblast giant cells in the mouse.* Biol. Reprod., 2000. **63**: p. 570-574.
55. Tam PP, P.M., Kinder SJ, Weinberger RP, *The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation.* Development, 1997. **124**: p. 1631-1642.
56. Rawles ME, *The heart-forming areas of the early chick blastoderm.* Physiol Zool, 1943. **16**: p. 22-42.
57. Kinder SJ, T.T., Wakamiya M, *The organiser of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm.* Development, 2001. **128**: p. 3623-3634.

58. Jacobson AG, S.A., *Features of embryonic induction.* Development, 1988. **104**(341-359).
59. Raffin M, L.L., Rones MS, Sparrow D, Mohun T, Mercola M, *Subdivision of the cardiac Nkx2-5 expression domain into myogenic and non-myogenic compartments.* Dev. Biol., 2000. **218**: p. 326-340.
60. BG, B., *Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis.* Circ Res, 2002. **90**: p. 509-519.
61. Christoffels VM, H.P., Franco D, *Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart.* Dev. Biol., 2000. **223**: p. 266-278.
62. Harvey RP, *Patterning the vertebrate heart.* Nat Rev Genet, 2002. **3**: p. 544-556.
63. Lough J, S.Y., *Endoderm and heart development.* Dev. Dyn., 2000. **217**: p. 327-342.
64. Alsan BH, S.T., *Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling.* Development, 2002. **129**: p. 1935-1943.
65. Schultheiss TM, B.J., Lassar AB, *A role for bon morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis.* Genes Dev, 1997. **11**: p. 451-462.
66. Solloway MJ, R.E., *Eraly embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup.* Development, 1999. **126**: p. 1753-1768.
67. Dudley AT, R.E., *Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family memebers potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos.* Dev. Dyn., 1997. **208**: p. 349-362.
68. Ladd AN, Y.T., Antin PB, *Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFbeta and bone morphogenetic proteins.* Dev. Biol., 1998. **204**: p. 407-419.
69. Andree B, D.D., Vorbusch B, Arnold HH, Brand T, *BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos.* Mech Dev, 1998. **70**: p. 119-131.
70. Yamada M, R.J., Eichele G, Barron M, Schwartz RJ, *Expression of chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 genes during early heart development: evidence for BMP2 induction of Tbx-2.* Dev. Biol., 2000. **228**: p. 95-105.
71. Barron M, G.M., Lough J, *Requirement of BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient and cooperative.* Dev. Dyn., 2000. **218**: p. 383-393.
72. Schlange T, A.B., Arnold HH, Brand T, *BMP2 is required for early heart development during a distinct time period.* Mech Dev, 2000. **91**: p. 259-270.
73. Zhang H, B.A., *Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/ chorion and cardiac development.* Development, 1996. **122**: p. 2977-2986.
74. Kishimoto Y, L.K., Zon L, Hammerschmidt M, Schulte-Merker S, *The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning.* Development, 1997. **124**: p. 4457-4466.
75. Lough J, B.M., Brogley M, Sugi Y, Bolender DL, Zhu X, *Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm.* Dev. Biol., 1996. **178**: p. 198-202.
76. Klingensmith J, A.S.-l., Bachiller D, Rossant J, *Neural induction and patterning in the mouse in the absence of the node and its derivatives.* Dev. Biol., 1999. **216**: p. 535-549.
77. Tzahor E, L.A., *Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis.* Genes Dev, 2001. **15**: p. 255-260.
78. Marvin MJ, D.R.G., Gardiner A, Bush SM, Lassar AB, *Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm.* Genes Dev, 2001. **15**: p. 316-327.

