

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

**Promotor-gestützte *in vivo*-Markierung
stabil transfizierter embryonaler Stammzellen
zur Aufreinigung kardial differenzierter Subpopulationen:
Ansatz zur Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Gröbner

aus
Passau

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang-Michael Franz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. Engelmann
Mitberichterstatter:	PD Dr. St. Linder PD Dr. N. Weiss Prof. Dr. P.B. Becker
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Robert David
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	18.01.2007

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	9
1.1. Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen	9
1.1.1. Zelltherapie mit adulten Stammzellen	11
1.1.1.1. Klinische Studien mit Skelettmyoblasten	13
1.1.1.2. Klinische Studien mit Stammzellen aus dem Knochenmark	14
1.1.2. Limitationen der Zelltherapie mit adulten Stammzellen	16
1.2. Charakterisierung und Herstellung embryonaler Stammzellen	18
1.2.1. Charakterisierung und Herstellung muriner embryonaler Stammzellen	20
1.2.2. Charakterisierung und Herstellung humaner embryonaler Stammzellen	21
1.2.2.1. Gesetzliche Auflagen zu Import und Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen in Deutschland	21
1.2.2.2. Bisher publizierte humane embryonale Stammzelllinien und deren Limitationen	22
1.3. Kardiovaskuläre Differenzierung embryonaler Stammzellen	27
1.3.1. Kardiovaskuläre Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen	28
1.3.2. Kardiovaskuläre Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen	29
1.4. Transplantation von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen	31
1.4.1. Präklinische Studien mit Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen	31
1.4.2. Limitationen der Transplantation von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen	33
1.5. Markierung und Aufreinigung kardial differenzierter Subpopulationen aus embryonalen Stammzellen	35
1.5.1. Promotor-gestützte Markierung	35
1.5.2. Nkx2.5 als Transkriptionsfaktor der Kardiomyogenese und Marker kardialer Vorläuferzellen	37
1.5.3. Promotor-gestützte Selektionsverfahren zur Aufreinigung	40
1.5.3.1. Antibiotikumselektion	40
1.5.3.2. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	41

1.6. Aufgabenstellung: Etablierung einer magnetischen Markierung und Sortierung (MACS) embryonaler Stammzellen und deren Übertragung auf Nkx2.5 exprimierende kardiale Vorläuferzellen	42
2. MATERIAL UND METHODEN	43
2.1. Material	43
2.1.1. Chemikalien	43
2.1.2. Enzyme und Proteine	43
2.1.3. Zellkultur	44
2.1.3.1. Zellen	44
2.1.3.2. Zellkultur-Materialien	44
2.1.4. Bakterienkultur	45
2.1.4.1. Bakterien	45
2.1.4.2. Bakterienkultur-Materialien	45
2.1.5. Laborgeräte und sonstige Materialien	45
2.1.6. Medien, Puffer und Lösungen	46
2.1.7. Antikörper	48
2.1.8. Plasmide, Oligonukleotide und DNA-Längenstandards	48
2.1.8.1. Plasmide	48
2.1.8.2. Oligonukleotide	48
2.1.8.3. Längenstandards	49
2.2. Methoden	50
2.2.1. Mikrobiologische Methoden	50
2.2.1.1. Kultivierung von Bakterien	50
2.2.1.2. Transformation nach der Hitzeschockmethode	50
2.2.2. DNA-Methoden	50
2.2.2.1. Präparation und Reinigung von DNA	50
2.2.2.1.1. Präparation genomischer DNA	50
2.2.2.1.2. Präparation von Plasmid-DNA	50
2.2.2.1.3. Phenolextraktion	51
2.2.2.1.4. Ethanol-fällung	51
2.2.2.1.5. Isopropanol-fällung	51
2.2.2.2. Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten	52
2.2.2.2.1. Restriktionsendonukleaseverdau von DNA	52

2.2.2.2. Analytische Gelelektrophorese	52
2.2.2.2.3. Präparative Gelelektrophorese	52
2.2.2.3. Subklonierung isolierter DNA-Fragmente	53
2.2.2.4. Ligation	53
2.2.2.5. Polymerase-Ketten-Reaktion	53
2.2.2.5.1. Amplifikation von Fragmenten für Klonierungszwecke mittels PCR	53
2.2.2.5.2. Analyse stabiler Klone mittels genomischer PCR	54
2.2.2.5.3. PCR mit radioaktiver Markierung zur Quantifizierung der Expression von Markergenen	54
2.2.2.5.4. Nested-PCR zur Kontrolle der Expression von Markergenen	54
2.2.3. RNA-Methoden	55
2.2.3.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus den sortierten Zellen	55
2.2.3.2. Reverse Transkription	55
2.2.4. Proteinbiochemische Methoden	55
2.2.4.1. Translation <i>in vitro</i>	55
2.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
2.2.5. Zellkulturmethoden	56
2.2.5.1. Kultivierung der Zellen	56
2.2.5.2. Konservierung der Zellen	56
2.2.5.3. Transfektion mittels Elektroporation	56
2.2.5.4. Selektion mit Geneticinsulphat und Separation von Einzelklonen	57
2.2.5.5. Differenzierung	57
2.2.6. Magnetische Zellsortierung (MACS, Magnetic Cell Sorting)	57
2.2.6.1. Vereinzelung der Zellen	57
2.2.6.2. Markierung mit Hilfe des indirekten Antikörpersystems	58
2.2.6.3. Selektion mittels Mini-MACS	58
2.2.7. Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting)	58
2.2.7.1. Vorbereitung der Proben	58
2.2.7.2. Analytisches FACS	59
2.2.7.3. Zellsortierung	61
 3. ERGEBNISSE	 61
3.1. <i>In vivo</i>-Markierung und MACS-Aufreinigung stabil transfizierter embryonaler Stammzellen	 61

3.1.1. Etablierung eines optimierten Protokolls zur Zellvereinzelung	61
3.1.2. Ausschluss einer endogenen Expression des ΔCD4-Oberflächenmoleküls in GSES-Zellen	62
3.1.3. Analyse der Aktivität und der Stabilität der Promotoren CMV und PGK in GSES-Zellen	63
3.1.3.1. Klonierung des Plasmids pPGK-EGFP	63
3.1.3.2. Herstellung von stabil mit PGK-EGFP und CMV-EGFP transfizierten GSES-Zellen	65
3.1.3.3. Fluoreszenzanalyse von stabil mit PGK-EGFP und CMV-EGFP transfizierten GSES-Zellen	65
3.1.4. <i>In vivo</i>-Markierung und MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten GSES-Zellen mit Hilfe des ΔCD4EGFP-Moleküls	66
3.1.4.1. <i>In vitro</i> -Translation des Δ CD4-EGFP-Konstrukts	66
3.1.4.2. Klonierung des Plasmids pPGK- Δ CD4EGFP	67
3.1.4.3. Herstellung von stabil mit PGK- Δ CD4EGFP transfizierten GSES-Zellen	69
3.1.4.4. Nachweis der Funktionalität des Δ CD4EGFP-Konstrukts in GSES-Zellen	69
3.1.4.5. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten undifferenzierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4EGFP-Moleküls	70
3.1.4.6. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten differenzierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4EGFP-Moleküls	71
3.1.5. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten GSES-Zellen mit Hilfe des ΔCD4-Moleküls	72
3.1.5.1. Klonierung des Plasmids pPGK- Δ CD4	73
3.1.5.2. Herstellung von stabil mit PGK- Δ CD4 transfizierten GSES-Zellen	74
3.1.5.3. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten undifferenzierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4-Moleküls	76
3.1.5.4. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten differenzierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4-Moleküls	77
3.1.6. Analyse der Vitalität der MACS-aufgereinigten stabil transfizierten differenzierten GSES-Zellen	79
3.1.6.1. Reaktivierung der MACS-aufgereinigten stabil transfizierten differenzierten GSES-Zellen	80
3.1.6.2. mRNA-Expressionsanalyse der reaggregierten Embryoid Bodies	80

3.2. Markierung kardialer Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen mit Hilfe des humanen Nkx2.5-Promotors	82
3.2.1. <i>In vivo</i>-Markierung, FACS-Aufreinigung und Charakterisierung von stabil mit Nkx2.5-EGFP transfizierten früh differenzierten embryonalen Stammzellen ...	82
3.2.1.1. Klonierung des Plasmids pNkx2.5-EGFP	82
3.2.1.2. Herstellung von stabil mit Nkx2.5-EGFP transfizierten GSES-Zellen	84
3.2.1.3. Fluoreszenzanalyse von stabil mit Nkx2.5-EGFP transfizierten früh differenzierten GSES-Zellen	84
3.2.1.4. Durchflusszytometrische Analyse und FACS-Aufreinigung Nkx2.5-positiver früh differenzierter GSES-Zellen	85
3.2.1.5. mRNA-Expressionsanalyse Nkx2.5-positiver früh differenzierter GSES-Zellen	87
4. DISKUSSION	88
4.1. Aufreinigung markierter embryonaler Stammzellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)	90
4.1.1. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten GSES-Zellen mit Hilfe des ΔCD4EGFP-Moleküls	90
4.1.2. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten GSES-Zellen mit Hilfe des ΔCD4-Moleküls	91
4.1.3. MACS-Aufreinigung als Alternative zur Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) und Antibiotikumselektion	91
4.1.4. Anwendungsmöglichkeiten und Perspektiven	93
4.2. Markierung kardialer Vorläuferzellen mit Hilfe des hNkx2.5-Promotors	93
4.2.1. Limitationen bisher publizierter Promotoren zur Selektion von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen	93
4.2.2. Charakterisierung des hNkx2.5-Promotors in murinen embryonalen Stammzellen	95
4.2.3. Anwendungsmöglichkeiten und Perspektiven	97
5. ZUSAMMENFASSUNG	99
6. LITERATURVERZEICHNIS	101

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	122
8. LEBENSLAUF	123
9. DANKSAGUNG	124

1. EINLEITUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Promotor-gestützte *in vivo*-Markierung und MACS-Aufreinigung stabil transfizierter embryonaler Stammzellen etabliert. Dies könnte neue Ansätze zur Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen ermöglichen. Zum besseren Verständnis soll zu Beginn der Arbeit der klinische Hintergrund erläutert werden.

1.1. Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern (6). Die Mehrzahl der kardiovaskulär bedingten Todesfälle wird durch die koronare Herzkrankheit (KHK) verursacht. In Deutschland verstarben im Jahre 2002 ca. 182.000 Patienten an einem akuten Myokardinfarkt oder einer chronisch-ischämischen Herzerkrankung als Folgen einer KHK (7). Die Letalität des akuten Infarkts innerhalb der ersten vier Wochen beträgt zwischen 42 und 44% (8). Die Akutphase überlebende Patienten entwickeln häufig eine ischämische Kardiomyopathie, deren Letalität im Endstadium jährlich 50% beträgt (9). Die allogene Herztransplantation als Therapie der Wahl bei terminaler Herzinsuffizienz ist aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Spenderorganen limitiert. Die rückläufige Zahl der Herztransplantationen in Deutschland (1999: 481 (10); 2003: 374 (11)) führt zu einer durchschnittlichen Wartezeit von ca. zwölf Monaten (abhängig von Dringlichkeit, Blutgruppe und Körpergröße) und einer Letalität gelisteter Patienten innerhalb einer zwölfmonatigen Wartezeit von 17% (12). Im Falle einer erfolgreichen Transplantation stellt neben den unerwünschten Wirkungen der lebenslang notwendigen immunsuppressiven Pharmakotherapie eine Insuffizienz des Spenderorgans häufig ein Problem dar, die sich meist aufgrund einer Transplantatvaskulopathie entwickelt (13). Aus diesen Gründen gewinnt die Forschung an alternativen Therapiemöglichkeiten zunehmend an Bedeutung.

Ein vielversprechender Ansatz ist die Zelltherapie mit Stammzellen zur biologischen Regeneration des Herzmuskels. Zwar gibt es Indizien dafür, dass Kardiomyozyten mitotisches Potenzial besitzen (14); (15); (16); (17); (18), jedoch ist deren Proliferationsfähigkeit sehr gering, so dass dadurch ein Zelluntergang bei Myokardinfarkt nicht kompensiert werden kann. Vielmehr kommt es zu einer Defektheilung mit pathologischem Remodelling und Ersatz des Herzmuskelgewebes durch Narbengewebe, was häufig zu linksventrikulärer Dilatation und Herzinsuffizienz führt (19). Während sich die etablierten konservativen Therapiestrategien bislang auf eine Verminderung des pathologischen Remodellings beschränken, würde die Zelltransplantation die Möglichkeit einer kausalen Therapie eines ausgedehnten Gewebeverlusts bieten.

Embryonale Stammzellen (20); (21); (22); (23); (24); (25); (26); (27); (28); (29); (30); (31); (32) und verschiedene Subtypen adulter Stammzellen wie Skelettmyoblasten (9); (33); (34) und Knochenmarksstammzellen (35); (36); (37); (38); (39); (40); (41); (42); (43); (44); (45); (46); (47) wurden in den letzten Jahren in zahlreichen präklinischen Studien bezüglich ihrer Eignung als Spenderzellen zur myokardialen Regeneration untersucht (Abb. 1). Jüngste Arbeiten beschreiben die Identifizierung, *ex-vivo*-Expansion und Transplantation von ortständigen kardialen Stammzellen, die bioptisch aus fötalen (48); (49) und adulten humanen Herzen gewonnen wurden (50); (51); (52).

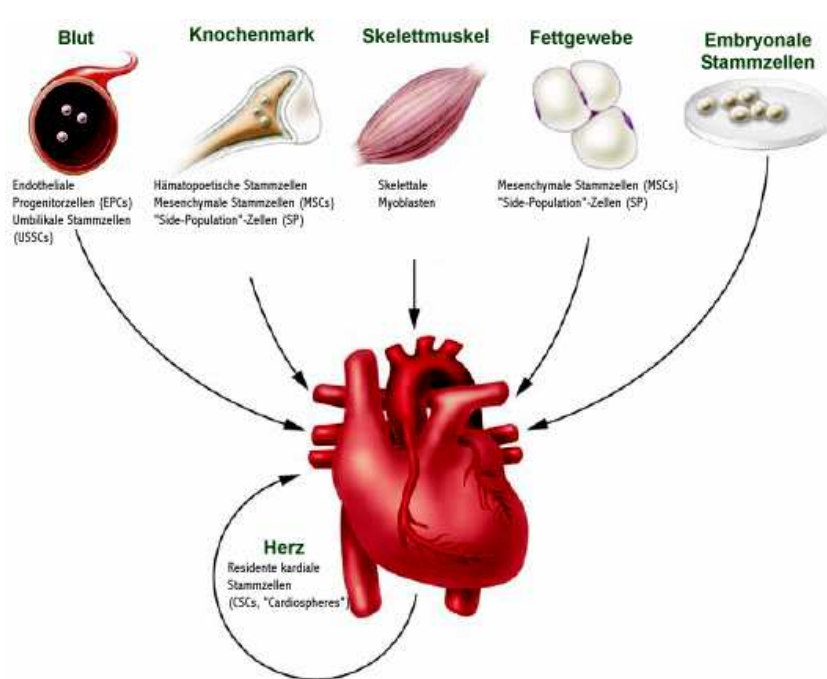


Abb. 1: Quellen für die Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen

In klinischen Studien finden skelettale Myoblasten, endotheliale Progenitorzellen und unfraktioniertes Knochenmark Anwendung, während residente kardiale Stammzellen, mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe, Nabelschnurblut und Knochenmark sowie embryonale Stammzellen bisher noch in der präklinischen Phase untersucht werden.

Abb. modifiziert nach (53)

Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen, können in undifferenziertem Zustand kultiviert werden und wegen ihrer Pluripotenz in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren (s. 1.2.).

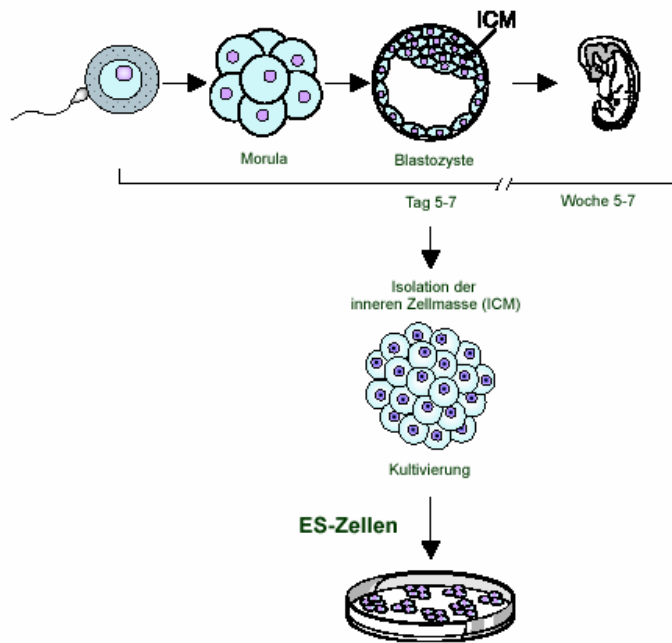


Abb. 2: Schematische Darstellung der Gewinnung pluripotenter embryonaler Stammzellen

Die Isolation erfolgt im Embryogenesestadium der Blastozyste aus deren innerer Zellmasse.

Abb. modifiziert nach (54)

Adulte Stammzellen haben ihren Ursprung im adulten Organismus. Sie weisen nur geringe Differenzierung auf und sind damit noch nicht endgültig hinsichtlich ihrer späteren Funktion im Organismus determiniert. Aus adulten Stammzellen können sich entweder durch mitotische Teilung weitere Stammzellen oder durch Differenzierung spezialisierte Zellen entwickeln. Dabei sind adulte Stammzellen nicht mehr pluripotent, d.h. sie können nicht mehr alle Körperzellen hervorbringen. Sie besitzen jedoch noch die Fähigkeit, in mehrere verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Man spricht hierbei von Multipotenz.

