

Entwicklung von Protokollen zur myokardialen Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen in Suspensionskultur

Diplomarbeit

zur Erlangung des Hochschulgrades Dipl.- Ingenieur
am Fachbereich Life Science
der Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg

vorgelegt von

Andreas Lange

angefertigt in den
Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie
und künstliche Organe Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
Medizinische Hochschule Hannover
2011-2012

Betreut durch

Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)
Dr. rer. Nat. Robert Zweigerdt (Lebao, MHH Hannover)

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Entwicklung von Protokollen zur myokardialen Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen in Suspensionskultur“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hannover, den 28.03.2012

Andreas Lange

Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Martin sowie Dr. Robert Zweigerdt bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Diplomarbeit in den Leibnizforschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe der Medizinischen Hochschule Hannover anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich möchte ich meinen Dank für die Übernahme der offiziellen Betreuung durch die HAW-Hamburg während der Diplomarbeit aussprechen, sowie für die Hilfe bei kleinen und größeren Problemen.

Bei Susann Müller bedanke ich mich herzlich für die tolle praktische Einarbeitung in die Zellkultur und Betreuung vor Ort, wo sie immer ein offenes Ohr für mich und meine Fragen hatte. Ich werde die gemeinsamen Gespräche während der „Kaffeepause“ sehr vermissen.

Weiterhin möchte ich mich hiermit aus tiefstem Herzen bei Dr. Robert Zweigerdt für seine Anleitung in fachlichen Angelegenheiten, das unendliches Verständnis bei Problemen sowie die vielen aufschlussreichen Gespräche bedanken. Danke Robert!

Außerdem möchte ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe Zweigerdt für die schnelle Aufnahme ins Team sowie das tolle Arbeitsklima bedanken. Besonderer Dank gilt hierbei Sarah Dettmer, Ruth Olmer, Kristin Schwanke, Monica Jara-Avaca, Henning Kempf und Maria Ensthaler. Danke dass Ihr immer für Fragen ansprechbar wart und mir durch unsere Gespräche die Arbeitszeit nur halb so lang erschien.

Weiterhin bedanke ich mich noch bei allen anderen Mitarbeitern des Lebao für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meiner Familie, insbesondere **meinen Eltern** und **meiner Freundin Yvonne** danken, denen diese Arbeit gewidmet ist. Ohne Eure unermüdliche Geduld und Unterstützung wäre ich nie so weit gekommen! Danke, dass Ihr immer und überall für mich da seid!

Publikationen

Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors

Ruth Olmer^{1,2}, Andreas Lange^{1,2}, Sebastian Selzer³, Cornelia Kasper⁴, Axel Haverich^{1,2}, Ulrich Martin^{1,2*}, Robert Zweigerdt^{1,2*}

1 Leibniz Research Laboratories for Biotechnology and Artificial Organs (LEBAO), Department of Cardiac, Thoracic-, Transplantation and Vascular Surgery

2 REBIRTH-Cluster of Excellence, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany.

3 DASGIP AG, Rudolf Schulten Strasse 5, 52428 Juelich, Germany

4Institute for Technical Chemistry, Leibniz University Hannover, Hannover, Germany

In Revision, Journal: Tissue Engineering, 2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Embryonal- und Herzentwicklung des Menschen.....	1
1.2 Aufbau des Säugetierherzens.....	4
1.3 Schädigung des Herzens durch Myokardinfarkt und deren Folgen.....	5
1.4 Stammzellen und deren Ethische Kontroverse.....	6
1.5 Können Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) eine mögliche ethisch unbedenkliche Alternative zu ES-Zellen darstellen?.....	8
1.6 Entwicklung neuer Ansätze zur Stammzellbasierten Therapie und Ziel dieser Arbeit.....	8
2. Material.....	10
2.1 Geräte.....	10
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	11
2.3 Zellkulturmedien.....	12
2.3.1 Basalmedien.....	12
2.3.2 Medienzusätze.....	12
2.3.3 Kulturmedium für embryonale murine Fibroblasten.....	13
2.3.4 Kulturmedium für undifferenzierte Stammzellen.....	13
2.3.5 Kulturmedium für die Suspensionskultur undifferenzierter Stammzellen.....	13
2.3.6 Differenzierungsmedien.....	14
2.4 Chemikalien und Lösungen.....	15
2.5 Gebrauchsfertige Kits.....	16
2.6 Zelllinie.....	16

3. Methoden	17
3.1 Zellkultur.....	17
3.1.1 Isolierung, Expansion und Inaktivierung von murinen Embryonalen Fibroblasten.....	17
3.1.2 Standardkultur auf inaktivierten murinen Fibroblasten.....	18
3.1.3 Einzelzelldissoziation.....	18
3.1.4 Suspensionskulturen.....	19
3.1.5 Zellzahlbestimmung.....	19
3.1.6 Differenzierung.....	20
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	20
3.2.1 Analyse der Genexpression auf mRNA Ebene.....	20
3.2.2 RNA Isolierung.....	20
3.2.3 Bestimmung von Quantität und Qualität der isolierten Gesamt RNA.....	21
3.2.4 cDNA Synthese.....	21
3.2.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	21
3.2.6 Agarosegelelektrophorese.....	22
3.2.7 Quantitative Echtzeit PCR.....	23
4. Ergebnisse	25
4.1 Morphologie undifferenzierter pluripotenter hES-Zellen auf Feederlayer und in Suspensionskultur.....	26
4.2 Vergleiche von möglichen Kulturmedien zur Kultivierung pluripotenter hES-Zellen in Suspension.....	27
4.3 Untersuchungen der Auswirkung von Zellinokulationsdichten auf die Aggregatgröße.....	35
4.4 Optimierung der Differenzierungsexperimente durch BMP 4 / Activin A Zugabe.....	41
4.5 Optimierung der Differenzierungsexperimente durch BMP 4 / DMSO / IDE 2 / SB 203580 Zugabe.....	52
4.6 Optimierung der Differenzierungsexperimente durch BMP 4 / Activin A / bFGF Zugabe.....	58
4.7 Reproduktion des BMP 4 / bFGF Differenzierungsexperimentes.....	65

5. Diskussion	68
5.1 Vergleich alternativer Kulturmedien zur Kultivierung von hES-Zellen in Suspensionskultur und der Einfluss ungewollter Bewegung von Kulturschalen auf die Entwicklung von Aggregaten.....	68
5.2 Kardiale Differenzierungen nach dem Standardprotokoll.....	70
5.3 Der Einfluss der Inokulationsdichte auf die Entwicklung von Aggregaten und Stoffwechselfparameter in Suspensionskultur; Erfolgreiche Anpassung der Suspensionskultur an ein „12-well“ Kulturschalen Format.....	73
5.4 Optimierungsexperimente zur Myokardialen Differenzierung der Suspensionskultur durch Zugabe der Wachstumsfaktoren BMP4 und Activin A.....	76
5.5 Optimierungsexperimente zur Myokardialen Differenzierung der Suspensionskultur durch Zugabe von niedermolekularen Wirkstoffen.....	78
5.6 Optimierungsexperimente zur Myokardialen Differenzierung der Suspensionskultur durch Zugabe des Wachstumsfaktors bFGF.....	79
5.7 Fazit.....	81
 Literaturverzeichnis	 82

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Herz des Menschen.....	5
Abb. 2: Schematische Darstellung zur Entstehung der Inneren Zellmasse (ICM) und daraus isolierte pluripotente ES-Zellen.....	6
Abb. 3: Verwendete pluripotente hES-Zellen unter Standardkulturbedingungen.....	26
Abb. 4: Aggregate aus hES-Zellen nach 4 Tagen in verschiedenen Expansionsmedien.....	28
Abb. 5: EB's nach 7-14 Tagen in Differenzierungsmedium expandiert mit verschiedenen Suspensionsmedien.....	30
Abb. 6: Auswertung der Kontrahierenden Areale in der Differenzierung.....	32
Abb. 7: Auswertung qPCR Versuch Mediumvergleich.....	33
Abb. 8: Aggregate aus hES-Zellen, Passage 1-3 des Expansionversuches an Tag 3 im 6-„well“	36
Abb. 9: Versuch Inokulationsdichte Auswertung Glucose / Lactat 6-„well“	38
Abb. 10: Versuch Inokulationsdichte Auswertung Glucose / Lactat 12-„well“	39
Abb. 11: Versuchsschema BMP4 / Activin A Differenzierung.....	43
Abb. 12: hES-Zellen Aggregate Expansion Tag 3,5 mTeSR®1.....	44
Abb. 13: EB's in BMP 4/Activin A Differenzierung Tag 2.....	45
Abb. 14: EB's in BMP 4/Activin A Differenzierung Tag 4.....	47
Abb. 15: EB's in BMP 4/Activin A Differenzierung Tag 9.....	48
Abb. 16: qPCR Auswertung BMP 4 Differenzierung.....	49
Abb. 17: Versuchsschema BMP4 / IDE 2 / SB 203580 Differenzierung.....	53
Abb. 18: hES-Zellen Expansion Tag 3,5 mTeSR®1.....	54
Abb. 19: EB's BMP 4/IDE 2/SB Differenzierung Tag 2.....	55
Abb. 20: EB's BMP 4/IDE 2/SB Differenzierung Tag 7 bSF-Medium.....	56
Abb. 21: EB's BMP 4/IDE 2/SB Differenzierung Tag 7 RPMI-Medium.....	57
Abb. 22: Versuchsschema BMP4 / Activin A / bFGF Differenzierung.....	59
Abb. 23: hES-Zellen Expansion Tag 3,5 mTeSR®1.....	60
Abb. 24: EB's BMP 4 / bFGF / Activin A Differenzierung Tag 2.....	61
Abb. 25: EB's BMP 4 / bFGF / Activin A Differenzierung Tag 10 bSF-Medium.....	62
Abb. 26: EB's BMP 4 / bFGF / Activin A Differenzierung Tag 10 bSF-Medium +SB 203580.....	63

Abb. 27: Kontrahierende Areale hES-Zellen BMP 4 / Activin A / bFGF Differenzierung Tag 10.....	64
Abb. 28: Versuchsschema Reproduktion BMP4 / bFGF Differenzierung.....	65
Abb. 29: Kontrahierende Areale hES-Zellen BMP 4 / bFGF Differenzierung Tag 10-14.....	66
Abb. 30: qPCR Auswertung BMP 4 / bFGF Differenzierung Tag 14.....	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standard PCR Programm.....	22
Tabelle 2: Mastermix für Go-Taq-Polymerase PCR-Reaktionen.....	22
Tabelle 3: Solaris qPCR Programm.....	24
Tabelle 4: Mastermix für Solaris qPCR-Reaktionen.....	24
Tabelle 5: hES-Zellen Inokulationsdichte und Expansionsrate nach 3 Tagen in 6-„well“ und 12-„well“ Platten.....	37

Zusammenfassung

Weltweit gehören Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zu den häufigsten Todesursachen. Bei diesen Erkrankungen, vor allem in der Folge eines Myokard Infarkts, kommt es häufig zu einem irreversiblen Verlust von Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), die über die patienteneigene Zellregeneration nicht wieder ersetzt werden können. Daher wird in die Zellersatztherapie große Hoffnung gesetzt. Auf die speziellen Erkrankungen des Herzens bezogen, sollen neue Therapien entwickelt werden, die darauf abzielen verlorene Kardiomyozyten zu ersetzen, um damit die Funktion des Herzens zu verbessern und deren Ausfall zu vermeiden.

Eines der großen bisher ungelösten Probleme für die Entwicklung zellbasierter kardialer Therapien stellt die Bereitstellung humaner Kardiomyozyten dar. Pluripotente Stammzellen könnten als Ausgangszellquelle potentiell geeignet sein. Bisher verwendete konventionelle 2D-Methoden zur Kultivierung und nachfolgenden gezielten Differenzierung der pluripotenten Stammzellen zu Kardiomyozyten sind jedoch nicht in der Lage, Zellen in geeigneter Menge und Qualität bereitzustellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane Embryonale Stammzellen (hES-Zellen) in einem definierten Medium über mehrere Passagen erfolgreich als undifferenzierte Zellen in skalierbarer Suspensionskultur kultiviert werden konnten. Dieser Ansatz ist auch für ein späteres „Upscaling“ in Bioreaktoren geeignet, wodurch man in der Lage wäre, die für eine erfolgreiche Zelltherapie benötigten großen Zellmengen bereitzustellen.

Als wichtiger Parameter zur Verbindung der Zellexpansion und Differenzierung wurde außerdem die Inokulationsdichte für die Bildung von Aggregaten zur anschließenden Differenzierung optimiert.

Ausgehend von diesen Suspensions-Aggregaten wurde ein Protokoll ausgearbeitet, das durch optimierte Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren und niedermolekularer Wirkstoffe („Small Molecules“) erfolgreich zur gezielten myokardialen Differenzierung von hES-Zellen geführt hat. Damit hat die Arbeit entscheidend zur Verbesserung des bisherigen Standardprotokolls beigetragen.

1. Einleitung

In die Regenerative Medizin werden große Hoffnungen gesetzt. In naher Zukunft sollen damit viele Erkrankungen erfolgreich behandelt werden.

Herz-Kreislauf Erkrankungen sind eine dieser Erkrankungen und gehören weltweit zu den führenden Todesursachen. Allein in Deutschland verstarben im Jahr 2010 über 400000 Menschen an dieser Art Erkrankung [1].

Humane embryonale Stammzellen haben das Potential in der regenerativen Medizin eine große Rolle zu spielen, sowohl für die Grundlagenforschung als auch die klinische Forschung.

Durch ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrbarkeit wird angenommen, dass sie eine unerschöpfliche Quelle zur Gewinnung von Gewebe- und Zellersatz darstellen. Weiterhin sind Stammzellen wegen ihrer Differenzierungseigenschaften zu allen 3 Keimblättern dazu geeignet, eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen im Detail zu untersuchen. In der Grundlagenforschung möchte man damit ein besseres Verständnis der Mechanismen der Vermehrung und Differenzierung erforschen, sowie der Regulation und Entwicklung früher Stammzellstadien.

Dies soll in der klinischen Forschung die Möglichkeit zur Schaffung von Gewebeersatz ermöglichen, besonders im Hinblick auf solche Gewebe, die kein oder nur ein geringes Regenerationsvermögen aufweisen, wie z.B. Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) nach Schädigung des Herzens durch Hypoxie infolge eines Infarktes.

1.1 Embryonal- und Herzentwicklung des Menschen

Ein zeitlich und räumlich genau festgelegtes Expressionsmuster von genomisch codierten Genen stellt den festgelegten Plan der embryonalen Entwicklung eines Individuums dar. Hierbei unterliegen die Entwicklungsvorgänge präzise koordinierten Wechselwirkungen [7].

Hierbei werden die Differenzierungsvorgänge auch durch den Einfluss von Umgebungsfaktoren, wie Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen und Geweben, beeinflusst.

Nach Befruchtung der humanen Eizelle beginnt ungefähr ab der 30 Stunde die Furchung der Zygote. Das Stadium der *Morula* ist durch 16 bis 32 Blastomere gekennzeichnet, die eine kompakte Zellkugel bilden. Vor der Implantation in den Uterus wird die Blastozyste gebildet, die aus dem Trophoblast, dem Embryoblast sowie der inneren Zellmasse und einer äußeren Zellschicht besteht.

Aus dem Trophoblast geht der embryonale Teil der Plazenta und die Eihäute hervor, wobei aus den Zellen des Embryoblasten der eigentliche Embryo entsteht.

Etwa am siebten Tag erscheint eine untere Zellschicht des Embryoblasten, der Hypoblast (primitives Endoderm). Die restlichen Zellen des Embryoblasten ordnen sich zu einem Epithel, dem sogenannten Epiblast an.

Zwischen den beiden Schichten bildet sich eine Basalmembran.

Der Dottersack geht nach Beginn der Implantation der Blastozyste in den Uterus aus dem Hypoblast hervor.

Im 14 Tage alten Keim beginnt die Differenzierung der Keimscheibe.

Hierbei bildet sich der sogenannte Primitivstreifen und es beginnt die Gastrulation.

Dieser verdickt sich nach vorn zum Primitivknoten. Etwa zur gleichen Zeit löst sich ein Teil der Basalmembran des Epiblastenepithels am Primitivstreifen auf.

Die dort liegenden Epiblastzellen lösen sich aus dem epithelialen Verband apikal heraus und differenzieren zum Mesoderm (epitheliale-mesenchymale Umwandlung).

An dieser nun entstandenen Einsenkung bildet sich die Primitivrinne.

Der Transkriptionsfaktor *Brachyury* nimmt bei der epithelialen-mesenchymalen Umwandlung eine Schlüsselfunktion ein. Zudem sind eine Reihe von intraembryonal und extraembryonal produzierten Signalmolekülen, wie der Wachstumsfaktor *Nodal* aus der TGF β -Familie, und spezifische Inhibitoren bei der Mesodermbildung beteiligt.

Unter dem vorderen Ende des Primitivstreifens werden einzelne aus dem Epiblast ausgewanderte Zellen in die Hypoblastschicht aufgenommen.

Der Hypoblast wird so zur Seite gedrängt, so dass sich das innere Keimblatt, das definitive Endoderm, bildet. Die zurückgebliebenen Zellen der Epiblastschicht repräsentieren das Ectoderm.

Aus dem Mesoderm entstehen in der Folge das Bindegewebe der Haut und der inneren Organe von Atem- und Darmtrakt, die verschiedenen Gewebe des Bewegungsapparates, des Herz-Kreislauf-Systems und des Urogenitalsystems.

Das Endoderm steuert im Wesentlichen die Entwicklung der inneren Oberflächen und Drüsenepithelien von Atem- und Darmtrakt.

Aus dem Ectoderm entwickeln sich alle epidermalen Strukturen mit Anhangsgebilden wie Haare, Drüsen, Hornsubstanzen, Zahnschmelz, Epithelien, wie das der Mund- und Nasenhöhle und des Innenohrs, das Zentrale Nervensystem und die Neuralleistenzellen, aus denen später das periphere Nervensystem entsteht [7].

Die erste sichtbare Herzentwicklung wird Mitte der dritten Woche durch Induktionssignale aus dem Endoderm eingeleitet und umfasst die Entwicklung der ersten Blutgefäße. Hierzu proliferieren aus der Splanchnopleura (mit Endoderm verbindende innere Mesodermbblatt) Mesenchymzellen und bilden isolierte Zellansammlungen, die sich später zu Endothelrohren zusammenfügen. Diese werden während der Herzentwicklung mit Hilfe einer hochspezifischen Genexpression einschließlich der Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5* und *Gata4*, die durch die Wachstumsfaktoren der BMP-, FGF- und Wnt-Familie induziert wird, zur kardiogenen Platte geformt.

Am Ende der dritten Woche wird mit Abfaltung des Embryos die kardiogene Platte zum primitiven endokardialen Herzschlauch umgeformt. Die ursprünglichen Schenkelenden dieses einheitlichen länglichen Herzschlauches bilden dabei den venösen und arteriellen Pol. Der endokardiale Herzschlauch wird von der Splanchnopleura umgeben. Aus der Splanchnopleura bilden sich die Anlagen des Myokards. Das Epikard (Herzaußenhaut) überwächst dann die Myokardanlage sekundär von der proepikardialen Anlage (am venösen Pol in der Nähe des *Septum transversum*) aus und das Perikard (Herzbeutel) wird von der Somatopleura (liegt dem Ektoderm an) gebildet. Das Herz liegt nach Abfaltung des Embryos ventral des Vorderdarms. Gleichzeitig wächst der Herzschlauch in die Länge und gliedert sich durch Einschnürungen und Aussackungen in mehrere Teile. Zu Beginn der vierten Woche fängt das Herz an zu schlagen.

Der einfache Herzschlauch wird durch das Wachstum in die Länge gekrümmt und bildet eine Herzscheife, die durch den Sulcus bulboventricularis eingekerbt wird. Die Herzscheife wird in der vierten bis siebten Woche durch Septen und Klappen in vier Räume unterteilt. In das primitive Herz münden nun drei paarige Venensysteme. Zum einen die *Venae vitellinae*, die das Pfortadersystem bildet, zum anderen die *Venae cardinales*, aus denen das Kava-System hervorgeht und letztendlich die *Venae umbilicales*, die sich nach der Geburt weitgehend zurückbildet. In der vierten und fünften Woche bilden sich die Schlundbögen.

Hier wachsen Arterien aus dem *Saccus aorticus* in die Schlundbögen ein und bilden so die zugehörigen Schlundbogenarterien. Diese Arterien werden dann in der sechsten und siebten Woche zu den paarigen *Arteriae subclaviae*, *Arteriae carotides* und *Arteriae pulmonales* umgewandelt [7].

1.2 Aufbau des Säugetierherzens

Das Säugetierherz ist ein Hohlmuskel mit vier voneinander getrennten Räumen, den zwei Kammern (Ventrikel) und den zwei Vorhöfen (Atrium) [siehe Abb. 1].

Durch die Verdoppelung der Herzkammern kann eine stufenweise Erhöhung des Druckes erfolgen, wenn das Blut durch Kontraktion des Herzens von der venösen Seite des Kreislaufs in die arterielle Seite übergeleitet wird.

Ein weiterer funktionell wichtiger Teil des Herzens ist die Herzbasis, die aus straffem Bindegewebe aufgebaut ist. Sie ist der Ursprungsort der Lungenarterie und der Aorta. Zudem ist die Herzbasis Sitz der Herzklappen, zu denen die beiden Segelklappen (Gefäßklappen) und die beiden Taschenklappen gehören.

Das aus dem Körper kommende sauerstoffarme Blut sammelt sich im rechten Atrium und fließt vom rechten Ventrikel in den Lungenkreislauf. Das sauerstoffangereicherte Blut wird von der Lunge in das linke Atrium geleitet und von dort über den linken Ventrikel zum Körperkreislauf zurückgepumpt. Die Klappen verhindern durch passive Bewegung einen Rückfluss des Blutes.

Die Herzmuskelzellen sind elektrisch miteinander über Gap junctions (Membranverbindungen) gekoppelt. Der Herzschlag, der aus der Systole (rhythmische Kontraktion) und Diastole (Relaxation) besteht, wird durch Aktionspotentiale (AP) der Schrittmacherregion (im Sinusknoten) elektrisch ausgelöst, welche sich über die Atrien zum AV-Knoten ausbreiten und von dort auf die Ventrikel übertragen werden [9].

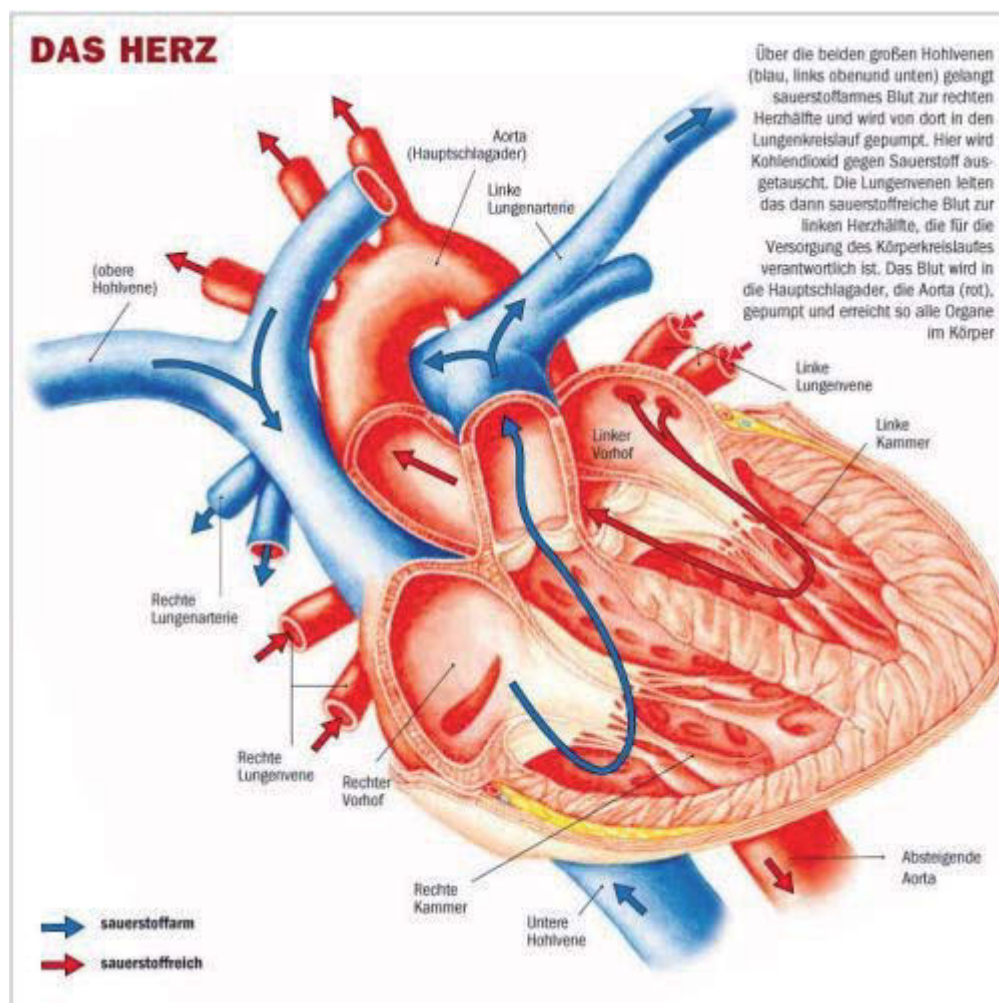


Abb. 1: Herz des Menschen

Aufbau des menschlichen Herzens mit Beschreibung der einzelnen Teile [8].

1.3 Schädigung des Herzens durch Myokardinfarkt und deren Folgen

Aufgrund der Ernährungsgewohnheiten in industriellen Staaten und schädlicher Umwelteinflüsse gehören Gefäßerkrankungen wie atherosklerotische Ablagerungen zu den häufigsten Erkrankungen. Bezogen auf das Herz kann es hierbei zu einem Verschluss der Herzgefäße kommen. Unterhalb dieses Verschlusses kommt es zu einer fehlenden Nährstoffversorgung und dadurch zum Absterben des Gewebes, welches dann durch ein starres Narbengewebe ersetzt wird.

Die Regeneration von zerstörtem Gewebe nach einem Myokardinfarkt stellt eine hochinteressante Möglichkeit dar, die Funktion des geschädigten Herzens in Zukunft wieder zu verbessern.

Es wurde lange angenommen, dass es sich bei den im Herzen vorkommenden Kardiomyozyten um terminal differenzierte Zellen handelte. Damit hätten sie die Fähigkeit zur Proliferation verloren. Neueste Forschungen ergaben jedoch, dass das Herz offensichtlich doch eine gewisse Regenerationsfähigkeit aufweist [2-5].

Hierbei reicht die auftretende Zellteilung aber nicht aus, um großflächig zerstörte Gewebe in Folge eines Herzinfarkts durch neue Kardiomyozyten funktionell zu ersetzen.

Daher besteht die Notwendigkeit neue Ansätze zu finden, um das abgestorbene Gewebe zu regenerieren oder durch *in vitro* hergestelltes Gewebe zu ersetzen.

1.4 Stammzellen und deren Ethische Kontroverse

Im Körper des Menschen sind die meisten vorhandenen Zellen differenzierte Zellen. Diese Zellen können ihre Funktion untereinander nicht auswechseln, da diese durch die Differenzierung festgelegt sind. Stammzellen hingegen sind undifferenzierte Zellen, die mittels mitotischer Zellteilung wieder Stammzellen und differenzierte Tochterzellen hervorbringen können. Im Allgemeinen werden *totipotente* Stammzellen, *pluripotente* Stammzellen und *multipotente* Stammzellen unterschieden [7].