79. Schneider VA, M.M., *Wnt antagonism initiates cardiogenesis in Xenopus laevis.* Genes Dev, 2001. **15**: p. 304-315.
80. Glinka A, W.W., Delius H, Monaghan AP, Mlumenstock C, Niehrs C, *Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction.* Genes Dev, 1998. **15**: p. 316-327.
81. Pandur P, L.M., Eisenberg LM, Kuhl M, *Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis.* Nature, 2002. **418**: p. 636-641.
82. Xu C, L.G., Persico MG, Adamson ED, *Abrogation of the Cripto gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiocytes.* Development, 1999. **126**: p. 483-494.
83. Muslin AJ, W.L., *Well-defined growth factors promote cardiac development in axolotl mesodermal explants.* Development, 1991. **112**: p. 1095-1101.
84. Bouwmeester T, S.Y., Lu B, De Robertis EM, *Cerebrus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer.* Nature, 1996. **382**: p. 596-601.
85. Conley BJ, T.A., Mollard R, *Huamn embryonic stem cells from embryoid bodies containing visceral endoderm-like Derivatives.* Fetal Diagnosis and Therapy, 2004. **19**: p. 218-223.
86. Wobus AM, W.G., Hescheler J, *Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers.* Differentiation, 1991. **48**: p. 173-182.
87. Klug MG, S.M., Koh GY, Field LJ, *Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts*
J Clin Invest, 1996. **98**: p. 216-224.
88. Wobus AM, K.G., Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM, *Retionic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes.* J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**: p. 1525-1539.
89. Takahashi T, L.B., Schulze PC, Fryer RM Sarang SS, Gullans SR, Lee RT, *Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes.* Circulation, 2003. **107**: p. 1912-1916.
90. Behfar A, Z.L., Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Puceat M *Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart.* FASEB J, 2002. **16**: p. 1558-1566.
91. Sachinidis A, K.E., Fleischmann BK, Hescheler J, *Generation of cardiomyocytes from embryonic stem cells experimental studies.* Herz, 2002. **27**(589-597).
92. Sachinidis A, Fleischmann BK, Kollossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J, *Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells.* Cardiovasc Res, 2003. **58**: p. 278-291.
93. Van der Heyden, D.L., *Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation.* Cardiovasc Res, 2003. **58**: p. 292-302.
94. Rudy-Reil D, L.J., *Avian precardiac endoderm/mesoderm induces cardiac myocyte differentiation in murine embryonic stem cells.* Circ Res, 2004. **94**: p. 107-116.
95. Nishikawa S, O.M., Nishikawa S, Kunisada T, Kodama H, *B lymphoiesis on stromal cell clones: Stromal cell clones acting on different stages of B cell differentiation.* Eur. J. Immunol., 1988. **18**: p. 1767-1771.

96. Yamashita JK, T.M., HiraokaKanie, Shimazu C, Peishi Y, Yanagi K, Nakano A, Inoue E, Kita F, Nishikawa SI, *Prospective identification of cardiac progenitors by anovel single cell-based cardiomyocyte induction*
FASEB J, 2005: p. 1-29.
97. Schuldiner M, Y.O., Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N, *Effects of eight grwoth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**: p. 11307-11312.
98. Mummery C, W.-v.O.D., Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, *Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells.* Circulation, 2003. **107**: p. 2733-2740.
99. Passier R, W.-v.O.D., Snapper J, Kloots J, Hassink RJ, Kuijk E, Roelen B, Brutel de la Riviere A, Mummery C, *Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum free cultures.* Stem cells, 2005. **23**: p. 772-780.
100. Reppel M, B.C., Hescheler J, *Beta-adrenergic and muscarinic modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.* Cell Physiol Biochem, 2004. **14**: p. 187-196.
101. Tanaka S, K.T., Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J, *Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4.* Science, 1998. **282**: p. 2072-2075.
102. Riley P, A.-C.L., Cross JC, *The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis.* Nat Genet, 1998. **18**: p. 271-275.
103. King A, T.L., Bischof P, *Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines-a workshop report.* Placenta, 2000. **21**: p. 113-119.
104. Xu R-H, C.X., Li D, Li R, Addicks G, Glennon C, Zwaka T, Thomson JA, *BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast.* Nature, 2002: p. 1-4.
105. Gerami-Naini B, D.O., Durning M, Wegner FH, Thomson JA, Golos TG, *Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells.* 2004.
106. Tolkunova E, C.F., Eckardt S, Reinbold R, Christenson LK, Scholer HR, Tomilin A, *The caudal-related protein cdx2 promotes trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells.* Stem cells, 2005. **24**: p. 139-144.
107. Hough SR, C.I., Welch PJ, Wiederholt KA, *Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing Oct-4 and Nanog.* Stem cells, 2006. **24**: p. 1467-1475.
108. Harun R, R.L., Matin M, Draper J, Jenkins NM, Liew GC, Andrews PW, Li TC, Laird SM, Moore HDM, *Cytotrophoblast stem cell lines derived from human embryonic stem cells and their capacity to mimic invasive implantation events.* Human Reprod., 2006. **21**: p. 1349-1354.
109. Conley BJ, Y.J., Trounson AO, Mollard R, *Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells.* Int. J. Biochem. Cell Biol., 2004. **36**: p. 555-567.
110. Kubo A, S.K., Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ, Keller G, *Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture.* Development and Disease, 2004. **131**: p. 1651-1662.
111. Huber TL, K.V., Fehling HJ, Palis J, Keller G, *Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo.* Nature, 2004. **432**: p. 625-630.
112. Stary M, P.W., Summer A, Hrdina A, Eger A, Weitzer G, *Parietal endoderm secreted SPARC promotes early cardiomyogenesis in vitro.* Exp. Cell Res., 2005. **310**: p. 331-343.