Obwohl sich in den präklinischen Studien für embryonale Stammzellen ein größeres therapeutisches Potenzial gezeigt hatte (s. 1.1.2.), führten vor allem Sicherheitsaspekte und praktische Überlegungen der einfacheren Durchführbarkeit dazu, dass die ersten klinischen Zelltherapiestudien mit adulten Stammzellen vorgenommen wurden. Die bisherigen Ergebnisse und gravierenden Limitationen der adulten Stammzelltransplantationen bei akutem Myokardinfarkt und chronisch-ischämischer Kardiomyopathie sollten einleitend dargestellt werden, bevor auf die in dieser Dissertation verwendete Spezies der embryonalen Stammzellen eingegangen wird.

1.1.1. Zelltherapie mit adulten Stammzellen

Die klinisch bedeutendste Quelle für adulte Stammzellen stellt das Knochenmark dar, das seit Jahren erfolgreich zur Therapie leukämischer Erkrankungen eingesetzt wird. Dieses enthält verschiedene Subtypen von Progenitorzellen wie die hämatopoetischen Stammzellen, die sog. „Side Population“ (55), mesenchymale Stammzellen (MSCs) (56) und multipotente adulte Progenitorzellen (MAPCs), eine Subpopulation der mesenchymalen Stammzellen (57).

Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) stammen aus dem peripheren Blut und werden aus mononukleären Zellen isoliert. Tab. 1 enthält eine Zusammenstellung humaner adulter Stammzellen aus Knochenmark und peripherem Blut sowie residenter kardialer und anderer gewebeständiger Stammzellen, die als Ressourcen für die Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen in Frage kommen.

Quelle	Zelltyp	Charakteristika
Knochenmark	Hämatopoetische Stammzellen (HSCs)	CD34 ⁺ , CD 45 ⁺ , CD133 ⁺ , c-kit ⁺ Lin ⁻
	„Side Population“ (SP)	Ausschleusen des Farbstoffes Hoechst 33342 über den Transportkanal ABCG2 (42)
	Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	Auf Fibronectin adhärenente, nicht hämatopoetische Stromazellen des Knochenmarks CD44 ⁺ , CD90 ⁺ , CD105 ⁺ , Stro-1 ⁺ CD34 ⁻ , CD45 ⁻ , CD133 ⁻
	Multipotente adulte Progenitorzellen (MAPCs)	Subtyp der MSCs Differenzierung zu Zelltypen aller drei embryonalen Keimblätter CD45 ⁻ , Glykophorin A ⁻ (57)
Nabelschnurblut	Umbilikale somatische Stammzellen (USSCs)	Subtyp der MSCs Differenzierung zu Zelltypen aller drei embryonalen Keimblätter CD 44 ⁺ ; CD90 ⁺ ; CD105 ⁺ CD34 ⁻ ; CD45 ⁻ ; c-kit ⁻ (58)
Peripheres Blut	Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)	Isolation aus mononukleären Zellen <i>ex vivo</i> -Kultivierung CD31 ⁺ ; CD34 ⁺ ; CD133 ⁺ , CD105 ⁺ ; KDR ⁺ , Tie-2 ⁺ CD45 ⁻ (47); (44)
Gewebeständige Stammzellen	Residente kardiale Stammzellen (CSCs; „Cardiospheres“)	Isolation aus Myokardbiopsat <i>ex vivo</i> -Kultivierung negativ für hämatopoetische Marker hohe Telomerase-Aktivität aus adulten Herzen: c-kit ^{+/-} , Sca-1-ähnliche Epitope ⁺ , MDR1 ⁺ , KDR1 ⁺ (15); (59); (50); (51) aus neonatalen Herzen: Isl-1 ⁺ (48); (49)
	Skelettmuyoblasten	Isolation aus Skelettmuskelbiopsat <i>ex vivo</i> -Kultivierung CD56 ⁺

Tab. 1: Übersicht der Subpopulationen humaner adulter Stammzellen für die Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen

Die ersten klinischen kardialen Zelltherapiestudien wurden mit skelettalen Myoblasten, unfraktioniertem Knochenmark und endothelialen Progenitorzellen zur Therapie akuter Myokardinfarkte und chronisch-ischämischer Herzerkrankungen durchgeführt (Abb. 2).

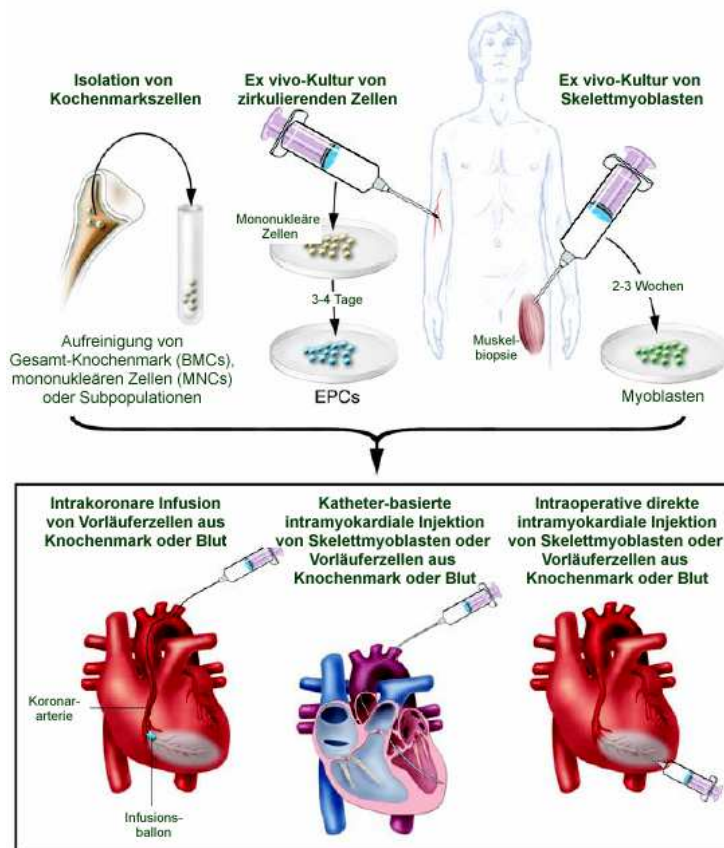


Abb. 3: Prinzipien der in klinischen Studien angewandten Zelltransplantationen adulter Stammzellen

Unfraktioniertes Knochenmark wird nach Aufreinigung infundiert, während endotheliale Progenitorzellen (EPCs) aus mononukleären Zellen und Skelettmyoblasten nach mehrtägiger *in vitro*-Kultivierung transplantiert werden. Die Verabreichung der Zellen erfolgt entweder im Rahmen einer offenen Operation mit direkter intramyokardialer Injektion oder mittels Katheterverfahren mit intrakoronarer oder intramyokardialer Applikation. Abb. aus (53)

1.1.1.1. Klinische Studien mit Skelettmyoblasten

Skelettmyoblasten (Synonym: Satellitenzellen) sind ruhende muskuläre Vorläuferzellen, die aus einem Skelettmuskelbiopsat isoliert und in Kultur vermehrt werden können. 2001 berichteten Menasche et al. (60) erstmals über die Implantation autologer Skelettmyoblasten in ein akinetisches Infarktareal bei einem Patienten im Rahmen einer aortokoronaren Bypass-Operation. Postoperativ kam es zu einer signifikanten und persistierenden Verbesserung der regionalen und globalen Pumpfunktion. Angesichts der simultanen Bypass-Operation ist jedoch der Effekt der Zelltransplantation schwer zu beurteilen. Bei Patienten ohne gleichzeitige Revaskularisationstherapie reduzierten die per Katheter in alte Infarktarnen

injizierten Myoblasten zwar die Symptome der Herzinsuffizienz, verbesserten jedoch die globale linksventrikuläre Pumpfunktion nicht (61). Obwohl es in den vorausgegangenen umfangreichen Tierexperimenten keinen Hinweis auf eine arrhythmogene Wirkung der Skelettmyoblastentransplantation gegeben hatte, entwickelten Patienten nach Myoblasteninjektion ventrikuläre Arrhythmien, die zu Todesfällen führten (62). Deshalb ist für die gegenwärtig in Europa laufende Phase-II-Studie MAGIC („Myoblast Autologous Graft in Ischaemic Cardiomyopathy“) die simultane Implantation eines automatischen Defibrillators (ICD) obligat (63) (64). Nach Myoblasteninjektion aufgetretene ventrikuläre Arrhythmien sind wohl auf die ektopische elektrische Aktivität der transplantierten Skelettmuskelzellen zurückzuführen, die keine zellulären Kontakte mit den Kardiomyozyten des Empfängerherzens ausbilden (65). *In vitro*-Experimente zeigten, dass die transgene Expression des „Gap-Junction“-Proteins Connexin 43 die Arrhythmogenität humaner Skelettmyoblasten in Kokultur mit neonatalen Rattenkardiomyozyten deutlich reduzierten (66).

1.1.1.2. Klinische Studien mit Stammzellen aus dem Knochenmark

Die gegenwärtig am häufigsten verwendete Quelle für klinische Zelltherapiestudien ist das Knochenmark (67); (68); (69); (70). Hierfür wird per Aspiration unfraktioniertes Knochenmark gewonnen, das die heterogenen Subtypen der mononukleären Zellen wie hämatopoetische Stammzellen, „Side Population“-Zellen, mesenchymale Zellen und multipotente adulte Progenitorzellen (Tab. 1) enthält. Nach Isolation der Zellen werden diese ohne *ex vivo*-Expansion injiziert. Alternativ finden endotheliale Progenitorzellen Anwendung, die aus dem peripheren Blut gewonnen werden und mittels *ex vivo*-Kultivierung in „Endothel-spezifischem“ Medium selektiert werden (71), bevor sie ins Herz injiziert werden. Die Tabellen 2 und 3 fassen die bisherigen klinischen Studien zur Stammzelltherapie bei akutem Myokardinfarkt und chronischer ischämischer Herzinsuffizienz zusammen. Die intrakoronare Infusion von unfraktioniertem Knochenmark oder zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen ist in keiner der Publikationen mit zusätzlichen Komplikationen assoziiert.

Alle bisherigen Studien bei akutem Myokardinfarkt zeigen – unabhängig vom transplantierten Zelltyp und der Zellzahl - ähnliche Ergebnisse nach vier bis sechs Wochen: einen Anstieg der linksventrikulären Ejektionsfraktion zwischen 7 und 9%, ein vermindertes enddiastolisches linksventrikuläres Volumen und eine verbesserte Perfusion im Infarktareal. Jüngste Daten der TOPCARE-AMI-Studie zeigen magnetresonanztomographisch, dass die verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion auch zwölf bzw. 24 Monate nach Transplantation anhält und eine reaktive Hypertrophie ausbleibt (72); (73). Die wenigen bisher durchgeführten

prospektiv randomisiert konzipierten Studien mit größeren Patientenkollektiven liefern widersprüchliche Daten. So zeigen erste ventrikulographische Daten der in Deutschland derzeit laufenden multizentrischen REPAIR-AMI-Studie eine Verbesserung der globalen Kontraktilität in der mit unfraktioniertem Knochenmark behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe nach vier Monaten (74), während in der skandinavischen ASTAMI-Studie nach sechs Monaten signifikante funktionelle Effekte nicht nachgewiesen werden konnten (75). Die BOOST-Studie, die bisher einzige randomisierte Studie mit Langzeitergebnissen, führte zwar zu einem Anstieg der globalen linksventrikulären Funktion sechs Monaten nach Transplantation, nicht jedoch in der 18-Monats-Kontrolle (70).

Studie	Zelltyp	Zellzahl (x10 ⁶)	Patienten	Effekte
Strauer et al. (67)	BMC vs. Ko.	28	20 vs. 20 Ko.	Regionale Kontraktilität (LVA) ↑ Endsystolisches Volumen (LVA) ↓ Perfusion (Szintigraphie) ↑
TOPCARE-AMI (68); (72); (76); (73)	BMC bzw. EPCs	213 (BMC) bzw. 16 (EPCs)	30 (BMC) bzw. 29 (EPCs)	BMC: Globale Kontraktilität (LVA/MRT) ↑ Vitalität (PET, MRT) ↑ Endsystolisches Volumen (LVA) ↓ Koronare Flussreserve (i.c. Doppler) ↑ EPCs: Globale Kontraktilität (LVA) ↑ Vitalität (PET, MRT) ↑ Endsystolisches Volumen (LVA) ↓ Koronare Flussreserve (i.c. Doppler)
BOOST (70)	BMC vs. random. Ko.	2460	30 vs. 30 Ko.	Globale Kontraktilität (MRT) ↑
Fernandez-Aviles (77)	BMC	78	20	Globale Kontraktilität (MRT) ↑ Endsystolisches Volumen (MRT) ↓
Erbs (78) ; (79)	EPCs vs. random. Ko.	70	13 vs. 13 Ko.	Globale Kontraktilität (MRT) ↑ Endsystolisches Volumen (MRT) ↓
ASTAMI (80)	BMC vs. random. Ko.	87	50 vs. 50 Ko.	Globale Kontraktilität (MRT, SPECT, Echo) → Endsystolisches Volumen (MRT, Echo) → Enddiastolisches Volumen (MRT, Echo) →
Repair-AMI (74)	BMC vs. random. Ko.	236	101 vs. 103 Ko.	Globale Kontraktilität (LVA) ↑

Tab. 2: Intrakoronare Stammzelltherapie bei akutem Myokardinfarkt

BMC: unfraktioniertes Knochenmark; EPCs: endotheliale Progenitorzellen; LVA: linksventrikuläre Angiographie; MRT: Magnetresonanztomographie; SPECT : Einzel-Photon-Emissions-Computertomographie; Ko.: Kontrolle

Erste Daten zur Zelltherapie bei Patienten mit chronisch-ischämischer Kardiomyopathie legen einen positiven Effekt nahe, zeigen aber im Vergleich zu o.g. Studien bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt weniger einheitliche Ergebnisse, was vermutlich auf das heterogenere Patientenkollektiv zurückzuführen ist (Tab. 3).

Studie	Zelltyp	Zellzahl (x10 ⁶)	Patienten	Effekte
TOPCARE-CHD (81)	BMC vs. EPCs vs. random. Ko.	180 (BMC) bzw. 21 (EPCs)	44 (BMC) vs. 42 (EPCs) vs. 23 Ko.	BMC: Globale Kontraktilität ↑ (LVA, MRT); ANP↓ EPCs: Globale Kontraktilität → (LVA); Globale Kontraktilität ↑ (MRT) ANP ↓
IACT (82)	BMC vs. random. Ko.	100	30 vs. 20 Ko.	Globale Kontraktilität (LVA) ↑ Vitalität (PET) ↑
Tse et al. (83)	BMC	K. A.	8	Regionale Wandbewegung und Wanddicke (MRT) ↑
Fuchs et al. (84)	BMC	78,3	10	Stress-induzierte Ischämie (MRT) ↓ Globale Kontraktilität (MRT) →
Perin et al. (69); (85)	BMC	30	14	Globale Kontraktilität (LVA, Echo) ↑

Tab. 3: Stammzelltherapie bei ischämischer Kardiomyopathie

BMC: unfraktioniertes Knochenmark; LVA: linksventrikuläre Angiographie; MRT: Magnetresonanztomographie; k. A.: keine Angaben; k. n. A.: keine näheren Angaben

1.1.2. Limitationen der Zelltherapie mit adulten Stammzellen

Obwohl die unter 1.1.1. vorgestellten klinischen Studien mit Skelettmyoblasten und Stammzellen aus dem Knochenmark positive Effekte bei ischämischen Herzerkrankungen nahe legen, sind die Daten dennoch vorsichtig zu interpretieren. Für den Großteil der Studien erfolgte weder Randomisierung noch Doppel-Blindung oder Placebo-Kontrollen. Die wenigen randomisiert durchgeführten Studien lieferten widersprüchliche funktionelle Effekte. Zudem fehlen Langzeitergebnisse sowie Daten bezüglich der Effekte auf Morbidität und Mortalität. Das Schicksal der transplantierten Zellen ist weiterhin ungeklärt. So wurde bisher weder deren Überleben noch deren Integration ins Myokard nachgewiesen.

Bezüglich der Sicherheit ist die Transplantation von Skelettmyoblasten aufgrund schwerster Komplikationen in Form von tödlichen ventrikulären Arrhythmien sehr kritisch zu beurteilen (s. 1.1.1.1.)

In den Zelltherapiestudien mit Knochenmarks-Stammzellen traten zwar bisher keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf, doch geben jüngste präklinische Studien klare Indizien dafür, dass adulte Stammzellen grundsätzlich tumorigenes Potenzial besitzen können. Bapat et al. kultivierten Stammzellen des humanen Fettgewebes *in vitro* und transplantierten diese in Mäuse, woraufhin sich sowohl nach intraperitonealer Applikation als auch Injektion in den Oberschenkel Tumore bildeten (86). Kritisch erscheint in diesem Zusammenhang insbesondere die Phase der *in vitro*-Vermehrung, auch wenn der Zeitraum der *in vitro*-Kultur bei den klinischen Studien zur Zelltherapie der ischämischen Herzerkrankungen kürzer ist. Bezüglich des tumorigenen Potenzials kommt dem Stammzellmarker CD133 eine entscheidende Rolle zu: So zeigten Singh et al., dass CD133-Expression humane Hirntumor-initiiierende Zellen kennzeichnet (87). Singh et al. isolierten Zellen aus humanem Hirntumor und sortierten diese nach Expression von CD 133. Nach Injektion von weniger als 100 CD133-positiven Zellen in das Gehirn von *NOD-SCID*-Mäusen entstanden Tumore, während die Transplantation von über 10^5 CD133-negativen Zellen zu keiner Tumorbildung führte. Ob das CD133-Molekül auch in hämatopoetischen Stammzellen in Zusammenhang mit Tumorigenität eine Rolle spielt, wurde bisher nicht untersucht.

Eine weitere potenzielle Komplikation einer Therapie mit Knochenmarksstammzellen zeigten Yoon et al. im akuten Myokardinfarktmodell bei Ratten (88). Die intramyokardiale Injektion von unfraktioniertem Knochenmark ging mit einer intramyokardialen Kalzifizierung im Perinfarktareal und im normalen Herzmuskelgewebe einher.