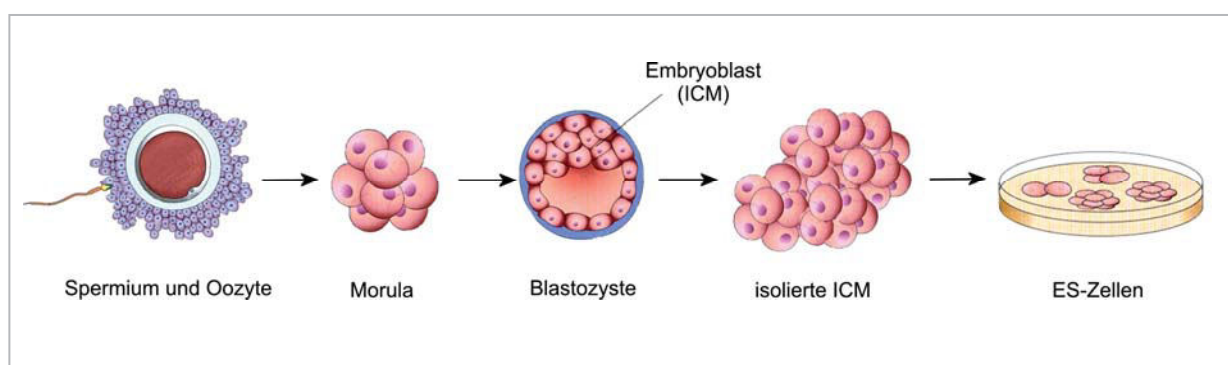


Abb. 2: Schematische Darstellung zur Entstehung der Inneren Zellmasse (ICM) und daraus isolierte pluripotente ES-Zellen.

Ablauf der Entstehung der ICM über die verschiedenen Stadien und die daraus folgende Isolierung von pluripotenten ES-Zellen, schematisch dargestellt [7].

Wird eine Oozyte von einem Spermium befruchtet, entstehen bei der ersten Teilung totipotente Stammzellen. Diese totipotenten Stammzellen sind vom Vierzell- bis Achtzellstadium anzutreffen. Dieser Zelltyp hat das Potenzial, ein lebensfähiges Individuum zu bilden. Durch weitere Zellteilung und Differenzierung entsteht die Blastozyste mit der inneren (Embryoblast) und äußeren (Trophoblast) Zellmasse. Der Trophoblast bringt alle extraembryonalen Gewebe hervor. Aus den Zellen des Embryoblasten (ICM) bildet sich später der Embryo. Die Zellen der ICM besitzen die Fähigkeit Derivate aller drei Keimblätter (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) zu bilden und werden daher als pluripotent bezeichnet. Aus der ICM lassen sich Zellen gewinnen und kultivieren, die als embryonale Stammzellen (ES-Zellen) bezeichnet werden. Auch ES-Zellen sind sie in der Lage, in alle Zellderivate der drei Keimblätter zu differenzieren [10,11].

Die Verwendung von humanen Embryonalen Stammzellen (hES-Zellen) in der Medizin und Forschung wird von einem großen Teil der Gesellschaft als ethisch bedenklich angesehen, da zu deren Gewinnung die Zerstörung menschlicher Blastozysten erforderlich ist.

Die Art der Gewinnung von hES-Zellen nach *in-vitro*-Fertilisation (siehe Abb. 2) führte zu einer bis heute andauernden ethischen Debatte. Dabei wird die Frage diskutiert, ob der frühe Embryo als menschliches Wesen angesehen werden soll.

In Deutschland verbietet das Embryonenschutzgesetz humane Embryonen für Forschungszwecke zu zerstören, sowie diese künstlich herzustellen.

Es ist jedoch unter Auflagen möglich, an importierten hES-Zellen zu forschen.

Dies wird durch das Stammzellgesetz vom Juli 2002 geregelt, welches im Jahr 2008 novelliert wurde [12]. Damit dürfen nur hES-Zelllinien nach Deutschland importiert werden, die vor dem 1. Mai 2007 gewonnen wurden.

1.5 Können Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) eine mögliche ethisch unbedenkliche Alternative zu ES-Zellen darstellen?

Die 2007 durch Takahashi et al. [13] entwickelte Induktion pluripotenter Zelllinien aus somatischen Zellen stellte einen Durchbruch in der Stammzellforschung dar. Dadurch wurde es möglich, Patienten-eigene pluripotente Zelllinien zu generieren, die keine Abstoßung nach autologer Transplantation zurück in den Patienten zeigen sollten. Die Fähigkeit unter geeigneten Bedingungen alle somatischen Zelltypen hervorzubringen sowie das hohe Proliferationspotential geben die Hoffnung auf eine ethisch unbedenkliche Alternative zu hES-Zellen. Weitere Arbeiten in unserem Institut durch Haase et al [14] sowie Olmer et al [15] bestätigten dies und werden zurzeit weiter erforscht.

1.6 Entwicklung neuer Ansätze zur Stammzellbasierten Therapie und Ziel dieser Arbeit

Der Entwicklung dieser Ansätze stehen große Hindernisse gegenüber; eines der Kernprobleme sind die fehlenden Zellquellen und deren Kardiale Differenzierungen. Abschätzungen zur benötigten Menge an Stammzell-abgeleiteter Kardiomyozyten nach einem myokardialen Infarkt bewegen sich im Bereich von mehreren Milliarden differenzierter Zellen pro Patient [6].

Bei einer realistischen Betrachtung können die für klinische Anwendungen benötigten Zellmengen über die bisher verwendeten 2D-Kulturbedingungen aus logistischen, ökonomischen und klinischen Gesichtspunkten nicht bereitgestellt werden. Die Entwicklung von Methoden zur Expansion pluripotenter humaner Stammzellen in skalierbaren Suspensionskulturen und deren anschließende myokardiale Differenzierung ist daher ein wichtiger Schritt zur Massenproduktion dieser Zellen, idealer Weise unter klinisch relevanten Qualitätsmaßstäben.

Darum war die Aufgabe dieser Arbeit, alternativen zu den bisherigen konventionellen 2D-Kulturbedingungen zu finden. Weiterhin sollten effiziente Protokolle zur myokardialen Differenzierung entwickelt werden, da diese bisher oft geringe Effizienzen aufwiesen und z. B. durch die Zugabe von Serum schwer zu reproduzieren waren.

In der Arbeit wurde durch ein skalierbares Suspensionskulturverfahren eine erfolgreiche Alternative zu den bisherigen konventionellen Verfahren entwickelt, welches sich auch zu einem späteren Upscaling in Bioreaktoren eignet.

Weiterhin wurde die Inokulationsdichte experimentell optimiert, um große homogene Zellaggregate für die folgende Differenzierung zu erhalten.

Durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren und niedermolekularer Substanzen konnte das Protokoll zur myokardialen Differenzierung essentiell verbessert werden.

2. Material

2.1 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	(Agilent, Böblingen)
Axiovert A1 Mikroskop	(Zeiss, Göttingen)
Olympus Zellkultur Mikroskop CK 40	(Olympus, Hamburg)
Elektrische Pipettierhilfe Pipetus®	(Hirschmann, Eberstadt)
Elektrophorese Kammer, Sub Cell GT	(Bio Rad, München)
Geldoc	(Bio-Rad, München)
Eppendorf mastercycler	(Eppendorf, Hamburg)
Eppendorf realplex	(Eppendorf, Hamburg)
Einfrierbox, Cryo 1°C freezing container	(Nalgene, Neerjise, Belgien)
pH Meter, pH539	(WTW, Weilheim)
Pipetten	(Eppendorf; Hamburg)
1-10µl	
20-200µl	
100-1000µl	
Pipetman	(Gilson, Middletown, USA)
1-10µl	
2-20µl	
50-200µl	
200-1000µl	
Sanyo CO2 Inkubator MCO-20AIC	(Sanyo, Bad Nenndorf)
Sterilwerkbank Herasafe	(Heraeus, Osterode)
Sterilwerkbank Heraeus LaminAir	(Heraeus, Osterode)
Trio Thermoblock	(Biometra, Göttingen)
Vortexer	(Ika-Works, Wilmington, USA)
Wasserbad GFL 1083	(Heraeus, Osterode)
YSI 2300 STAT Plus™	(YSI Life Science, Ohio, USA)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Einwegspritzen 10 ml	(Braun, Melsungen)
Einfrierröhrchen PP 1ml	(Greiner, Frickenhausen)
Gewebekulturplatten	
6 „well“ und 12 „well“	(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
Suspensionskulturplatten	
6 „well“ und 12 „well“	(Greiner, Frickenhausen)
Pipettenspitzen	
TIP-ONE (1-20µl, 20-200µl, 100-1000µl)	(Star Lab, Ahrensburg)
200µl, 1000µl	(Sarstedt, Nümbrecht)
0,1-10µl	(Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße	
0,5ml	(Eppendorf; Hamburg)
1ml	(Eppendorf; Hamburg)
2ml	(Eppendorf; Hamburg)
15ml Falconröhrchen	(Greiner, Frickenhausen)
50ml Falconröhrchen	(Greiner, Frickenhausen)
Serologische Pipetten 1ml – 50 ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Sterilfilter	
Bottle Top 500 ml	(Nalgene, Neerjise, Belgien)
Spritzenfilter 0,22 µm	(Roth Karlsruhe)
Zellsiebe 100µm	(VWR, Darmstadt)

2.3 Zellkulturmedien

2.3.1 Basalmedien

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	(Invitrogen, Karlsruhe)
KnockOut DMEM	(Invitrogen, Karlsruhe)
RPMI-1640	(Invitrogen, Karlsruhe)
mTeSR®1	(StemCell Technologies, Vancouver, Kanada)
STEMPRO® hESC SFM	(Invitrogen, Karlsruhe)
NutriStem™ XF/FF	(StemGent, San Diego, USA)

2.3.2 Medienzusätze

MEM nicht essentielle Aminosäuren	(Invitrogen, Karlsruhe)
L-Glutamin	(Invitrogen, Karlsruhe)
Serumersatz (KnockOut Serumreplacement)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Fötales Kälberserum (FCS)	(PAA, Cölbe)
β-Mercaptoethanol	(Invitrogen, Karlsruhe)
Insulin-Transferin-Selenium (ITS)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Transferin-Selenium (TS)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Basic fibroblast growth factor (bFGF)	(bereitgestellt vom Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover)
Rho Kinase Inhibitor (Y27632) (RI)	(bereitgestellt vom Institut für organische Chemie, Leibniz Universität Hannover)
SB 203580	(bereitgestellt vom Institut für organische Chemie, Leibniz Universität Hannover)
Stemolecule IDE-2	(StemGent, San Diego, USA)
BMP 4	(StemGent, San Diego, USA)
Activin A	(StemGent, San Diego, USA)

2.3.3 Kulturmedium für embryonale murine Fibroblasten

90 % Dulbecco´s Modified Eagle Medium

10 % Fötale Kälberserum

1 % nicht essentielle Aminosäuren

1 % L-Glutamin (2mM)

2.3.4. Kulturmedium für undifferenzierte Stammzellen

80 % KnockOut DMEM

20 % Serumersatz

1% nicht essentielle Aminosäuren

0,1 % L-Glutamin (1mM)

0,025 % β Mercaptoethanol (0,1mM)

8 ng / ml basic fibroblast growth factor (bFGF)

2.3.5. Kulturmedien für die Suspensionskultur undifferenzierter Stammzellen

mTeSR®1

10 mM Rho Kinase Inhibitor (Y27632)

STEMPRO® hESC SFM

10 mM Rho Kinase Inhibitor (Y27632)

NutriStem™ XF/FF

10 mM Rho Kinase Inhibitor (Y27632)

2.3.6. Differenzierungsmedien

SF (50ml)

48 ml DMEM
500 µl L-Glutamin
500 µl AS
100 µl Merc.
500 µl Insulin-Transferin-Selenium

bSF (50ml)

48 ml DMEM
500 µl L-Glutamin
500 µl AS
100 µl Merc.
500 µl Transferin-Selenium
50 µl SB (1µl/ml bSF-R)

RPMI (50ml)

48 ml RPMI
500 µl L-Glutamin
500 µl AS
100 µl Merc.

2.4 Chemikalien und Lösungen

Agasorse NEEO Ultra Qualität	(Roth, Karlsruhe)
Aqua ad iniectabilia	(Braun, Melsungen)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	(Sigma, Deisenhofen)
Chloroform	(Sigma, Deisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, Deisenhofen)
Ethidiumbromid (10mg/ml)	(Sigma, Deisenhofen)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Sigma, Deisenhofen)
Gelatine Typ A (porcine)	(Sigma, Deisenhofen)
Glucose	(Merck, Darmstadt)
HEPES minimum 99,5%	(Sigma, Deisenhofen)
Kaliumchlorid KCl	(Merck, Darmstadt)
Magnesiumchlorid MgCl ₂	(Sigma, Deisenhofen)
Magnesiumsulfat MgSO ₄	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumchlorid NaCl	(Merck, Darmstadt)
TRizol® Kat.15596-018	(Invitrogen, Karlsruhe,)
Trypsin/EDTA (0,5%/0,2%) Lösung (10x)	(Biochrom AG, Berlin)
TrypLE Select	(Invitrogen, Karlsruhe)
Trypanblau (0,4%)	(Sigma, Deisenhofen)
Phosphat gepufferte Salzlösungen (PBS)	
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (PBS w/o, Tabletten)	(Sigma, Deisenhofen)
PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (Dulbecco's PBS 1X)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Kollagenase IV 0,2%	
In DMEM gelöst	(Invitrogen, Karlsruhe)

Kollagenase B 1%	(Roche,Grenzach)
in Low Ca ²⁺ Lösung gelöst	
(Zusammensetzung siehe unten)	
NaCl	120mM
KCl	5.4mM
MgSO ₄	5mM
NaPyruvat	5mM
Glucose	20mM
Taurine	20 mM
Hepes	10mM
CaCl ₂	30µM
pH	6,9

2.5 Gebrauchsfertige Kits

NucleoSpin® RNA II Kat. 740955.250	(Macherey Nagel, Düren)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	(Fermentas,St.Leon-Rot)
Go-Taq Polymerase	(Promega, Mannheim)
Solaris qPCR Gene Expression Assay	(Thermo Fisher Scientific Waltham,Massachusetts)

2.6 Zelllinie

Humane Embryonalen Stammzellen Linie HES-3 der Firma ES Cell International
(Singapore, <http://stemcells.nih.gov/StaticResources/research/registry/pdfs/Registry.pdf>)

3. Methoden

3.1 Zellkultur

Die Arbeit mit allen verwendeten Zellen erfolgte unter einer Sterilwerkbank und die spätere Inkubation bei einer angemessenen Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit sowie 37°C (Sanyo CO₂ Inkubator MCO-20AIC).

Es wurde kein Antibiotika verwendet, um eventuelle Wechselwirkungen mit der Zellkultur auszuschließen.

3.1.1 Isolierung, Expansion und Inaktivierung von murinen embryonalen Fibroblasten

Als Kultivierungsgrundlage für die adhärente Zellkultur wurden murine embryonale Fibroblasten benötigt und aus Mäuseembryonen (d13) isoliert.

Hierzu wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert und die Anlagen des Herzkreislaufsystems, der Kopf und die Gliedmaßen entfernt. Anschließend wurden die erhaltenen Gewebestücke zweimal in PBS w/o gewaschen und mechanisch in 2ml einer 0,05%/0,2% Trypsin/EDTA Lösung auf Eis zerkleinert.

Der weitere enzymatische Verdau des zerkleinerten Gewebes erfolgte unter Rühren in einem Erlenmeyerkolben (37°C, 15 min.) in einem Gesamtvolumen von 17ml 0,05%/0,2% Trypsin/EDTA Lösung. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 51ml DMEM+20% FCS wurden unverdaute Gewebestücke durch Filtration (100 µm Zellsiebe) aus der Suspension entfernt.

Die erhaltenen Einzelzellen wurden auf 10 cm Zellkulturschalen (5 x 10⁶ Zellen/Schale) in Kulturmedium ausgesät, bei erreichter Konfluenz in 90% FCS+10% DMSO eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Bevor die MEFs als Kultivierungsgrundlage verwendet werden konnten, wurden sie über drei Passagen auf 100mm Zellkulturschalen expandiert und anschließend durch Bestrahlung inaktiviert. Zum Passagieren wurden die konfluenten Zellen einmal mit PBS w/o gewaschen und mit 0,05% / 0,2% Trypsin/EDTA Lösung (5 min 37°C) von der Zellkulturschale abgelöst.

Die Reaktion wurde mit Kulturmedium gestoppt und die Zellen nach Zentrifugation

(5 min 500 x g 4°C) auf neue Zellkulturschalen ausgesät. Zur Inaktivierung wurden die Zellen abgelöst, mit γ Strahlung behandelt und in definierten Zellzahlen in 90%FCS+10%DMSO eingefroren. Zur Verwendung als Feederzellen, wurden die inaktivierten Fibroblasten aufgetaut und in einer Dichte von ca. 30.000 Zellen / cm² (0,28 - 0,3 x 10⁶ Zellen pro Well einer 6 Well Platte) auf mit 1% Gelatine beschichteten Zellkulturplatten ausgesät. Die inaktivierten Fibroblasten wurden für höchstens 7 Tage als Feederzellen verwendet [16].

3.1.2 Standardkultur auf inaktivierten murinen Fibroblasten

Die undifferenzierten Stammzellen wurden auf Feederzellen in 6 „well“ Zellkulturplatten kultiviert. Durch Verwendung des Standardkulturmediums und regelmäßiger Passagierung (4-5 Tage) auf frische Feederzellen konnte der pluripotente Zustand der Kulturen erhalten werden.

Das Passagieren erfolgte durch eine kombinierte enzymatische und mechanische Behandlung. Dazu wurden die Kolonien für 10-15min mit 0,2% Kollagenase IV Lösung bei 37°C inkubiert und anschließend durch leichtes Klopfen an die Multiwell Platte oder durch vorsichtiges Spülen mit Kulturmedium von den Feederzellen gelöst. Nach Zentrifugation für 3 min. bei 100xg wurden die Stammzellkolonien vorsichtig resuspendiert und auf frische Feederzellen ausgesät. Alle 24 – 48 Stunden fand ein Austausch des Kulturmediums statt [16].

3.1.3 Einzelzelldissoziation

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die Stammzellkolonien aus dem Feederzell-basierten Kultursystem zunächst von den Feederzellen gelöst (...) und einmal mit PBS w/o gewaschen. Die enzymatische Dissoziation erfolgte im Anschluss mit 1% Kollagenase B Lösung für 10 -15 min im Wasserbad (37°C) unter regelmäßigen schütteln. Nach Abstoppen der Reaktion mit Medium und Zentrifugation (3 min, 100 x g) wurden die Zellen im mit 10 μ M Rho Kinase Inhibitor (Y 27632) supplementiertem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann entweder ausgesät oder in PBS w/o aufgenommen, um eine Zellzahlbestimmung durchzuführen [16].

3.1.4 Suspensionskulturen

Die Standardkultivierung der Stammzellen in Suspension erfolgte in 6- und 12-well Suspensionskulturplatten der Firma Greiner in mTeSR®1 Medium, supplementiert mit 10µM Rho Kinase Inhibitor (Y 27632). Dabei wurde ein Kulturvolumen von 3 ml Medium pro Well verwendet.

Zum Einleiten der Suspensionskulturen wurden die undifferenzierten Stammzellkolonien wie vorher beschrieben (2.2.1.2.1) von den Feederzellen abgelöst, vereinzelt und als Einzelzellsuspension mit 5×10^5 Zellen/3ml auf einer 6-„well“ oder mit $2,5 \times 10^5$ auf einer 12-„Well“ Platte ausgesät. Beim Passagieren der Suspensionskulturen alle 4 Tage wurden die entstandenen Zellaggregate wiederholt enzymatisch zu Einzelzellen dissoziiert und erneut ausgesät [16].

3.1.5 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahlen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Für die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde die Zellsuspension vor der Zellzahlbestimmung mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 versetzt. Da bei toten Zellen die äußere Zellmembran nicht mehr intakt ist, dringt der Farbstoff in die Zellen ein und färbt das Cytoplasma blau. So können diese von den hellen lebenden Zellen unterschieden werden. Nach dem Auszählen der lebenden Zellen in jeweils 4 Großquadraten wurde die Zellzahl anhand folgender Formel berechnet:

$$(N / Q * V_K) * (V_G / V_Z) = x$$

N = Anzahl gezählte Zellen [Zellen]

Q = Anzahl gezählte Quadrate

V_K = Kammervolumen über einem Großquadrat [ml]

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

V_Z = Volumen der eingesetzten Zellsuspension [ml]

x = Zellzahl [Zellen / ml]

3.1.6 Differenzierung

Zur Induktion der Differenzierungen wurde den Aggregaten aus den Expansionskulturen des Kulturmedium entnommen und das jeweilige Differenzierungsmedium zugegeben. In den folgenden Tagen der Differenzierung bilden sich in der Suspensionskultur die „Embryoid Bodies“ (EB's).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Analyse der Genexpression auf mRNA Ebene

Zur Molekularbiologischen Beurteilung der generierten Expansions- und Differenzierungskulturen sollte die Expression von spezifischen Genen analysiert werden.

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

3.2.2 RNA Isolierung

Die Gesamt RNA aus Zellkulturproben wurde mit Hilfe eines kombinierten Protokolls aus TRIzol® und dem RNA Isolationskit NucleoSpin® RNA II durchgeführt.

Die Zellkulturproben wurden in TRIzol® aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Chloroform versetzt und 15 min bei 11.000xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde zur Isolierung laut Herstellerangaben des RNA Isolations Kits eingesetzt [16]

3.2.3 Bestimmung von Quantität und Qualität der isolierten Gesamt RNA

Die isolierte Gesamt RNA wurde mit Hilfe von RNA 600 Nano Chips (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) analysiert.

Die eingesetzte RNA wird dabei kapillarelektrophoretisch auf dem Chip aufgetrennt und die Konzentration durch den Bezug auf einen internen Standard bestimmt.

Des Weiteren ermöglicht die Darstellung der enthaltenen 18s und 28s rRNA eine Aussage zur Qualität der isolierten RNA.

3.2.4 cDNA Synthese

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

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit laut Herstellerangaben. Es wurden Random Primer für die Synthese verwendet [16].

3.2.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

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

Davon ausgehend generiert die DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang (Extension). Die entstandenen Doppelstränge werden anschließend durch Temperaturerhöhung denaturiert, wodurch eine erneute Anlagerung (Annealing) der Primer, auch an die neu synthetisierten DNA-Stränge, ermöglicht wird.

Durch zyklische Wiederholung der Annealings-, Extensions- und Denaturierungsschritte kommt es zu einer exponentiellen Zunahme der zu amplifizierenden DNA.

Das verwendete PCR Programm ist nachfolgend dargestellt, wobei $T_{\text{Annealing}}$ jeweils vom verwendeten Primerpaar abhängig war.

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

Tabelle 1: Standard PCR Programm

Die PCR-Reaktionen wurden mit Go-Taq Polymerase und folgenden Mastermix durchgeführt.

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

Tabelle 2: Mastermix für Go-Taq-Polymerase PCR-Reaktionen

3.2.6 Agarosegelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente auf Grund ihrer Ladung im Spannungsfeld auftrennen, wobei die Größe der Fragmente und die Konzentration des Agarosegels Einfluss auf die Auftrennung hat. Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen werden Längenstandards zusammen mit den Proben auf ein Agarosegel aufgetragen.

Durch die Zugabe des organischen Farbstoffs Ethidiumbromid), der aufgrund seiner planaren Struktur in die DNA interkalieren kann, werden die Fragmente im UV Licht (254 nm-366 nm) sichtbar.

Für die Auftrennung der PCR Fragmente wurden 1,5 %ige Agarosegele mit 0,5 µg / ml Ethidiumbromid verwendet. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 130 V für etwa 60 min. Die Dokumentation wurde im Anschluss mit dem GelDoc System durchgeführt [16]. Die Agarosegelelektrophorese wurde zur abschließenden Kontrolle der cDNA-Synthese eingesetzt.

3.2.7 Quantitative Echtzeit PCR

Um quantitative Aussagen zu Veränderungen der Genexpression in Zellpopulationen aus verschiedenen Expansionssystemen oder im Differenzierungsverlauf treffen zu können, wurde die Methode der quantitativen Echtzeit PCR (qPCR) verwendet. Diese ist eine auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruhende Vervielfältigungsmethode, die zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name Echtzeit). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

In der Arbeit wurde das Thermo Scientific Solaris qPCR Assay benutzt [17].

Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgt über den sogenannten Ct-Wert.

Der Ct-Wert einer Probe ist der PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal den Wert der Hintergrundfluoreszenz überschreitet und sich der Prozess in der exponentiellen Phase befindet. Zur relativen Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens auf die Expression eines internen Standards bezogen. Als interner Standard wurden die sogenannten Housekeeping-Gene verwendet.

Hierbei handelt es sich um Gene, deren Expressionshöhe von den untersuchten Versuchsbedingungen oder des Entwicklungszustandes unbeeinflusst sein sollte. Das für die qPCR verwendete Housekeeping-Gen war β -Actin.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	15 Min.	1
95°C	15 Sek.	
60°C	60 Sek.	40
95°C	15 Sek.	1
4°C	∞	

Tabelle 3: Solaris qPCR Programm

Die qPCR-Reaktionen wurden mit folgenden Mastermix auf 96-„well“-Platten durchgeführt.

Mastermix	μ l
Solaris qPCR Master Mix (2X)	12,5
Solaris Primer (20X)	1,25
H ₂ O	9,25
cDNA (250ng)	2
Gesamt	25

Tabelle 4: Mastermix für Solaris qPCR-Reaktionen

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten effiziente Protokolle zur Expansion und myokardialen Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen in Suspensionskultur entwickelt werden. Die Effizienz dieser Protokolle hängt von verschiedenen Faktoren ab, die in einzelnen Experimenten untersucht wurden.

Die Planungen für die folgenden Experimente bezogen sich auf die vorangegangenen Publikationen im Bereich der embryonalen Stammzell-suspensionskulturen und deren myokardiale Differenzierung [15,24,26,29].

In diesen wurde gezeigt, dass die Expansion und Kultur von undifferenzierten hES-Zellen in Suspension über einen längeren Zeitraum möglich ist. Hierzu benötigt man ein speziell definiertes Medium. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Zugabe des Rho Kinase Inhibitor Y-27632 (Ri) eine weit erhöhte Überlebensrate der Einzelzellen zu Beginn der Expansionskultur ermöglicht. Außerdem wurden in den genannten Publikationen erfolgreiche Ansätze zur myokardialen Differenzierung aufgezeigt.

Aufbauend auf den vorher beschriebenen Publikationen lag der Schwerpunkt dieser Arbeit hierbei auf der Kultivierung und Expansion von hES-Zellen in Suspensionskultur und der Etablierung der Verbindung von Zellexpansion mit anschließender Differenzierung. In den bisherigen Ansätzen traten Probleme bei der Zugabe von Differenzierungsmedium zu Aggregaten aus Suspensionskultur auf sowie häufig eine Dissaggregation der Zellen und anschließende fehlende Differenzierung zu Kardiomyocyten. Hierzu sollten experimentelle Lösungen gefunden werden.