113. Schroeder T, F.S., Ogawa M, Nishikawa S, Oka C, Bornkamm GW, Nishikawa S, Honjo T, Just U, *Recombination signal sequence-binding protein Jk alters mesodermal cell fate decisions by suppressing cardiomyogenesis.* Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**: p. 4018-4023.
114. Nishikawa SI, N.S., Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H, *Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies Flk1+VE-Cadherin+ cells at a diverging point of endothelial cells and hemopoietic lineages.* Development, 1998. **125**: p. 1747-1757.
115. Vodyanik MA, B.J., Thomson JA, Slukvin II, *Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential.* Blood, 2005. **105**: p. 617-626.
116. Mummery C, W.D., van den Brink CE, *Cardiomyocyte differentiation in mouse and human embryonic stem cells.* J Anat, 2002. **200**: p. 233-242.
117. Mummery CL, v.A.T., van den Eijnden, van Raji AJ, *Visceral-endoderm-like cell lines induce differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells.* Differentiation, 1991. **46**: p. 51-60.
118. Barile MF, *Incidence and source of mycoplasma contamination: A brief review.* 1992.
119. Wirt M, B.E., Grashoff M, Pfützner H, Schubert U, Hauser HJ, *Detection of mycoplasma contamination by the polymerase chain reaction.* Cytotechnology, 1994. **16**: p. 67-77.
120. Salli U, R.A., Salli N, Lu NZ, Kuo HC, Pau FK, Wolf DP, Bethea CL, *Serotonin neurons derived from rhesus monkey embryonic stem cells: similarities to CNS serotonin enurons.* Exp. Neurol., 2004. **188**: p. 351-364.
121. Kuo HC, P.K., Yeoman RR, Mitalipov SM, Okano H, Wolf DP, *Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages.* Biol. Reprod., 2003. **86**: p. 1727-1735.
122. Tibbitts D, R.R., Shin S, West FD, Stice SL, *Uniform adherent neural progenitor populations from rhesus embryonic stem cells.* Stem Cells Dev, 2006. **15**: p. 200-208.
123. Li T, Z.J., Xie W, Wang S, Zhang X, Li J, Jin L, Ma Y, Wolf DP, Zhou Q, Ji W, *Transplantable neural progenitor populations derived from rhesus monkey embryonic stem cells.* Stem Cells, 2005. **14**: p. 440-451.
124. Thomson JA, M.V., Trojanowski J, *Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells.* APMIS, 1998. **106**: p. 149-157.
125. Calhoun JD, L.N., Mitalipova MM, Noggle SA, Lyons I, Condie BG, Stice SL, *Differentiation of rhesus embryonic stem cells to neural progenitors and neurons.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 2003. **306**: p. 191-197.
126. Bavister, B., Wolf DP, Brenner C, *Challenges of primate embryonic stem cell research.* Cloning and Stem Cells, 2005. **7**: p. 1-13.
127. Ranganayakulu G, E.D., Harvey RP, Olson EN, *Divergent roles for NK-2 class homeobox genes in cardiogenesis in flies and mice.* Development, 1998. **125**: p. 3037-3048.
128. Lyons I, P.L., Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP, *Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeobox gene Nkx2-5.* Genes Dev, 1995. **9**: p. 1654-1666.
129. Tevosian SG, D.A., Cantor AB, Rieff HI, Fujiwara Y, Corfas G, Orkin SH, *FOG-2:A novel GATA-family cofactor related to multiple zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped.* Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**: p. 839-844.