Es zeichnet sich immer mehr ab, dass Skelettmyoblasten und Knochenmarkszellen bezüglich ihrer Eignung zum kardialen Zellersatz wesentlich limitiert sind: Bisher konnte für humane Zellen nicht gezeigt werden, dass sie sich zu echten Kardiomyozyten entwickeln, die die durch Herzinfarkt irreversibel geschädigten Herzmuskelzellen ersetzen könnten. Diese Limitation war für Skelettmyoblasten, die nach Transplantation ihren Phänotyp als Skelettmuskelzellen beibehalten, bekannt (89). Jüngste Publikationen liefern nun klare Daten, dass die Entstehung von Purkinjezellen und Kardiomyozyten aus Knochenmarkszellen vielmehr auf Zellfusionen und fehlinterpretierte immunhistochemische Artefakte als auf die ursprünglich angenommene Fähigkeit der Transdifferenzierung zurückzuführen ist (90); (91), (92), (93), (94); (95); (96), (97), (39).

Die Wirksamkeit von Knochenmarkszellen und Skelettmyoblasten in präklinischen tierexperimentellen Studien rechtfertigte zwar den Einsatz dieser Therapiestrategien für klinische Studien, die Frage der potenziellen Mechanismen der Zelltherapie mit adulten Stammzellen bleibt aber offen. So konnte im Hasenmodell sogar die Injektion von

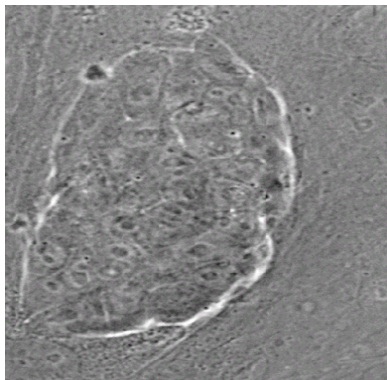
Fibroblasten, die keinesfalls Kardiomyozyten ausbilden können, die diastolische Funktion verbessern (98) und die systolische Pumpfunktion in gleichem Ausmaß wie Skelettmyoblasten und Knochenmarkszellen steigern (99). Diese Daten legen nahe, dass die funktionellen Effekte der Zelltherapie mit adulten Stammzellen – neben der für die endothelialen Progenitorzellen diskutierten Induktion der Angiogenese (100); (47) - am ehesten auf eine verringerte ventrikuläre Dilatation aufgrund der vermehrten Zellmasse zurückzuführen sind. Es wird zunehmend klar, dass weder Skelettmuskelzellen noch Knochenmarkszellen die beiden wesentlichen Voraussetzungen für eine echte kardiale Regeneration erfüllen: die elektrophysische Kopplung der transplantierten Zellen mit den Empfänger-Kardiomyozyten und die Fähigkeit, an der Herzaktion mittels aktiver mechanischer Kontraktion mitzuwirken. Diese Limitationen adulter Stammzellen geben in jüngster Zeit zahlreichen Arbeitsgruppen Anstoß, Zelltypen zu untersuchen, die echte Kardiomyozyten auszubilden imstande sind und damit tote Herzmuskelzellen ersetzen könnten. Dieser Ansatz wird durch bahnbrechende „Proof-of-the-principle“-Experimente gestützt, die zeigten, dass sich humane fetale Herzzellen nach Transplantation im Rattenmodell im myokardialen Narbenareal ansiedeln, Zellkontakte mit den benachbarten Empfänger-Kardiomyozyten ausbildeten und die linksventrikuläre Pumpfunktion verbesserten (101). Weil aber humane fetale Kardiomyozyten wegen ethischer Einwände, mangelnder Verfügbarkeit, unzureichender Vermehrungsfähigkeit und immunologischer Antworten nicht für die klinische myokardiale Ersatztherapie in Frage kommen, bietet sich eine alternative Quelle für Herzmuskelzellen an: embryonale Stammzellen. Diese pluripotenten Zellen mit der Fähigkeit, zu sämtlichen Zelltypen und somit auch zu Kardiomyozyten zu differenzieren, gelten gegenwärtig als die erfolgversprechendste Quelle zur Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen. So sieht etwa Philippe Menasché, der Pionier der Skelettmyoblastentransplantationen (60), mittlerweile embryonale Stammzellen als die einzige Möglichkeit, das ehrgeizige Ziel der kardialen Regeneration zu erreichen (63). Die Eigenschaften embryonaler Stammzellen, ihre Isolation und ihr kardiovaskuläres Differenzierungspotential sollen im Folgenden dargestellt werden.

1.2. Charakterisierung und Isolierung embryonaler Stammzellen

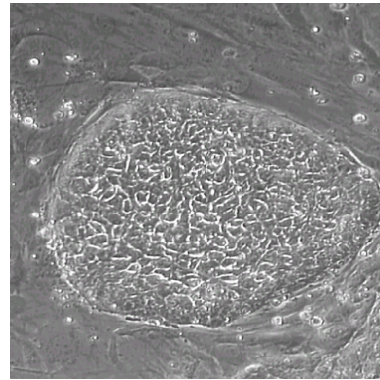
Nach Vereinigung von Ei- und Samenzelle entstehen bei den ersten mitotischen Teilungen Zellen, die als „totipotent“ bezeichnet werden, d.h. jede einzelne dieser Zellen ist in der Lage, einen vollständigen Embryo mit Plazenta auszubilden. Diese Fähigkeit verlieren die Zellen nach gegenwärtigem Wissensstand spätestens im 16-Zell-Stadium. Embryonale Stammzellen

werden im Embryogenese-Stadium der Blastozyste aus deren innerer Zellmasse am Entwicklungstag 2 – 3,5 (Maus) bzw. 5 – 9 (Mensch) isoliert. Embryonale Stammzellen sind durch folgende Kriterien charakterisiert:

- Immortalität, d.h. sie sind in der Lage, sich in der Kulturschale unbegrenzt in undifferenziertem Zustand zu teilen (Abb. 4)



Maus ES-Zellkolonie



Humane ES-Zellkolonie

Abb. 4: Undifferenzierte murine und humane embryonale Stammzellen in der *in vitro*-Kultur

- Pluripotenz, d.h. sie besitzen das Potenzial, zu Zelltypen aller drei Keimblätter (102) und Keimzellen (Oozyten und Spermato gonien) zu differenzieren (103); (104) (Abb. 5)

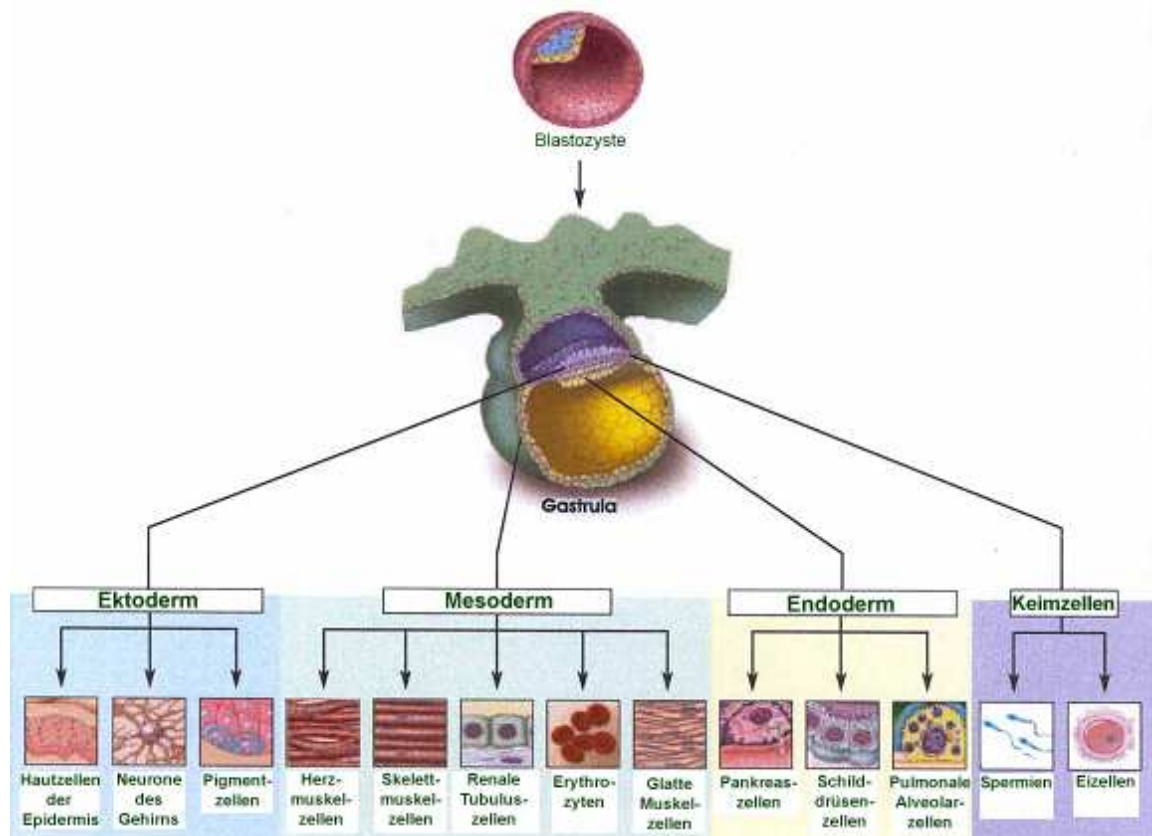


Abb. 5: Entwicklung von Geweben der drei Keimblätter sowie der Keimbahnzellen im Embryo

Abb. modifiziert nach (105)

- Hohe Expression des Stammzellmarkers Oct-4 sowie alkalische Phosphatase- und Telomerase-Aktivität (Tab. 4).

Humane ES-Zellen zeigen ferner die Expression typischer Oberflächenmarker von Primaten-ES-Zellen wie SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 und Tra-1-81 (Tab. 4).

Stammzellmarker	Murine ES	Humane ES	Quellen
SSEA-1	+	-	(106)
SSEA-3/4	-	+	(107); (108); (109); (110)
TRA-1-60/81	-	+	(107); (108); (109); (110)
TRA-2-54	-	+	(107);
Alkalische Phosphatase AP	+	+	(109); (111)
GCTM2	-	+	(108); (112)
CD9	+	+	(112)
CD133/Prominin	+	+	(113); (114)
Oct-4	+	+	(109); (115)
Nanog	+	+	(116); (117)
Sox-2	+	+	(118); (119)
FGF-4	+	-	(118)
LIF-Rezeptor	+	+/-	(120)
Telomerase	+	+	(109); (121)

Tab. 4: Vergleich der Expression typischer Stammzellmarker zwischen murinen und humanen ES-Zellen

1.2.1. Charakterisierung und Isolierung muriner embryonaler Stammzellen

Die Isolierung der ersten embryonalen Stammzelllinie aus Mäusen gelang 1981 (122). Charakteristisch für die ES-Zellen ist neben den unter 1.2. aufgeführten Kriterien, dass nach Übertragung in Mausblastozysten die Deszendenten der ES-Zellen in allen drei Keimblättern inklusive Keimbahn vorzufinden sind (123). Solange murine ES-Zellen auf inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (sog. „Feederzellen“) wachsen und/oder unter Zugabe von sog. „Leukaemia Inhibiting Factor“ (LIF) kultiviert werden, proliferieren sie *in vitro* im undifferenzierten Zustand (124); (125); (126). Nach Entzug von LIF und/oder Entfernen der „Feederzell“-Schicht differenzieren ES-Zellen zu Zellaggregaten, den sog. „Embryoid Bodies“ (EBs) mit Anteilen aller drei Keimblätter (122).

1.2.2. Charakterisierung und Isolierung humaner embryonaler Stammzellen

Trotz der Kenntnisse mit murinen ES-Zellen gelang die Isolierung der ersten humanen Stammzelllinie H9 erst 1998 (109). Sie wurde aus künstlich befruchteten Embryonen im Blastozystenstadium gewonnen und auf inaktivierten murinen „Feederzellen“ (MEFs) kultiviert. Verschiedene Labors haben seither weitere humane ES-Zelllinien mit Hilfe ähnlicher Protokolle erzeugt (s. Tab. 5). Im Gegensatz zu murinen ES-Zellen gelang es bisher für humane ES-Zellen nicht, sie allein durch Gabe von LIF in undifferenziertem Zustand zu kultivieren.

1.2.2.1. Gesetzliche Auflagen zu Import und Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen

Bezüglich des Imports und der Forschung mit humanen ES-Zellen gelten in Deutschland im internationalen Vergleich sehr restriktive Bestimmungen. Der Deutsche Bundestag hat sich am 30. Januar 2002 grundsätzlich für ein Importverbot humaner ES Zellen ausgesprochen und gleichzeitig beschlossen, ein Gremium einer Zentralen Ethik-Kommission für Stammzellforschung einzusetzen, welches in Einzelfällen den Import bereits vorhandener humaner ES-Zellen erlaubt. Grundlegende Regelungen des neuen Stammzellgesetzes (StZG), das am 28.06.2002 in Kraft trat, sind dabei wie folgt:

§ 1 StZG: Ziele des Gesetzes sind:

die Einfuhr und die Verwendung embryonaler Stammzellen grundsätzlich zu verbieten

zu vermeiden, dass von Deutschland aus eine Gewinnung embryonaler Stammzellen oder eine Erzeugung von Embryonen zur Gewinnung embryonaler Stammzellen veranlasst wird

die Voraussetzung zu bestimmen, unter denen die Einfuhr und die Verwendung embryonaler Stammzellen ausnahmsweise zu Forschungszwecken zugelassen sind

§ 5 StZG: Forschungsvorhaben mit humanen embryonalen Stammzellen dürfen nur durchgeführt werden, falls gewährleistet ist, dass

1. sie hochrangigen Forschungszielen für den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn im Rahmen der Grundlagenforschung oder für die Erweiterung medizinischer Kenntnis bei der Entwicklung diagnostischer, präventiver oder therapeutischer Verfahren zur Anwendung am Menschen dienen und

2. nach dem anerkannten Stand der Technik

die im Forschungsvorhaben vorgesehenen Fragestellungen so weit wie möglich bereits an *in vitro*-Modellen mit tierischen Zellen oder in Tierversuchen vorgeklärt wurden und

die Forschung mit anderen als embryonalen Stammzellen keine gleichwertigen Ergebnisse für die im Forschungsvorhaben vorgesehenen Fragestellungen erwarten lässt.

Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen können nach § 4(2) StZG und § 6 StZG in Ausnahmefällen genehmigt werden, wenn:

1. die embryonalen Stammzellen vor dem 1. Januar 2002 im Herkunftsland aus Embryonen, die zur IVF vorgesehen wären, gewonnen wurden
2. eine freiwillige Einwilligungserklärung der Spender vorliegt
3. für die Überlassung der Embryonen kein Entgelt oder sonstiger geldwerter Vorteil gewährt wurde
4. der Einfuhr nicht andere gesetzliche Vorschriften insbesondere das EschG entgegenstehen.

Die Durchführung eines Forschungsantrages kann demnach nur erfolgen, wenn die Voraussetzungen des § 4(2) StZG und des § 5 StZG erfüllt sind und die Genehmigung durch das Robert-Koch-Institut vorliegt.

Neben der an unser Labor erteilten Import- und Forschungsgenehmigung für humane embryonale Stammzellen wurden nach Angaben des Robert-Koch-Institutes bis zum 27.06.2005 zehn weitere entsprechende Anträge genehmigt.

So besteht die Gefahr von Infektübertragungen durch die transplantierten Zellen.

1.2.2.2. Bisher publizierte humane embryonale Stammzelllinien und deren Limitationen

Bisher wurden 149 humane embryonale Stammzelllinien publiziert (Tab. 5). Davon erfüllen 54 Linien die Kriterien des Deutschen Stammzellgesetzes.

Land	Publikation	Zelllinien	Feederzellen	Isolation an Embryonaltag
USA	(109), (127)	H1*, H7*, H9*, H13*, H14*	Bestrahlte MEFs	K. A.
	(127)	H9.1*, H9.2*	Bestrahlte MEFs	K. A.
	(127)	CY10*, CY12*, CY30*, CY40*, CY51*, CY81*, CY82*, CY91*, CY92*	MEFs, k. n. A.	K. A.
	(128)	ES-76, ES-78-1, ES-78-2	Bestrahlte MEFs	6
	(129), (127)	BG01*, BG02*, BG03*, BG04*	Inaktivierte MEFs	6-9
	(127)	HSF-1*, HSF-6*	MEFs, k. n. A.	K. A.
	(130)	HUES-1 bis -17	MitoC MEFs	Keine Angabe
	(131)	15, 18, 21, 24, 27, 28, 31, 33, 53, 60, 62, 63, 79, 80,	MitoC MEFs oder BRL	K. A.

USA (Fortsetzung)		81, 93, 94, 95, 96, 97		
	(132)	ACT-14	Lysierte MEFs	5
	(133)	UCSF-1, UCSF-2	Bestrahlte humane plazentale Fibroblasten	6-7
Israel	(134), (127)	I-3*, I-4*, I-6*	MEFs	K. A.
	(127)	I-3.2*, I-3.3*, I6.2*, J3*, J3.2*	MEFs, k. n. A.	K. A.
	(135)	19	Inaktivierte MEFs	K. A.
Korea	(136), (127)	Miz-hES1*, Miz-hES2, Miz-hES-3	MitoC STO	K. A.
	(137)	MB01*, MB02*, MB03*, MB-04; bis-09	MitoC MEFs	K. A.
	(138)	Miz endo-1, -2, -3	MitoC humane uterine Endometrium-Zellen	K. A.
	(139)	Miz-hES-4 bis -8, Miz- hES-10 bis -13	MitoC MEFs	K. A.
	(140)	SNUhES-1 bis -3	MitoC STO	5-7
Tschechien	(141); (142)	CCTL-6, -8, -9, -10, -12, - 13, -14	MitoC MEFs	K. A.
UK	(143)	HES-NCL1	Bestrahlte MEFs	8
Australien/ Singapur	(108), (127)	HES-1*, HES-2*	MitoC MEFs	6
	(127)	HES-3*, HES-4*, HES- 5*, HES-6*	MEFs, k. n. A.	
Singapur	(144)	1 (keine Bezeichnung)	MitoC HEFs	K. A.
Schweden	(127)	SA01*, SA02*, SA03*	MEFs, k. n. A.	K. A.
	(127)	SA04*, SA05*	MEFs, k. n. A.	K. A.
	(127)	KA08*, KA09*	MEFs, k. n. A.	K. A.
	(127)	KA40*, KA41*, KA42*, KA43*	Ohne MEFs, k. n. A.	K. A.
	(145)	HS181, HS 207	Bestrahlte HEFs	6
	(146)	HS293, HS 306	Postnatale humane Fibroblasten	K.A.
	(147)	SA002, FCO18, ASO34, ASO38, SA121, SA181	MitoC MEFs	6-7
Iran	(148)	Royan H1	MitoC MEFs	6
Indien	(127)	NC01*, NC02*, NC03*	K. A.	K. A.
China	(149)	CHES-1	Bestrahlte MEFs	K. A.