4.1 Morphologie undifferenzierter pluripotenter hES-Zellen auf Feederlayer und in Suspensionskultur

Ein typisches Merkmal undifferenzierter pluripotenter hES-Zellen ist das Wachstum in Zellverbänden, sogenannten Kolonien, auf mitotisch oder durch Bestrahlung inaktivierten murinen oder humanen Fibroblasten (auch als Feederzellen bezeichnet). Kolonien undifferenzierter hES-Zellen zeichnen sich durch eine Abgrenzung durch einen hellen klaren Rand von den umgebenden Feederzellen ab (siehe Abb.3, roter Pfeil)

Die undifferenzierten Stammzellen wurden tägliche Lichtmikroskopisch morphologisch beurteilt und beim Erreichen einer kritischen Koloniegröße durch Passagieren im undifferenzierten Zustand gehalten.

In Suspension bilden die zuvor von den Feederzellen abgelösten und vereinzelt Zellen Aggregate (siehe Abb. 3, blauer Pfeil). Sobald Aggregate durch Zugabe eines definierten Mediums differenzieren, werden die Aggregate als Embryoid Bodies (EB's) bezeichnet.

Die Bildung von EB's geht einher mit der inneren Bildung verschiedener Zelltypen, ähnlich der embryonalen Entwicklung.

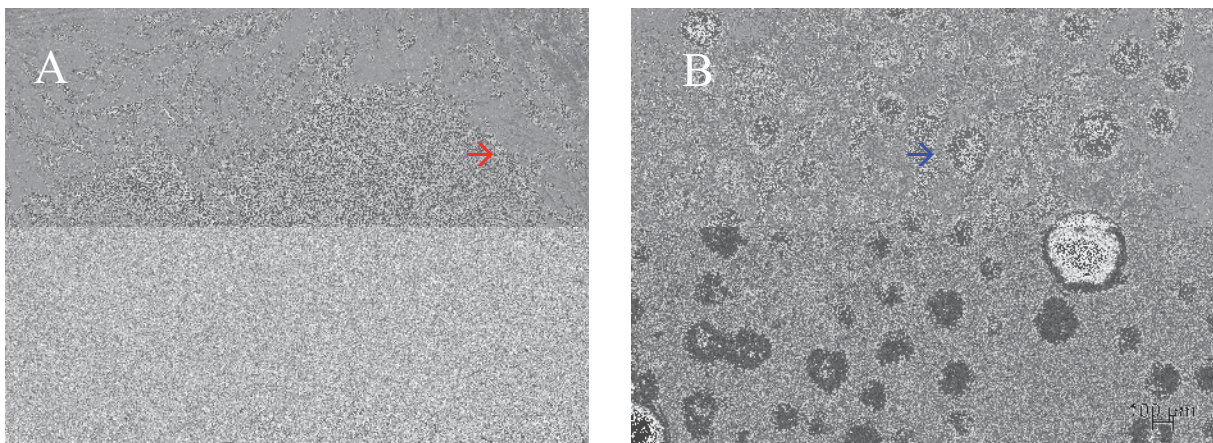


Abb. 3: Verwendete pluripotente hES-Zellen unter Standardkulturbedingungen
Undifferenzierte hES-Zellen auf Feederzellen (A), in Suspension vorliegend als annähernd kugelförmige Aggregate (B)

4.2 Vergleiche von möglichen Kulturmedien zur Kultivierung pluripotenter hES-Zellen in Suspension

Zu Beginn der Versuchsreihen stellte sich die Frage nach dem optimalen Kulturmedium zur Expansion der hES-Zellen in Suspension. Da in vorherigen Versuchen in unserer Arbeitsgruppe [15] mTeSR®1 erfolgreich als Standardmedium für Suspensionskulturen eingesetzt wurde, wurde dieses Vorgehen weiter verfolgt. Zusätzlich wurde der Versuch noch um 2 weitere speziell definierte Medien für Suspensionskulturen anderer Firmen als Vergleich erweitert. Damit ergab sich folgende Zusammenstellung von Testmedien:

- mTeSR®1 (STEMMCELL TECHNOLOGIES)
- STEMPRO® hESC SFM (INVITROGEN)
- NutriStem™ XF/FF (STEMGENT)

Für den Versuch wurden hES-Zellen von Feederzellen abgelöst, vereinzelt und gezählt (siehe Methoden). Anschließend wurden die vereinzelt hES-Zellen mit einer 1ml Eppendorf-Pipette auf 3 verschiedene 6-well Greiner Suspensionsplatten mit einer Inokulationsdichte von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen pro well in 3ml Medium verteilt, wobei jede 6-well Platte mit einen der zu testenden Suspensionsmedien befüllt war. Zusätzlich wurde, um die Überlebensrate der Einzelzellen zu erhöhen, der Rho kinase Inhibitor Y-27632 zugegeben. Die Platten wurden dann bei 37°C 4 Tage im Brutschrank inkubiert und nicht bewegt, um eine homogene Aggregat Bildung nicht zu beeinflussen. An Tag 4 wurden unter dem Lichtmikroskop Fotos für den morphologischen Vergleich der Aggregate in den verschiedenen Expansionsmedien aufgenommen.

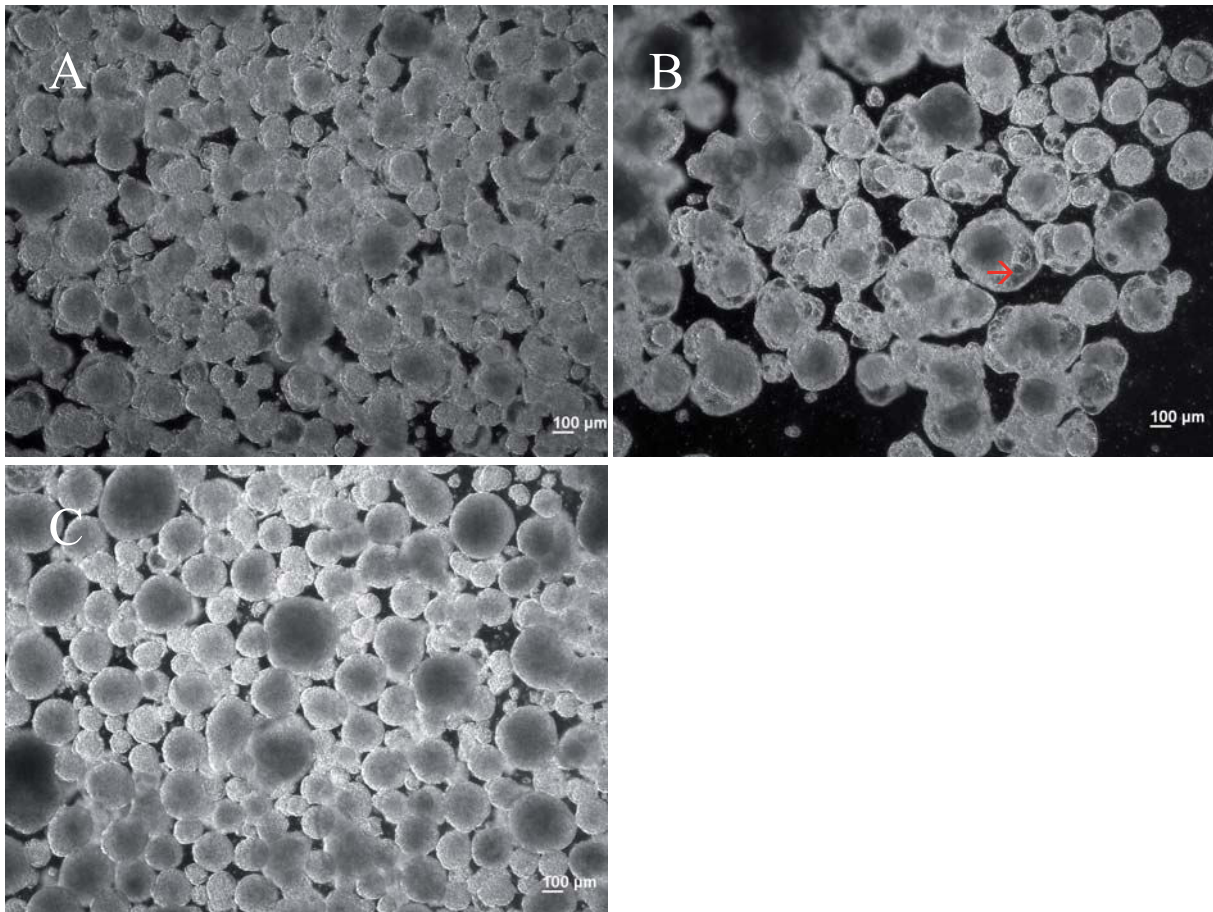


Abb. 4: Aggregate aus hES-Zellen nach 4 Tagen in verschiedenen Expansionsmedien
Aggregate nach 4 Tagen in NutriStem™ XF/FF (A), STEMPRO® hESC SFM (B), mTeSR®1 (C)

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Kulturen 4 Tage nach der Inokulation in den verschiedenen Expansionsmedien zeigten Aggregate von heterogener Struktur und Größe, die durchschnittlich größer als 200 µm waren (siehe Abb.4).

Die heterogene Struktur der Aggregate lässt vermuten, dass es zur Fusion mehrerer Aggregate gekommen war.

Gleichzeitig kann man auf den Aufnahmen erkennen, dass eine hohe Überlebensrate der hES-Zellen in allen 3 Medien gewährleistet wurde und nur sehr wenige Zellüberreste abgestorbener Zellen vorhanden sind. Auffällig hierbei war die Bildung von Strukturen im STEMPRO® hESC SFM Ansatz (siehe Abb. 3, roter Pfeil).

Für die Akquisition von Daten nach dem Standarddifferenzierungsprotokoll zum Vergleich mit späteren optimierten Differenzierungsansätzen wurden die vorhandenen Aggregate am Tag 4 der Expansion in 3ml/well des Standarddifferenzierungsmediums bSF+SB203580 [24] überführt, um die Differenzierung einzuleiten. Eine weitere Fragestellung war hierbei die Auswirkungen der verschiedenen Kulturmedien auf die anschließende Differenzierung zu untersuchen.

Dazu wurde das Expansionsmedium vorsichtig mit einer Eppendorf-Pipette aus dem jeweiligen well entfernt. Anschließend wurden die Aggregate im „well“ 2-mal mit 1 ml bSF gewaschen, um Rückstände des Expansionsmediums zu entfernen und dann 3ml bSF/well + 1µl/ml Medium SB 203580 zugegeben. Die Zellen wurden 14 Tage bei 37°C inkubiert und das Differenzierungsmedium wurde alle 3 Tage gewechselt. Alle 2 Tage wurden Fotos unter dem Lichtmikroskop aufgenommen und an den Tagen 0,3,7,14 RNA-Proben entnommen für eine spätere quantitative Echtzeit PCR (qPCR) Analyse der Genexpressionen bestimmter Marker.

Nach Einleitung der Differenzierung konnte nach 4-5 Tagen in allen Ansätzen innerhalb der EB's das entstehen erster zystischer bzw. epithelialer Strukturen beobachtet werden, welches sich bei fortschreitender Dauer des Experimentes fortsetzte (siehe Abb. 5). Die beginnende Strukturbildung wurde als Zeichen der einsetzenden Differenzierung gewertet.

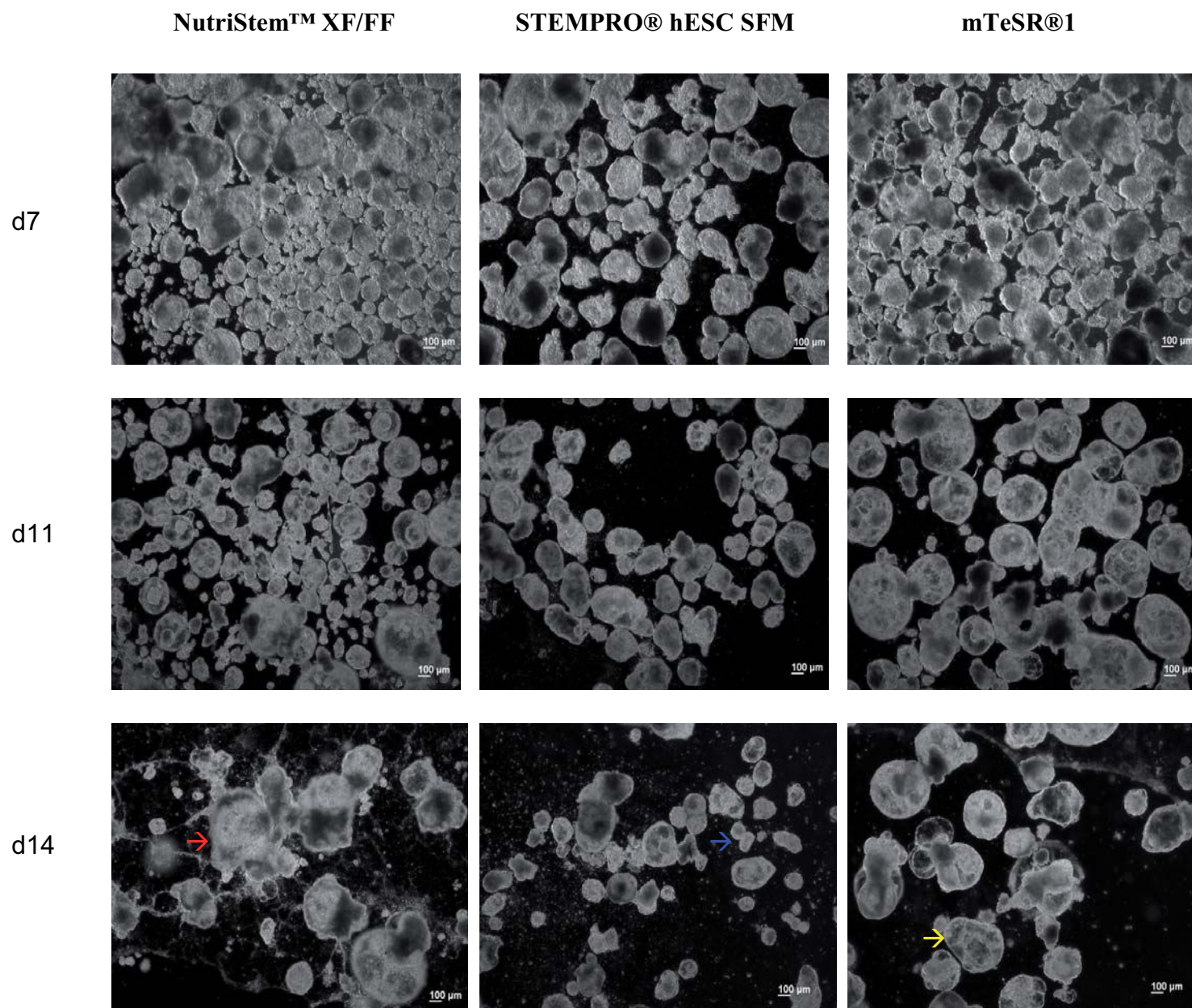


Abb. 5: EB's nach 7-14 Tagen in Differenzierungsmedium expandiert mit verschiedenen Suspensionsmedien
 Linke Beschriftung: Tag der Differenzierung, Obere Beschriftung: Verwendetes Expansionsmedium

Der Differenzierungsansatz hervorgehend aus der NutriStem™ XF/FF Expansion zeigte ab Tag 7 ein vermehrtes Absetzen der Aggregate am Boden der Suspensionsplatten. An Tag 14 waren die Aggregate durchgehend adhärent (siehe Abb. 5, roter Pfeil).

Dies konnte bei den beiden anderen Ansätzen nicht beobachtet werden.

Im Differenzierungsansatz aus der STEMPRO® Expansion konnte dagegen ab Tag 9 ein gehäuftes Zellsterben beobachtet werden. Dies führte dazu, dass an Tag 14 in der Differenzierung nur noch Aggregate mit einer durchschnittlichen Größe von 100-200 µm vorhanden waren (siehe Abb. 5, blauer Pfeil). In dem Differenzierungsansatz aus der mTeSR®1 Expansion konnten dagegen an Tag 14 durchschnittliche Aggregatgrößen >200 µm beobachtet werden (siehe Abb. 5, gelber Pfeil).

Nur im Differenzierungsansatz hervorgehend aus der mTeSR®1 Expansion konnten ab Tag 11 unter dem Lichtmikroskop kontrahierende Areale beobachtet werden. Die Anzahl kontrahierender EB's werden in Abbildung 6 gezeigt. Die Gesamtzahl der EB's wurde hier nicht erfasst, betrug aber >100. Die kontrahierenden Areale waren relativ klein im Vergleich zu Feeder-basierten Kontrollkulturen im Labor (Daten nicht gezeigt) und nur in EB's mit einen durchschnittlichen Durchmesser von >300 µm zu finden.

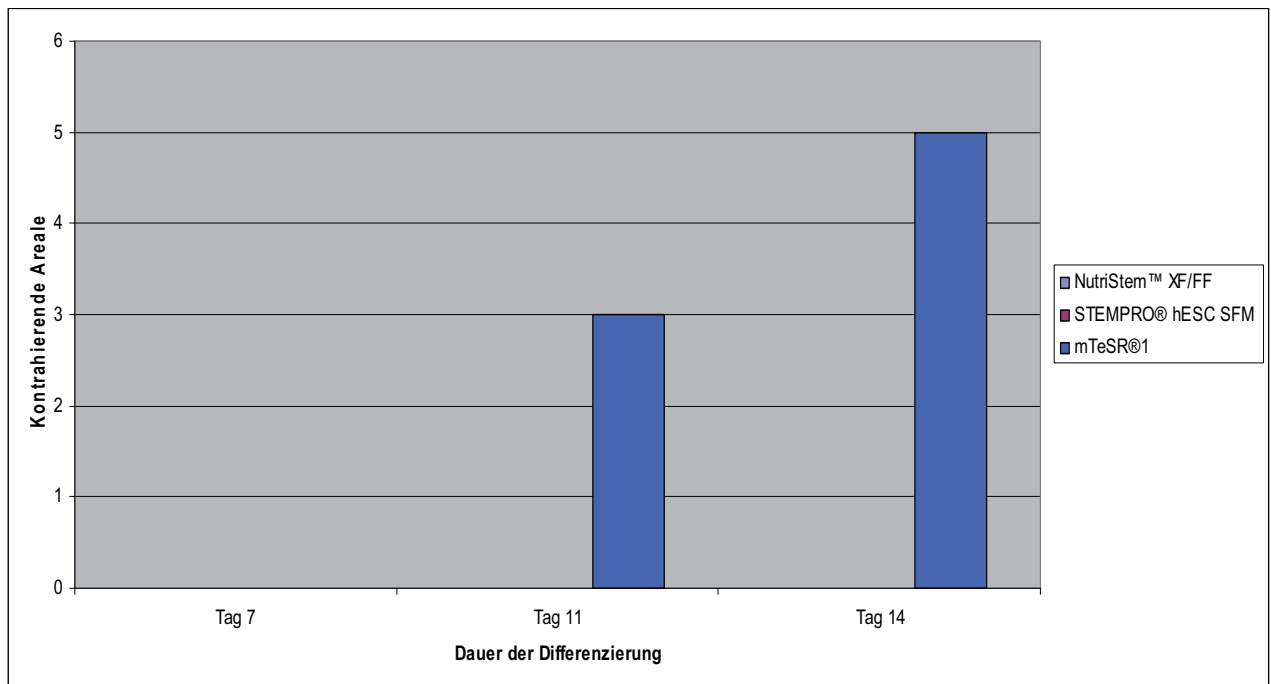


Abb. 6: Auswertung der Kontrahierenden Areale in der Differenzierung

Zur Molekularbiologischen Beurteilung der generierten Differenzierungen sollten diese anhand von Genexpressionsanalysen beurteilt werden.

Die RNA Proben wurden an den Tagen 0,3,7,14 der Differenzierung entnommen.

Es wurden Marker zum Nachweis der 3 Keimblätter verwendet sowie ein Pluripotenzmarker.

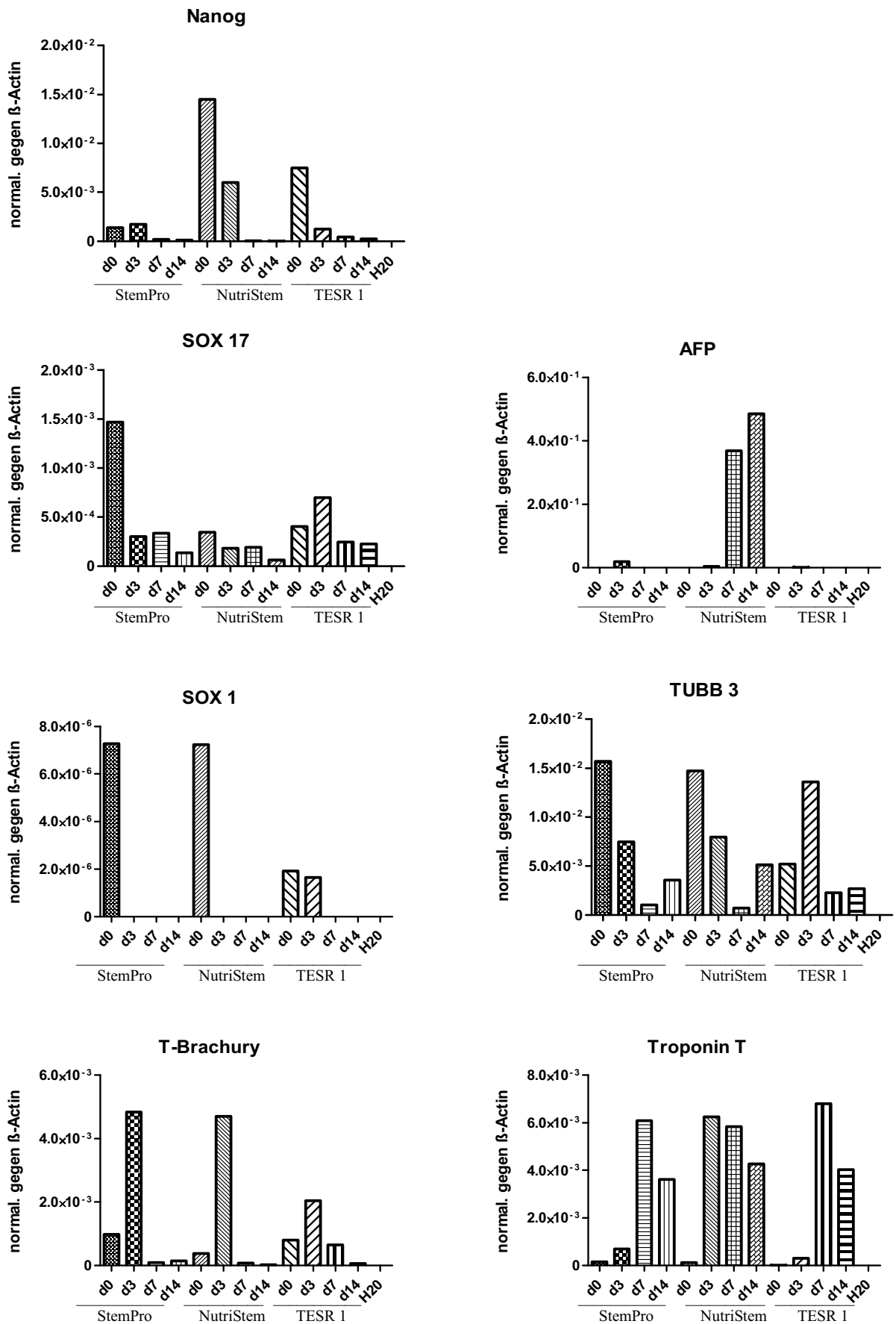


Abb. 7: Auswertung qPCR Versuch Mediumvergleich

Der Pluripotenzmarker Nanog zeigte an Tag 0 der Differenzierung in allen Ansätzen erhöhte Werte, deren Expression aber immer weiter nachließ (siehe Abb. 7).

Dies deutete auf eine erfolgte Differenzierung der hES-Zellen hin.

Einzig im NutriStem™ XF/FF Medium zeigten sich ab Tag 7 stark erhöhte Werte von Alpha-Fetoprotein (AFP), was auf eine Endoderme Differenzierung schließen lässt.

Alle Ansätze zeigten zu Beginn der Differenzierung erhöhte Werte der Ectodermen Marker SOX 1 und Tubulin-Beta 3 (TUBB 3). Die Expression ließ ab Tag 3 stetig nach und war an Tag 14 fast nicht mehr vorhanden (siehe Abb. 7).

Der frühe mesendodermale Marker Brachyury-T war an Tag 3 in den Ansätzen NutriStem™ und STEMPRO® leicht höher als im mTeSR®1 Ansatz, war aber ab Tag 7 in allen Ansätzen nur noch geringfügig vorhanden. Troponin T als myokardialer Marker wurde an Tag 7 und Tag 14 in allen Ansätzen auf ein ungefähr gleiches niedriges Niveau exprimiert (siehe Abb. 7).

Da nur im Differenzierungsansatz hervorgehend aus der mTeSR®1 Expansion kontrahierende Areale gefunden wurden und der frühe mesoderme Marker Brachyury-T sowie der myokardiale Marker Troponin T in der qPCR in erhöhten Maße exprimiert wurde, ergab sich für alle weiteren Versuche die Arbeit mit mTeSR®1 als Expansionsmedium. Allerdings muss hierzu angemerkt werden, dass die Höhe der Genexpression von Brachyury-T sowie Troponin T sehr gering war.

4.3 Untersuchungen der Auswirkung von Zellinokulationsdichten auf die Aggregatgröße

Nach der Wahl des Kulturmediums gehörte die Auswahl der optimalen Inokulationsdichte. Verschiedene Arbeiten [19,20,21] haben gezeigt, dass die Inokulationsdichte die Größe der sich in Suspension bildenden Aggregate beeinflusst und die Aggregatgröße Auswirkungen auf die spätere Differenzierung hat. Um dies an der von mir benutzten Zelllinie und Protokollen zu testen, wurden verschiedenen Inokulationsdichten angeimpft, expandiert und untersucht.

Hierzu wurden hES-Zellen von Feederzellen abgelöst, vereinzelt und gezählt (siehe Methoden). Im Gegensatz zu konventionellen Feeder-basierten Zelldichten hat die Vereinzelnung den Vorteil, dass die Anzahl der Inokulierten hES-Zellen genau bestimmt werden kann.

Anschließend wurden die in Einzelsuspension vorliegenden hES-Zellen mit einer 1ml Eppendorf-Pipette in folgenden 3 Konzentrationen in 3 ml mTeSR®1 / well auf je einer 6-well Greiner Suspensionsplatte angeimpft

- 1) 1×10^5 Zellen well / 3ml Medium
- 2) 2.5×10^5 Zellen well / 3ml Medium
- 3) 5×10^5 Zellen well / 3ml Medium

Die hES-Zellen wurden 3 Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, fotografiert, dann vereinzelt (siehe Methoden) und mit der Neubauer Zählkammer gezählt, um dadurch die Expansionsrate zu ermitteln. Dies wurde über 3 Passagen durchgeführt. Dazu wurden die hES-Zellen nach der Vereinzelnung aus der vorherigen Passage erneut in den Startzelldichten angeimpft und über 3 Tage bei den oben genannten Bedingungen kultiviert und ausgewertet. Da die späteren Differenzierungen aus ökonomischen Gründen eventuell auf 12-„well“ Platten durchgeführt werden sollten, wurden die Ansätze dort ebenfalls getestet (1 Passage).