130. Crispino JD, L.M., Thurberg BL, Litovsky SH, Collins T, Molkentin JD, Orkin SH, *Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG-2 cofactors.* Genes Dev, 2001. **15**: p. 839-844.
131. Lev S, K.I., Gepstein L, *Differentiation pathways in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.* Ann. N. Y. Acad. Sci, 2005. **1047**: p. 50-65.
132. Coucouvanis E, M.G., *Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo.* Cell, 1995. **83**: p. 279-287.
133. Olson EN, *The path to the heart and the road not taken.* Science, 2001. **291**: p. 2327-2328.
134. Piccolo S, A.E., Leyns L, *The head inducer cerebrus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals.* Nature, 1999. **397**: p. 707-710.
135. Metzger JM, L.W., Johnston RA, Wetsfall MV, Samuelson LC, *Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis.* Circ Res, 1995. **76**: p. 710-719.
136. Subramaniam A, J.W., Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J, *Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter.* Circ Res, 1991. **266**: p. 24613-24620.
137. Schwanke K, W.S., Reppel M, Winkler ME, Matzkies M, Groos S, Itskovitz-Eldor J, Simon AR, Hescheler J, Haverich A, Martin U, *Generation and characterization of functional cardiomyocytes from Rhesus monkey embryonic stem cells.* Stem cells, 2006. **24**: p. 1423-1432.
138. Dell'Era p, R.R., Coco L, Nicoli S, Metra M, Presta M, *Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development.* Circ Res, 2003. **93**: p. 414-420.
139. Xu C, P.S., Rao N, *Characterization and enrihment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells.* Circ Res, 2002. **91**: p. 501-508.
140. Terami H, H.K., Katsumata T, Lio A, Morisaki T, *Wnt11 faciliates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 2004. **325**: p. 968-975.
141. Bruneau BG, *Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis.* Circ Res, 2002. **90**: p. 509-519.
142. Price KM, L.W., Cummins P, *Human atrial and ventricular myosin light-chains subunits in the adult and during development.* Biochem J, 1980. **191**: p. 571-580.
143. Segev H, K.-K.D., Fishman B, Gerecht-Nir S, Ziskind A, Amit M, Coleman R, Itskovitz-Eldor J, *Molecular analysis of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells.* Develop Growth Differ 2005. **47**: p. 295-306.
144. Snir M, K.I., Gepstein A, Coleman R, Itskovitz-Eldor J, Livne E, Gepstein L, *Assesment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**: p. 2355-2363.
145. Hidaka M, S.W., Berstein A, *Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells.* Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**: p. 7370-7375.
146. Hirashima M, K.H., Nishikawa S, Matsuyoshi N, Nishikawa S, *Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis.* Blood, 1999. **93**: p. 1253-1263.
147. Midori I, T.H., Momoko Y, Baba S, Doi H, Tatsutoshi N, *Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31, and VE-Cadherin expression during embryonic stem cell differentiation.* FASEB J, 2005. **19**: p. 371-378.

148. van den Eijnden, v.R.A., van Achterber TA, van der Kruijsen CM, *Differentiation of aggregated murine P19 embryonal carcinoma cells induced by a novel visceral endoderm-specific FGF-like factor and inhibited by activin A.* Mech Dev, 1991. **33**: p. 157-165.
149. Stary M, S.M., Sheikh SP, Weitzer G, *Parietal endoderm secreted S100A4 promotes early cardiomyogenesis in embryoid bodies.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 2006. **343**: p. 555-563.
150. Florini JR, E.D., Magri KA, *Hormones, growth factors, and myogenic differentiation* Annu Rev Physiol, 1991. **53**: p. 201-216.
151. Hay D, S.L., Clark J, Burdon T, *Oct-4 Knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells.* Stem cells, 2004. **22**: p. 225-235.
152. Shim WS, J.S., Wong P, *Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 2004. **324**: p. 481-488.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AFP	Alphafetoprotein
ANF	Atrial Natriuretischer Faktor
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celcius
C	Konzentration
ca.	circa
cDNA	“complementary” Desoxyribonukleinsäure
Cdx2	“Caudal type homeobox transcription factor 2”
d	Tage
DAPI	4’,6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Eomes	eomesodermin
et al.	“et alii”, und andere
EtOH	Ethanol
FBS	Fetales bovines Kälberserum
FOG2	“Friend of GATA-2”
g	Erdbeschleunigung
hCG	humanes Gonadotropin
HNF	“Hepatocyte growth factor”
IgG/M	Immunglobulin der Klasse G/M
M	Molar, mol/L
µ...	Mikro (10^{-6})
MEF	murine embryonale Fibroblasten