China (Fortsetzung)	(150)	SH1, SH2	Bestrahlte MEFs	K.A.
	(151)	SH7	hES-dFs	K.A.
	(150)	hES-8, hES-18	MitoC MEFs	
Spanien	(152)	VAL-1, VAL-2	Humane plazentale Fibroblasten	K. A.

Tab. 5: Publierte humane embryonale Stammzelllinien (Stand: Oktober 2005)

MitoC: Mitomycin C; MEFs: murine embryonale Feederzellen; HEFs: humane embryonale Feederzellen; STO: Zelllinie muriner embryonaler Fibroblasten; BRL: konditioniertes Medium; hES-dFs: aus hES-Zellen gewonnene Fibroblasten; k.(n.)A.: keine (näheren) Angaben

Die mit * gekennzeichneten Linien erfüllen die Kriterien des Deutschen Stammzellgesetzes.

Sämtliche Stammzellgesetz-konformen Linien wurden mit Hilfe von murinen „Feederzellen“ und fetales Kälberserum (FCS) enthaltenden Medien isoliert und kultiviert, wodurch bei Zelltransplantationen tierische Pathogene und Viren übertragen werden könnten.

Jüngste Publikationen liefern hinsichtlich einer Eliminierung dieser potenziell infektiösen und immunogenen xenogenen Komponenten erste Fortschritte: So wurden verschiedene Linien mit *humanen* fetalen, neonatalen und adulten „Feederzellen“ (138); (145); (152); (144) (153) isoliert und kultiviert. Klimanskaya et al. gewannen die hES-Zelllinie ACT-14 ohne „Feederzellen“ auf einer extrazellulären Matrix, die aus lysierten und fixierten MEFs bestand (132). Kürzlich beschrieben Stojkovic et al. die Etablierung eines autogenen „Feederzell“-Systems (154). Aus den hES-Zelllinien H1 und hES-NCL1 wurden „Feederzellen“ (sog. „hES-derived Feeders“; hES-dFs) gewonnen, auf welchen die Kultivierung undifferenzierter hES-Zellen der jeweiligen Zelllinie gelang. Zudem entwickelte diese Gruppe eine zellfreie Kultur von hES-Zellen mit einer Matrix aus humanem Serum und Medium, das durch hES-dFs konditioniert worden war (155). Dennoch handelt es sich auch hier nicht um ein xenofreies System, da die verwendeten Zelllinien H1 und hES-NCL1 auf murinen embryonalen „Feederzellen“ isoliert worden waren. Wang et al. gelang 2005 die Gewinnung einer hES-Zelllinie (SH7) auf hES-dFs (151). Diese wurden jedoch aus hES-Zelllinien (H1, SH1, SH2) hergestellt, die unter xenogenen Bedingungen isoliert worden waren (150).

Sämtliche zitierte Arbeitsgruppen verwendeten für Isolation und Kultivierung anstatt des fetalen Kälberserums „Serum Replacement“, das allerdings auch tierische Komponenten wie die Sialinsäure Neu5Gc (N-Glykolyyl-Neuraminsäure) aufweist. Diese wird von humanen ES-Zellen inkorporiert und löst in Gegenwart von humanem Serum eine immunologische Reaktion mit Komplementaktivierung aus, weil dieses natürliche Antikörper gegen Sialinsäure Neu5Gc enthält (156).

Zudem ist bei sämtlichen bisher gewonnenen humanen ES-Zelllinien aufgrund der Allogenität der transplantierten Zellen das Problem einer Immunreaktion zu erwarten. Neben einer konventionellen immunsuppressiven Therapie kommt hier die Anlage einer „Stammzellbank“ ähnlich den Blutbanken oder die genetische Manipulation der transplantierten Zellen mit Induktion einer Immuntoleranz in Frage.

Das nach dem Embryonenschutzgesetz in Deutschland nicht erlaubte „therapeutische Klonen“ (Abb. 6) könnte die Gewinnung von autologen ES-Zellen ermöglichen, die das nukleäre Genom (nicht die mitochondriale DNA) des Spenders der somatischen Zelle enthalten. Damit hätten sie als autologe Zellen den entscheidenden Vorteil, dass bei künftigem zelltherapeutischen Einsatz keine allogene bedingte immunogene Reaktion zu erwarten wäre (157); (158). Das potenziell immunogene Potenzial mitochondrialer Proteine wurde bisher nicht gezeigt.

Beschrieben wurde die Technik des therapeutischen Klonens mittels Kerntransfers aus Kumuluszellen erstmals im Jahr 2001 für murine ES-Zellen (159). Die beiden inzwischen zurückgezogenen Publikationen (160); (161), in denen Hwang et al. die Isolation humaner ES-Zellen aus einem geklonten Embryo veröffentlicht hatten, stellten sich inzwischen als Fälschungen heraus. Laut der Prüfungskommission der Nationalen Universität Seoul konnte Hwang mit dieser Technik zwar Blastozysten gewinnen, aus diesen aber keine ES-Zellen isolieren (162). Stojkovic et al. beschrieben 2005 ebenfalls den erfolgreichen Kerntransfer humaner Zellen bis zum Blastozystenstadium (163).

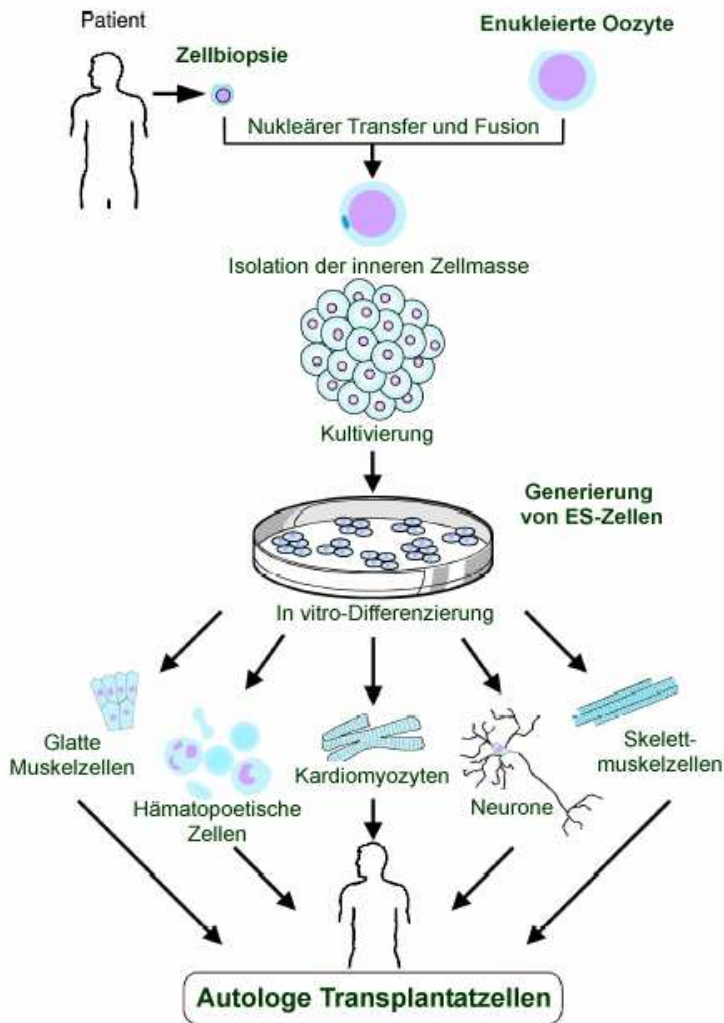


Abb. 6: Prinzip des „therapeutischen Klonens“

Das therapeutische Klonen könnte die Gewinnung von humanem autologen Gewebe ermöglichen. Der Zellkern einer Körperzelle wird in eine enukleierte Oozyte eingebracht. In der Umgebung des oozytären Zytoplasmas wird das Genom der Körperzelle in den embryonalen Zustand reprogrammiert. Aus dem geklonten Embryo lassen sich Blastozysten entwickeln (163); (162). Wäre es möglich, aus diesen ES-Zellen zu gewinnen, könnten diese *in vitro* in verschiedene Zelltypen differenziert und als autologes Zellgewebe transplantiert werden.

Abb. modifiziert nach (54)

Eine weitere Problematik im Hinblick auf eine klinische Anwendung wird aus der bisher umfangreichsten Analyse von humanen ES-Zellen bezüglich Mutationen ersichtlich: Hier zeigten sich für hohe Passagen bei acht von neun untersuchten Stammzellgesetz-konformen Zelllinien genomische Veränderungen in der Anzahl der DNA-Kopien (45%), der mitochondrialen DNA-Sequenz (22%) und der Promotor-Methylierung (90%) (164).

Zusammenfassend wird der Einsatz für therapeutische Zwecke erfordert niedrige, genetisch stabile Passagen von xenofreien humanen embryonalen Stammzelllinien erfordern. Trotz der

Fortschritte in der Eliminierung xenogener Komponenten erfüllt gegenwärtig keine ES-Zelllinie die GMP-Kriterien für klinische Transplantationen. Um embryonale Stammzellen in Zukunft für therapeutische Anwendungen nutzen zu können, ist die Gewinnung neuer Linien unter streng xenofreien Konditionen, d.h. unter Verzicht auf die Exposition nicht nur gegenüber tierischen „Feederzellen“, sondern auch gegenüber tierische Komponenten enthaltende Medien, notwendig.

1.3. Kardiovaskuläre Differenzierung embryonaler Stammzellen

Murine und humane ES-Zellen differenzieren innerhalb des kardiovaskulären Spektrums spontan zu schlagenden Kardiomyozyten (Abb. 7, Tab. 6, Tab. 7), Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäßwände (21).

Die aus ES-Zellen gewonnenen Kardiomyozyten zeigen, wie unter 1.3.1. genauer dargestellt,

- spontane Kontraktilität
- typisches Genexpressionsprofil von herzspezifischen Markergenen wie Strukturproteinen, Ionenkanälen und Rezeptoren
- charakteristische Strukturen des Sarkomers
- Kardiomyozyten-typische Aktionspotenziale und charakteristische pharmakologische Eigenschaften

Dabei umfasst das Spektrum sich kardial differenzierender Zellen sowohl atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten als auch Schrittmacherzellen des Sinusknotens und anderer Zentren des Erregungsbildungs- und -leitungssystems (165); (166); (167); (168); (169); (170). Abb. 7 zeigt die Entwicklung von murinen und humanen embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten.

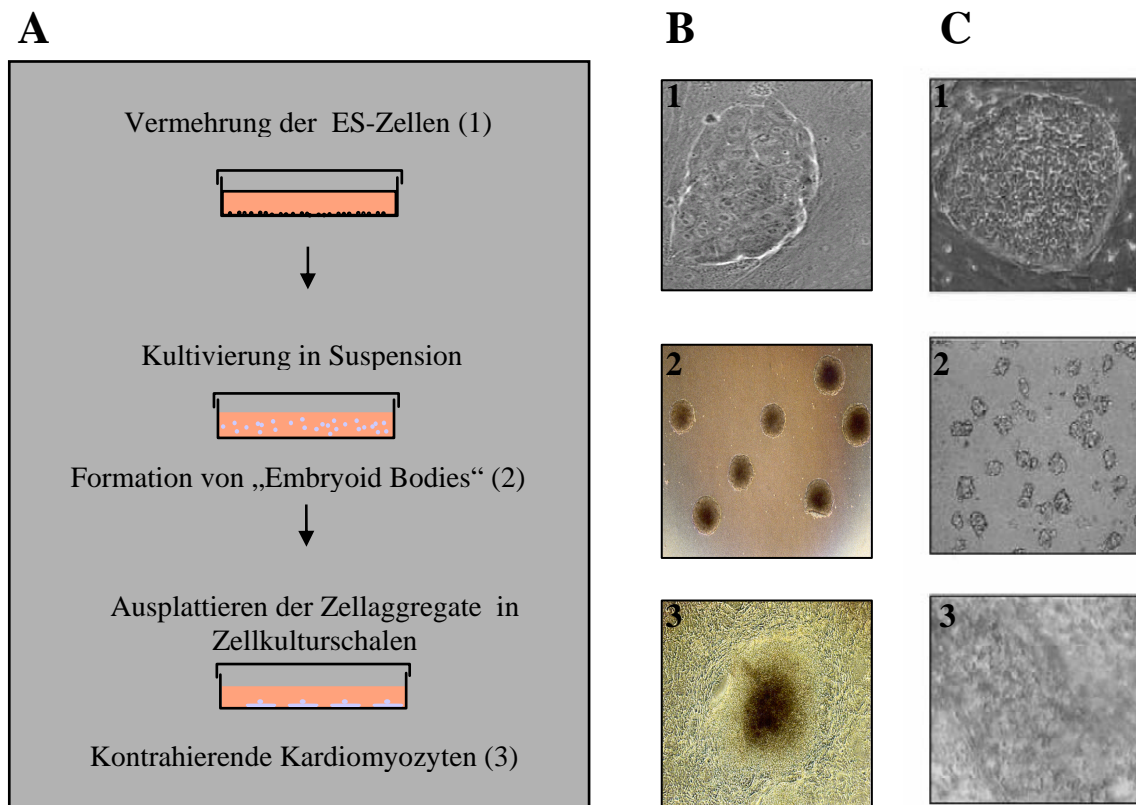


Abb. 7: Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten

A zeigt schematisch die Schritte der *in vitro*-Differenzierung. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen für murine (B) und humane ES-Zellen (C) die Entwicklung von undifferenzierten Zellen (1) über früh differenzierte „Embryoid Bodies“ in Suspensionskultur (2) zu Arealen schlagender Kardiomyozyten (3).

1.3.1. Kardiovaskuläre Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen

1985 gelang erstmals die *in vitro*-Differenzierung von murinen ES-Zellen zu schlagenden Kardiomyozyten (171). Seither wurde in zahlreichen Publikationen die kardiale Differenzierung von murinen ES-Zellen verschiedener Mausstämmen nachgewiesen und umfassend charakterisiert (Tab. 6).

Kommentar	Zelllinie	Publikation
Differenzierung in Kardiomyozyten	D3	(171)
Differenzierung in Sinusknotenzellen, atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten	D3	(172)
Differenzierung in Kardiomyozyten durch Ko-Kultur mit END-2-Zellen	E14, R1	(173)
Evaluation der Expression herzspezifischer Gene und Ionenkanäle	D3	(174)
Evaluation der Ultrastruktur und der elektrophysiologischen Kopplung	D3	(175)
Evaluation der MHC-Expression in der Differenzierung von Kardiomyozyten	D3, CCE, E14	(176)
Differenzierung in ventrikuläre Kardiomyozyten	GS-ES	(170)

Tab. 6: Differenzierung von Kardiomyozyten aus murinen ES-Zellen

Sämtliche Differenzierungsprotokolle beinhalten dabei dasselbe Prinzip: Durch einen Wechsel der Kulturbedingungen beginnen die murinen ES-Zellen sich in LIF-freiem Medium unter Bildung von als „Embryoid Bodies“ (EBs) bezeichneten Aggregaten zu differenzieren. Nach mehrtägiger Suspensionsphase werden die EBs üblicherweise auf Adhärenzplatten überführt. Es bilden sich nach vier bis sechs weiteren Tagen die ersten kontrahierenden Areale, wobei die Anzahl der schlagenden Zellen ab Tag zehn bis 15 ihr Maximum erreicht. Der Anteil der kontrahierenden Myozyten beträgt dabei ca. 5 bis 8% (165). Um die Ausbeute an Kardiomyozyten zu erhöhen, wurden verschiedene Stimuli für die kardiale Differenzierung muriner ES-Zellen beschrieben (Tab. 7).

Kardiogener Stimulus	Publikation
Retinsäure	(177)
DMSO	(178)
Oxytocin	(179)
NO	(180)
Dynorphin B	(181)
Cardiogenol	(182)
„Fibroblast Growth Factor 2“ (FGF-2)	(183)
„Bone Morphogenetic Protein 2“ (BMP-2)	(183), (29) (25)
„Transforming Growth Factor β “ (TGF- β)	(25)

Tab. 7: Spezifische Stimuli für die kardiale Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen

1.3.2. Kardiovaskuläre Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen

Kehat et al. konnten 2001 erstmals die spontane Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen der Linie H9.2 zu Kardiomyozyten zeigen: 8,1% der „Embryoid Bodies“ wiesen spontan kontrahierende Bereiche mit Herzmuskelzellcharakter auf, wobei es sich um eine Mischpopulation verschiedener Subspezies von Kardiomyozyten handelte, während jedoch keine Skelettmuskelzellen gefunden wurden (167). Inzwischen wurde die kardiale Differenzierung für verschiedene humane ES-Zelllinien beschrieben (Tab. 8). Das Prinzip der *in vitro*-Differenzierung ist ähnlich wie bei den murinen ES-Zellen: Durch Änderung der Kulturbedingungen, d.h. für humane ES-Zellen unter Entzug der „Feederzellen“, bilden sich in Suspensionskultur „Embryoid Bodies“, die nach acht bis zehn Tagen auf Gelatinebeschichtete Platten ausplattiert werden. Nach fünf bis 20 weiteren Tagen bilden sich kontrahierende Areale mit einem Anteil schlagender Zellen an den Gesamtzellen von 8 bis 10% (167). Kehat et al. konnten mit sog. „Microelectrode Arrays“ (MEA) zeigen, dass die

schlagenden Bereiche der humanen EBs einem funktionalen Synzytium mit Schrittmacherzentrum entsprechen (169).