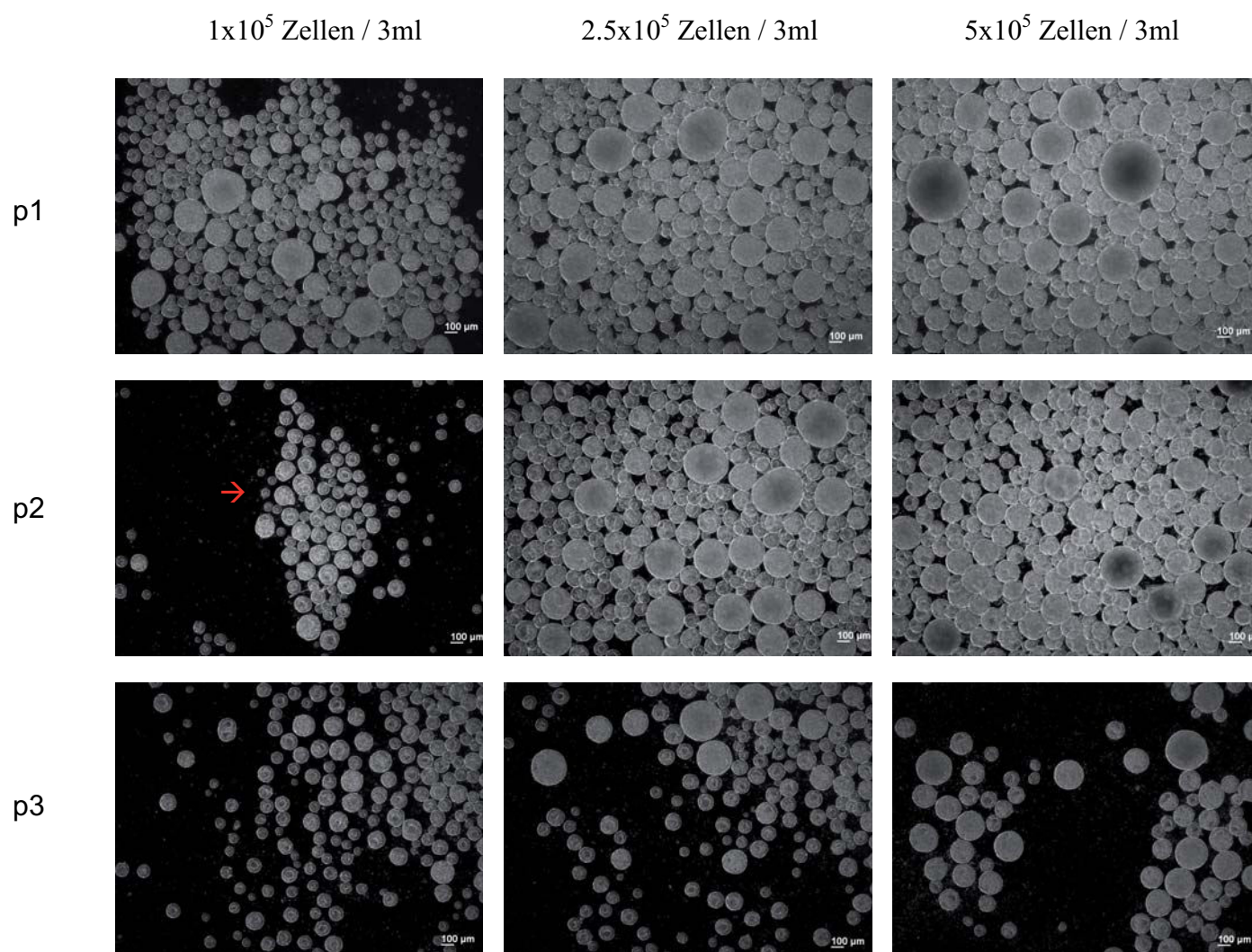


Abb. 8: Aggregate aus hES-Zellen, Passage 1-3 des Expansionsversuches an Tag 3 im 6-„well“

Linke Beschriftung: Passagenzahl, Obere Beschriftung: Inokulationsdichte

	Zellzahlen	Zellzahlen	Zellzahlen
Inokulationsdichte Tag 0 6-„well“	1x10⁵	2.5x10⁵	5x10⁵
Passage 1 Tag 3 6-„well“	2,9x10 ⁵ 2,9fache Expansion	7,0x10 ⁵ 2,8fache Expansion	14,9x10 ⁵ 2,98fache Expansion
Passage 2 Tag 3 6-„well“	3,1x10 ⁵ 3,1fache Expansion	7,2x10 ⁵ 2,88fache Expansion	15,1x10 ⁵ 3,02fache Expansion
Passage 3 Tag 3 6-„well“	3,0x10 ⁵ 3,0fache Expansion	7,0x10 ⁵ 2,8fache Expansion	15,1x10 ⁵ 3,02fache Expansion
Inokulationsdichte Tag 0 12-„well“	0,5x10⁵	1,25x10⁵	2,5x10⁵
Passage 1 Tag 3 12-„well“	1,4x10 ⁵ 2,9fache Expansion	3,5x10 ⁵ 2,8fache Expansion	7,1x10 ⁵ 2,9fache Expansion

Tabelle 5: hES-Zellen Inokulationsdichte und Expansionsrate nach 3 Tagen in 6-„well“ und 12-„well“ Platten

Die Auswertung der Fotos und Zellzahlen (Tabelle 5) ergab sowohl auf 6-„well“ Platten (siehe Abb. 8), als auch auf 12-„Well“ Platten (Fotos nicht gezeigt) in jeder der Passagen eine gleichbleibende Morphologie und Expansionsrate.

Die geringere Anzahl der sichtbaren Aggregate in einzelnen Fotos (siehe Abb. 8, roter Pfeil) ist auf ein fehlendes Sammeln der Aggregate in der Mitte der Suspensionsplatte vor den lichtmikroskopischen Aufnahmen zurückzuführen.

Um den Glucoseverbrauch, der in der Kultivierung als Hauptkohlenstoffquelle diente, sowie den aus dem Glucosestoffwechsel entstehenden Lactat in allen 3 Zelldichten zu untersuchen, wurden diese beiden Werte mit dem YSI 2300 STAT Plus™ untersucht. Hierzu wurde jeweils zu Beginn und am Ende der Kultivierung jeder Passage eine Probe des Expansionsmediums genommen.

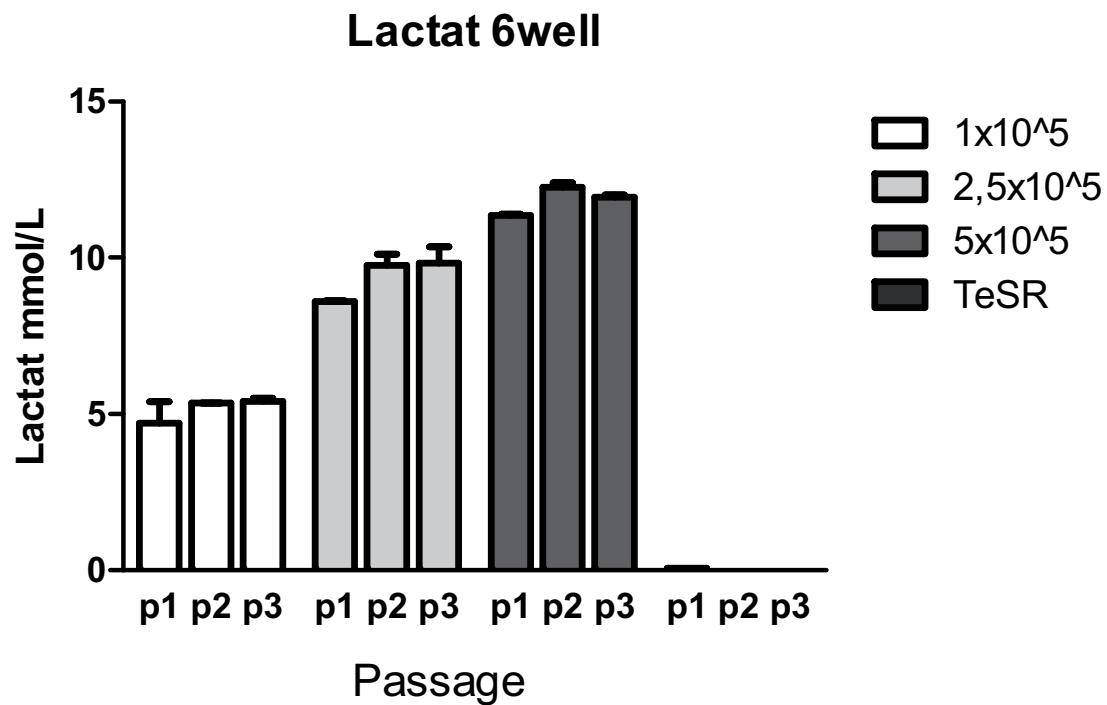
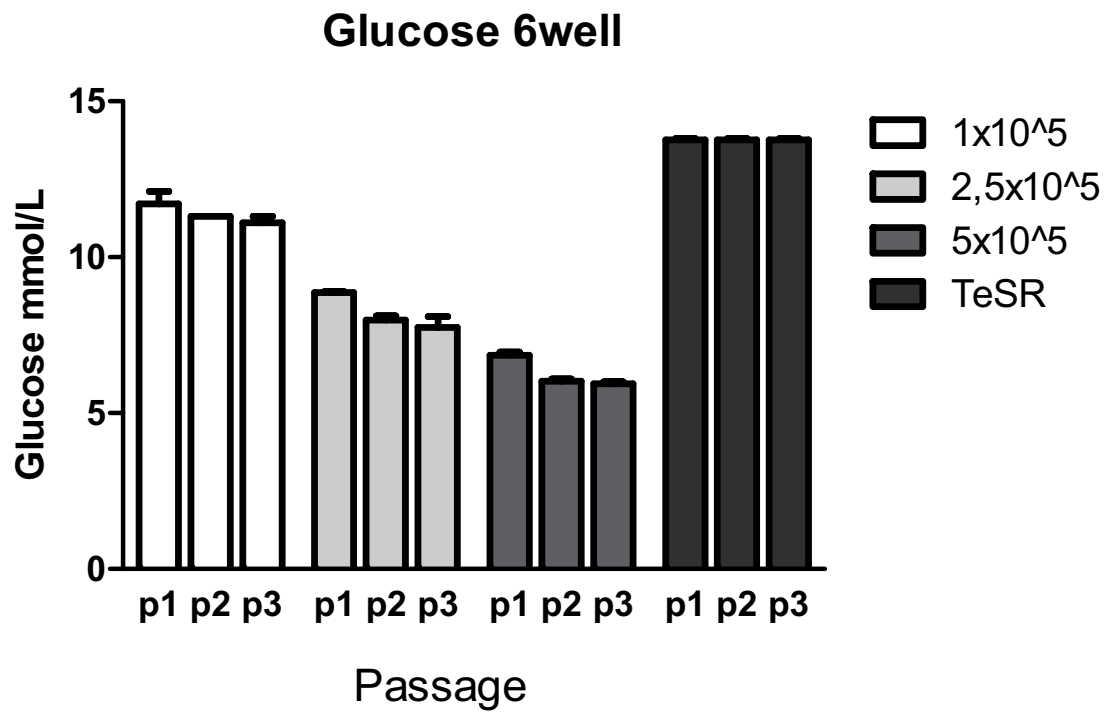


Abb. 9: Versuch Inokulationsdichte Auswertung Glucose / Lactat 6-,well“

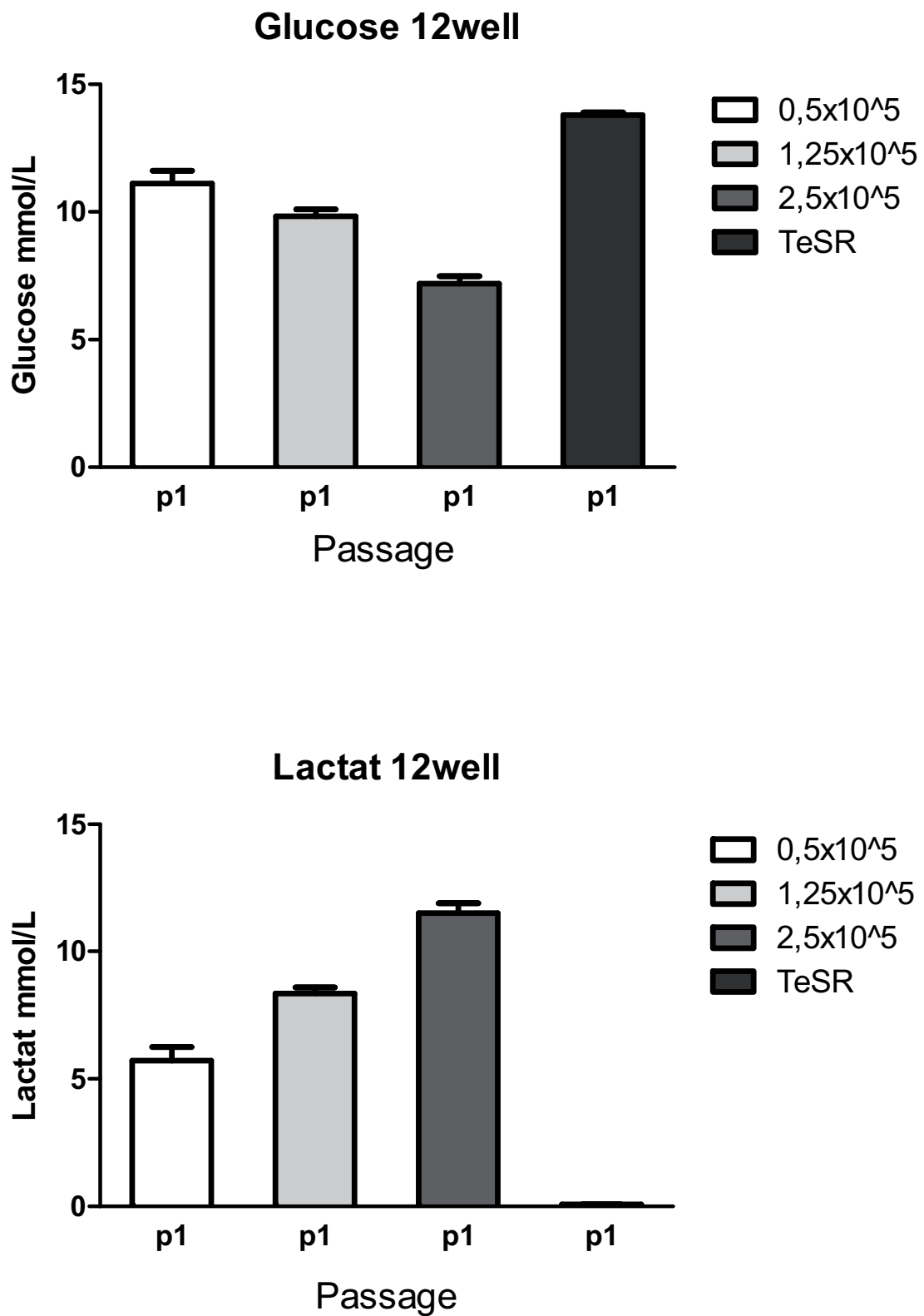


Abb. 10: Versuch Inokulationsdichte Auswertung Glucose / Lactat 12-„well“

Die Auswertung der Glucose / Lactat Daten zeigte, dass im Expansionsmedium selbst in der hohen Inokulationsdichte von 5×10^5 Zellen / 3ml Medium nach 3 Tagen ohne Mediumwechsel noch Glucose $> 5 \text{ mmol/L}$ und ein Lactat Wert weit unterhalb der kritischen Grenze vorhanden war. Dies galt für 6-„well“- und 12-„well“-Platten. Daher wurde für alle weiteren Versuche der Ansatz mit der höchsten Inokulationsdichte gewählt, um den bei Differenzierungen bisher beobachteten auftretenden Zellverlust auszugleichen und dort eine möglichst große Anzahl EB's zu erhalten.

4.4 Optimierung der Differenzierungsexperimente durch BMP 4 / Activin A Zugabe

Im Versuch des Medienvergleichs mit anschließender Differenzierung konnte gezeigt werden, dass mit dem bisherigen Protokoll zur Differenzierung die Entwicklung von Kardiomyocyten möglich ist. Die Erfolgsrate hierbei war jedoch gering. Um dies substanziell zu verbessern und zu standardisieren, wurden mehrere Ansätze zur Differenzierung getestet.

Als Grundlage der Versuche wurden Optimierungsansätze von Kattman et al [27] und Burrige et al [26] betrachtet, die gezeigt hatten, dass die Zugabe von BMP 4 und Activin A zu Beginn der Differenzierung die Expression von Brachyury-T in hES-Zellen induziert. Der frühe mesendodermale Marker Brachyury-T kennzeichnet die Entwicklung der hES-Zellen zum mesodermen Keimblatt, aus dem sich später das kardiale Mesoderm und die Kardiomyocyten entwickeln.

Dadurch sollte in der Differenzierung eine Entwicklung der hES-Zellen zu Kardiomyocyten eingeleitet werden. Dieses Vorgehen passte ich für die folgenden Versuche zur Differenzierung an. Dazu wurde der Versuchsaufbau in 4 Schritte unterteilt

- 1) Suspensionskultur
- 2) EB Bildung
- 3) Kardiale Spezifikation
- 4) Maturation

Schritt 1 beinhaltet die Expansion der hES-Zellen in Suspension in mTeSR®1 über 3,5 Tage auf 6-well Suspensionsplatten mit einer Inokulationsdichte von 5×10^5 Zellen/well/ 3ml Medium über mindestens 3 Passagen, um eventuell noch vorhandene Feederzellen zu entfernen. Die Zeit zwischen den Passagen wurde genau definiert. Hierbei wurde entschieden, eine Passage alle 3,5 Tage durchzuführen, um eine optimale logistische Organisation der über mehrere Wochen andauernden Kultivierung zu gewährleisten.

Dann wurden die hES-Zellen in der letzten Passage vor der Differenzierung mit einer Inokulationsdichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen well/ 1,5ml Medium auf 12-„well“ Suspensionsplatten angeimpft. Durch die Umstellung auf 12-„well“ Suspensionsplatten für die Differenzierungen konnte eine größere Anzahl von Ansätzen getestet werden. Dies hatte den Hintergrund, die hohen Kosten der Versuchsreihen zu minimieren.

Nach 3,5 Tagen Expansion wurde das Expansionsmedium mTeSR®1 entnommen und 1x mit dem Differenzierungsmedium SF gewaschen, um noch vorhandene Reste vom mTeSR®1 zu entfernen.

Im 2 Schritt wurden die hES-Zellen 48 Stunden im SF Differenzierungsmedium kultiviert und die jeweilige Mengen BMP 4 / Activin A (siehe Abb. 11) zu den Ansätzen zugegeben. Nach 48 Stunden wurde das SF-Medium entnommen und 1x mit dem nachfolgenden Differenzierungsmedium RPMI gespült, um Reste von BMP 4, Activin A und Insulin zu entfernen.

Der folgende 3 Schritt beinhaltet eine Kultivierung von 48 Stunden in RPMI Medium unter Zugabe von Fetalen Kälber Serum (FCS).

In dieser Phase ist es laut Burrige et al [26] wichtig, dass ein Insulin freies Differenzierungsmedium vorhanden ist, da Insulin in dieser Phase die myokardiale Spezifikation beeinträchtigt. Diese sollte in diesem Schritt erreicht werden soll.

Als letzter Schritt wurde ab Stunde 96 das RPMI+FCS entnommen und gegen RPMI ausgetauscht. Dieses wurde alle 48 Stunden gewechselt bis zum Ende der Differenzierung.

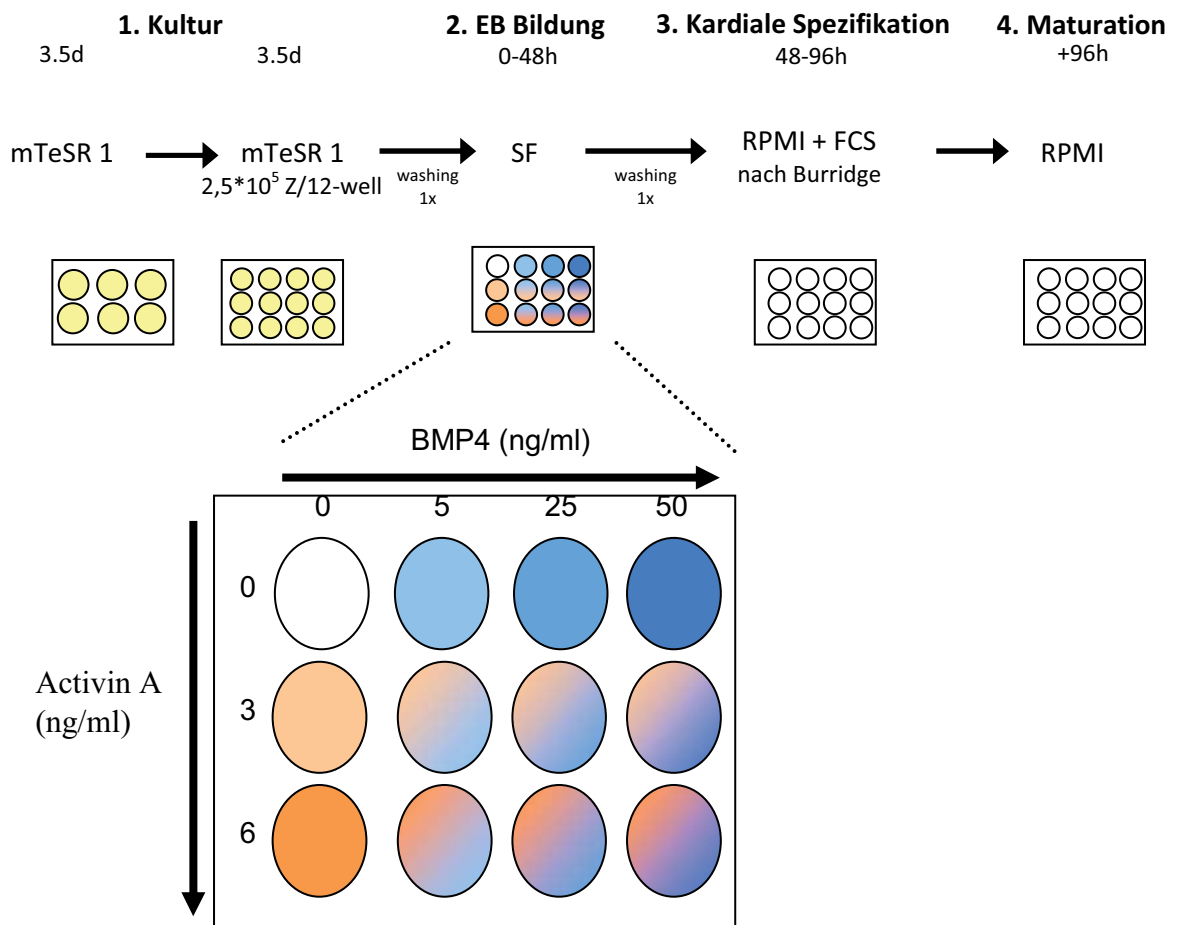


Abb. 11: Versuchsschema BMP4 / Activin A Differenzierung

Die Expansion der hES-Zellen 3,5 Tage in mTeSR®1 ergab durchschnittliche EB Größen von 200-400 µm (siehe Abb. 12). Hierbei ist die heterogene Größe auf eine Fusion mehrerer Aggregate zurückzuführen.

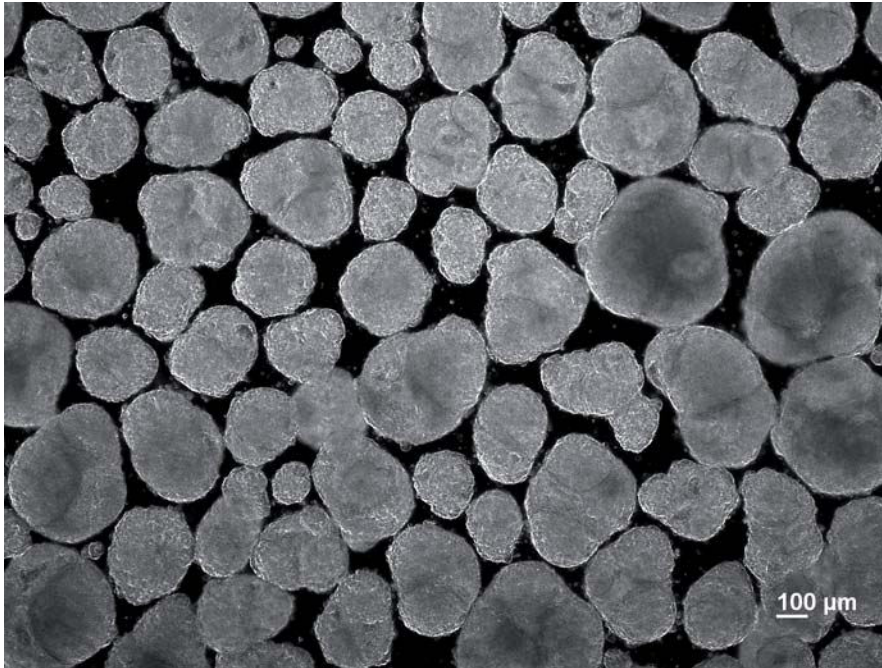


Abb. 12: hES-Zellen Aggregate Expansion Tag 3,5 mTeSR®1

Die Morphologie der EB's an Tag 2 der Differenzierung zeigt in allen Ansätzen die Entstehung epithelialer Strukturen. Vermehrt trat diese Bildung jedoch in den Ansätzen mit Zugabe von BMP 4 auf (siehe Abb. 13, rote Pfeile). Hierbei konnte kein sichtbarer morphologischer unterschied zwischen den Ansätzen von 25 ng BMP 4 zu 50 ng BMP 4 festgestellt werden, weshalb der Ansatz mit 25 ng BMP 4 nicht weiter lichtmikroskopisch beobachtet wurde. Außerdem zeigte die Zugabe von Activin A ebenfalls keinen sichtbaren morphologischen Unterschied.