Mesp1	“Mesoderm posterior 1”
min	Minute
MHC	“Myosin heavy chain” oder “Major Histocompatibility Complex”
MLC2a	Myosin leicht Kette 2, atrial
MLC2v	Myosin leicht Kette 2, ventrikulär
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	nano (10^{-9})
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RESC	Embryonale Stammzellen vom Rhesusaffen, Linie R366.4
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription- Polymerase Kettenreaktion
sec.	Sekunde
Sox2	“SRY-box containing gene 2”
SPARC	“Secreted protein acidic and rich in cysteine”
SSEA 3/4	“Stage Specific Embryonic Antigen 3/4”
SP-D	„Surfactant protein D“
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T_A	Annealing Temperatur
TBx5/20	T-box5/20
Ttr	transthyretin
U	Unit, Enzymaktivitätseinheit
Verd.	Verdünnung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8. Lebenslauf

Von Dipl.-Biologin Kristin Schwanke

geb. 1976 in Einbeck
ledig
Adresse
Bachstraße 32
31084 Freden/ Leine

Promotion	2002-2006	Promotion im Fachbereich Biologie an der Universität Hannover zum Thema „Charakterisierung und Differenzierung der embryonalen Stammzellinie vom Rhesusaffen R366.4“ angefertigt in den Leibniz Forschungslaboratorien (LEBAO) der Medizinischen Hochschule Hannover.
Studium	1997-2002	Studium des Studienganges Biologie an der Universität Hannover mit dem Abschluss Dipl. Biologin.
Diplomarbeit	08/2002	„Vorarbeiten für die Selektion kardial differenzierter Stammzellen mit Hilfe adenoviraler Vektoren“. Angefertigt wurde die Arbeit in den Leibniz Forschungslaboratorien (LEBAO) der Medizinischen Hochschule Hannover.
Schulbildung	1989-1996	Gymnasium Alfeld/ Leine mit den Abschluss Allgemeine Hochschulreife
	1987-1989	Orientierungsstufe Alfeld/ Leine
	1983-1987	Grundschule Freden/ Leine
Stipendien	2006	Teilnahme an der Baltic Summer School 2006 zum Thema „Stem Cell Biology“
Weitere Tätigkeiten	1996-1997	Freiwilliges Soziales Jahr in der Lebenshilfe Alfeld/ Leine e.V.

8.1 Verzeichnis eigener Veröffentlichungen

8.1.1 Bisherige Publikationen

1. **Winkler ME, Groos S, Kispert A, Menke S, Hoffmann A, Gruh I, Schwanke K, Haverich A, Martin U**
   Serum-free differentiation of murine embryonic stem cells into alveolar type II epithelial cells (*Zur Veröffentlichung eingereicht*)

2. **Gruh I., Wunderlich S, Winkler M, Schwanke K, Heinke J, Blömer U, Ruhparwar A, Haverich A, Martin U**
   Human CMV enhancer: a versatile tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors (*Manuskript in Vorbereitung*)

3. **Schwanke K, Wunderlich S, Reppel M, Winkler ME, Mattzkies M, Itskovitz-Eldor J, Simon AR, Hescheler J, Haverich A, Martin U**
   Generation and Characterization of Functional Cardiomyocytes from Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells (*Stem Cells 2006 Jun, 24(6):1423-32*)

4. **Gruh I, Schwanke K, Wunderlich S, Blömer U, Scherr M, Ganser A, Haverich A, Martin U**
   Shuttle System allowing simplified cloning of expression cassettes into advanced generation lentiviral vectors (*Biotechniques 2005; 38:530-534*)

8.1.2 Abstracts

Schwanke K, Wunderlich S, Beskov A, Chikobava M, Simon AR, Lapin BA, Martin U. Derivation of Trophoectodermal Cells from Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells. *Internal Meeting*: Socchi, Russia, 2006

Winkler ME, Kispert A, Menke S, Wunderlich S, Schwanke K, Beier J, Haverich A, Martin U. Differentiation of murine embryonic stem cells into alveolar type II epithelial cells. *Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs:* Hannover, 2006; *Keystone Symposium "Stem Cells":* Colorado, USA, 2006; *3rd International Meeting Stem Cell Network North Rhine Westphalia:* Münster, 2006

Wunderlich S, Gruh I, Winkler ME, Schwanke K, Heinke J, Blömer U, Haverich A, Martin U. Development of lentiviral vectors mediating tissue specific transgene expression. *Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs:* Hannover, 2006

Schwanke K, Wunderlich S, Reppel M, Winkler ME, Matzkies M, Groos S, Itskovitz-Eldor J, Simon AR, Hescheler J, Haverich A, Martin U. Generation and Characterization of Functional Cardiomyocytes from Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells. *Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs:* Hannover, 2006; *Keystone Symposium "Stem Cells":* Colorado, USA, 2006; *3rd International Meeting Stem Cell Network North Rhine Westphalia:* Münster, 2006