Im Gegensatz zu murinen ES-Zellen konnte für humane ES-Zellen bisher keine Reifung zu adulten Kardiomyozyten beobachtet werden; sie entsprechen vielmehr frühen, nicht enddifferenzierten Formen (167), wie aus der Dauer ihrer Differenzierungsphase von ca. einem Monat zu erwarten ist.

Kommentar	Zelllinie	Publikation
Evaluation der strukturellen und funktionellen Eigenschaften	H9.2	(167)
Analyse der elektrophysiologischen Kopplung mittels „Microelectrode Array“ (MEA)	H9.2	(169)
Charakterisierung und Anreicherung funktioneller Kardiomyozyten	H9.1, H9.2, H1, H7, H9	(110)
Evaluation der elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften	H1, H7, H9, H14	(184)
Differenzierung in Kardiomyozyten durch Ko-Kultur mit END-2-Zellen	HES2	(185)
Evaluation der ultrastrukturellen und proliferativen Eigenschaften	H9.2	(186)
Evaluation der elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften	H9.2	(187)

Tab. 8: Differenzierung von Kardiomyozyten aus humanen ES-Zellen

Verschiedene Arbeitsgruppen haben versucht, den Anteil der Herzmuskelzellen an den differenzierten humanen ES-Zellen, der bei spontaner Differenzierung weniger als 10% beträgt, durch Modifikation der Kulturbedingungen zu erhöhen (Tab. 9).

Kardiogener Stimulus	Publikation
Retinsäure	(188)
5-aza-2`-Deoxycytidin	(188); (110); (169)
„Hepatocyte Growth Factor“ (HGF)	(188)
„Epidermal Growth Factor“ (EGF)	(188)
„Basic Fibroblast Growth Factor“ (bFGF)	(188)
„Transforming Growth Factor β 1“ (TGF- β 1)	(188)

Tab. 9: Spezifische Stimuli für die kardiale Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen

Die höchste Reinheit gelang dabei Xu et al., die eine 5-aza-2`-Deoxycytidin-Behandlung der Zellen mit einer Dichtezentrifugation mittels Percoll-Gradienten kombinierten und dabei eine Population mit 70% reinen Kardiomyozyten aus humanen ES-Zellen erzielten (110).

1.4. Transplantation von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen

1.4.1. Präklinische Studien mit Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen

Sowohl murine als auch humane embryonale Stammzellen wurden in den letzten Jahren zur kardialen Zelltherapie in verschiedenen Tiermodellen eingesetzt (Tab. 8).

Klug et al. veröffentlichten die erste zelltherapeutische Studie mit aus murinen ES-Zellen entwickelten Kardiomyozyten. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass die transplantierten Zellen nach Injektion in die Wand des linken Ventrikels von *mdx* Mäusen („Knock out“ des Dystrophin-Gens) mit dem Empfängermyokard assoziiert waren (20). Die Transplantatzellen zeigten kardiomyozytären Phänotyp, herzmuskelspezifische Genexpressionsmuster sowie Zell-Zell-Verbindungen mit den Empfänger-Kardiomyozyten, die in Ultrastrukturanalysen als sog. „interkalierende Discs“ nachweisbar waren. Min et al. übertrugen die Zelltransplantationen auf Ratten mit experimentell erzeugtem Infarkt (22). Aus murinen ES-Zellen hervorgegangene schlagende Zellen bildeten ein stabiles intrakardiales Synzytium mit dem Myokard der Empfängertiere und verbesserten deren linksventrikuläre Pumpfunktion. Menard et al. transplantierten 2005 erstmals murine ES-Zellen in einem klinisch relevanten Großtiermodell. Sie zeigten, dass die transplantierten Zellen in das infarzierte Myokard von immunsupprimierten und immunkompetenten Schafen integrieren und zu reifen Kardiomyozyten mit Connexin-Expression differenzieren. Hiermit ging eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion einher. Sowohl die Rekolonisation des Infarktgebietes als auch die funktionelle Verbesserung nach Zelltherapie war bei Schafen ohne Immunsuppression stärker ausgeprägt als bei Schafen, die mit Ciclosporin behandelt worden waren. Menard et al. stellten unabhängig von einer immunsuppressiven Therapie keine histologischen Veränderungen im Sinne einer Immunantwort des Schafs gegen die spezie fremden ES-Zellen fest.

Dagegen beschrieben Swijnenburg et al. im xenofreien, aber allogenen Mausmodell ohne Immunsuppression eine progressiv verlaufende inflammatorische Infiltration als alloimmune Antwort gegen die nach induziertem Myokardinfarkt intramyokardial injizierten ES-Zellen (28). Die Autoren interpretierten die Beobachtung, dass die Transplantatzellen in den allogenen Empfängerherzen acht Wochen nach intrakardialer Injektion nicht mehr nachweisbar waren, als Folge der Immunreaktion. Zellen derselben ES-Zelllinie (D3) riefen nach syngener Transplantation keine Immunreaktion hervor und überlebten im Empfängerherzen.

Das therapeutische Potenzial von humanen ES-Zellen bei Herzrhythmusstörungen untersuchten zwei kürzlich erschienene Arbeiten von Xue et al. (31) und Kehat et al. (30). Sie

wiesen im Meerschweinchen- bzw. Schweinemodell die funktionelle Integration transplanteder Kardiomyozyten aus *humanen* ES-Zellen nach. In letztgenannter Publikation wurde durch dreidimensionale elektrophysiologische Untersuchungen und histopathologische Analysen gezeigt, dass aus humanen ES-Zellen gewonnene Kardiomyozyten nach Transplantation in Schweineherzen mit komplettem AV-Block Schrittmacherfunktion übernahmen.

Zelltyp	Studie	Empfänger	Injektion (Zellzahl)	Follow Up	Effekte
Undifferenzierte mES-Zellen	Behfar (25)	Ratte, 4 Wo. post MI	3x in LV (300.000)	5 Wo	LVEF ↑ (Echokardiographie)
	Behfar (25)	Maus (ohne MI)	k.n.A. (500.000)	3-4 Wo	Unter Blockade des TGF- β/BMP2-Signalwegs Tumorformation und keine Differenzierung
	Hodgson (26)	Ratte, 8 Wo post MI	3x in LV (300.000)	3-12 Wo	LVEF↑, Remodelling↓ (Echokardiographie)
	Himes (27)	Maus, unmittelbar post MI	3x in LV (300.000)	12 h – 36 d	Markierung mittels MRT (SPIO) möglich
	Swijnenburg (28)	Maus, unmittelbar post MI; syngene und allogene Tx	1x ins Infarktareal (1.000.000)	8 Wo	Bei allogener und syngener Tx: Intramyokardiale Teratome (n. 4 Wo); bei allogener Tx (nicht bei syngener Tx): progressive immunologische Infiltration; Verschwinden der Transplantatzellen (n. 8 Wo)
Kardiomyozyten aus mES-Zellen	Klug (20)	<i>mdx</i> -Maus	Intramyokardial (10.000)	7 Wo	Assoziation mit dem Empfängermyokard
Schlagende Muskelzellen aus mES-Zellen	Min (22)	Ratte, unmittelbar post MI	1x ins Infarktareal, 2x in die Randzone (10.000)	6 Wo	Infarktarealgröße↓, Remodelling↓, Kontraktilität↑ (Intraventrikuläre Druckregistrierung, Echokardiographie)
	Min (23)	Ratte, unmittelbar post MI	1x ins Infarktareal, 2x in die Randzone (100.000)	32 d	Infarktarealgröße↓, Remodelling↓, Kontraktilität↑, Kapillaranzahl↑, Überleben↑ (Intraventrikuläre Druckregistrierung, Echokardiographie)

Früh differenzierte Zellen aus mES-Zellen	Yang (24)	Maus, unmittelbar post MI	1x ins Infarktareal, 2x in die Randzone (100.000)	6 Wo	Infarktarealgröße↓, Remodelling↓, Kontraktilität↑ (Intraventrikuläre Druckregistrierung, Echokardiographie); mit VEGF zusätzliche Verbesserung dieser Parameter, Angiogenese↑; Proliferation der Transplantatzellen
	Menard (29)	Schaf, 2 Wo post MI, +/- Ciclosporin 0,5g/kg/d	25x in Infarktareal und Randzone (30.000.000)	4 Wo	LVEF↑ (Echokardiographie); stärkere Zunahme der LVEF ohne Immunsuppression
Schlagende Muskelzellen aus hES-Zellen	Kehat (30)	Schwein, unmittelbar nach Ablation des His-Bündels, Ciclosporin 10mg/kg/d + Methylprednisolon 2mg/kg/d	Injektion in den posterolateralen LV (40-150 schlagende EBs)	1-21 d	Schrittmacheraktivität der Transplantatzellen
	Xue T (31)	Meerschweinchen, 2-3 Tag vor partieller Ablation des RV	Injektion in anterioren LV (5 EBs)	2-3 d	Schrittmacheraktivität der Transplantatzellen
	Laflamme (32)	Ratte (ohne MI)	Injektion in LV (0,5x10 ⁶ – 10x10 ⁶)	4 Wo	Proliferation der Transplantatzellen; Angiogenese

Tab. 8: Intramyokardiale Zelltherapie mit undifferenzierten und differenzierten ES-Zellen

MI: Myokardinfarkt; LV: linker Ventrikel; RV: rechter Ventrikel; LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion; SPIO: superparamagnetische Eisenoxide; MRT: Magnetresonanztomographie; Tx: Transplantation

1.4.2. Limitationen der Transplantation von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen

Die vorgestellten präklinischen Experimente, insbesondere die Studien an klinisch relevanten Großtiermodellen, bekräftigen den potenziellen Nutzen embryonaler Stammzellen zur Regeneration des dysfunktionellen Myokards. Dennoch gibt es verschiedene Hindernisse im Hinblick auf eine künftige klinische Anwendung einer kardialen Zelltherapie mit ES-Zellen.

Auf genetische Aberrationen, potenzielle Infektiosität und Immunogenität der Stammzell-gesetz-konformen Linien wurde unter 1.2.2.2. eingegangen. Es ist zu erwarten, dass durch eine weitere Verbesserung der Isolations- und Kultivierungsprotokolle in den nächsten Jahren xenofreie humane embryonale Stammzelllinien mit genetisch stabilen Passagen zur Verfügung stehen werden, die jedoch als neu gewonnene Linien in Deutschland nach derzeitiger Gesetzeslage nicht verwendet werden dürften.

Die wohl bedeutendste Limitation einer Therapie mit aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten Zellen besteht darin, dass undifferenzierte Zellen mit tumorigem Potenzial verschleppt werden können. Nach Injektion in den Hodensack (108) und den dorsalen Oberschenkelmuskel (109) bei Mäusen ist eine Teratombildung durch ES-Zellen seit vielen Jahren bekannt. Swijnenburg et al. beschrieben 2005 erstmals die Formation von Tumoren nach intramyokardialer Injektion von undifferenzierten murinen ES-Zellen. Sowohl von den allogenen als auch den syngen Transplantaten gingen Teratome aus (s. Abb. 8).

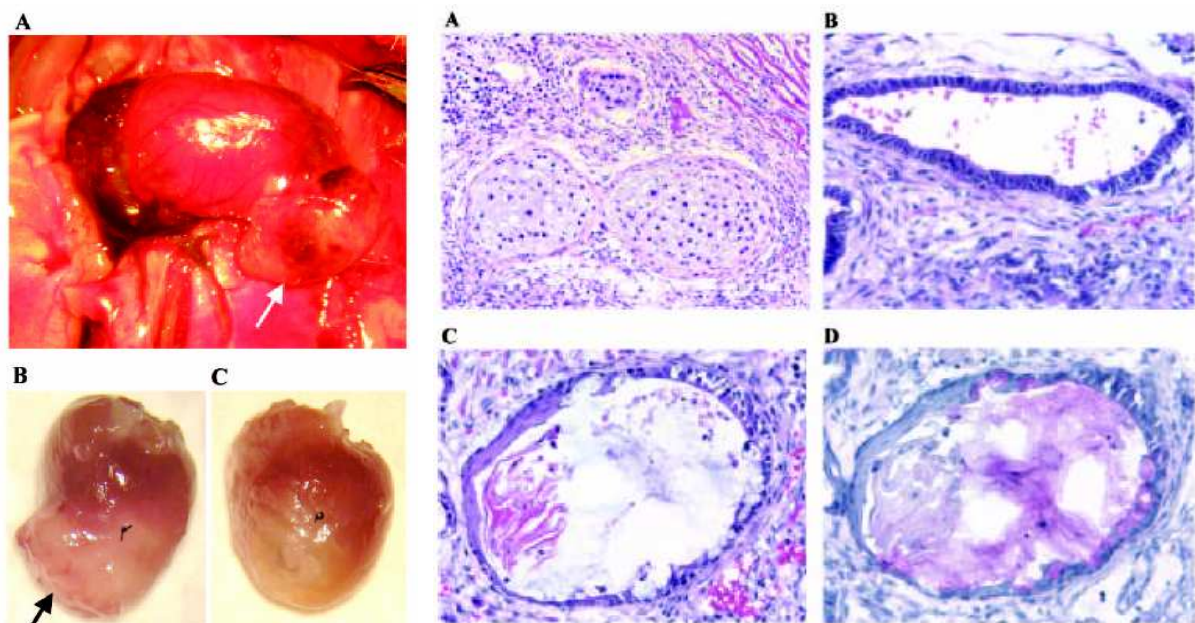


Abb. 8: Teratombildung nach intramyokardialer Transplantation von undifferenzierten murinen ES-Zellen

Links: Swijnenburg et al. fanden vier Wochen nach sygener (A) bzw. allogener Transplantation (B) Tumore, die sich ausgehend von der linksventrikulären Wand, in welche die Zellen injiziert worden waren, ausbreiteten. In „sham-operierten“ Herzen waren keine Tumore nachweisbar (C).

Rechts: Die Tumore in allogenen und syngen Empfängerherzen wurden als Teratome charakterisiert. Sie enthielten Gewebeanteile aller drei Keimblätter, darunter Knorpel (Mesoderm; A), squamöses Epithel (Ektoderm; B) und Drüsenepithel (Endoderm; C, D).

Abb. aus (28)

Für eine klinische Anwendung von ES-Zellen ist es essentiell, das Risiko intrakardialer Teratome durch eine Aufreinigung von Kardiomyozyten vor der Transplantation zu eliminieren bzw. zu minimieren. Darüber hinaus ist die Verwendung aufgereinigter Populationen des zu transplantierenden Zelltyps auch bezüglich der Integration in das Empfängermyokard und der Funktionalität von entscheidender Bedeutung.

Zwar ist durch eine weitere Optimierung der Kulturbedingungen davon auszugehen, dass der Anteil von Herzmuskelzellen an sich differenzierenden humanen ES-Zellen noch steigen wird (s. 1.3.2.). Allerdings ist nicht zu erwarten, dass allein durch Modifikation der Differenzierungsprotokolle die für Transplantationen erforderlichen Reinheiten zu erzielen sein werden.

Deshalb ist ein wesentliches Ziel der gegenwärtigen Forschung, funktionelle transplantierbare Kardiomyozyten durch genetische Manipulation zu markieren und darauf basierend mit einem zellschonenden, hocheffizienten Protokoll aufzureinigen.

1.5. Markierung und Aufreinigung kardial differenzierter Subpopulationen aus embryonalen Stammzellen

In diesem Kapitel sollen Strategien zur Markierung und Aufreinigung von kardial differenzierten Subpopulationen, die sich aus ES-Zellen entwickeln, vorgestellt werden. Auf den im Folgenden dargestellten Publikationen und Überlegungen basiert die Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation.

1.5.1. Promotor-gestützte Markierung

Einen vielversprechenden Ansatz zur Anreicherung funktioneller transplantierbarer Kardiomyozyten stellt die Selektion dieser Zellen mit Hilfe eines kardial spezifischen Promotors dar. Für den Zweck einer spezifischen Markierung von Kardiomyozyten interessieren deshalb Gene, die nur in diesem Zelltyp aktiv sind. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass die Entwicklung der Kardiomyozyten in den „Embryoid Bodies“ analog zu der *in vivo*-Situation im Herzen abläuft (189); (190); (191); (176); (174); (192); (193). In der *in vivo*-Kardiogenese beginnt die Differenzierung in Kardiomyozyten mit unterschiedlicher Kammerzpezifität (194); (195) entlang der anterior-posterioren Achse des kardialen Mesoderms bereits vor der Bildung des Herzrohrs. Ventrikuläre Kardiomyozyten entstehen aus den an der anterioren Seite des Mesoderms gelegenen Zellen, während sich atriale Herzmuskelzellen ausgehend von der posterioren Seite entwickeln. Kardiomyozyten aus „Embryoid Bodies“ treten trotz des Fehlens dieser anterior-posterior-Information in die

kammerspezifische Differenzierung ein und entwickeln sich sowohl zu atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten als auch zu Sinusknoten- und anderen Schrittmacherzellen. In Mäusen ist es möglich, mit Hilfe von immunologischen Markern verschiedene kardiale Subtypen zu identifizieren. So gilt „Myosin Light Chain 2 ventricular“ (MLC2v) als Marker, der spezifisch in ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert wird (196); (195), (197). Die meisten für den atrialen Zelltyp spezifischen Gene wie „Myosin Light Chain 1 atrial“ (MLC1a), „Myosin Light Chain 2 atrial“ (MLC2a), „ α -Myosin Heavy Chain“ (α -MHC), α -Aktin und atriale natriuretisches Protein (ANP) werden im frühen Stadium der embryonalen Entwicklung auch im Ventrikel exprimiert (196); (198); (195). Basierend auf diesen Erkenntnissen verwendeten verschiedene Arbeitsgruppen zu den spezifischen kardialen Expressionsgenen korrespondierende Promotoren, um den gewünschten kardialen Zelltyp in der heterogenen Population der „Embryoid Bodies“ zu markieren und zu isolieren (Tab. 10). So gelang es Franz et al. für den aus der Ratte isolierten Promotor MLC2v im transgenen Tiermodell eine ausschließlich herzspezifische Aktivität (199) nachzuweisen und mit Hilfe eines adenoviralen Vektors die Ventrikel-spezifische Expression zu zeigen (200). Mit Hilfe eines dem MLC2v-Promotor nachgeschalteten Markergens (EGFP) konnten innerhalb der sich aus murinen ES-Zellen differenzierenden „Embryoid Bodies“ die MLC2v-positiven Zellen markiert, angereichert und als ventrikuläre Kardiomyozyten charakterisiert werden (170). Dagegen diskriminieren Ansätze anderer Arbeitsgruppen zur Aufreinigung von Herzmuskelzellen mittels der murinen Promotoren α -MHC (20), (201); (202) und α -Aktin (203) nicht zwischen den verschiedenen Subtypen von Herzmuskelzellen. Stützten sich die genannten Veröffentlichungen zur Promotor-gesteuerten Markierung von Herzmuskelzellen auf während der Kardiogenese erst im späten Stadium aktivierte Gene und somit auf die Gewinnung von in der Differenzierung weit fortgeschrittenen Kardiomyozyten, so beschreiben jüngste Publikationen auch die Selektion von kardialen Vorläuferzellen. Fijnvandraat et al. markierten Kardiomyozyten mit Hilfe des herzspezifischen Promotors für den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiport und charakterisierten diese elektrophysiologisch als frühes Kammermyokard (204). Kardiale Vorläuferzellen erscheinen nicht nur für Zelltransplantationen, sondern auch für kardiales „Tissue Engineering“, die *in vitro*-Generierung von funktionellem Myokardgewebe, eine geeignete Quelle.