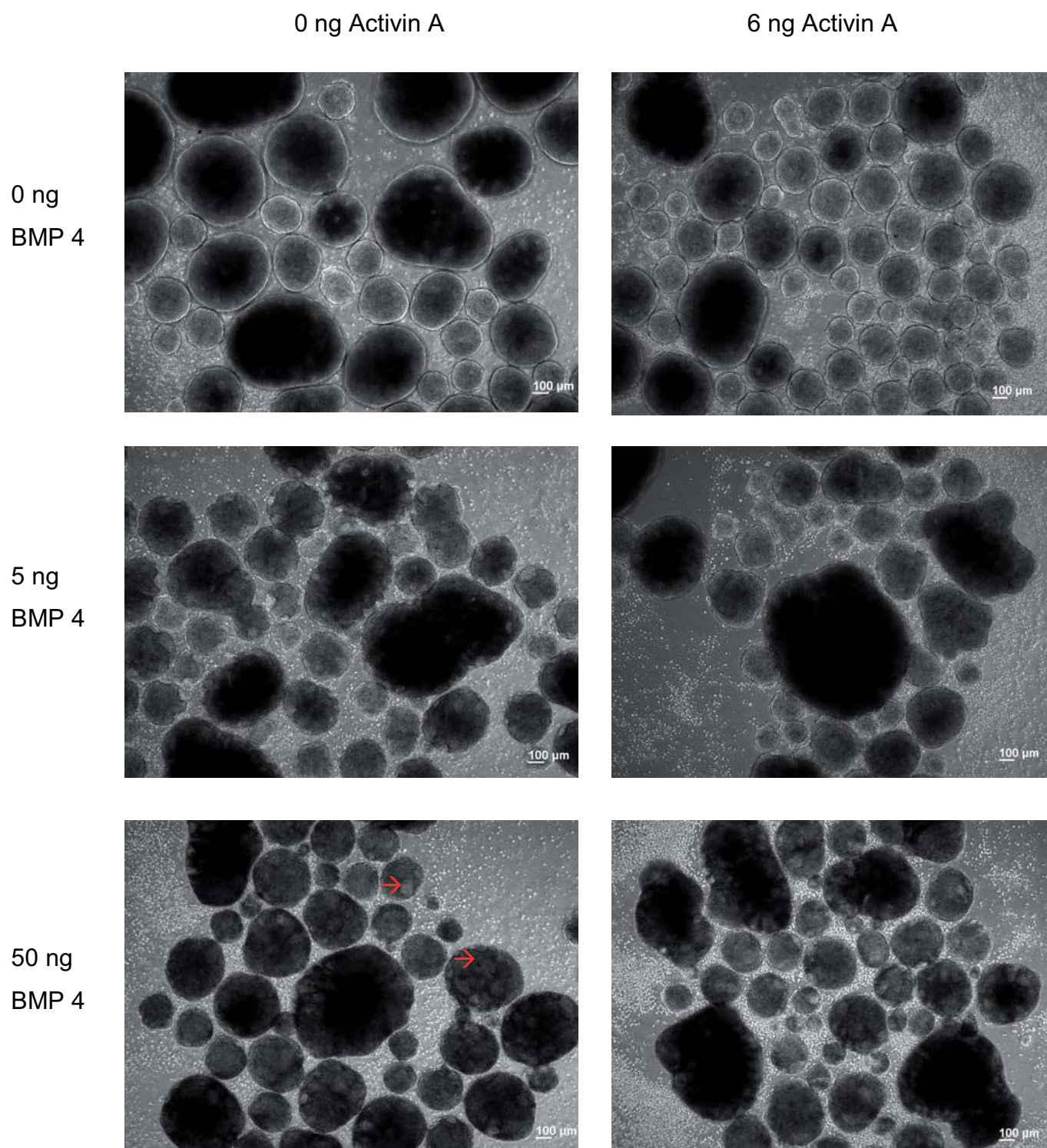


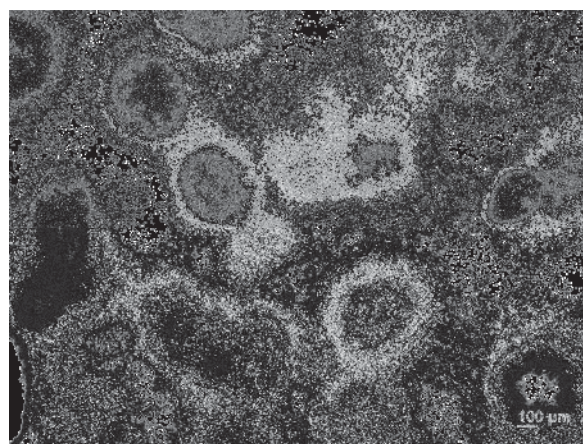
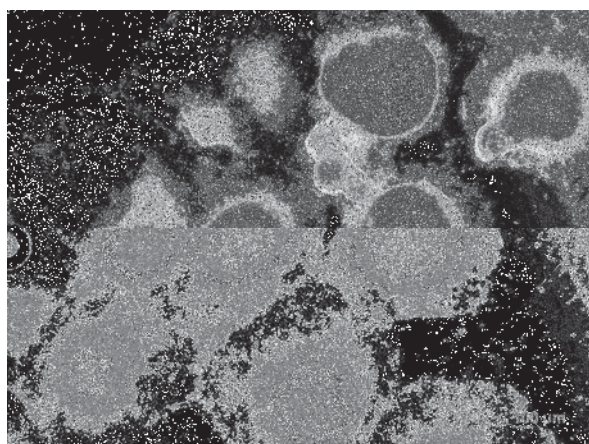
Abb. 13: EB's in BMP 4/Activin A Differenzierung Tag 2
Linke Beschriftung: Konzentration des zugegebenen BMP 4
Obere Beschriftung: Konzentration des zugegebenen Activin A

Nach 2 Tagen in dem RPMI+FCS Differenzierungsmedium zeigte sich ein beginnendes Absätzen der EB's am Boden der Suspensionsplatte (siehe Abb. 14). Dies führte dazu, dass ab Tag 9 der Differenzierung in allen Ansätzen nur noch adhärente EB's vorhanden waren (siehe Abb. 15). Diese überwuchsen bis Tag 14 die jeweiligen „wells“ der Suspensionsplatte, weshalb ab Tag 9 keine lichtmikroskopischen Aufnahmen mehr gemacht wurden. Eine Überprüfung der Ansätze alle 2 Tage unter dem Lichtmikroskop ergab bis Tag 14 der Differenzierung keine spontan kontrahierenden Areale.

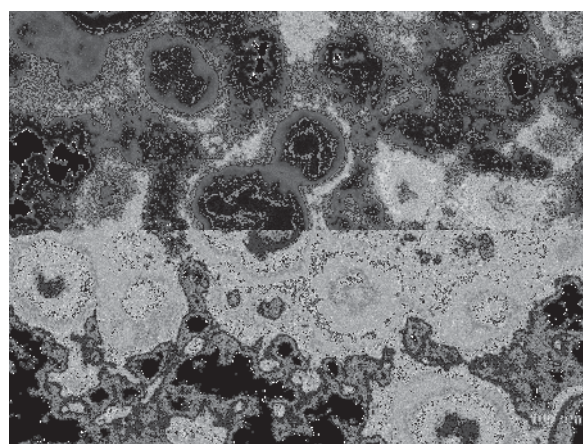
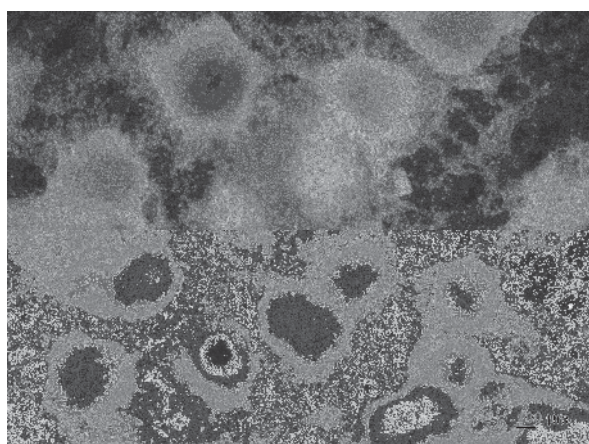
0 ng Activin A

6 ng Activin A

0 ng
BMP 4



5 ng
BMP 4



50 ng
BMP 4

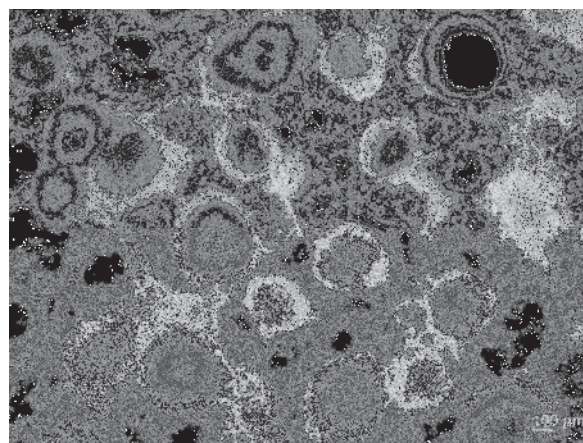
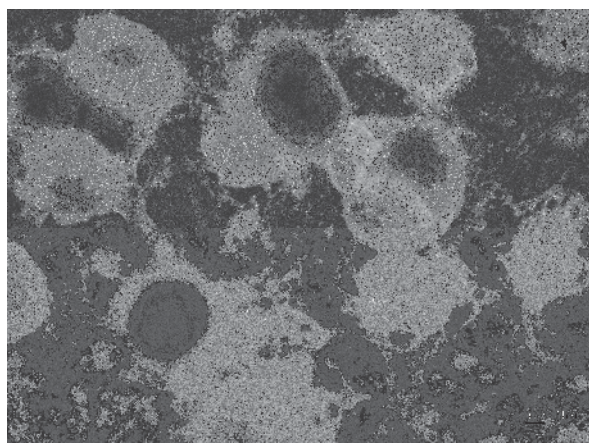


Abb. 14: EB's in BMP 4/Activin A Differenzierung Tag 4
Linke Beschriftung: Konzentration des zugegebenen BMP 4,
Obere Beschriftung: Konzentration des zugegebenen Activin A

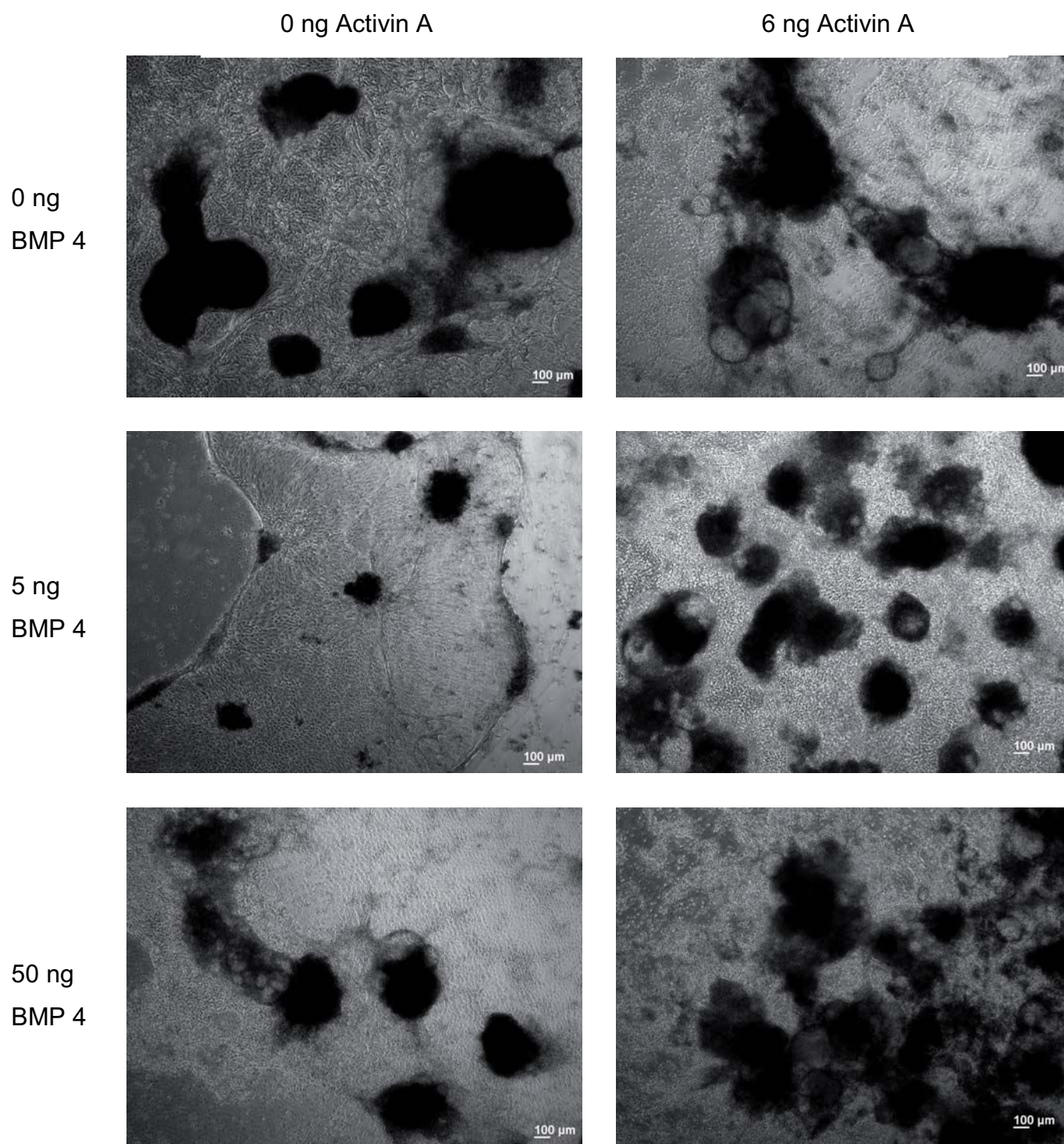


Abb. 15: EB's in BMP 4/Activin A Differenzierung Tag 9
Linke Beschriftung: Konzentration des zugegebenen BMP 4
Obere Beschriftung: Konzentration des zugegebenen Activin A

Um die Genexpression von Brachyury-T nach der Zugabe von BMP 4 zu überprüfen, wurden ab dessen Zugabe alle 12 Stunden RNA Proben genommen bis zum Zeitpunkt 60 Stunden. Die Proben wurden mit der qPCR auf die Genexpression von Brachyury-T und NKX 2.5 untersucht. Der Marker NKX 2.5 ist hierbei ein früher Transkriptionsfaktor, der auf die Entstehung von Kardiomyocten hinweist.

Da in den Ansätzen keine kontrahierenden Areale vorhanden waren, sowie morphologisch kein Unterschied zwischen der Zugabe von 25 ng BMP 4 und 50 ng BMP 4 sowie Activin A festzustellen war, wurde der Probenraum aus ökonomischen Gründen eingegrenzt auf die 3 in Abb. 16 gezeigten Ansätze.

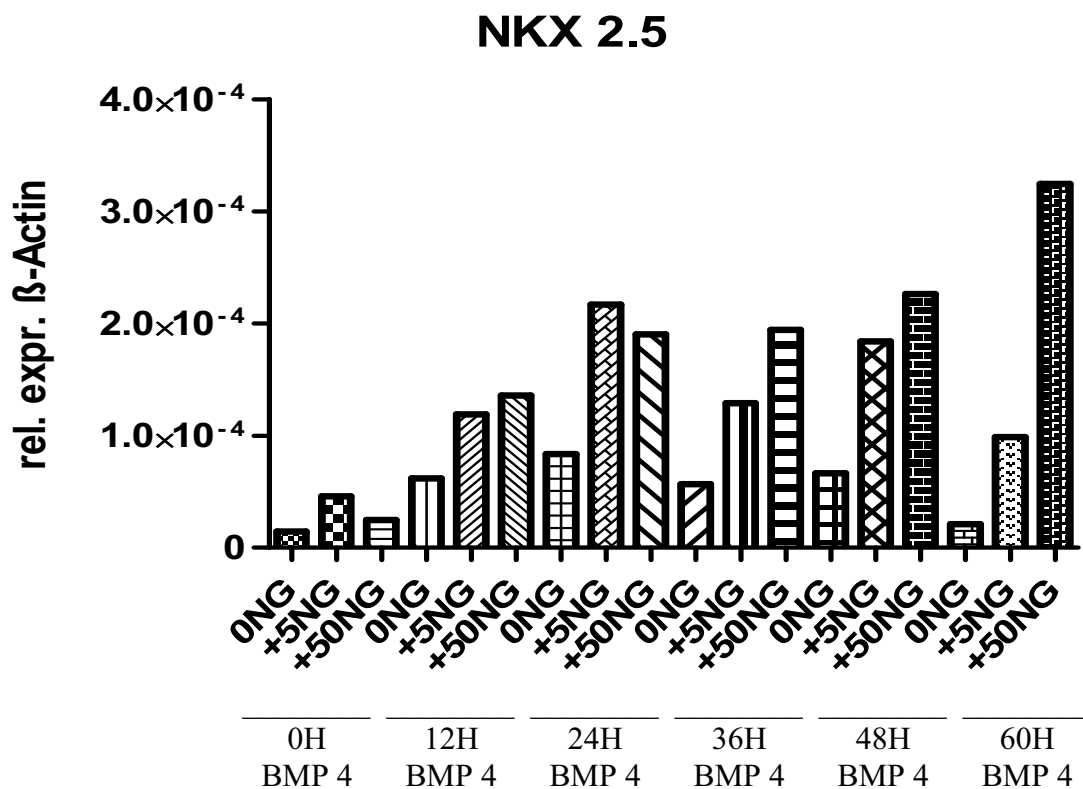
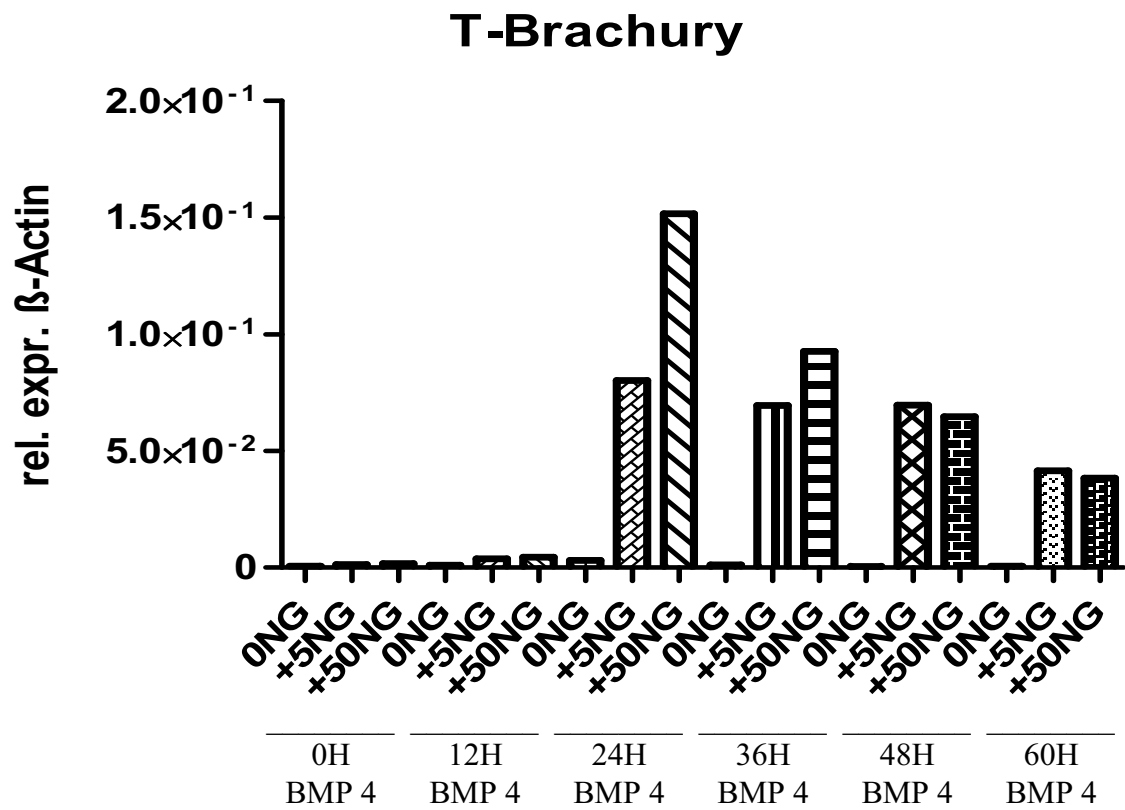


Abb. 16: qPCR Auswertung BMP 4 Differenzierung

Die qPCR Auswertung zeigte wie erwartet eine erhöhte Expression von Brachyury-T in den Ansätzen, denen BMP 4 zugegeben wurde. Hierbei fand die höchste Expression von Brachyury-T im Ansatz mit der Zugabe von 50 ng BMP 4 nach 24 Stunden statt und nahm dann stetig ab.

Bei der Auswertung der NKX 2.5 Expression wurden nur leicht erhöhte Werte festgestellt. Die höchsten Werte lagen hier bei 60 Stunden im Ansatz unter Zugabe von 50 ng BMP4. Die Auswertung zeigt den vom BMP 4 erwarteten Effekt der Induzierung der Brachyury-T Expression zu Beginn der Differenzierung und daher wurde BMP 4 für eine gezielte mesendoderme Induzierung bei allen weiteren Experimente angewandt.

4.5 Optimierung der Differenzierungsexperimente durch BMP 4 / DMSO / IDE 2 / SB 203580 Zugabe

In Versuchen innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte experimentell nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), dass die Zugabe von den niedermolekularen Wirkstoffen (Small Molecules) IDE 2 und SB 203580 Auswirkungen auf die myokardiale Differenzierung hatten.

Um eine mögliche Verbesserung des BMP 4 Ansatzes zu erreichen, wurde dies in dieser Versuchsreihe getestet. Da die „Small Molecules“ in DMSO gelöst vorlagen, wurden außerdem mögliche Auswirkungen des DMSO auf die Differenzierung untersucht.

Der Versuchsaufbau wurde wieder in die in 4.5 beschriebenen 4 Schritte unterteilt, wobei Schritt 1 nicht verändert wurde.

Im 2. Schritt wurden die hES-Zellen 48 Stunden im SF Differenzierungsmedium kultiviert und die jeweilige Menge BMP 4 / DMSO / IDE 2 / SB 203580 (siehe Abb. 17) zu den Ansätzen zugegeben.

Nach 48 Stunden wurde das SF-Medium entnommen und 1x mit dem nachfolgenden Differenzierungsmedium RPMI und bSF gespült, um Reste von BMP 4, IDE 2, SB 203580 und Insulin zu entfernen. Der folgende 3. Schritt beinhaltete eine Kultivierung einmal in RPMI-Medium unter Zugabe von FCS und in bSF-Medium unter Zugabe von SB 203580 von jeweils 48 Stunden. Als letzter Schritt wurde ab Stunde 96 das RPMI+FCS und bSF+SB 203580 entnommen und gegen RPMI und bSF ohne Zusätze ausgetauscht. Diese Medien wurden alle 48 Stunden gewechselt bis zum Ende der Differenzierung.

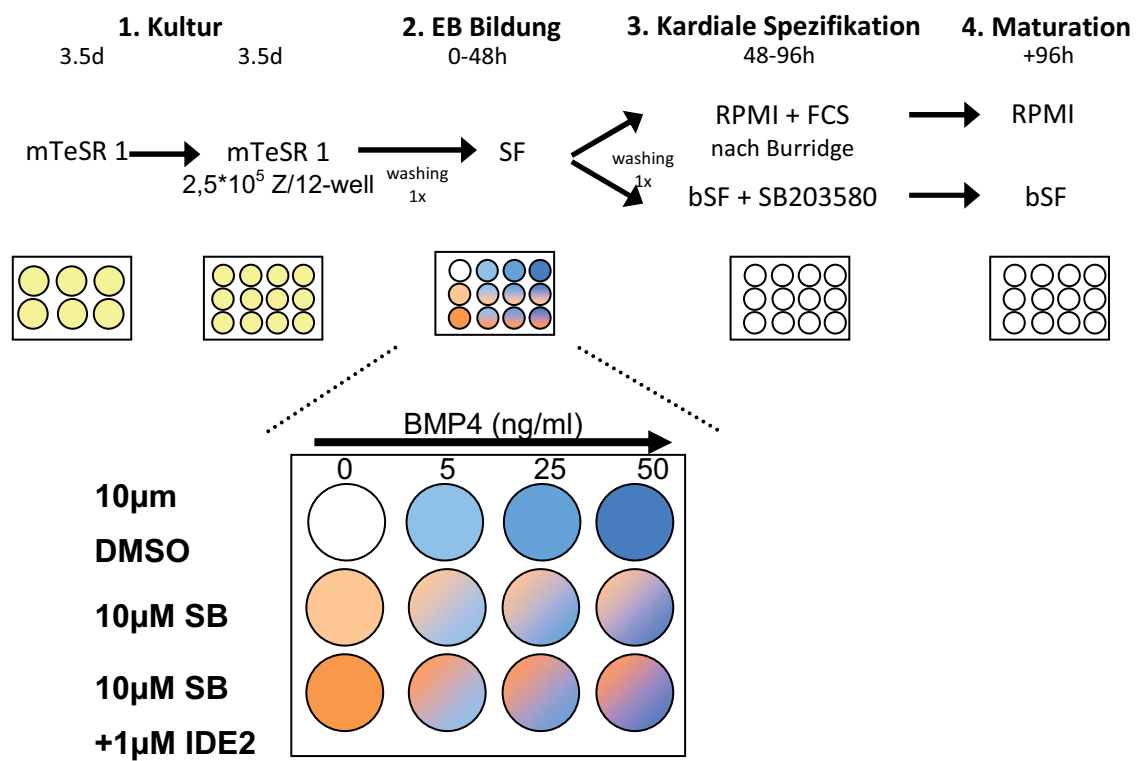


Abb. 17: Versuchsschema BMP4 / IDE 2 / SB 203580 Differenzierung

Die Expansion der hES-Zellen 3,5 Tage in mTeSR®1 ergab erneut durchschnittliche EB Größen von 200-400 µm (siehe Abb. 18). Hierbei ist die heterogene Größe der Aggregate auf eine Fusionierung zurückzuführen.

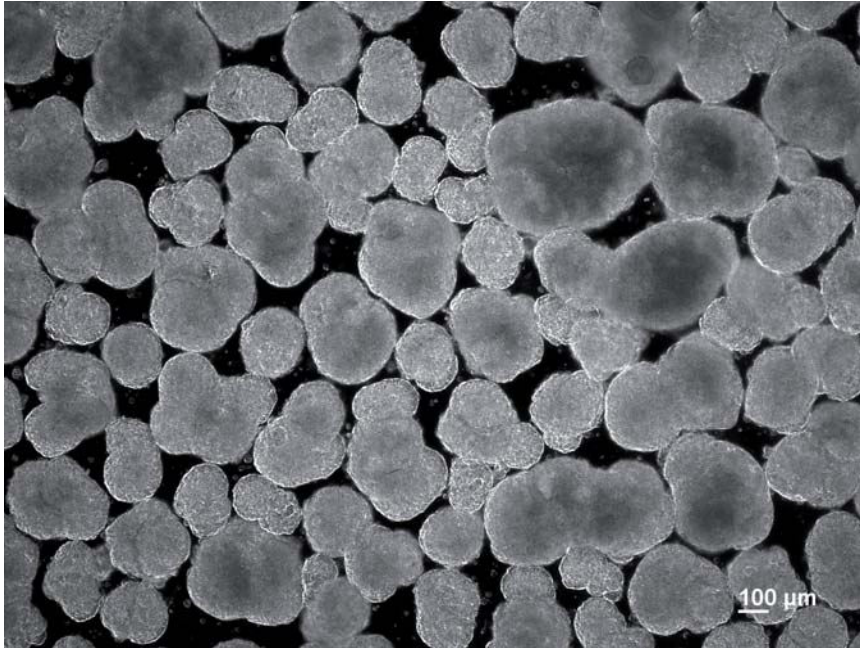


Abb. 18: hES-Zellen Expansion Tag 3,5 mTeSR®1

Die Untersuchung unter dem Lichtmikroskop an Tag 2 der Differenzierung in SF Medium zeigte in allen Ansätzen ein hohes Zellsterben und somit eine große Menge an „Zellschrott“ (siehe Abb. 19, rote Pfeile). Ein Vergleich der Morphologie zeigte im Gegensatz zu den vorherigen BMP 4 Versuch überdurchschnittlich viele EB's mit einer Größe <150 µm (siehe Abb. 19). Außerdem waren so gut wie keine epithelialen oder zystischen Strukturen zu erkennen. Der Ansatz unter Zugabe von DMSO zeigte keinen Unterschied zu den BMP 4 Ansätzen ohne Zugabe von SB 203580 und IDE 2 und wurde hier deshalb nicht betrachtet.