Schwanke K, Winkler ME, Wunderlich S, Schmiedl A, Miller K, Haverich A, Martin U. Molecular, Ultrastructural and Immunhistological Characterization of the Rhesus Monkey derived Stem Cell Line R366.4. *Keystone Symposium "Stem Cells":* Colorado, USA, 2004; *2nd International Meeting Stem Cell Network North Rhine Westphalia:* Bonn/Bad Godesberg, 2004; *Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs:* Hannover, 2004

Scherr M, Gruh I, Schwanke K, Blömer U, Beilner J, Ruhparwar A, Ganser A, Haverich A, Martin U. Detailed Characterization of the Rhesus Monkey Embryonic Stem Cell Line R366.4. *Keystone Symposium "From Stem Cells to Therapy":* Colorado, USA, 2003

Scherr M, Gruh I, Schwanke K, Blömer U, Beilner J, Ruhparwar A, Ganser A, Haverich A, Martin U. Construction of lentiviral vectors allowing selection of stem cell derived cardiomyocytes. *German Society for Cell Biology, Society for Developmental Biology: 1st Cell Biology and Development Meeting:* Bonn, 2003; *Keystone Symposium "From Stem Cells to Therapy":* Colorado, USA, 2003

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Martin. Ohne seine Betreuung, zahlreiche Diskussionen, Ratschläge und Anregungen wäre das gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. W. Müller danke ich herzlich für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung meiner Promotion. Herrn Prof. Dr. A. Haverich danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe an der MHH anfertigen zu können. Prof.Dr. Itskovitz-Eldor danke ich für die Überlassung der embryonalen Stammzellinie R366.4 und die Zellkulturprotokolle für embryonale Stammzellen.

Allen ehemaligen und momentanen Mitgliedern der Arbeitgruppe von Prof. Dr. Martin danke ich für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre. Im Einzelnen danke ich Stephanie Wunderlich für ihre Freundschaft, für viele Diskussionen über fachliche und private Angelegenheiten, ihren seelischen Beistand bei schwierigen Fragestellungen und die vielen aufmunternden Worte. Vielen Dank für das ausdauernde und detaillierte Korrekturlesen dieser Arbeit und die schönen Tage in Jever. Sandra Menke danke ich für den gemeinsamen Start in die Zellkultur embryonaler Stammzellen und das gemeinsam Meistern vieler zunächst unlösbar erscheinender Probleme und Fragestellungen. Monica Winkler danke ich für ihre unerschöpfliche Expertise in allen Fragen der Molekularbiologie. Ina Gruh, Ruth Olmer, Alexandra Haase und Ingrid Schmidt-Richter danke ich für die vielen netten Gespräche zwischendurch und das Erschaffen eines netten Arbeitsklimas. Mein besonderer Dank gilt Ruth Olmer für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Danke für den Spaß, den Wir bei der gemeinsamen Arbeit hatten und Deine unermüdliche Hilfsbereitschaft. Einen großen Dank auch an Mirela Wilkening, den „guten Geist“ der AG Martin.

Weiterhin danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dr. Michael Reppel danke ich für die Durchführung der vielen elektrophysiologischen Untersuchungen. Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Stephanie Groos und Dr. Andreas Schmiedl für die Anfertigung der vielen elektronenmikoskopischen Aufnahmen. Prof. Dr. Miller danke ich für die Anfertigung der G-Banden Karyogramme.

Mein ganz besonderer und größter Dank gilt meiner Familie. Meiner Mutter Evelyn Schwanke danke ich für ihre unermessliche Unterstützung und Liebe in allen Lebenslagen. Marc Hoffmeister danke ich für sein Verständnis während meines Studiums und der Promotionszeit. Das Ertragen der vielen „Aufs“ und „Abs“ innerhalb der Promotion mit stoischer Geduld und für die vielen aufbauenden Worte.

DANKE

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die der Universität Hannover eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung und Differenzierung der embryonalen Stammzellinie vom Rhesusaffen R366.4“

in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. Ulrich Martin ohne sonstige Hilfe durchgeführt und eigenständig verfasst habe. Alle benutzten Hilfsmittel, Quellen und zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen habe ich vollständig angegeben.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Freden /Leine, im November 2006

Kristin Schwanke