Promotor	Reportergen	Kommentar	Zelllinie	Publikation
MLC2v	EGFP	Evaluation der immunhistochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften MLC2v-positiver Kardiomyozyten + Aufreinigung	GSES	(170)
	ECFG	Markierung und Charakterisierung MLC2v-positiver Zellen	CGR8	(205)
α -Aktin	GFP	Evaluation der elektrophysiologischen Eigenschaften α -Aktin-positiver Kardiomyozyten	D3	(203)
α -MHC	Neomycin ^R	Evaluation der immunzytologischen und ultrastrukturellen Eigenschaften α -MHC-positiver Kardiomyozyten + Aufreinigung + Transplantation in <i>mdx</i> Mäuse	D3	(20)
	Neomycin ^R	Charakterisierung α -MHC-positiver Kardiomyozyten + Aufreinigung	R1, D3, CCE, J1	(201)
	Neomycin ^R	Charakterisierung α -MHC-positiver Kardiomyozyten + Aufreinigung	71	(202)
NCX-1	Neomycin ^R	Charakterisierung NCX-1-positiver Kardiomyozyten + Aufreinigung	HM1	(204)

Tab. 10: Promotor-gestützte Markierung von Kardiomyozyten aus murinen ES-Zellen

1.5.2. Nkx2.5 als Transkriptionsfaktor der Kardiomyogenese und Marker kardialer Vorläuferzellen

Bei der Suche nach einem geeigneten Promotor, mit dessen Hilfe man kardiale Vorläuferzellen markieren kann, bieten sich insbesondere Promotoren von Transkriptionsfaktorgenen an. Deren Expression geht während der Organogenese der Expression von strukturellen Genen zeitlich voraus. Interagierend mit extrazellulären Signalmolekülen spielen verschiedene Transkriptionsfaktoren während der Herzentwicklung eine Schlüsselrolle, indem sie die Expression nachgeschalteter Herzmuskel-spezifischer Gene kontrollieren (206); (195) (Abb. 9).

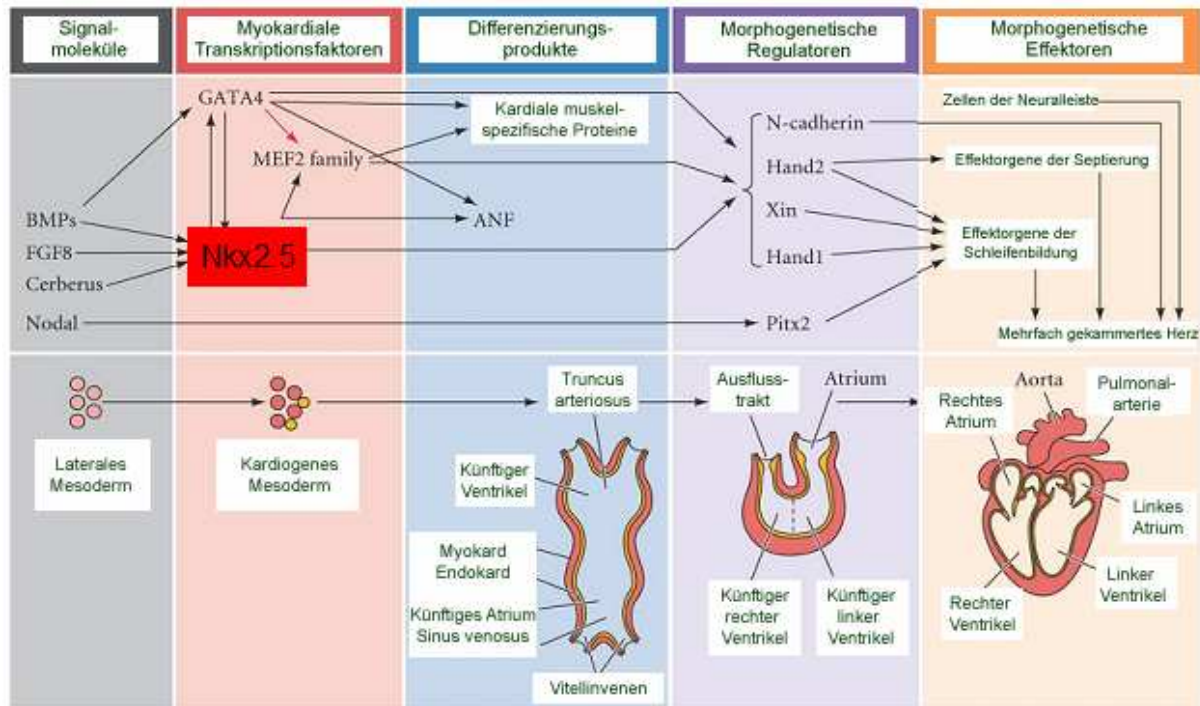


Abb. 9: Schematische Darstellung der Herzentwicklung

Dargestellt sind die Interaktionen von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Expression von kardialen Proteinen und morphogenetischen Faktoren. Die morphologischen Stadien der Herzentwicklung korrelieren mit der Aktivität der Transkriptionsfaktoren im Zellkern der kardialen Vorläuferzellen. Die Proteine der Nkx- und GATA-Familien spielen eine Schlüsselrolle für die Differenzierung zu Kardiomyozyten, die herzmuskelspezifische Proteine bilden und das Herzrohr ausbilden. Unter dem Einfluss von Hand1/2, Xin und Pitx2 beginnt die Bildung der Herzscheifen und der Herzkammern.

Abb. modifiziert nach (207)

Nkx2.5 (Synonym: Csx) ist einer der frühesten kardialen Marker in allen bisher untersuchten Wirbeltieren, darunter auch in Mäusen (208); (209) und Menschen (210); (211). Nkx2.5 stellt den prominentesten und den am höchsten konservierten bekannten Vertreter der Transkriptionsfaktorenfamilie der sog. „Nk2-Homeobox Genes“ dar, zu welcher bisher sechs zum „Tinman“-Gen in *Drosophila* homologe Gene (Nkx2.3, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9) gezählt werden (212). Während „Tinman“ in *Drosophila* für die Kardiogenese essentiell ist, kommt es in Nkx2.5-„Knock-out“-Mäusen zur Bildung des Herzrohrs und zur Expression der meisten kardialen Gene, jedoch unterbleibt die komplette kardiale Schleifenbildung (213). Die Nkx2.5-Genexpression beginnt bei Mäusen im kardiogenen Mesoderm an Embryonaltag 7,5, bevor die Gene α -Aktin und „ β -Myosin Heavy Chain“ aktiviert werden (209); (208). Dabei wird Nkx2.5 sowohl während der gesamten Phase des Herz-Primordiums als auch in adulten Kardiomyozyten exprimiert (209); (208); (195). Daneben wird Nkx2.5 im frühen Differenzierungsstadium auch im pharyngealen Endoderm aktiviert (214), wobei das

Expressionsniveau hier allerdings wesentlich niedriger liegt. Zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie GATA-4, mit welchem Nkx2.5 direkt interagiert (Abb. 10), und der Mef-2-Genfamilie reguliert Nkx2.5 die Kardiogenese. Die funktionelle Rolle des Nkx2.5 in der Embryogenese und im adulten Organismus ist in Abb. 10 dargestellt. Im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren weist Nkx2.5 ein nahezu ubiquitäres Expressionsmuster entlang der anterior-posterioren Achse des linearen Herzrohres auf (215); (206); (196).

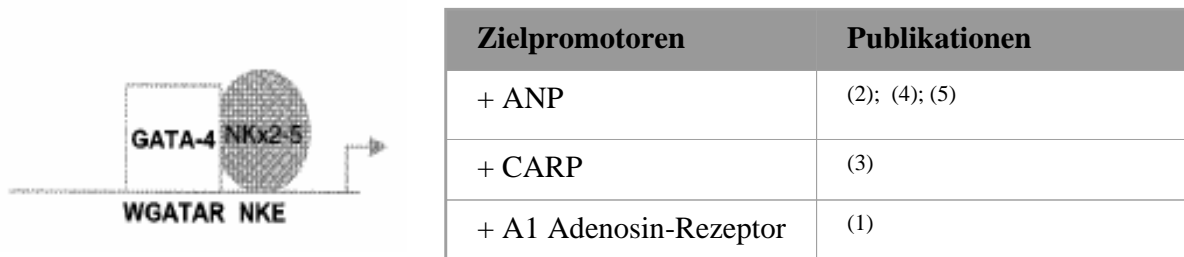


Abb. 10: Protein-Protein-Interaktionen zwischen Nkx2.5 und GATA-4.

ANP: Atriales natriuretisches Peptid; CARP: „Cardiac Ankyrin Repeat Protein“; +: Hochregulation

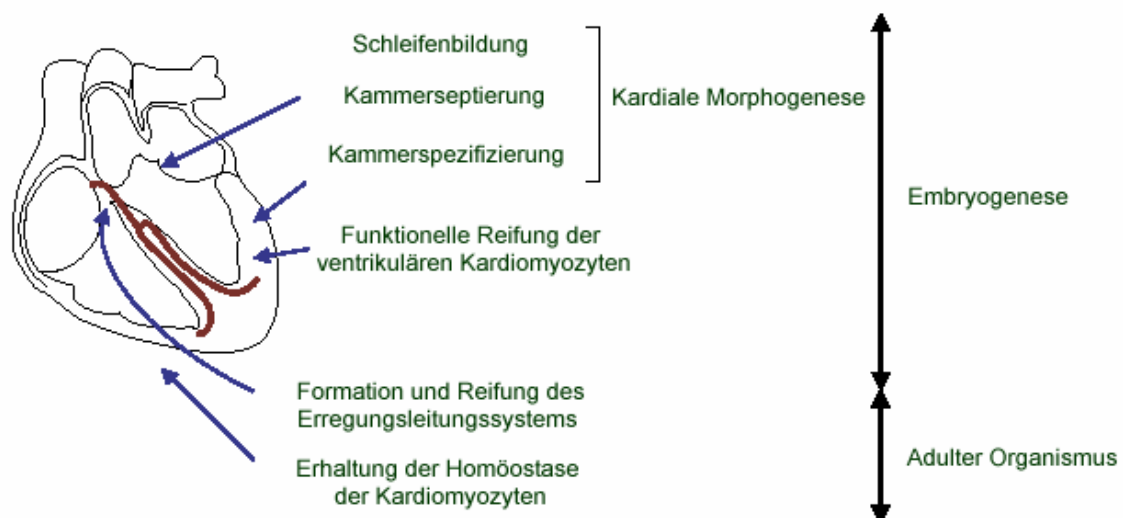


Abb. 11: Funktion von Nkx2.5 während der Embryogenese und im adulten Organismus.

Nkx2.5 spielt eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation der kardialen Entwicklung und der Homöostase des postnatalen Herzens. Nkx2.5 ist dabei vor allem in die kardiale Morphogenese und die funktionelle Reifung des arbeitenden Myokard und des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems einbezogen. Abb. Modifiziert nach (216)

Hidaka et al. generierten 2003 (195) eine murine ES-Zelllinie mit einem „Knock in“ des GFP-Reportergens in einen der beiden Nkx2.5-Loci. Diese Publikation zeigte, dass kammer-spezifische Differenzierung von Kardiomyozyten bereits in der frühen Phase der

Entwicklung der „Embryoid Bodies“ beginnt. Nkx2.5-positive Zellen repräsentierten kardiale Vorläuferzellen, die zu Sinusknotenzellen sowie atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten differenzierten. Diese Eigenschaften lassen das Nkx2.5-Gen als geeigneten Marker zur Promotor-gestützten Aufreinigung von kardialen Vorläuferzellen erscheinen.

1.5.3. Promotor-gestützte Aufreinigerungsverfahren

Bei der Promotor-gestützten Isolation von Herzmuskelzellen aus transgenen ES-Zellen finden bisher zwei Aufreinigerungsverfahren Anwendung: Antibiotikumselektion und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung.

1.5.3.1. Antibiotikumselektion

Die Antibiotikumselektion basiert auf der Transfektion von ES-Zellen mit einem Antibiotikum-Resistenzgen. Verschiedene Arbeitsgruppen transfizierten das Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle der kardial spezifischen Promotoren α -MHC („ α -Myosin Heavy Chain“) bzw. NCX-1 (Na⁺/Ca²⁺-Antiport), so dass unter Zugabe des Zellgiftes Geneticinsulphat (G418) nur die Zellen mit α -MHC- bzw. NCX-1-Promotoraktivität überleben, wodurch aus murinen ES-Zellen hoch aufgereinigte Kulturen von Kardiomyozyten gewonnen werden konnten (20), (201); (217), (204) (Tab. 11).

Resistenzgen	Promotor	Kommentar	Zelllinie	Publikation
Neomycin ^R	NCX-1	Aufreinigung NCX-1-positiver Kardiomyozyten	HM1	(204)
	α -MHC	Evaluation der immunzytologischen und ultrastrukturellen Eigenschaften α -MHC-positiver Kardiomyozyten + Aufreinigung + Transplantation in mdx Mäuse	D3	(20)
	α -MHC	Charakterisierung α -MHC-positiver Kardiomyozyten + Aufreinigung	R1, D3, CCE, J1	(201)
	α -MHC	Charakterisierung α -MHC-positiver Kardiomyozyten + Aufreinigung	71	(202)

Tab. 11: Promotor-gestützte Aufreinigung von Kardiomyozyten aus ES-Zellen mittels Antibiotikumselektion

Dieser Ansatz ist aufgrund der langen Inkubationszeit kritisch zu betrachten, weil er mit dem Nachteil von Resistenzentwicklung und möglichen schädlichen Auswirkungen des

Antibiotikums auf die Kardiomyozyten verbunden ist. Bei einer künftigen klinischen Anwendung der Zelltransplantation entsteht mit der Expression nicht humaner Proteine, die für eine Antibiotikumresistenz Voraussetzung sind, ein weiteres Problemfeld. Immunogene oder sogar toxische Reaktionen des Patienten könnten ausgelöst werden.

1.5.3.2. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Eine Alternative zur Antibiotikumselektion ist die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS). Weil für Kardiomyozyten kein hoch spezifisches endogenes Oberflächenprotein zur Verfügung steht, das über einen Fluoreszenz-konjugierten Antikörper markiert werden könnte, ist die Einführung eines Markergens notwendig. Der Arbeitsgruppe Franz gelang es 2000, ventrikuläre Kardiomyozyten mit Hilfe der Expression des *in vivo* grün fluoreszierenden Proteins EGFP unter der Kontrolle des für diesen Zelltyp spezifischen Promotors MLC2v („Myosin Light Chain 2 ventricular“) zu markieren und mittels FACS aufzureinigen (170). Jedoch ist die Durchflusszytometrie ein zeitaufwändiges Verfahren mit einer Sortierleistung von etwa 3000 Zellen pro Sekunde, um eine Reinheit von mindestens 95% bei einer Ausbeute von 50 bis 70% zu erzielen. Zur Zelltherapie eines Myokardinfarkts mit einer Nekrose von 10% wäre eine Masse von etwa 40g vitalen Myokards notwendig, was bei einer Masse von ca. 80ng pro Kardiomyozyt 10^8 Zellen entsprechen würde. Die zytometrische Sortierung würde eine für den klinischen Einsatz unrealistische Dauer von über 500 Stunden beanspruchen (218). Darüber hinaus gilt für die FACS-Methode wie für die Antibiotikumselektion die Problematik der Immunogenität von transgen exprimierten nicht humanen Proteine (219).

Reportergen	Promotor	Kommentar	Zelllinie	Publikation
ECFG	MLC2v	Markierung und Charakterisierung MLC2v-positiver Zellen	CGR8	(205)
EGFP	MLC2v	Evaluation der immunhistochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften MLC2v-positiver Kardiomyozyten + Aufreinigung	GSES	(170)
GFP	α -Aktin	Evaluation der elektrophysiologischen Eigenschaften α -Aktin-positiver Kardiomyozyten	D3	(203)

Tab. 12. Promotor-gestützte Aufreinigung von Kardiomyozyten aus ES-Zellen mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS)

1.6. Aufgabenstellung

Um die unter 1.5.3. dargestellten Hindernisse, welche sowohl die auf Antibiotikumselektion als auch die auf Durchflusszytometrie basierenden Ansätze zur zelltypspezifischen Sortierung von ES-Zellen mit sich bringen, zu überwinden, sollte in dieser Arbeit ein Protokoll zur Markierung und Isolation stabil transfizierter ES-Zellen mit Hilfe magnetischer Zellsortierung (MACS) etabliert werden (Abb. 12). Diese Methode gilt gegenwärtig als Goldstandard einer zellschonenden Zellseparation, verbunden mit einem geringen Zeitaufwand. MACS ermöglicht die Analyse von bis zu 10^{11} Zellen pro Stunde, wodurch die Sortierung großer Zellzahlen und die Identifikation von Populationen mit sehr geringer Frequenz ermöglicht werden.