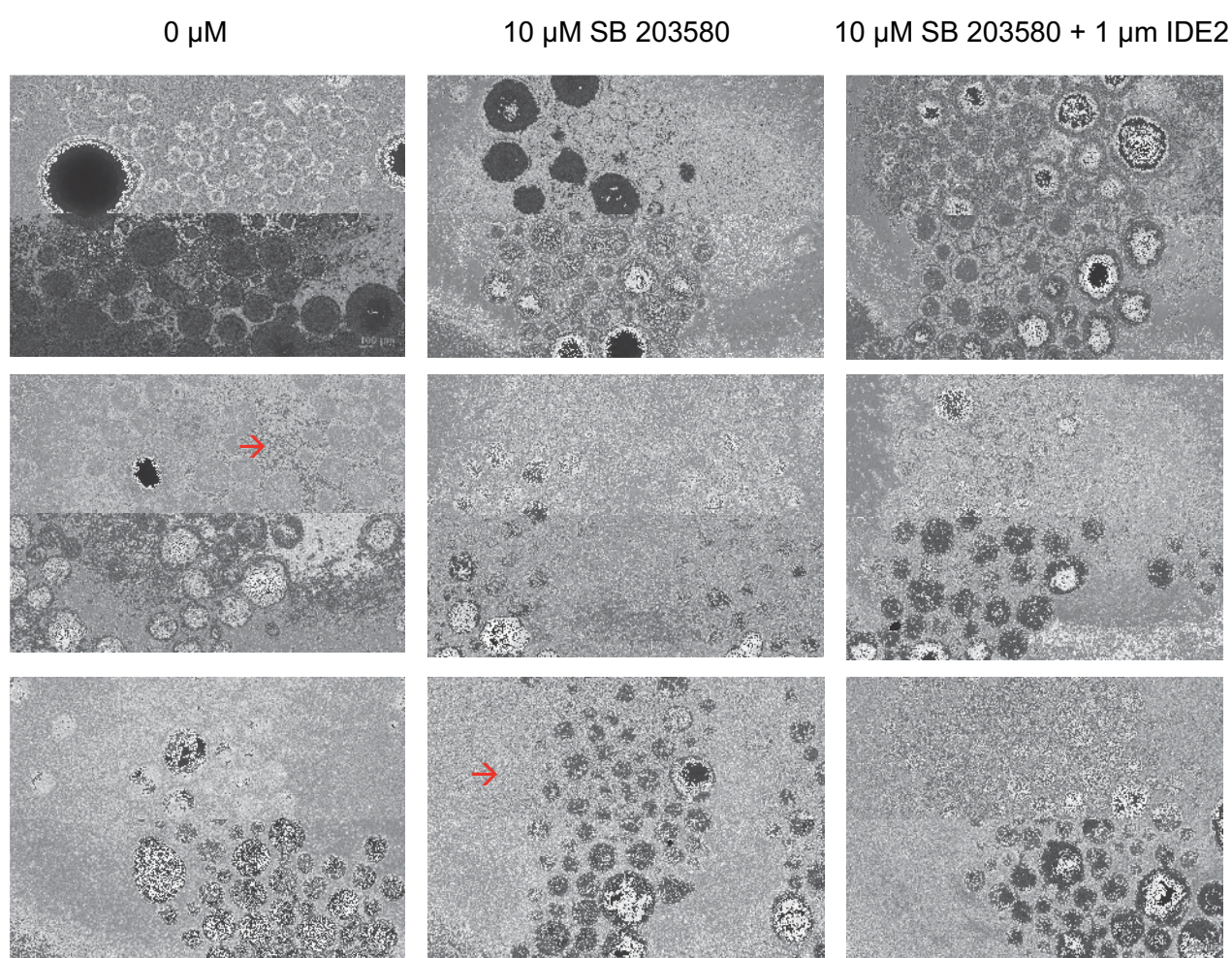


Abb. 19: EB's BMP 4/ IDE 2 / SB Differenzierung Tag 2

Linke Beschriftung: Konzentration des zugegebenen BMP 4

Obere Beschriftung: Konzentration der zugegebenen „Small Molecules“

An Tag 7 der Differenzierung waren in den bSF-Medium Ansätzen nur noch wenige EB's durch ein anhaltendes Zellsterben erhalten (siehe Abb. 20). Die EB's im Ansatz mit dem RPMI Medium setzen sich wie im vorherigen Versuch beobachtet wieder am Boden der Suspensionsplatte ab und wurden adhärent (siehe Abb.21, rote Pfeile).

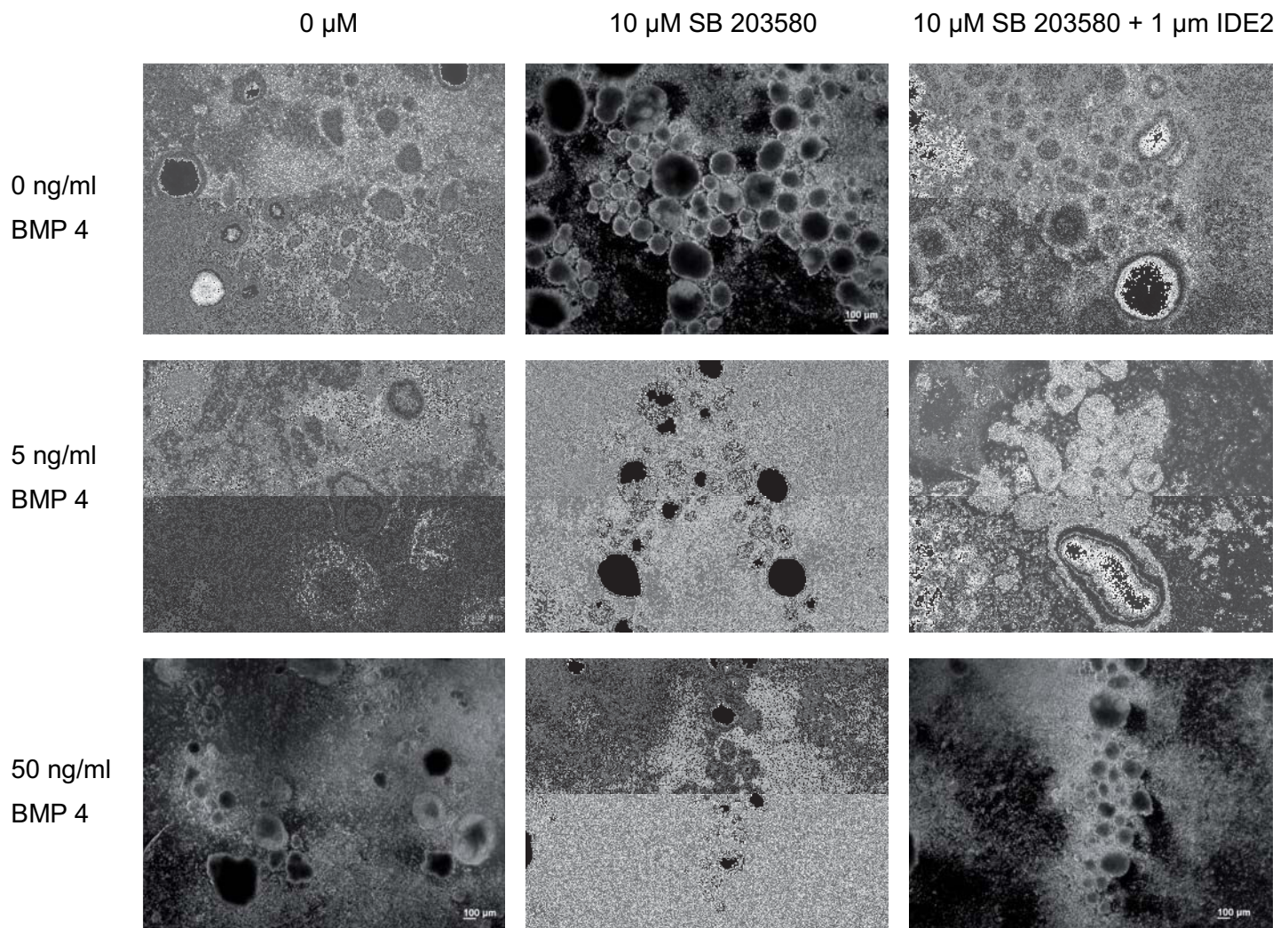


Abb. 20: EB's BMP 4/IDE 2/SB Differenzierung Tag 7 bSF-Medium
Linke Beschriftung: Konzentration des zugegebenen BMP 4
Obere Beschriftung: Konzentration der zugegebenen „Small Molecules“

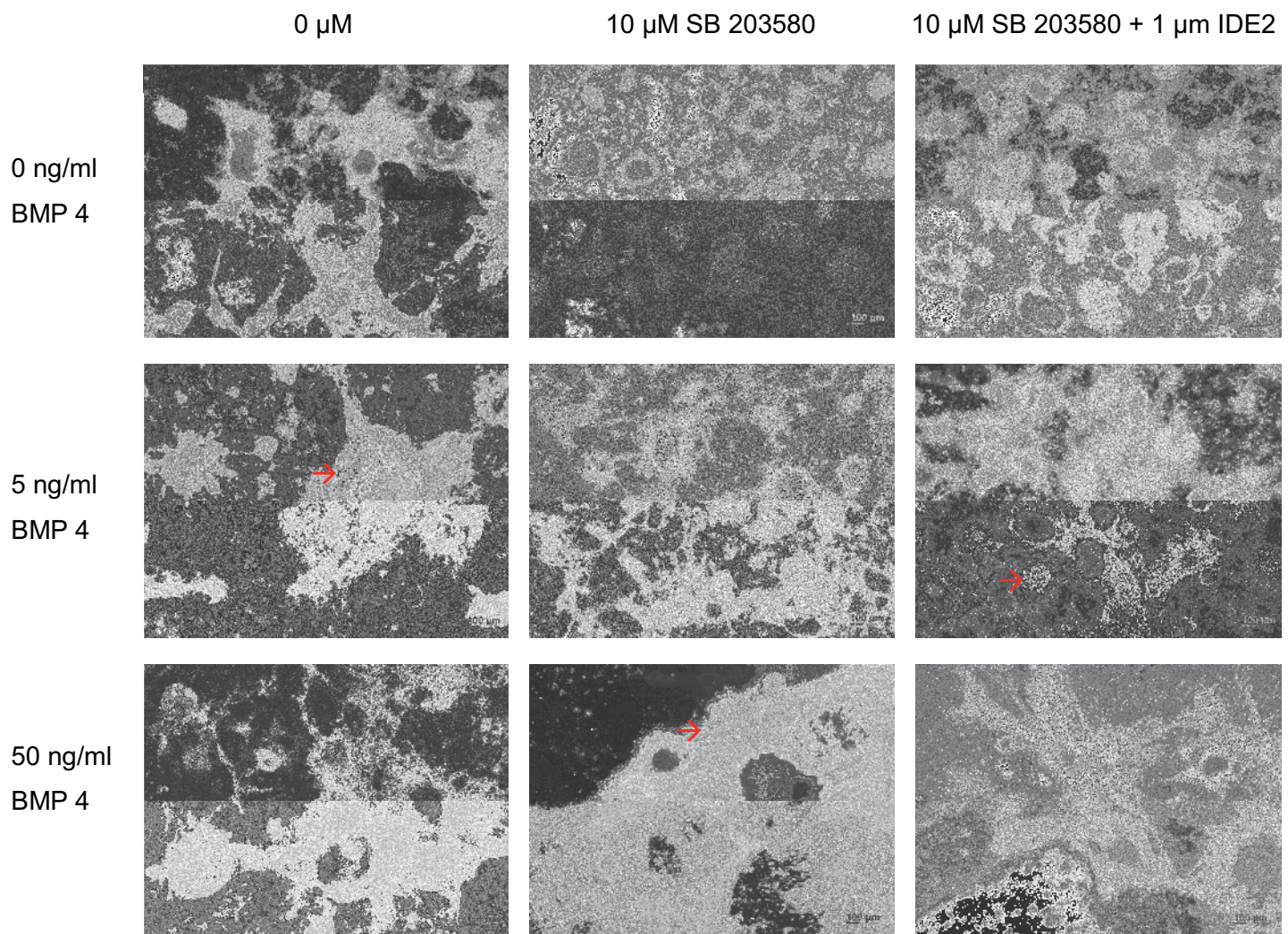


Abb. 21: EB's BMP 4/IDE 2/SB Differenzierung Tag 7 RPMI-Medium
 Linke Beschriftung: Konzentration des zugegebenen BMP 4
 Obere Beschriftung: Konzentration der zugegebenen „Small Molecules“

Ab Tag 10 konnte der bSF-Medium Ansatz nicht mehr ausgewertet werden, da die EB's komplett zerfallen waren (Daten nicht gezeigt). Die Suspensionsplatte mit dem RPMI-Medium war wiederum komplett überwachsen und konnte ebenfalls nicht mehr ausgewertet werden (Daten nicht gezeigt).

Da der Ansatz mit DMSO / IDE 2 / SB in Phase 2 der Differenzierung keine brauchbaren Ergebnisse lieferte, wurden diese Ansätze aus Zeitgründen nicht weiter verfolgt. Weiterhin wurde eine Arbeit mit RPMI als Differenzierungsmedium ausgeschlossen, da es wiederholt zu einem Absetzen der EB's in Suspension führte.

4.6 Optimierung der Differenzierungsexperimente durch BMP 4 / Activin A / bFGF Zugabe

Der Versuchsaufbau wurde wie in 4.5 beschrieben in 4 Schritte unterteilt, wobei Schritt 1 nicht verändert wurde.

Im 2. Schritt wurden die hES-Zellen 48 Stunden im SF Differenzierungsmedium kultiviert und die jeweilige Mengen BMP 4 / Activin A / bFGF (siehe Abb. 22) zu den Ansätzen zugegeben.

Nach 48 Stunden wurde das SF-Medium entnommen und 1x mit dem nachfolgenden Differenzierungsmedium bSF gespült. Der 3. Schritt beinhaltete eine Kultivierung von 48 Stunden in bSF-Medium mit Zugabe von SB 203580 und ohne. Als letzter Schritt wurde ab Stunde 96 das jeweilige Differenzierungsmedium entnommen und gegen bSF-Medium ohne Zusatz von SB 203580 ausgetauscht. Dieses wurde alle 48 Stunden gewechselt bis zum Ende der Differenzierung.

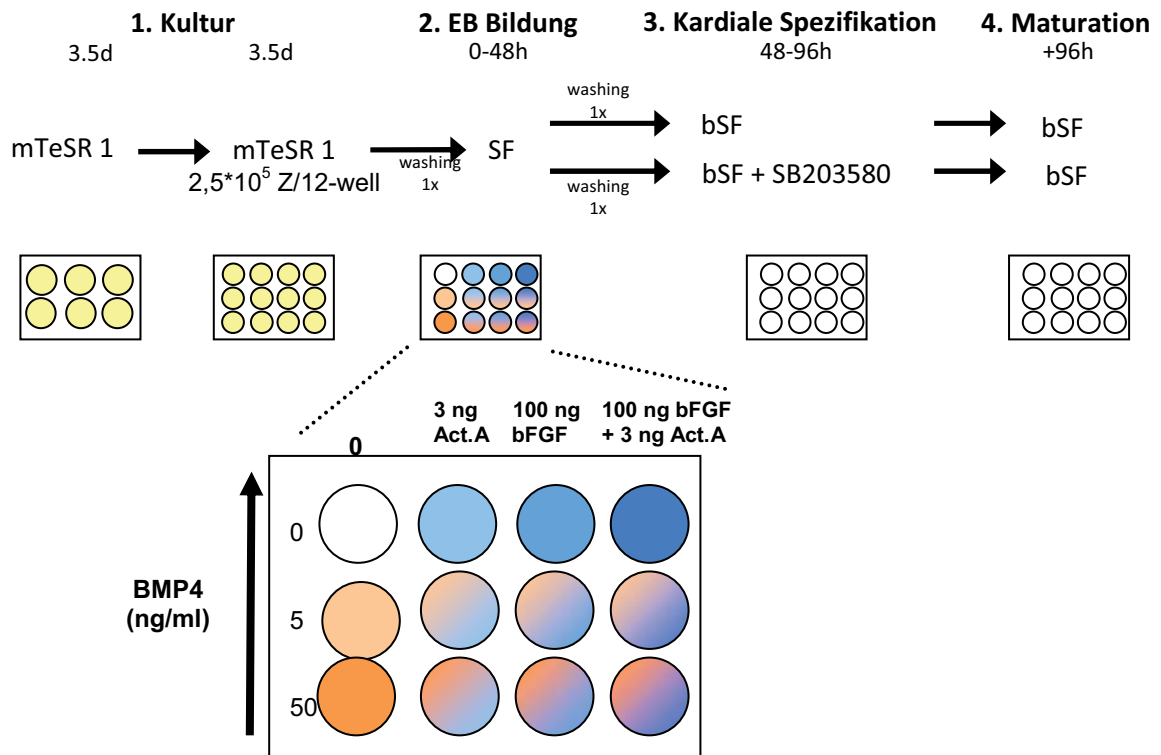


Abb. 22: Versuchsschema BMP4 / Activin A / bFGF Differenzierung

Die Expansion der hES-Zellen 3,5 Tage in mTeSR®1 ergaben wie in den vorherigen Versuchen durchschnittliche EB Größen von 200-400 µm (siehe Abb. 23). Hierbei ist die heterogene Größe der Aggregate auf eine Fusion mehrerer Aggregate zurückzuführen.

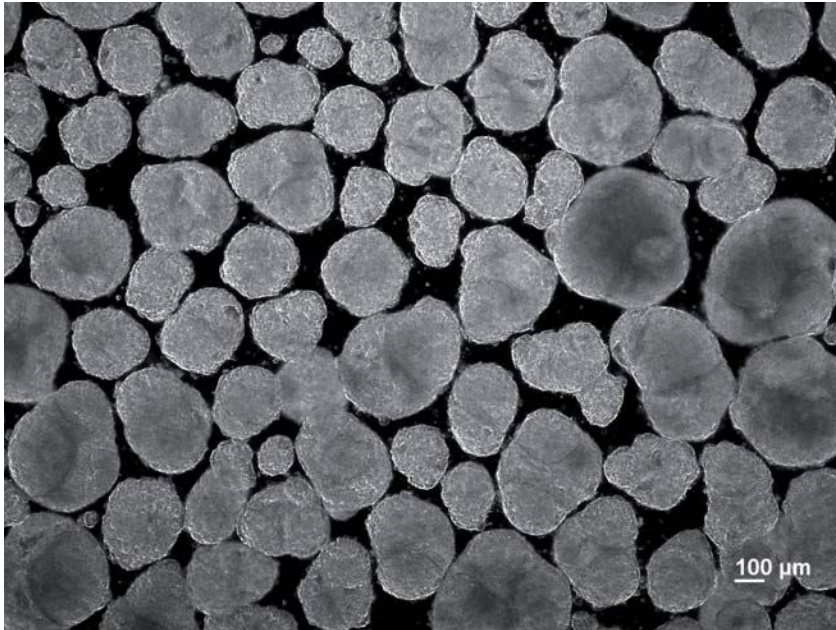


Abb. 23: hES-Zellen Expansion Tag 3,5 mTeSR®1

Die Lichtmikroskopische Untersuchung an Tag 2 der Differenzierung in SF Medium zeigte bei allen Ansätzen, die mit BMP 4 und gleichzeitig bFGF supplementiert waren, auffällige epitheliale Strukturen (siehe Abb. 24, rote Pfeile).

Diese Strukturen traten ebenfalls in den Ansatz mit 100 ng bFGF ohne BMP 4 Supplementierung auf, jedoch in einem weit geringeren Ausmaß (siehe Abb. 24, gelber Pfeil). Weiterhin ist im Kontrollansatz ohne Zusätze keine dieser Strukturen zu erkennen. Dies lässt auf einen großen Einfluss des bFGF auf die Entstehung dieser Strukturen schließen. Die Zugabe von Activin A zeigte keinen zusätzlichen morphologischen Unterschied.

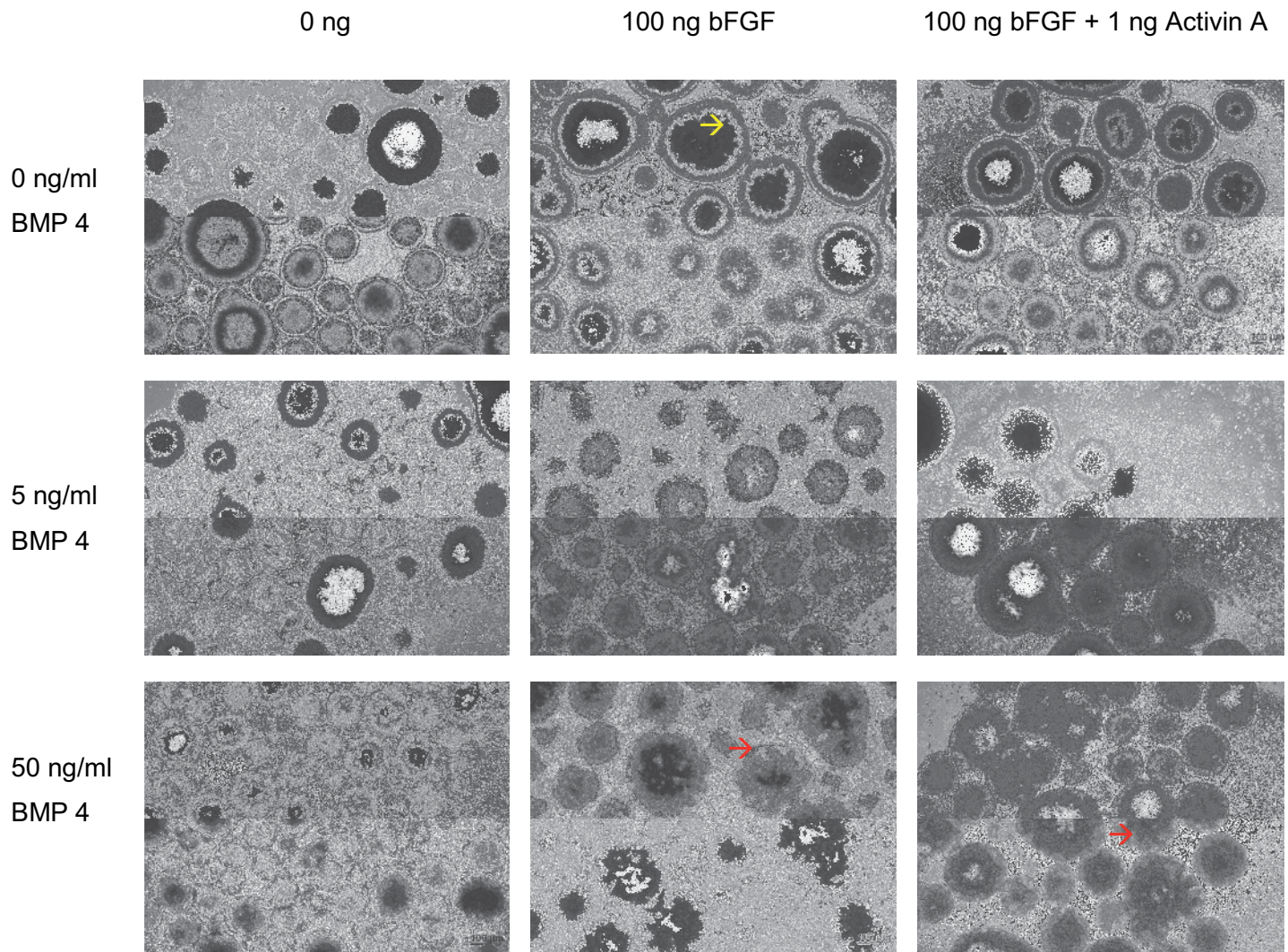


Abb. 24: EB's BMP 4 / bFGF / Activin A Differenzierung Tag 2

Linke Beschriftung: Konzentration des zugegebenen BMP 4

Obere Beschriftung: Konzentration der zugegebenen Wachstumsfaktoren

Tag 10 der Differenzierung in bSF-Medium ohne 48-stündige SB 203580 Zugabe zeigte in den Ansätzen mit fehlender vorheriger BMP 4 Supplementierung ein großes Zellsterben (siehe Abb. 25, roter Pfeil). In allen weiteren Ansätzen kam es ebenfalls zu einem Zellsterben, aber hier setzten sich die restlichen EB's am Boden der Suspensionsplatte ab. Es konnte eine geringe Anzahl kleiner kontrahierende Areale in 2 Ansätzen gefunden werden (siehe Abb. 27).

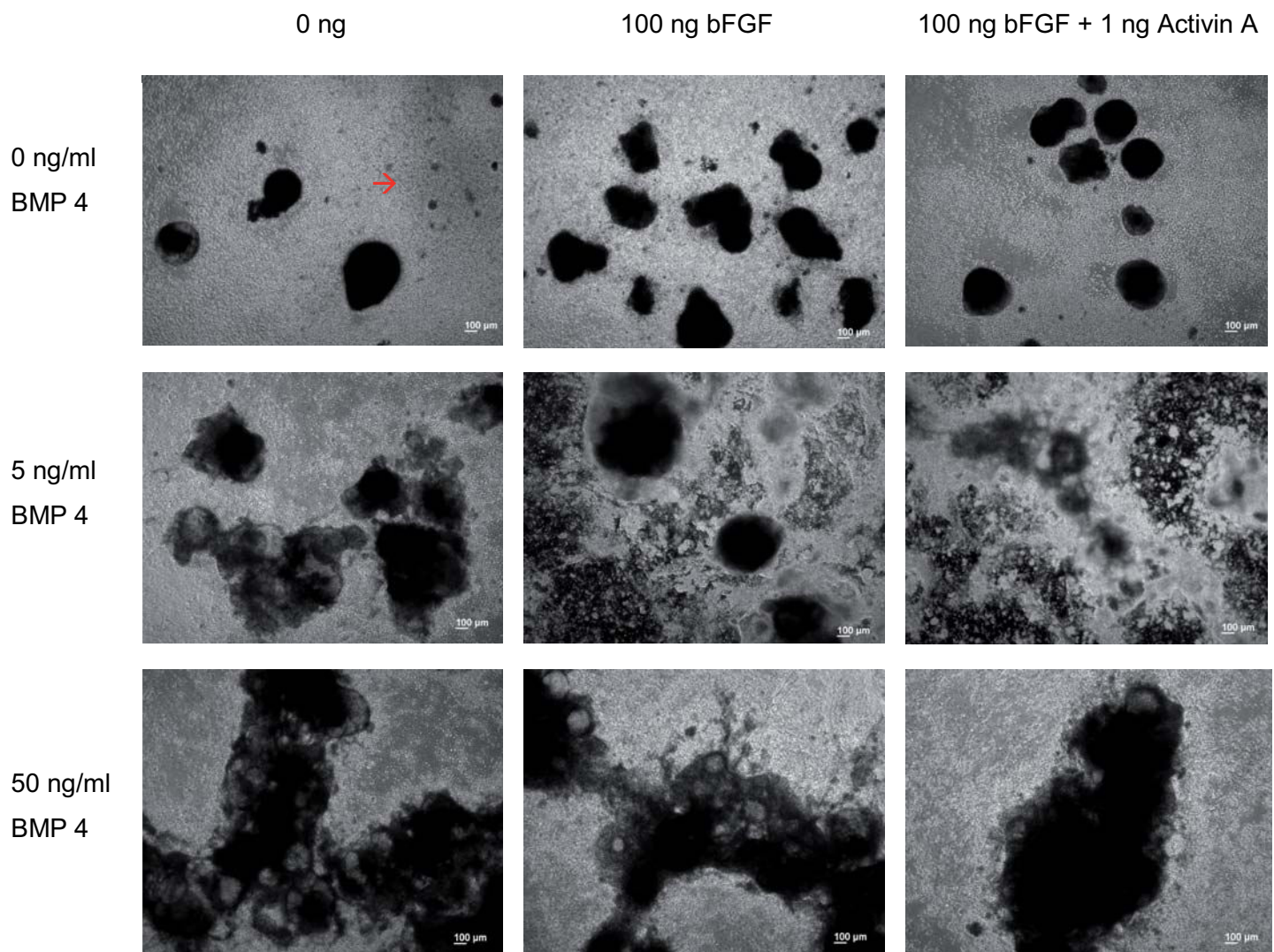


Abb. 25: EB's BMP 4 / bFGF / Activin A Differenzierung Tag 10 bSF-Medium
 Linke Beschriftung: Konzentration des zugegebenen BMP 4
 Obere Beschriftung: Konzentration der zugegebenen Wachstumsfaktoren

Die Differenzierung an Tag 10 in bSF-Medium mit 48-stündiger SB 203580 Zugabe zeigte in den Ansätzen mit fehlender vorheriger BMP 4 Supplementierung ebenfalls ein großes Zellsterben (siehe Abb. 26, roter Pfeil). In den anderen Ansätzen kam es zu einem geringeren Zellsterben im Vergleich zum bSF Ansatz. Außerdem konnte nur eine geringe Anzahl abgesetzter EB's beobachtet werden. Zudem bildeten sich in den Ansätzen mit BMP 4 Supplementierung deutliche Strukturen (siehe Abb. 26, gelbe Pfeile).

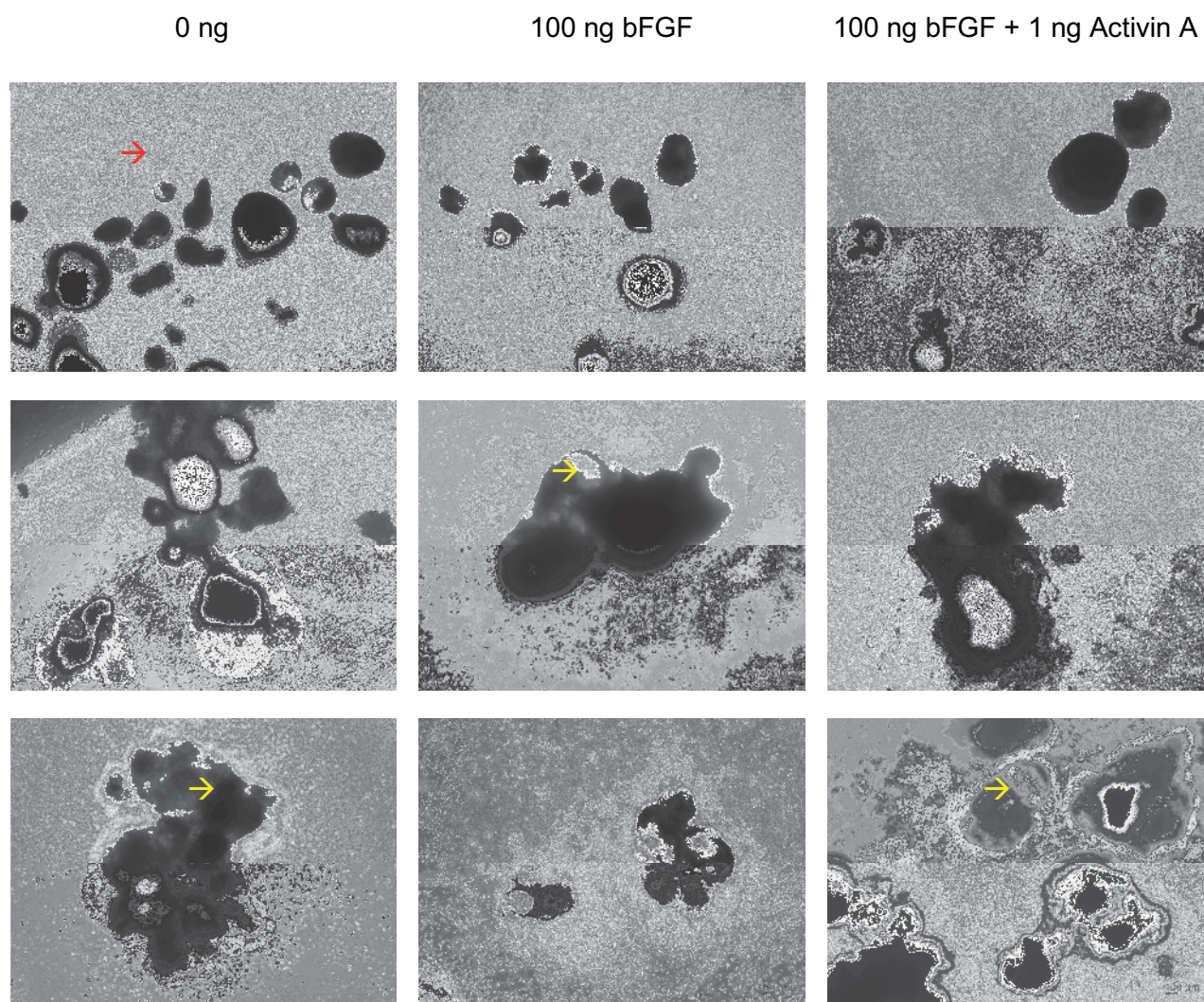


Abb. 26: EB's BMP 4 / bFGF / Activin A Differenzierung Tag 10 bSF-Medium +SB 203580

Linke Beschriftung: Konzentration des zugegebenen BMP 4

Obere Beschriftung: Konzentration der zugegebenen Wachstumsfaktoren

In den Ansätzen mit 50 ng BMP 4 und 100 ng bFGF konnten große kontrahierende Areale in deutlich höherer Anzahl als im Vergleichsansatz gefunden werden (siehe Abb. 6 zu Abb. 27).

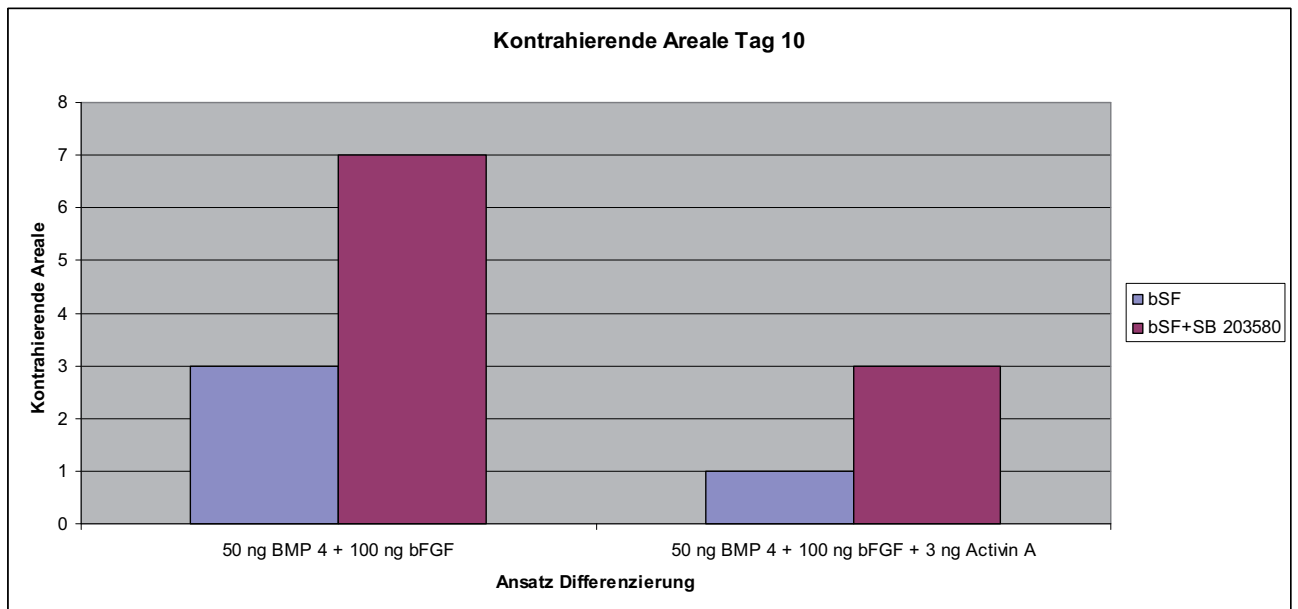


Abb. 27: Kontrahierende Areale hES-Zellen BMP 4 / Activin A / bFGF Differenzierung Tag 10

Die Differenzierung konnte nicht über Tag 10 beobachtet werden, da die Zellkulturen aufgrund einer bakteriellen Kontamination verworfen werden mussten.

4.7 Reproduktion des BMP 4 / bFGF Differenzierungsexperimentes

Um die positiven Ergebnisse aus 4.6 zu reproduzieren, wurde der Differenzierungsansatz wiederholt. Hierzu wurde aus ökonomischen Gründen nur der Ansatz mit Zugabe von 50 ng BMP 4 und 100 ng bFGF im bSF-Medium unter 48 stündiger Zugabe von SB 203580 erneut durchgeführt, da hier die besten Ergebnisse erreicht wurden. Der Ablauf der Differenzierung wurde wie in 4.6 beschrieben durchgeführt und in Abbildung 28 erneut gezeigt.

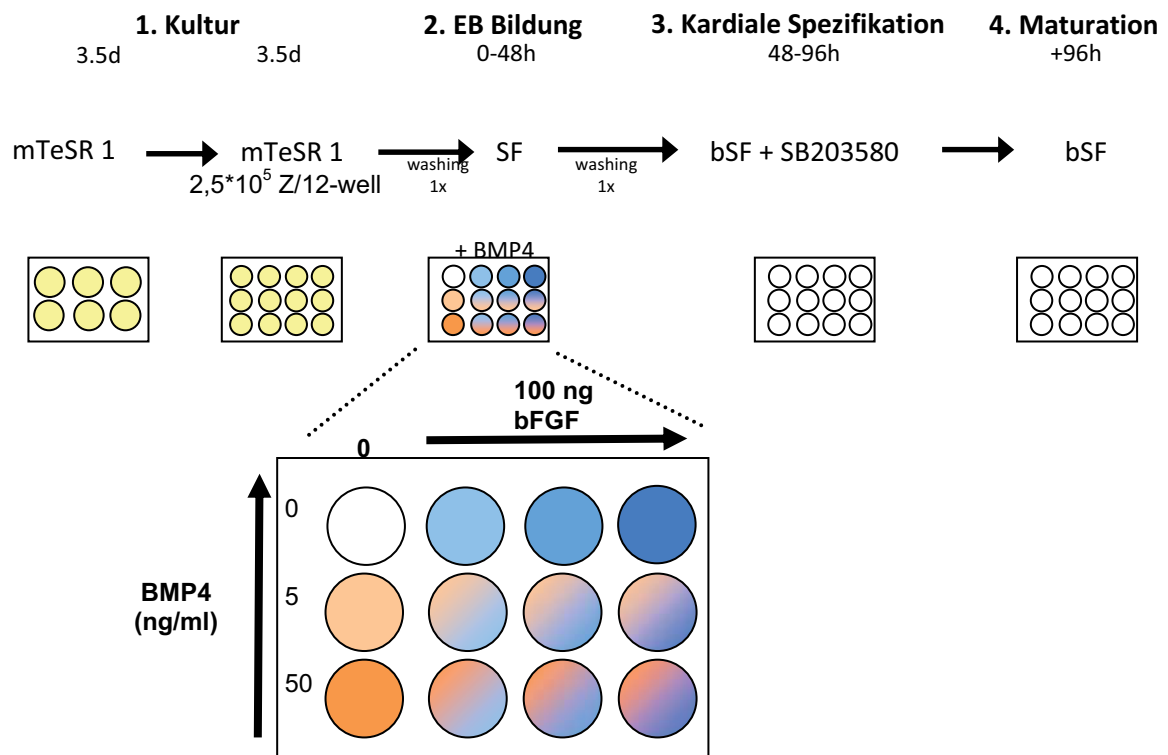


Abb. 28: Versuchsschema Reproduktion BMP4 / bFGF Differenzierung

Da die lichtmikroskopischen Aufnahmen keine morphologischen Unterschiede zu Ansatz 4.6 zeigten, wurden die Bilddaten hier nicht noch mal gezeigt.

Die Auswertung der Ansätze auf spontan kontrahierende Areale ergab ab Tag 10 die in Abb. 29 gezeigte Anzahl. Die Areale waren größer und kontrahierten schneller als im vergleichbaren Standarddifferenzierungsansatz.

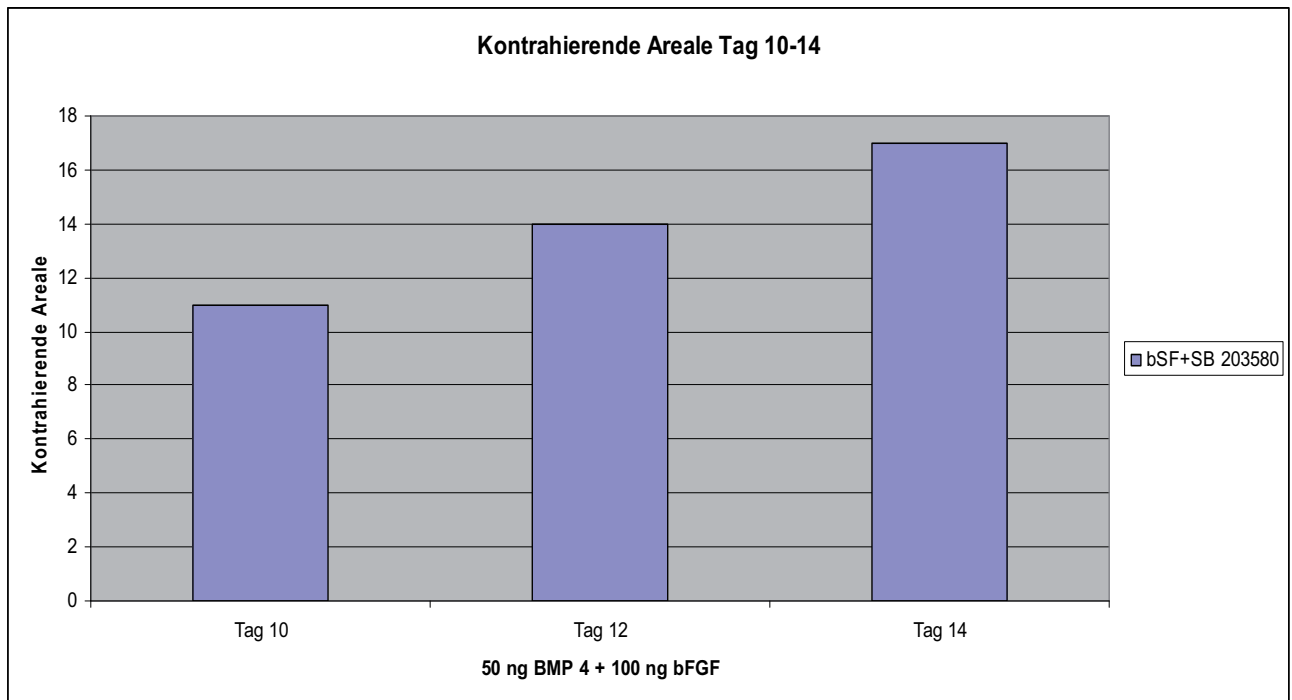


Abb. 29: Kontrahierende Areale hES-Zellen BMP 4 / bFGF Differenzierung Tag 10-14

Zusätzlich zur Auswertung auf kontrahierende Areale wurden an Tag 14 RNA-Proben für eine qPCR Analyse auf die kardialen Marker NKX 2.5 und Troponin T genommen. Hierbei ergab sich an Tag 14 eine um den Faktor 20 höhere Troponin T Expression (siehe Abb. 30) als die qPCR Auswertung des Standardansatzes zeigte (siehe Abb. 7). Die NKX 2.5 Werte an Tag 14 zeigten eine niedrigere Expression als bei Troponin T. Somit konnte das Standardprotokoll entscheidend verbessert werden.

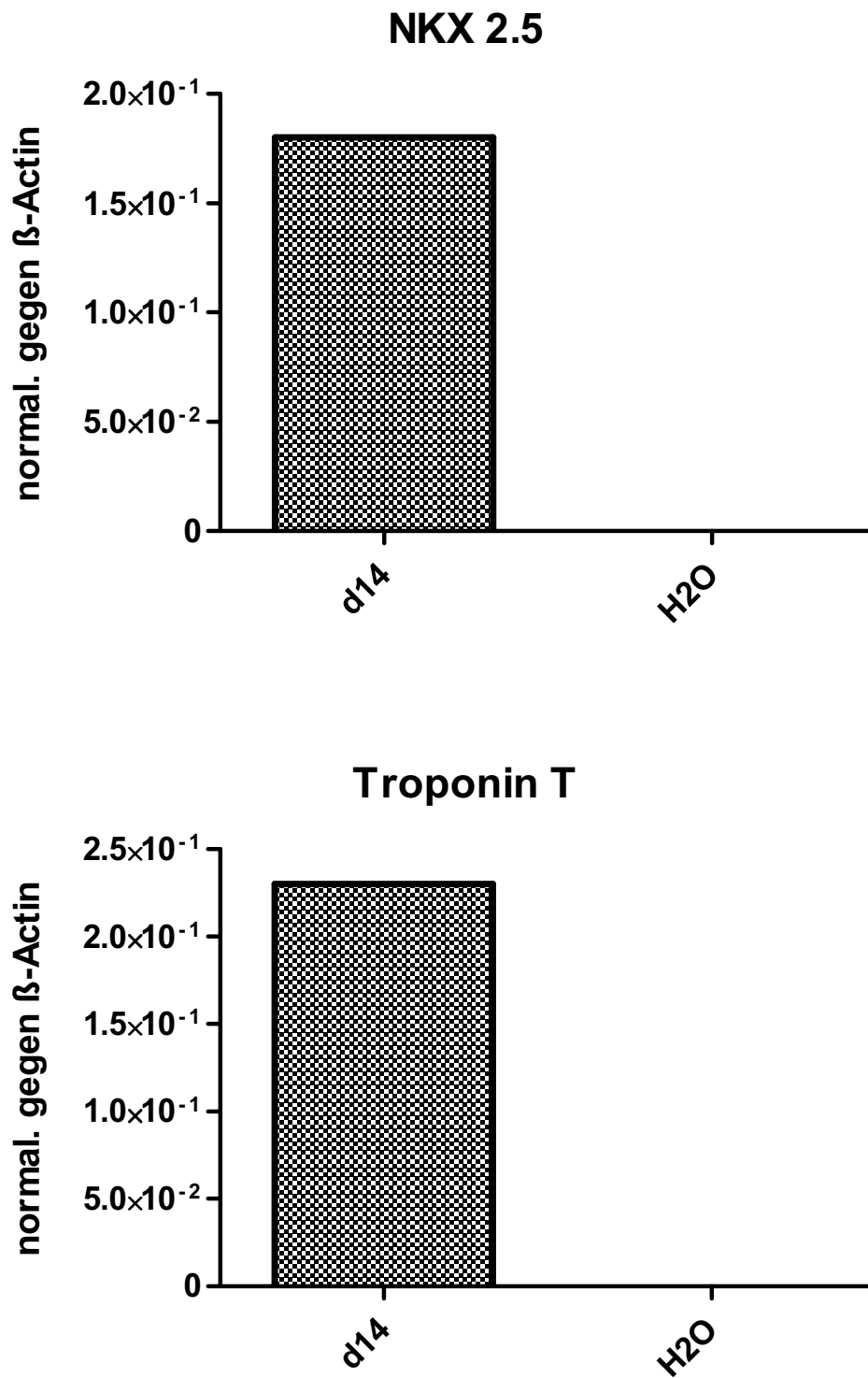


Abb. 30: qPCR Auswertung BMP 4 / bFGF Differenzierung Tag 14

5. Diskussion

5.1 Vergleich alternativer Kulturmedien zur Kultivierung von hES-Zellen in Suspensionskultur und der Einfluss ungewollter Bewegung von Kulturschalen auf die Entwicklung von Aggregaten

Die Kultivierung und Expansion von humanen pluripotenten Stammzellen erfolgt standardgemäß in Co-Kultur auf durch γ -Strahlung inaktivierten murinen oder humanen Fibroblasten. Diese Methode ist technisch schwer kontrollierbar und daher ungeeignet um hES-Zellen in den für die Zellersatztherapie benötigten Mengen herzustellen. Die Übertragung in eine Feeder-Zell freie, Co-Kultur unabhängige Suspensionskultur stellt eine mögliche Lösung dieses Problems dar. In skalierbaren Suspensionskulturen können potential große Menge an pluripotenten hES-Zellen kultiviert und expandiert werden. Bisher war jedoch eines der Kernprobleme bei diesem Schritt das Überleben der hES-Zellen in Suspension zu ermöglichen. Humane pluripotente Stammzellen zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität gegenüber enzymatischer Vereinzellung und mechanischem Scherstress aus. Durch arbeiten in unserer Arbeitsgruppe [15] konnten Methoden entwickelt werden, die eine Expansion von pluripotenten hES-Zellen sowie humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) durch Einzelzellinokulation in Suspension mit einer durchschnittlichen Überlebensrate von 50% 24 Stunden nach Inokulation ermöglichten.

Hierbei wurde das definierte Medium mTeSR®1 als Standardmedium unter Zusatz eines Rho Kinase Inhibitor Y-27632 (Ri) etabliert [15,29].

Die Zugabe des Wirkstoffs Y-27632 nach der Inokulation ist hierbei für das Überleben der Einzelzellen von erheblicher Bedeutung.

Um eventuelle weitere Verbesserungen der Kultivierung und Expansion durch anderer Kulturmedien zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit 2 weitere Medien - **STEMPRO® hESC SFM** und **NutriStem™ XF/FF** - getestet und mit dem bisherigen Standard **mTeSR®1** verglichen.

Beide Kulturmedien wurden als geeignet für eine Feederzellen freie Kultivierung beschrieben, bisher jedoch nicht in Suspensionskultur, sondern nur als konventionelle Oberflächen-abhängige Kultur in Kombination mit einer Matrix zur Beschichtung der Kulturoberfläche (Matrigel, BD).

Die Kultivierung der hES-Zellen konnte nach Inokulation von Einzelzellen in Suspensionkultur in allen drei Medien über 4 Tage erfolgreich durchgeführt werden, wobei jeweils sehr ähnliche Zellerträge erhalten wurden. Bei diesen Experimenten wurde darauf geachtet, dass die Suspensionskulturen im Brutschrank möglichst nicht bewegt wurden, d.h. das beispielsweise wiederholtes Mikroskopieren zur Zellanalyse gezielt vermieden wurde. Beobachtungen während dieser Arbeit lassen vermuten, dass die Bewegung der Kulturen die Fusion von Einzelzellen sowie bereits gebildeter Zellaggregate untereinander verstärkte und dabei die reproduzierbare Entwicklung homogener Aggregatstrukturen verhinderte.

Obwohl folglich die Bewegung der Kulturschalen nach Zellinokulation gezielt vermieden wurde, zeigten Lichtmikroskopische Aufnahmen der Kulturen 4 Tage nach Inokulation (siehe Abb. 4) dennoch in allen Expansionsmedien Aggregate von relativ heterogener Struktur und Größe, die durchschnittlich größer als 200 µm waren. Da die Brutschränke im Laboralltag täglich mehrmals geöffnet werden müssen und es dadurch zu Erschütterungen in den Suspensionsplatten kommt, besteht die Annahme, dass dies einen Einfluss auf die Fusion der Aggregate hatte. Diese bei der experimentellen Planung nicht erwartete Problematik stellt einen systematischen Fehler bei der Durchführung und Reproduzierbarkeit der Experimente dar. Dieser konnte im Rahmen des ersten Teils dieser Arbeit zwar nicht ausgeschlossen, jedoch bewusst bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

Interessanter Weise kann man auf den Bildern in Abb. 4 erkennen, dass in allen 3 Suspensionsmedien nur sehr wenige sichtbare Überreste abgestorbener Zellen vorhanden waren. Dies lässt auf eine hohe Überlebensrate der hES-Zellen schließen, wobei diesbezüglich lichtmikroskopisch keine gravierenden Unterschiede zwischen den drei Medien beobachtet wurden. Im NutriStem™ XF/FF zeigte sich jedoch ein häufiges Fusionieren von Aggregaten (siehe Diskussion oben), welches zur Bildung großer Aggregat „Klumpen“ führte.

Dieser Effekt wurde im deutlich geringeren Maße im STEMPRO® Ansatz beobachtet. Hier trat außerdem in einzelnen Aggregaten eine sichtbare Strukturbildung auf, welches auf eine beginnende Differenzierung dieser Zellen hindeutete. Der mTeSR®1 Ansatz brachte die homogensten Aggregate hervor.

Die Arbeiten haben die Funktion von mTeSR®1 als Suspensionsmedium bestätigt und erstmals gezeigt, dass generell auch STEMPRO® hESC SFM und NutriStem™ XF/FF zur Etablierung von Suspensionskulturen humaner Pluripotenter Stammzellen geeignet sein könnten. Eine kürzlich erscheinende Arbeit von Chen et al [18] hat diese Beobachtungen für STEMPRO® bestätigt.

5.2 Kardiale Differenzierungen nach dem Standardprotokoll

Für spätere therapeutische Anwendungen ist es unerlässlich, spezifische Zelltypen aus undifferenzierten hES-Zellen generieren zu können.

Bereits 2001 konnte hierbei die Differenzierung von hES-Zellen zu Kardiomyozyten durch Kehat et al [24] gezeigt werden.

Die kardiale Differenzierung pluripotenter Stammzellen stellte einen Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe dar. Daher waren notwendige Methoden bereits etabliert [24].

Als kardiales Differenzierungsmedium wurde hierbei das Serum-freie, voll definierte sogenannte bSF-Medium verwendet, das in vorangegangene Arbeiten erfolgreich zur Induktion von Kardiomyozyten entwickelt wurde [24,25]. Hierbei wurde allerdings stets von konventionell auf Feeder-Zellen expandierten hES-Zellen ausgegangen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Entstehen und die Anzahl von spontan kontrahierenden Arealen als Nachweis für die Bildung funktioneller Kardiomyocyten gewertet und konnte damit als funktionelles „Assay“ der zu testenden Differenzierungsprotokolle verwendet werden. Zusätzlich wurde durch die Analyse mittels qPCR die Genexpression verschiedener früher und später kardialer Marker in verschiedenen Ansätzen untersucht.

Als Ausgangspunkt wurden die hES-Zell-Aggregate des Mediumvergleiches (siehe 4.2) im 6-„well“ Format nach dem bisherigen Standardprotokoll durch Zugabe von bSF-Medium differenziert. Dies hatte einmal ökonomische Gründe und zweitens sollte ein möglicher Einfluss der 3 Suspensionsmedien auf die spätere Differenzierung untersucht werden.

Nach 3-4 Tagen konnte in allen Ansätzen innerhalb der nun als EB's bezeichneten Aggregate das Entstehen zystischer und epithelialer Strukturen beobachtet werden (siehe Abb.5, roter Pfeil). Die beginnende Strukturbildung wurde als Zeichen der einsetzenden Zelldifferenzierung gewertet.

Der Ansatz hervorgehend aus der NutriStem™ XF/FF-basierten Expansion zeigte ab Tag 7 der Differenzierung ein vermehrtes Absetzen der EB's am Boden der Suspensionsplatten; an Tag 14 waren die Aggregate durchgehend adhärent (siehe Abb.5). Dies konnte bei den beiden anderen Ansätzen nicht beobachtet werden. Im Differenzierungsansatz der STEMPRO® Expansion konnte dagegen ab Tag 9 ein gehäuftes Zellsterben beobachtet werden.