Die Methode basiert auf der Expression einer intrazellulär trunkierten Variante des humanen CD4-Oberflächenmarkers, die eine Signaltransduktion verhindert und als humanes Protein eine immunogene Reaktion im Hinblick auf künftige klinische Anwendungen unwahrscheinlich macht.



Abb. 12: Prinzip der MACS-Aufreinigung

Mittels eines spezifischen, Fluoreszenz-konjugierten Erstantikörpers gegen ein Oberflächenprotein werden die Zielzellen markiert. Ein Eisenoxid-gekoppelter Zweitantikörper sorgt dafür, dass die Antikörper-beladenen Zielzellen in der Säulenmatrix aufgrund magnetischer Wechselwirkungen gebunden werden, während die nicht markierten Zellen die Säule passieren (Negativfraktion). Nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld können die Zielzellen eluiert werden (Positivfraktion). Abb. aus (220)

Die in dieser Arbeit etablierte MACS-Methode könnte ein bedeutendes Instrument für die Selektion eines spezifischen aus embryonalen Stammzellen differenzierten Zelltyps mit hoher Ausbeute und Reinheit darstellen und somit die Grundlage für künftige Zelltransplantationstherapien bilden.

Parallel zur Etablierung der MACS-Methode für embryonale Stammzellen sollte der Nkx2.5-Promotor isoliert und mit Hilfe des *in vivo*-Markers EGFP in embryonalen Stammzellen

charakterisiert werden. Bei Eignung dieses frühen kardialen Promotors zur Markierung kardialer Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen könnte die MACS-Methode auf das Nkx2.5-Promotor-System übertragen werden und die effektive und zellschonende Selektion von kardialen Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen ermöglichen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid, Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Grünenthal, Aachen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Remel, Lenexa, USA
Kanamycin	Gibco, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
α-[³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
Phenol	Roth, Karlsruhe
[³⁵ S]-Methionin (1000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Allgemeine Laborchemikalien und Lösungsmittel in p.a. Qualität	

2.1.2. Enzyme und Proteine

Alkalische Phosphatase (CIP)	Biolabs, Frankfurt
BSA (Bovines Serumalbumin)	Biolabs, Frankfurt
Herculase-DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Lysozym	Sigma, Deisenhofen

Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Protein-Molekulargewichtsstandard Low	Pharmacia, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	Biolabs, Frankfurt
Reverse Transkriptase	Amersham, Braunschweig
RNase-Inhibitor	Stratagene, Heidelberg
T4 DNS-Ligase	Biolabs, Frankfurt
Taq-DNA-Polymerase	Amersham, Braunschweig

2.1.3. Zellkultur

2.1.3.1. Zellen

GSES-Zellen	Deriviert vom Mäusestamm Agouti 120/SV Bezogen von Dr. M. Aguet (ISREC, Lausanne, Schweiz)
-------------	--

2.1.3.2. Zellkultur-Materialien

DMSO	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose	Gibco, Karlsruhe
FCS	Biochrom, Berlin
Gelatine, porcine	Sigma, Deisenhofen
Geneticinsulphat (G418)	Gibco, Karlsruhe
Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
LIF (ESGRO)	Chemicon International, Temecula, USA
MEM	Gibco, Karlsruhe
PBS (ohne Calcium, Magnesium, Natriumbikarbonat)	Gibco, Karlsruhe
Penicillin(U/ml)/Streptomycin (µg/ml)	Gibco, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Gibco, Karlsruhe
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
α-Monothioglycerol	Sigma, Deisenhofen

TNT <i>in vitro</i> -Transkriptions- und Translations-Kit	Promega, Madison, USA
Ultraschallbad	Sonorex RK 1065 Bandelin, Berlin
UV-Lampen	Mercury Short Arc Photooptic Lamp HBO Osram, München
Videokamera	Gel Doc 2000 Bio-Rad, München
Wasserbad	W12 Medingen, Freital
Zentrifugen	BR 4 Jouan, Unterhachingen Zentrifuge Mikro 20 Hettich, Bäch, Schweiz

2.1.6. Medien, Puffer und Lösungen

Kultivierungsmedium undifferenzierter Zellen	Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose 10% FCS 100 U/ml Penicillin, 0,1µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 x MEM Nichtessentielle AS 1000 U/ml LIF 0,1mM β-Mercaptoethanol zur Selektion: 0,4 g/l G418
Kultivierungsmedium differenzierter Zellen	500 ml Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium 10% FCS 100 U/ml Penicillin, 0,1µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 x MEM Nichtessentielle AS 0,004 % α-Monothioglycerol
TELT-Puffer (pH 7,5)	50 mM Tris 62,5 mM EDTA 2,5 M LiCl 0,4 % Triton X-100
MACS-Puffer (pH 7,2)	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA

TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Acetat (pH 8,0) 950 mM Essigsäure 50 mM EDTA
YT-Medium mit Kana (pH 7,2)	85 mM KCl 30 mM K ₂ HPO ₄ 5 mM MgSO ₄ 1 mM EGTA 2 mM Na ₂ ATP 5 mM Na-Pyruvat 5 mM Kreatin 20 mM Taurin 20 mM Glucose 50µg/ml Kanamycin
YT-Platten	
PBS	
TE-Puffer	1mM EDTA (pH 8,0) 10 mM TrisHCl (pH 8,0) 20µg/ml RNase
Phenol	Gepuffert in TE, pH 8,0 0,1% Hydroxychinolin
Phenol/Chloroform	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol 25:24:1
TE	
Auftragspuffer SoIE 2x für SDS-PAGE	100 mM TrisHCl, pH 6,8 4% Glycerin 6% SDS 0,02% Bromphenolblau 200 mM DTT
MACS-Puffer (pH 7,4)	PBS mit 2 mM EDTA 0,5% BSA

Medien, hitzestabile Lösungen, Glasbehälter und Kunststoffmaterialien wurden 20 min bei 134°C und 2 bar autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße 0,2 µm).

2.1.7. Antikörper

PE anti-human CD4	BD Pharmingen, Heidelberg
IgG1-PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.8. Plasmide, Oligonukleotide und Längenstandards

2.1.8.1. Plasmide

pEGFP	BD Clontech, Heidelberg
MACSelect4.I	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
pEGFP N1	BD Clontech, Heidelberg
pPGK-Neomycin	Schneider (GSF München), nicht veröffentlicht

2.1.8.2. Oligonukleotide

Die gereinigten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, bezogen.

Folgende Oligonukleotide wurden als PCR-Primer zu Klonierungszwecken eingesetzt:

Δ CD4-BamH1 sense	5'GTTGCGGATCCCGCCACCATGAACCGGGGAGTCCCTTT TAG-3'
Δ CD4-Not1 anti-sense	5'-GAGTCGCGGCCGCTTCAGTGCCGGCACCTGAC-3'
PGK-BamH1 anti-sense	5'-CTTAGGATCCCAGGTCGAAAGGCCCGGAG-3'
PGK-Xho1 sense	5'-CTGACTCGAGCAGTACTTTTCCCAAGGCAG-3'

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die PCR zur Sequenzierung der klonierten Plasmide eingesetzt:

EGFP-4104 sense	5'-CCTGCGTTATCCCCTGATTC-3'
EGFP-149 anti-sense	5'-GTGCAGATGAACTTCAGGG-3'
EGFP-1561 anti-sense	5'-CATTCCACAGCTGGTTCTTTCC-3'
EGFP-1584 anti-sense	5'-CATTCCACAGCTGGTTCTTTCC-3'
Δ CD4-BamH1 sense	5'GTTGCGGATCCCGCCACCATGAACCGGGGAGTCCCTTT TAG-3'
Δ CD4-143 anti-sense	5'-CTCTTCTTCTGGGAAGCTG-3'
Δ CD4EGFP-1861 sense	5'-GACAACCACTACCTGAGCAC-3'

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die PCR zur Kontrolle stabiler Integration der transfizierten Plasmide in den GSES-Zellen eingesetzt:

Δ CD4-BamHI sense	5'GTTGCGGATCCCGCCACCATGAACCGGGGAGTCCCTTT TAG-3'
Δ CD4-Not1 anti-sense	5'-GAGTCGCGGCCGCTTCAGTGCCGGCACCTGAC-3'
Δ CD4-143 anti-sense	5'-CTCTTCTTCTGGGAAGCTG-3'

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die Nested-PCR bzw. die PCR mit radioaktiver Markierung zur Quantifizierung der Expression von Markergenen eingesetzt:

mBrachyury-580 sense	5'-GAGAGAGAGCGAGCCTCCAAAC-3'
mBrachyury-810 anti-sense	5'-CTGTCCGGTGCTCTTCATTTTC-3'
mGATA4-1058 anti-sense	5'-GTGGCATTGCTGGAGTTAC-3'
mGATA4-641 sense	5'-GAGAGTGTGTCAATTGTGGG-3'
mHiston H4-189 anti-sense	5'-CAGGAACACCTTCAGCACAC-3'
mHiston H4-64 sense	5'-GTTCTCCGCGATAACATCC-3'
mHNF4-6 sense	5'-ACTCTCTAAAACCCTTGCCG-3'
mHNF4-640 anti-sense	5'-CCAGAAGGAGTTCGCAGAAG-3'
mInvolucrin-270 anti-sense	5'-CTTTTTCACCTGCAGCTGCTG-3'
mInvolucrin-7 sense	5'-CATCAACACACACTGCCAGTG-3'
mMef2c-1326 sense	5'-CCCCTTCGAGATACCCACAA-3'
mMef2c-1476 anti-sense	5'-GAAGGTCTGGTGAGTCCAATGG-3'
mNCX1-2050 sense	5'-GGAAAAGAGATGTATGGCCAACC-3'
mNCX1-2203 anti-sense	5'-GCCCCATTTCCGCAATG-3'
mNeurogenin-18 sense	5'-GACCTGCATCTCTGATCTCG-3'
mNeurogenin-680 anti-sense	5'-GGAAAGGAGAAAAGGGGATC-3'
mNkx2.5-1314 sense	5'-ACTATGCCCTGTCCCTCGGAT-3'
mNkx2.5-1332 sense	5'-GATTTACACCCACCCTCG-3'
mNkx2.5-1454 anti-sense	5'-GAATCCGTCGAAAGTGCCC-3'
mNkx2.5-1471 anti-sense	5'-CTCCCGGTCCTAGTGTGGAA-3'

2.1.8.3. Längenstandards

1 kb-Leiter	Biolabs, Frankfurt
100 bp-Leiter	Biolabs, Frankfurt
λ -HindIII-Längenmarker	Biolabs, Frankfurt

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von Bakterien

E.coli-Stämme wurden bei 37°C unter Kanamycinselektion (50µg/ml) für 14 – 16 h bei 225 upm und 37°C inkubiert. Dabei wurden für die Plasmidpräparation zu analytischen Zwecken (s. 2.2.2.1.2.) 3 - 4 ml YT-KANA-Medium mit einer Einzelkolonie, für die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA (s. 2.2.2.1.2.) 250 ml YT-KANA-Medium mit 1 ml einer Bakterien-Übernacht-Kultur angeimpft.

2.2.1.2. Transformation von Bakterien nach der Hitzeschockmethode

Zur Transformation wurden 50 µl aufgetauter kompetenter TOP10-Zellen mit 7,5 µl des Ligationsansatzes (s. 2.2.2.4.) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock (42°C) erfolgte die Inkubation der Zellen zur Expression der Antibiotikaresistenz mit 250 µl SOC-Medium 1h bei 37°C im Schüttler (225 upm). 90% bzw. 10% des Ansatzes wurden auf YT-KANA-Platten mit einem Drygalski-Spatel ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2. DNA-Methoden

2.2.2.1. Präparation und Reinigung von DNA

2.2.2.1.1. Präparation genomischer DNA

Die Präparation genomischer DNA aus GSES-Zellen erfolgte durch Entnahme eines 37,5 µl Aliquots der nach einem Passagiervorgang in 250µl Kultivierungsmedium resuspendierten Zellen. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (Jouan-Zentrifuge, 2500 upm, 3 min, Raumtemperatur) erfolgte die Resuspension in 10µl Proteinase K (125 µg/ml) und 5µl SDS (17 µM) sowie anschließend eine Inkubation (37°C, 1h; 95°C, 15 min) zur Freisetzung der DNA.

Nach Abzentrifugation der gefällten Proteine (13 000 upm, 5 min, Raumtemperatur) wurde die DNA aus dem Überstand für weitere Untersuchungen mittels PCR (s. 2.2.2.5.2.) eingesetzt.

2.2.2.1.2. Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde entweder zur Gewinnung großer DNA-Mengen mit dem Qiagen MaxiKit nach den Angaben des Herstellers oder als Mini-Präparation zu analytischen Zwecken nach folgender Lyse-Methode (TELT-Präparation) isoliert: Das Bakteriensediment

einer 3-4 ml Übernachtskultur (Jouan-Zentrifuge, 5000 upm, 5 min, Raumtemperatur) wurde in 150 µl TELT-Puffer und 15µl Lysozym durch Vortexen resuspendiert. Die anschließende Inkubation über 5 min bei Raumtemperatur diente der Bakterienlyse. Die Denaturierung des Lysozyms und der Bakterienproteine erfolgte durch Kochen bei 95°C über 120 s. Chromosomale DNA und Proteine präzipitierten durch Inkubation auf Eis über mindestens 5 min; sie wurden durch Zentrifugation (14 000 upm, 20 min, 4°C) abgetrennt. Die im Überstand vorhandenen Plasmide wurden durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt (5 min, Raumtemperatur) und abzentrifugiert (14000 upm, 10 min, Raumtemperatur). Nach einem Waschschrift mit 70%-igem Ethanol wurde die Plasmid-DNA luftgetrocknet (10 min), in 25-30 µl TE und RNase resuspendiert und über 5 min bei 65°C zum Abbau der RNA durch die zugesetzte RNase inkubiert. Für analytische Restriktionsverdau wurden 1-2 µl dieser Plasmid-DNA-Lösung eingesetzt.

2.2.2.1.3. Phenolextraktion

Um Proteine abzutrennen, die spätere Schritte bei der DNA-Verarbeitung beeinträchtigt hätten, wurden die DNA-Lösungen durch Zugabe eines gleichen Volumens Phenol bzw. Phenol/Chloroform und kräftiges Schütteln am Vortexer extrahiert. Nach Zentrifugation (13 000 upm, 3 min, 4°C) konnte die wässrige, DNA-enhaltende Oberphase abgenommen werden. Die Entfernung der Phenolreste erfolgte durch zweimaliges Ausschütteln mit Chloroform, die Fällung der DNA im Anschluss mit Ethanol.

2.2.2.1.4. Ethanolfällung

Bei DNA-haltigen Lösungen wurde durch Zugabe von TE (pH 8,0) zunächst ein Volumen von mindestens 150 µl eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 Volumen Ethanol (96%, vorgekühlt auf -20°C) und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2). Nach kräftigem Schütteln am Vortexer wurde bei -20°C mindestens 30 min gefällt, danach das Präzipitat bei 4°C für 20 min bei 14000 upm (Jouan-Zentrifuge) abzentrifugiert und mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung (10 min) wurde die DNA im gewünschten Volumen TE (pH 8,0) gelöst.

2.2.2.1.5. Isopropanolfällung

Zur DNA-Lösung wurde 1 Volumen Isopropanol gegeben und bei 4°C für 60 min zentrifugiert. Waschen und Lösen des Sediments erfolgte wie für die Ethanolfällung beschrieben.

2.2.2.2. Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten

2.2.2.2.1. Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Ein Unit (U) Restriktionsendonuklease schneidet definitionsgemäß 1 µg Referenz-DNA in einer Stunde bei 37°C. Die benötigte Enzymmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$U = m_p \times (l_{\text{Ref}} \times n_p) / (l_p \times n_{\text{Ref}})$$

m_p : Masse des zu spaltenden Plasmids; l_p : Länge des zu spaltenden Plasmids; n_p : Zahl der Schnittstellen des Plasmids;

l_{Ref} : Länge der Referenz-DNA (λ -DNA) ; n_{Ref} : Zahl der Schnittstellen der Referenz-DNA

In der Praxis wurde das Doppelte der rechnerisch benötigten Menge an Restriktionsenzym eingesetzt. Analytische Verdauungen wurden mit ca. 500 ng Plasmid-DNA in den vom Enzymhersteller mitgelieferten Puffern in einem Volumen von 10 bis 30 µl durchgeführt (37°C, 1 h). Die Analyse der entstandenen Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.2.2.2.). Präparative Verdauungen erfolgten mit ca. 5 µg DNA in den entsprechenden Puffern in einem Gesamtvolumen von 100 µl über 4 bis 6 Stunden. Erhaltene Fragmente wurden nach Auftrennung im Agarosegel, wie unter 2.2.2.2.3. beschrieben, isoliert.

2.2.2.2.2. Analytische Gelelektrophorese

Zur Analyse von isolierter DNA (PCR-Produkte, Plasmide nach Restriktionsverdau) wurde diese in Agarosegelen (0,8 bis 2%, abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente) aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in TAE-Puffer unter Kochen gelöst, nach Abkühlung 0,5 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben und die flüssige Agaroselösung in die entsprechende Gelapparatur gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel mit TAE-Elektrophoresepuffer überschichtet, die Proben mit 0,1 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 60-120 Volt. Die Fragmente wurden auf einem Transilluminator (260 und 355 nm) sichtbar gemacht und mit einer Videokamera fotografiert. Als Größenstandards wurden die 100 bp-Leiter, die 1 kbp-Leiter und der λ -HindIII-Marker verwendet.

2.2.2.2.3. Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Elektrophorese und Ausschneiden der gewünschten Bande aus 1%-igen Agarosegelen mit dem QiagenGelExtraktionskit nach Herstellerangaben.