Dies führte dazu, dass an Tag 14 der Differenzierung nur noch EB's mit einer durchschnittlichen Größe von 100-200 µm vorhanden waren (siehe Abb. 5).

In dem Differenzierungsansatz aus der mTeSR®1 Expansion konnten dagegen an Tag 14 durchschnittliche Aggregatgrößen >200 µm beobachtet werden (siehe Abb.5).

Nur im Differenzierungsansatz hervorgehend aus der mTeSR®1 Expansion konnten ab Tag 11 unter dem Lichtmikroskop spontan kontrahierende Areale beobachtet werden. Die Anzahl kontrahierender EB's je „Well“ einer 6-„well Platte“ betrug sich auf 2-6 wie in Abbildung 6 dargestellt. Die Gesamtzahl der EB's wurde aufgrund der hohen Dichte zwar nicht quantifiziert, hatte aber die Dimension von etwa >100-200 pro well. Außerdem waren diese kontrahierenden Areale relativ klein im Vergleich zu Feeder-basierten Kontrollkulturen im Labor, bei denen häufig große, kontrahierende Areale entstehen (Daten nicht gezeigt). Eine wichtige Beobachtung dieser Arbeit ist, dass nur in EB's mit einem durchschnittlichen Durchmesser von >300 µm kontrahierende Areale auftraten.

Daraus lässt sich vermuten, dass viele der Aggregate, die zu Beginn der Differenzierung in Suspensionskult vorhanden waren, unter den gegebenen Differenzierungsbedingungen zu klein waren um myokardial zu differenzieren.

Zur Molekularbiologischen Beurteilung der Differenzierung wurde die Expression von spezifischen Genen in den verschiedenen Ansätzen analysiert.

Hierzu wurden an Tag 0,3,7,14 der Differenzierung RNA-Proben entnommen und auf Marker aller 3 Keimblätter sowie auf ihre Pluripotenz untersucht (siehe Abb. 7).

Als Endoderme Marker kamen hierbei SOX 17 und Alpha-Fetoprotein (AFP) zum Einsatz, für das Ectoderm Tubulin-Beta 3 (Tubb 3) und der Neuroectodermmarker SOX 1. Für das frühe Mesoderm wurde T-Brachury ausgewählt sowie Troponin T als später kardialer Marker. Die Pluripotenz wurde mittels des Pluripotenzmarker Nanog überprüft.

Nanog wurde in den Medien NutriStem™ sowie mTeSR®1 an Tag 0 in größeren Mengen exprimiert und war ab Tag 3 nicht mehr messbar (siehe Abb. 7). Dies weist auf einen Erhalt der Pluripotenz in der Expansionsphase durch die beiden Medien hin und bestätigt den Beginn der Differenzierung ab Zugabe des Differenzierungsmediums. Hingegen wurden im STEMPRO® Medium zu Beginn der Differenzierung nur äußerst geringe Mengen gefunden. Damit kann man davon ausgehen, dass in diesem Medium schon während der Expansionsphase eine beginnende Differenzierung der Zellen stattfand. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten an Tag 4 (siehe Abb. 4) der Expansion im STEMPRO® Medium eine deutliche Strukturbildung, was die oben genannte Behauptung unterstützt.

Einzig im NutriStem™ XF/FF Medium zeigten sich ab Tag 7 stark erhöhte Werte von Alpha-Fetoprotein (AFP), was auf eine durch das Medium induzierte Endoderme Differenzierung hinweist (siehe Abb. 7).

Alle Ansätze zeigten zu Beginn der Differenzierung leicht erhöhte Werte der Ectodermen Marker SOX 1 und Tubulin-Beta 3 (TUBB 3). Die Expression ließ ab Tag 3 stetig nach und war an Tag 14 fast nicht mehr vorhanden (siehe Abb. 7).

Daher gehe ich davon aus, dass die Ectoderme Entwicklung der Zellen durch die Medien nicht im besonderen Maße induziert wurde.

Der frühe mesendodermale Marker Brachyury-T war an Tag 3 in den Ansätzen NutriStem™ und STEMPRO® leicht höher als im mTeSR®1 Ansatz, war aber ab Tag 7 in allen Ansätzen nur noch geringfügig vorhanden. Troponin T als myokardialer Marker wurde an Tag 7 und Tag 14 in allen Ansätzen auf ein ungefähr gleich niedriges Niveau exprimiert (siehe Abb. 7).

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die Anzahl kontrahierender Areale im Gegensatz zu der Gesamtmenge vorhandener EB's sehr gering war. Außerdem ergab die qPCR Auswertung nur leicht erhöhte Expressionswerte der kardialen Marker. Damit ließ sich auf eine relativ geringe kardiale Differenzierungseffizienz des Standardprotokolls unter den gegebenen Bedingungen schließen.

Das morphologische Aussehen der mTeSR®1 Kultur nach der Expansion sowie die Bildung kontraktile Areale in der Differenzierung und deren qPCR Auswertung legte für alle folgenden Experimente mTeSR®1 als Standardmedium zur Expansion fest. Um das Standardprotokoll substantiell zu verbessern und das neue Protokoll zu standardisieren, wurden mehrere experimentelle Ansätze mit Wachstumsfaktoren und niedermolekularen Wirkstoffen im späteren Verlauf der Arbeit getestet.

5.3 Der Einfluss der Inokulationsdichte auf die Entwicklung von Aggregaten und Stoffwechselfparameter in Suspensionskultur; Erfolgreiche Anpassung der Suspensionskultur an ein „12-well“ Kulturschalen Format

Die für die Expansion eingesetzte Inokulationsdichte der hES-Zellen spielt für die sich bildenden Aggregatgrößen eine entscheidende Rolle. Verschiedene Publikationen [19,20,21] haben gezeigt, dass die Inokulationsdichte die Aggregatgröße in Suspension direkt beeinflusst. Außerdem beschrieb Bauwens et al [21], dass für eine spätere effektive Differenzierung von hES-Zellen eine EB Mindestgröße von 250 µm vorliegen muss. Da Vorversuche in mTeSR®1 gezeigt haben, dass die Inokulation von Einzelzellen häufig zur Bildung relativ kleiner Aggregate <250 µm führte, wurde mit verschiedenen Inokulationsdichten darauf

abgezielt, möglichst viele, relativ große und homogene Aggregate von hES-Zellen zu erhalten. Die Methode der Einzelzellinokulation hat, im Gegensatz zur konventionellen Feeder-basierten Kultur die als heterogene „Zellklumpen“ ohne genau bekannte Zelldichte passagiert wird, den großen Vorteil, dass die Anzahl der inokulierten hES-Zellen genau bestimmt werden kann.

Um die Reproduzierbarkeit der Aggregatgröße und Expansionsrate in Abhängigkeit der Inokulationsdichte zu untersuchen, wurden die Versuche über 3 aufeinander folgende Passagen durchgeführt. Die Auswertung der durchschnittlichen Aggregatgröße ergab, wie vermutet, die größten Aggregatdurchmesser bei dem Ansatz mit der höchsten Inokulationsdichte von 5×10^5 Zellen well / 3ml Medium. Aggregate unter diesen Bedingungen erreichten durchschnittlich eine Größe von 250 μm nach 4 Tagen. In den Ansätzen mit 1×10^5 und $2,5 \times 10^5$ Zellen well / 3ml Medium ergab sich eine entsprechend kleinere durchschnittliche Aggregatgröße von 150-200 μm . Trotz der um Faktor 2,5-5 divergierenden Inokulationsdichten, ergab die Ermittlung der Expansionsraten bei allen Ansätzen eine ungefähr 3-fache Expansionsrate (siehe Tabelle 5). Trotz des oben diskutierten Einflusses ungewollter „Erschütterungen des Zellkulturinkubators“ (im Täglichen Umgang) auf die Zellaggregation, hat die Auswertung der durchschnittlichen Aggregatgröße und der Zellerträge über 3 Passagen in diesem Teil der Arbeit vergleichsweise homogene Ergebnisse und eine hohe Reproduzierbarkeit geliefert. Diese Beobachtung unterstreicht eine verbesserte experimentelle Technik im Laufe der Arbeit, die generelle Robustheit der Methode und letztlich die hohe Aussagekraft der Daten.

Wie bei der Kultivierung von Säugerzellen üblich, dient auch bei der Expansion von hES-Zellen Glucose als Hauptkohlenstoffquelle, welche in ausreichender Menge im Medium vorhanden sein muss. Ein Abbauprodukt des Glucose Stoffwechsels ist Lactat, das zum einen den pH Wert des Medium reduziert und ab einer bestimmten Konzentration Wachstumsinhibierend wirken kann. Hauser et al [22] haben gezeigt, dass eine Glucosekonzentration im Medium unter 5 mmol/L für die Zellkultivierung nachteilig war und inhibierend wirken konnte. Ebenfalls wurde eine Wachstumsinhibierung bei Lactatkonzentration von > 40 mmol/L festgestellt [22].

Die Auswertung der Glucose / Lactat Daten zeigte (siehe Abb. 9), das im Expansionsmedium selbst in der hohen Inokulationsdichte von 5×10^5 Zellen / 3ml Medium nach 3 Tagen ohne Mediumwechsel noch Glucose > 5 mmol/L (Ausgangskonzentration in mTeSR ist 10 mmol/L) und ein Lactat Wert von maximal 13 mmol/L vorlag, der damit weit unterhalb der kritischen Grenze war.

Damit untermauern die Daten, dass auch bei der höchsten hier getesteten Inokulationsdichte und bei 3 Tagen Kultivierung ohne Medienwechsel offensichtlich kein wachstumsbeschränkendes Kulturmilieu entsteht. Somit konnten die weiteren Experimente unter diesen Bedingungen durchgeführt werden.

Die bisherigen Experimente wurden alle auf 6-„well“ Suspensionsplatten durchgeführt. Um eine Optimierung der Zelldifferenzierung im zweiten Teil der Arbeit in einem höheren Durchsatz und unter Verwendung geringerer Medienmengen durchführen zu können (geringere Verbrauch teurer Wachstumsfaktoren), sollte nachfolgend die letzte Expansionspassage auf 12-„well“ Suspensionsplatten durchgeführt werden. Hierfür wurden auch die Glucose / Lactat Werte in dem 12-„well“ Format überprüft. Da ein „well“ einer 12-well Platte ungefähr die halbe Kulturoberfläche des 6-„well“ Formats aufweist, wurde die Inokulationsdichte und das Medium Volumen jeweils halbiert. Mit der höchsten Inokulationsdichte ergaben sich auch hier Aggregatgrößen von durchschnittlich 250 μ m und Glucose / Lactat Werte innerhalb der oben genannten Grenzen (siehe Abb. 10).

Damit konnte der 12-„well“ Platten Ansatz mit der höchsten Inokulationsdichte für die weiteren Experimente etabliert und verwendet werden.

5.4 Optimierungsexperimente zur myokardialen Differenzierung der Suspensionskultur durch Zugabe der Wachstumsfaktoren BMP4 und Activin A

Als Grundlage der folgenden Experimente wurden Optimierungsansätze laut Publikationen von Burrige et al [26] und Kattman et al [27] durchgeführt. Darin konnte gezeigt werden, dass die konzentrationsabhängige Zugabe vom Bone morphogenetic protein 4 (BMP 4) und dem Wachstumsfaktor Activin A zu Beginn der Differenzierung die Expression von Brachyury-T, ein früher Mesendodermaler Marker, in hES-Zellen induziert. BMP 4 bindet an Membranrezeptoren von Zellen, welche dieses Signal durch die Zellmembran hindurch ins Zellinnere weiterleiten. In einer Signalkaskade im Zellinneren wird diese Nachricht schließlich von weiteren Proteinen in den Zellkern übermittelt. Dieses Signal kann dann im Zellkern zu einer Veränderung der Genaktivität führen - was letztendlich dazu führt, dass die Empfängerzelle ihre Proteinzusammensetzung und damit ihre Eigenschaften verändert [28].

Activin A ist ein als Glykoprotein gebildetes Proteohormon, welches die Freisetzung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) stimuliert.

Der frühe Marker Brachyury-T kennzeichnet die Entwicklung mesendodermaler Zellen während der frühen Differenzierung, woraus unter anderem das kardiale Mesoderm und in der Folge Kardiomyozyten hervorgehen.

Die Morphologie der EB's zeigte zu Beginn der Differenzierung in allen Ansätzen die Entstehung epithelialer Strukturen (siehe Abb. 13). Vermehrt trat die Strukturbildung in den Ansätzen mit Zugabe von BMP 4 auf. Hierbei konnte kein sichtbarer morphologischer Unterschied zwischen der Zugabe von 25 ng BMP4 zu 50 ng BMP 4 festgestellt werden. Bei der Zugabe von 5 ng BMP 4 trat eine geringere Strukturbildung im Gegensatz zu den höheren Konzentrationen auf.

Weiterhin zeigte die Zugabe von Activin A weder im BMP4-freien Ansatz noch bei der Zugabe zu BMP4 einen sichtbaren morphologischen Unterschied.

Dies deutet darauf hin, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen BMP4 einen größeren Effekt auf die Differenzierung hatte als die Zugabe von Activin A.

Nach 2 Tagen im RPMI+FCS Differenzierungsmedium zeigte sich ein beginnendes Absätzen der EB's am Boden der Kulturplatten.

Dies setzte sich an den folgenden Tagen fort und führte dazu, dass ab Tag 9 der Differenzierung in allen Ansätzen nur noch adhärente EB's vorhanden waren (siehe Abb. 15). Diese überwuchsen bis Tag 14 die komplette Oberfläche der Kulturschalen. Das Absetzen der EB's und die spätere Proliferation am Boden der Suspensionsplatte stellte ein Problem, da die Überwucherung eine eindeutige Auswertung der Ansätze erschwerte. Die regelmäßige Lichtmikroskopische Überprüfung der Ansätze ergab bis Tag 14 der Differenzierung keine kontrahierenden Areale. Zusammenfassend haben diese Experimente gezeigt, dass BMB4 bei einer Konzentration von 5 ng zumindest bezüglich der Morphologie von EBs eine Induktive Wirkung aufweist.

Die molekularbiologische Genexpressionsanalyse hat außerdem gezeigt, dass ab einer Konzentration von 5 ng BMP 4 eine Induktion von Brachiury-T nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 16). Daraus lässt sich eindeutig auf eine erhöhte Induktion von Kardialem Mesoderm bewirkt durch BMP4 in den Kulturen schließen. Möglicher Weise wurde das Ausbleiben kontraktiler Areale als definitiver Nachweis funktioneller Kardiomyzyten durch die vergleichsweise hohe Zelldichte und damit das starke überwachsen der Kulturen, offensichtlich durch nicht-Kardiomyozyten, verhindert. Eine weitere Modifikation der Experimente war also notwendig.

5.5 Optimierungsexperimente zur myokardialen Differenzierung der Suspensionskultur durch Zugabe von niedermolekularen Wirkstoffen

In Versuchen innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte experimentell nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), dass die Zugabe von niedermolekularen Wirkstoffen IDE 2 und SB 203580 (spezifische MAP-Kinase Inhibitor) Auswirkungen auf die myokardiale Differenzierung hatten.

Um eine mögliche Verbesserung des BMP 4 Ansatzes zu erreichen, wurde dies experimentell getestet. Da die „Small Molecules“ in DMSO gelöst vorlagen, wurden außerdem mögliche Auswirkungen des DMSO auf die Differenzierung untersucht. Zudem wurden die Ansätze diesmal in 2 verschiedenen Differenzierungsmedien kultiviert.

Die Untersuchung unter dem Lichtmikroskop ergab im Zeitraum der Differenzierung in SF Medium in allen Ansätzen ein hohes Zellsterben und somit eine große Menge an Zellschrott (siehe Abb. 19). Dieser Effekt konnte in den vorherigen Experimenten nicht beobachtet werden. Es ist also davon auszugehen, dass die Zugabe von IDE 2 und SB 203580 in dieser Phase der Differenzierung einen großen negativen Effekt auf das Überleben der Zellen hatte. Ein Vergleich der Morphologie zeigte im Gegensatz zu den vorherigen BMP 4 Versuch überdurchschnittlich viele EB's, die kleiner als 150 μm waren. Diese wiesen zudem so gut wie keine epithelialen Strukturen auf.

An Tag 7 der Differenzierung waren in den bSF-Medium Ansätzen nur noch wenige EB's durch ein anhaltendes Zellsterben erhalten (siehe Abb. 20). Die EB's im Ansatz mit dem RPMI Medium setzen sich wie im vorherigen Versuch beobachtet wieder am Boden der Suspensionsplatte ab und wurden adhärent (siehe Abb. 21).

Ab Tag 10 konnte der bSF-Medium Ansatz nicht mehr ausgewertet werden, da die EB's komplett zerfallen waren. Die Suspensionsplatte mit dem RPMI+FCS-Medium war wiederum komplett überwachsen und konnte ebenfalls nicht mehr ausgewertet werden. Aus zeitlichen Gründen konnte der genaue Grund des Zellsterbens nach Zugabe der niedermolekularen Wirkstoffe nicht weiter erforscht werden.

Deshalb wurde die Arbeit mit den oben genannten „Small Moleculs“ in dieser Form nicht weitergeführt. Die Arbeit mit RPMI+FCS als Differenzierungsmedium wurde nach den wiederholten Problemen mit dem Absetzen der EB's und der folgenden Zellproliferation ausgeschlossen, da dies eine Reproduktion von Ergebnissen ausschloss.

5.6 Optimierungsexperimente zur myokardialen Differenzierung der Suspensionskultur durch Zugabe des Wachstumsfaktors bFGF

Bei der Kultivierung und anschließenden Differenzierung Feeder basierter hES-Zellen in unserer Arbeitsgruppe wird der Wachstumsfaktor bFGF eingesetzt (Daten nicht gezeigt).

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (Fibroblast Growth Factor 2, bFGF) gehört zu den Signalproteinen, die wichtige und potente Regulatoren des Zellwachstums und der Differenzierung von Zellen sind. Die Familie der FGFs stimulieren die Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen, insbesondere von Endothelzellen, aber auch von Muskelzellen und Fibroblasten. Der komplexe Prozess der Angiogenese wird wesentlich von Wachstumsfaktoren der FGF-Familie gesteuert. Damit war bFGF ein hoffnungsvoller Kandidat für die Optimierung der Differenzierung in Suspension.

Die morphologische Begutachtung an Tag 2 der Differenzierung zeigte bei allen Ansätzen, die mit BMP 4 und gleichzeitig bFGF supplementiert waren, auffällige epitheliale Strukturen (siehe Abb. 24, rote Pfeile). Diese Strukturen traten ebenfalls in den Ansatz mit 100 ng bFGF, aber ohne BMP 4 Supplementierung auf, jedoch in einem weit geringeren Ausmaß. Weiterhin ist im Kontrollansatz ohne Zusätze keine dieser Strukturen zu erkennen (siehe Abb. 24). Dies lässt auf einen großen Einfluss des bFGF auf die Entstehung dieser Strukturen schließen. Die Zugabe von Activin A zeigte keinen zusätzlichen morphologischen Unterschied. In den Ansätzen ohne vorherige BMP 4 Supplementierung kam es in beiden Differenzierungsmedien zu einem großen Zellsterben. Hierbei ergab sich im bSF-Medium mit 48-stündiger SB 203580 Zugabe ein geringerer Effekt des Zellsterbens, was auf einen positiven Effekt des SB 203580 auf das Zellüberleben schließen lässt (siehe Abb. 26).

Außerdem konnte eine weit geringere Anzahl abgesetzter EB's als im Vergleichsansatz ohne SB 203580 beobachtet werden.

In den Ansätzen mit 50 ng BMP 4 und 100 ng bFGF konnten große kontrahierende Areale in deutlich höherer Anzahl als im Standardprotokoll Vergleichsansatz gefunden werden (siehe Abb. 27).

Die Differenzierung konnte nicht über Tag 10 beobachtet werden, da die Zellkulturen aufgrund einer bakteriellen Kontamination verworfen werden mussten.

Da die Ergebnisse mit hoher bFGF und BMP 4 Supplementierung bis Tag 10 erfolversprechend aussahen, wurde die Differenzierung reproduziert.

Es ergaben sich hierbei die gleichen Effekte auf die Differenzierung wie vorher gezeigt. Bei der Auswertung der spontan kontrahierenden Areale von Tag 10 bis Tag 14 zeigte sich eine weit höhere Anzahl (siehe Abb. 29) als im Vergleichsansatz (siehe Abb. 6), die zudem erheblich größer waren.

Die qPCR Auswertung an Tag 14 (siehe Abb. 30) ergab eine um den Faktor 20 höhere Troponin T Expression als die qPCR Auswertung des Standard-differenzierungsprotokolls (siehe Abb. 7). Die NKX 2.5 Werte an Tag 14 zeigten eine niedrigere Expression als bei Troponin T. Dies lässt sich damit erklären, das NKX 2.5 im Gegensatz zu Troponin T ein früher kardialer Marker ist und im späteren Verlauf der Differenzierung weniger exprimiert wird.

Mit dem zuletzt entwickelten Protokoll konnte ein gut reproduzierbarer Ansatz mit hohem kardialem Differenzierungspotential etabliert werden.

5.7 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane Embryonale Stammzellen in einem definierten Medium über mehrere Passagen erfolgreich als undifferenzierte Zellen in skalierbarer Suspensionskultur kultiviert werden konnten. Dieser Ansatz ist auch für ein späteres „Upscaling“ in Bioreaktoren geeignet, womit man in der Lage wäre, die für eine erfolgreiche Zelltherapie benötigten Zellmengen bereitzustellen.

Als wichtiger Parameter zur Verbindung der Zellexpansion und Differenzierung wurde außerdem die Inokulationsdichte für die Bildung von Aggregaten zur anschließenden Differenzierung optimiert.

Ausgehend von diesen Suspensions-Aggregaten wurde ein Protokoll ausgearbeitet, das durch optimierte Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren und niedermolekularer Wirkstoffe („Small Molecules“) erfolgreich zur gezielten myokardialen Differenzierung von hES-Zellen geführt hat. Damit hat die Arbeit entscheidend zur Verbesserung des bisherigen Standardprotokolls beigetragen.

Literaturverzeichnis

1. <http://www.who.int/en/>
2. Anversa, P., et al., *Myocyte mitotic division in the aging mammalian rat heart*. Circ Res, 1991. 69 (4) : p. 1159-64.
3. Anversa, P., et al., *Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart*. Circ Res, 1998. 83 (1): p. 1-14.
4. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell, 2003. 114 (6): p. 763-76.
5. Kajstura, J., et al., *Myocyte growth in the failing heart*. Surg Clin North Am, 2004. 84 (1): p. 161-77.
6. D. Jing, A. Parikh, J.M. Canty, Jr., and E.S. Tzanakakis, *Stem cells for heart cell therapies*, Tissue Eng Part B Rev. 14 (2008) 393-406.
7. Keith L. Moore and T.V.N. Persaud, *Embryologie*. Vol. 5. 2007, München, Jena: Elsevier.
8. http://www.welt.de/multimedia/archive/00963/Herzz_DW_Wissenscha_963255_z.jpg
9. Eckert, R., et al., *Tierphysiologie*. Vol. 4. 2002, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
10. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. 282(5391): p. 1145-7.
11. Itskovitz-Eldor, J., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers*. Mol Med Today, 2000. 6: p. 88-95.
12. <http://www.bmbf.de/de/2657.php>
13. K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*, Cell. 131 (2007) 861-72.
14. A. Haase, R. Olmer, K. Schwanke, S. Wunderlich, S. Merkert, C. Hess, R. Zweigerdt, I. Gruh, J. Meyer, S. Wagner, L.S. Maier, D.W. Han, S. Glage, K. Miller, P. Fischer, H.R. Scholer, and U. Martin, *Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood*, Cell Stem Cell. 5 (2009) 434-41.

15. R. Olmer, A. Haase, S. Merkert, W. Cui, J. Palecek, C. Ran, A. Kirschning, T. Scheper, S. Glage, K. Miller, E. Curnow, E. Hayes and U. Martin, *Long term expansion of undifferentiated human iPS and ES cells in suspension culture using a defined medium*, *Stem Cell Research* 5 (2010) 51-64
16. Zellkultur-Protokolle AG Zweigerdt, Lebao MHH Hannover
17. C. Ogorean, B. Jackson, J. Covino, *Quantitative Real-Time PCR using the Thermo Scientific Solaris qPCR Assay*, *Journal of Visualized Experiments* 40 (2010)
18. Vincent C. Chen, Sylvana M. Couture, Jingjing Ye, Ziguang Lin, Giau Hua, Hsiao-I P. Huang, Jun Wu, David Hsu, Melissa K. Carpenter Larry A. Couture, *Scalable GMP compliant suspension culture system for human ES cells*, *Stem Cell Research*, **In Press, Accepted Manuscript**, Available online 22 February 2012
19. Zweigerdt R, Burg M, Willbold E, Abts H, Ruediger M., *Generation of confluent cardiomyocyte monolayers derived from embryonic stem cells in suspension: a cell source for new therapies and screening strategies*, *Cytotherapy*. 2003 (5) 399-413.
20. Zandstra PW, Bauwens C, Yin T, Liu Q, Schiller H, Zweigerdt R, Pasumarthi KB, Field LJ., *Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*, *Tissue Eng.* 2003 Aug;9(4):767-78. Erratum in: *Tissue Eng.* 2003 Dec;9(6)1331.
21. C.L. Bauwens, R. Peerani, S. Niebruegge, K.A. Woodhouse, E. Kumacheva, M. Husain, and P.W. Zandstra, *Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories*, *Stem Cells*. 26 (2008) 2300-10.
22. Hauser H, Wagner R. 1997. *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, Walter de Gruyter, 191-225, Berlin New York
23. I. Kehat, D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir, H. Segev, M. Amit, A. Gepstein, E. Livne, O. Binah, J. Itskovitz-Eldor, and L. Gepstein, *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes*, *J Clin Invest.* 108 (2001) 407-14.

-
24. Xu XQ, Graichen R, Soo SY, Balakrishnan T, Rahmat SN, Sieh S, Tham SC, Freund C, Moore J, Mummery C, Colman A, Zweigerdt R, Davidson BP., *Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells*. Differentiation, 2008 Nov; 76(9):958-70.
 25. Kempf H, Lecina M, Ting S, Zweigerdt R, Oh S., *Distinct regulation of mitogen-activated protein kinase activities is coupled with enhanced cardiac differentiation of human embryonic stem cells*, Stem Cell Res. 2011 Nov;7(3):198-209.
 26. Paul W. Burridge, Susan Thompson, Michal A. Millrod, Seth Weinberg, Xuan Yuan, Ann Peters, Vasiliki Mahairaki, Vassilis Koliatsos, Leslie Tung, Elias Zambidis, *A Universal System for Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells That Eliminates Interline Variability*, PLoS ONE 6(4) 2011
 27. S. Kattman, A. Witty, M. Gagliardi, N. Dubois, M. Niapour, A. Hotta, J. Ellis und G. Keller, *Stage-Specific Optimization of Activin / Nodal and BMP Signaling Promotes Cardiac Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell Lines*, Cell Stem Cell 8, 228-240, 2011.
 28. http://en.wikipedia.org/wiki/Bone_morphogenetic_protein_4
 29. H. Singh, P. Mok, T. Balakrishnan, S. Rahmat, R. Zweigerdt, *Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells*, Stem Cell Research 4 (2010), 165-179.