2.2.2.3. Subklonierung isolierter DNA-Fragmente

Um bei der Ligation eine Religation der Vektoren zu verhindern, wurden mit dem Enzym CIP („Calf Intestine Phosphatase“) die 5`-Phosphatgruppen entfernt. Hierzu wurden zu dem hydrolysierten Vektor 1 Volumen 1x CIP Puffer und 3 U CIP zugegeben. Das CIP-Enzym zeigt bereits unter diesen nicht optimalen Pufferbedingungen volle Aktivität. Die Inkubation dieses Ansatzes erfolgte über einen Zeitraum von 1 h bei 37°C. Anschließend wurde nach präparativer Gelelektrophorese (s. 2.2.2.2.3.) die erwünschte Vektorbande aus der Agarose isoliert und zur Ligation eingesetzt.

2.2.2.4. Ligation

Für die Ligation wurde ausgehend von der Dugaiczky-Formel (221) die zu klonierende Insert-Fragment-DNA mit einem zwei- bis vierfachen molaren Überschuss zur entsprechend vorbereiteten Vektor-DNA (50 – 100 ng) gegeben. Die Inkubation erfolgte in 15 µl Reaktionspuffer mit 0,5 U T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur über 1 h. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde zur Transformation von E.coli-Bakterien eingesetzt (s. 2.2.1.2.).

2.2.2.5. Polymerase-Ketten-Reaktion

2.2.2.5.1. Amplifikation von Fragmenten für Klonierungszwecke mittels PCR

DNA-Fragmente, bei denen geeignete Restriktionsschnittstellen zur Umklonierung in einen anderen Vektor fehlten, wurden mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden dabei so gestaltet, dass sie zusätzlich zum genspezifischen Teil entsprechende Schnittstellensequenzen aufwiesen. Zur Amplifikation im automatisierten Thermocycler wurden ca. 10 ng linearisierte Matrizen-DNA eingesetzt, wobei das Volumen des Reaktionsansatzes 50 µl betrug. Als Enzym wurde Pfu-Polymerase wegen der relativ geringen Fehlerrate verwendet. Die Errechnung der Schmelztemperatur der Primerpaare erfolgte anhand der folgenden Formel:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \times \Sigma(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times \Sigma(\text{G}+\text{C})$$

In der Praxis wurde eine Annealingtemperatur gewählt, die um 3 - 4°C unter der mit oben stehender Formel errechneten Temperatur lag. Für die Enzymreaktion wurden 72° C gewählt; dabei betrug die Zeit ca. 1 min pro 1000 bp. Annealing und Denaturierung erfolgten jeweils über 1 min. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt. Zum Schutz vor Verdunstung erfolgte eine Überschichtung der Reaktionsansätze mit Mineralöl. Nach Gelaufreinigung oder nach Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung konnten die amplifizierten DNA-Fragmente in H₂O bidest aufgenommen werden.

2.2.2.5.2. Analyse stabiler Klone mittels PCR aus genomischer DNA

Die Untersuchung auf stabile Integration des transfizierten Plasmids in den einzelnen Klonen erfolgte mittels PCR aus der genomischen DNA der GSES-Zellen, die wie unter 2.2.2.1.1. beschrieben gewonnen wurde. Basierend auf der cDNA-Sequenz der über Transfektion eingebrachten Reportergene (Δ CD4, EGFP, bzw. Δ CD4EGFP) wurden geeignete Primer entworfen. 1 μ l DNA wurde bei einem Gesamtvolumen von 10 μ l eingesetzt, wobei Taq-Polymerase (0,625 U) als Enzym Verwendung fand. Nach 40 Zyklen wurden die PCR-Produkte mit 1 μ l DNA-Auftragspuffer (10x) versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.2.5.3. PCR mit radioaktiver Markierung zur Quantifizierung der Expression von Markergenen

Hier wurden gemäß der cDNA-Sequenzen der untersuchten Markergene Primerpaare konstruiert, wobei die Schmelztemperaturen nach obiger Formel (s. 2.2.2.5.1.) errechnet wurden. Als Kontrolle zur Standardisierung diente Histon H4. 1 μ l RT-Ansatz, der die cDNA-Matrize enthielt, wurde direkt für die PCR eingesetzt; als Negativkontrolle diente die entsprechend verdünnte RNA (-RT). Taq-Polymerase (0,625 U) fand als Enzym Verwendung. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 μ l enthielt zusätzlich α^{32} P-CTP mit einer Aktivität von 0,5 μ C. Es wurden 38 bis 40 Zyklen durchgeführt und der Ansatz nach der Reaktion auf 30 μ l verdünnt sowie zusätzlich mit 3,3 μ l Auftragspuffer versetzt. Ein Aliquot wurde auf ein 7,5%-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, wobei der Gellauf bei 140 V erfolgte. Nach Abklatschen auf Whatman-Papier wurde das Gel unter Vakuum bei 80 °C getrocknet. Die Quantifizierung der radioaktiv markierten PCR-Produkte im getrockneten Gel erfolgte mittels Phosphorimager.

2.2.2.5.4. Nested PCR zur Kontrolle der Expression von Markergenen

Für Markergene, bei welchen das verwendete Primerpaar in der nach 2.2.2.5.3. durchgeführten PCR zu Fehlhybridisierungen und damit zu unspezifischen Banden oder keinem sichtbaren Produkt führte, wurde auf das Prinzip der Nested-PCR zurückgegriffen: Nach einer PCR ohne radioaktive Markierung (1 μ l RT-Ansatz; 0,625 U Taq-Polymerase; 40 Zyklen) wurde aus dem 10 μ l-Ansatz 1 μ l als Matrize für eine zweite, ebenfalls nicht radioaktive Amplifikation (35 Zyklen) mit anderen Primern entnommen, wobei das zweite Primerpaar innerhalb des ersten lag. Auf diese Weise wurden die falschen Amplifikationsprodukte der ersten Runde ausgesondert.

2.2.3. RNA-Methoden

2.2.3.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus GSES-Zellen

Mit Hilfe des RNAeasy-Mini-Kits (Qiagen) wurden aus mittels Durchflusszytometrie sortierten Zellen (s. 2.2.7.2.), die auf $4,5 \times 10^3$ Zellen pro Fraktion titriert und abzentrifugiert (Jouan-Zentrifuge, 2500 upm, 3 min, Raumtemperatur) worden waren, die Gesamt-RNA isoliert. Dies erfolgte nach den Angaben des Herstellers entsprechend dem Protokoll für tierische Zellen. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80 °C

2.2.3.2. Reverse Transkription

Für die reverse Transkription zur Herstellung der Gesamt-cDNA wurden je $2\mu\text{l}$ der isolierten Gesamt-RNA (s. 2.2.3.1.) eingesetzt. Die Reaktion mit 30 U AMV-reverser Transkriptase erfolgte in einem Volumen von $20\mu\text{l}$ für 60 min bei 37 °C entsprechend der Anleitung, es wurden allerdings zusätzlich 24 U RNase-Inhibitor eingesetzt. Anschließend wurde das Volumen durch Zugabe von $20\mu\text{l}$ H_2O bidest verdoppelt, die Lösung auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Für die RT-PCR konnten von dieser Verdünnung direkt je $1\mu\text{l}$ der cDNA-Matrize eingesetzt werden.

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. *in vitro*-Translation

Die *in vitro*-Translation wurde mit nicht linearisiertem rekombinanten SP6- $\Delta\text{CD4EGFP}$ -Plasmid als DNA-Matrize gemäß der Anleitung mit einem TNT-Kit durchgeführt. Bei diesem vereinfachten Verfahren können die Transkription und die Translation der DNA-Matrize im selben Reaktionsansatz erfolgen. Das Gesamtvolumen betrug pro Ansatz $50\mu\text{l}$, der Einbau von $[\text{ }^{35}\text{S}]\text{-Methionin}$ ($1\mu\text{l}$; 10 mCi/ml) diente der radioaktiven Markierung, um das *in vitro* translatierte Protein nach SDS-PAGE darzustellen.

2.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde mit diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli (222) in einer Mini-Gelapparatur durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das 10% Polyacrylamidgel mit dem gleichen Volumen 2x SoIE für 5 min bei 95 °C gekocht. Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmolekulargewichtsstandard verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V .

2.2.5. Zellkulturmethoden

Die Medien und Lösungen für die Zellkultur waren autoklaviert oder steril filtriert und wurden vor Gebrauch i. d. R. auf 37°C vorgewärmt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.5.1. Kultivierung der Zellen

GSES (murine embryonale Stammzellen) wurden in undifferenziertem Zustand in oben beschriebenen Kultivierungsmedium mit LIF gezogen, wodurch eine spontane Differenzierung der ES-Zellen verhindert wurde. Dabei erfolgte die Kultivierung der undifferenzierten Zellen ohne „Feederzellen“. Es fanden in der Regel 10cm-Schalen (10 ml Medium) Verwendung, welche zuvor mit 0,1%-iger denaturiertes Kollagen enthaltender porciner Gelatine beschichtet worden waren, um die Zelladhärenz zu verbessern (mind. 15 min, 37 °C). Die Passagierung der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 60-90%: Nach zweimaligem Waschen mit PBS ohne Calcium (jeweils 8 ml) wurden die Zellen mit 1 ml 1x Trypsin-EDTA im Brutschrank für 3-5 min inkubiert, sodass sie sich durch leichtes Klopfen ablösen ließen. Die Zugabe von 10 ml des FCS-haltigen Kultivierungsmediums stoppte die Trypsinierung. Nach Zentrifugation (Jouan-Zentrifuge, 1200 upm, Raumtemperatur, 5 min) und Aufnahme des Sediments in Medium wurden diese in einer Verdünnung von 1:5 - 1:20 erneut ausgesät.

2.2.5.2. Konservierung der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte unter schrittweiser Zugabe des vorgekühlten Einfriermediums mit einem Titer von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zellen wurden danach langsam in einem Kryobehälter bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.5.3. Transfektion mittels Elektroporation

Vor der Transfektion wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS bei einem Titer von 5×10^6 / 800µl aufgenommen und zusammen mit 10µg der linearisierten, Phenol-Chloroform-gereinigten Plasmid-DNA in eine 0,4 cm Elektroden-Küvette pipettiert. Nach fünfmaligem Schwenken der Küvette erfolgte die Elektroporation bei 240 V und 500 µF, wobei die Zeitkonstante zwischen 6,5 und 7,5 s lag (Bio-Rad Gene Pulse II). Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 90% bzw. 10% der Zellsuspension auf gelatinisierte Zellkulturschalen mit 10 ml Medium ausgesät.

2.2.5.4. Selektion mit Geneticinsulphat und Separation von Einzelklonen

Die Selektion stabiler Klone wurde ca. 24 h nach Elektroporation unter Zugabe von 0,4 mg Geneticinsulfat (G418) pro ml Medium begonnen. Nach täglichem Mediumwechsel konnten Einzelzellklone nach 9 - 11 Tagen separiert werden. Hierfür wurden die Schalen zweimal mit 8 ml PBS ohne Calcium gewaschen und anschließend mit 4 ml PBS überschichtet. Eine Zellkolonie wurde mit einer 1000µl-Eppendorf-Pipette in 40µl PBS aufgenommen, danach in 50µl 1x PBS-EDTA für 5 min inkubiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in einer 200µl-Eppendorf-Pipette vereinzelt. Anschließend erfolgte eine Umsetzung in ein Loch einer 24-well-Zellkulturplatte mit 1 ml G418-Kultivierungsmedium. Pro transfizierten Konstrukts wurden 24 – 36 Klone separiert und bis zu ca. 80% Konfluenz weitere vier bis sieben Tage unter Selektion gezogen. Danach erfolgte aus 15% der Zellen eines Klons die Extraktion der genomischen DNA (s. 2.2.2.1.1.), um diesen hinsichtlich einer stabilen Integration des transfizierten DNA-Konstrukts mittels PCR zu testen (s. 2.2.2.5.2.). Die restlichen Zellen wurden wie oben beschrieben passagiert und weiter kultiviert.

2.2.5.5. Differenzierung

Die Differenzierung der GSES-Zellen erfolgte in oben beschriebenem Differenzierungsmedium ohne LIF. Nach Trypsinierung und Abzentrifugieren wurden ca. $1-5 \times 10^6$ Zellen in 10ml Differenzierungsmedium resuspendiert und in diesem Volumen in 10cm-Bakerischalen gezogen, welche eine Zelladhärenz verhindern und somit eine Suspensionskultur ermöglichen. Dabei bilden die Zellen Aggregate aus, aus denen sich sog. „Embryoid Bodies“ (EBs) entwickeln. Nach sechstägiger Suspensionsphase bei mehrmaligem Mediumwechsel wurden die Zellen in gelatinierte 24-Loch-Zellkulturplatten (ca. 20 - 50 EBs pro Loch) mit Differenzierungsmedium umgesetzt, wobei die Zellen innerhalb von 1 – 2 Tagen adhärten und sich nach frühestens 4 Tagen schlagende Areale bildeten.

2.2.6. Magnetische Zellsortierung (MACS, Magnetic Cell Sorting)

2.2.6.1. Vereinzeln der Zellen

Zur Zellvereinzeln vor Antikörperfärbung und magnetischer Zellsortierung wurden Collagenase (30µM; 1 ml pro 10cm-Schale; 40 min, 7°C) oder PBS-EDTA (5 mM EDTA; 1 ml pro 10cm-Schale; 15 min bzw. 30 min, 37°C) eingesetzt, nachdem die Zellen zuvor zweimal mit PBS ohne Calcium gewaschen worden waren. Die vereinzeln Zellen wurden abzentrifugiert (Jouan-Zentrifuge, 2500 upm, 3 min, Raumtemperatur) und in 100µl MACS-Puffer resuspendiert.

2.2.6.2. Markierung mit Hilfe des indirekten Antikörpersystems

Die Markierung der Zielzellen für die MACS-Aufreinigung erfolgte mit α -PE-„Micro-Beads“, die gegen einen entsprechend konjugierten α CD4-Erst-Antikörper gerichtet sind. Dieses sog. „indirekte Markierungssystem“ wurde ausgewählt, weil bekannt ist, dass es für Zellseparationen mit dem Ziel eines möglichst hohen Reinheitsgrades besser geeignet ist als das weniger sensitive direkte Verfahren mit einem gegen das CD4-Molekül gerichteten magnet-gekoppelten Antikörper (220).

Die GSES-Zellen wurden hierfür gemäß 2.2.4.1. vereinzelt und nach dem Antikörper-Protokoll des jeweiligen Herstellers markiert. Dabei wurden $3-5 \times 10^6$ GSES-Zellen mit α -CD4-MicroBeads bzw. mit α -CD4-PE-Antikörper und anschließend α -PE-„Micro-Beads“ inkubiert.

Zur Bestimmung der Effektivität der Zellaufreinigung wurde nach MACS sowohl die Positiv-Fraktion als auch die Negativ-Fraktion mit α -CD4-PE-Antikörper inkubiert.

2.2.6.3. Separation mittels Mini-MACS

Die magnetische Separation wurde mit MS-Säulen (Mini-MACS) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden $3-5 \times 10^6$ Zellen (s. 2.2.6.2.) auf eine Säule gegeben. Als Puffer fand der von Miltenyi Biotec empfohlene MACS/FACS-Puffer Verwendung, der zuvor mindestens 15 min im Ultraschallbad entgast und auf Eis gekühlt worden war. Nach dem Separationsprozess wurden die positiv selektierten Zellen auf eine neue, frisch präparierte Säule gegeben, und ein zweiter Selektionsschritt wurde durchgeführt.

2.2.7. Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting)

Zur Analyse der Δ CD4-Expression (PGK- Δ CD4- und PGK- Δ CD4EGFP-Zellen) sowie der EGFP-Expression (PGK-EGFP- und Nkx2.5-EGFP-Zellen) wurde eine 3-Farben-Durchflusszytometrie durchgeführt. Zudem wurden Nkx2.5-EGFP-Zellen mit Hilfe eines FACS-Sortiergerätes entsprechend ihrer EGFP-Expression selektiert.

2.2.7.1. Vorbereitung der Proben

Δ CD4 exprimierende Zellen wurden wie unter 2.2.6.1. beschrieben vereinzelt, während EGFP exprimierende Zellen entsprechend dem Protokoll eines Passagiervorgangs mit 1x Trypsin-EDTA behandelt wurden (s. 2.2.5.1.).

Die Markierung der Δ CD4 exprimierenden Zellen erfolgte wie unter 2.2.6.2. beschrieben. Für die FACS-Auswertung dienten dabei 1×10^6 mit α -IgG1-PE-Antikörper markierte Zellen

(Protokoll des Antikörper-Herstellers) als Isotypenkontrolle, 1×10^6 mit α -CD4-PE-Antikörper markierte native, nicht transfizierte GSES-Zellen als weitere Kontrolle für unspezifische Antikörperbindungen. Als Negativkontrolle wurden sowohl für die EGFP- als auch die CD4-Expressionsanalysen 1×10^6 native GSES-Zellen verwendet.

Analytische Messungen wurden in FACS-MACS-Puffer (250 – 1000 μ l pro Probe) nach Zugabe von Propidiumjodid (0,05 mg/ml) zur Markierung der toten Zellen durchgeführt, während die FACS-Zellsortierung in 2 ml Differenzierungsmedium mit Propidiumjodid erfolgte.

2.2.7.2. Analytisches FACS

Bei jeder Messung wurden als repräsentative Auswahl 10.000 Zellen analysiert. Die Laser-Exzitation lag für alle drei Farbstoffe bei 488 nm, der Emissions-Spektralmessbereich für EGFP bei 515-545 nm, für das Fluorochrom PE bei 564-606 nm und für PI bei > 650 nm. Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer „FACS Calibur“, die Auswertung mit dem Programm „Cell-Quest“.

Die Zellen wurden zunächst im Vorwärts- und im Seitwärtsstreulicht entsprechend ihrer Größe und Granularität erfasst. Mit Hilfe der Darstellung der PI-Intensität wurde die Fraktion lebender Zellen selektiert („Gaten“) und weiter hinsichtlich EGFP- bzw. CD4-Expression analysiert (Abb. 13).

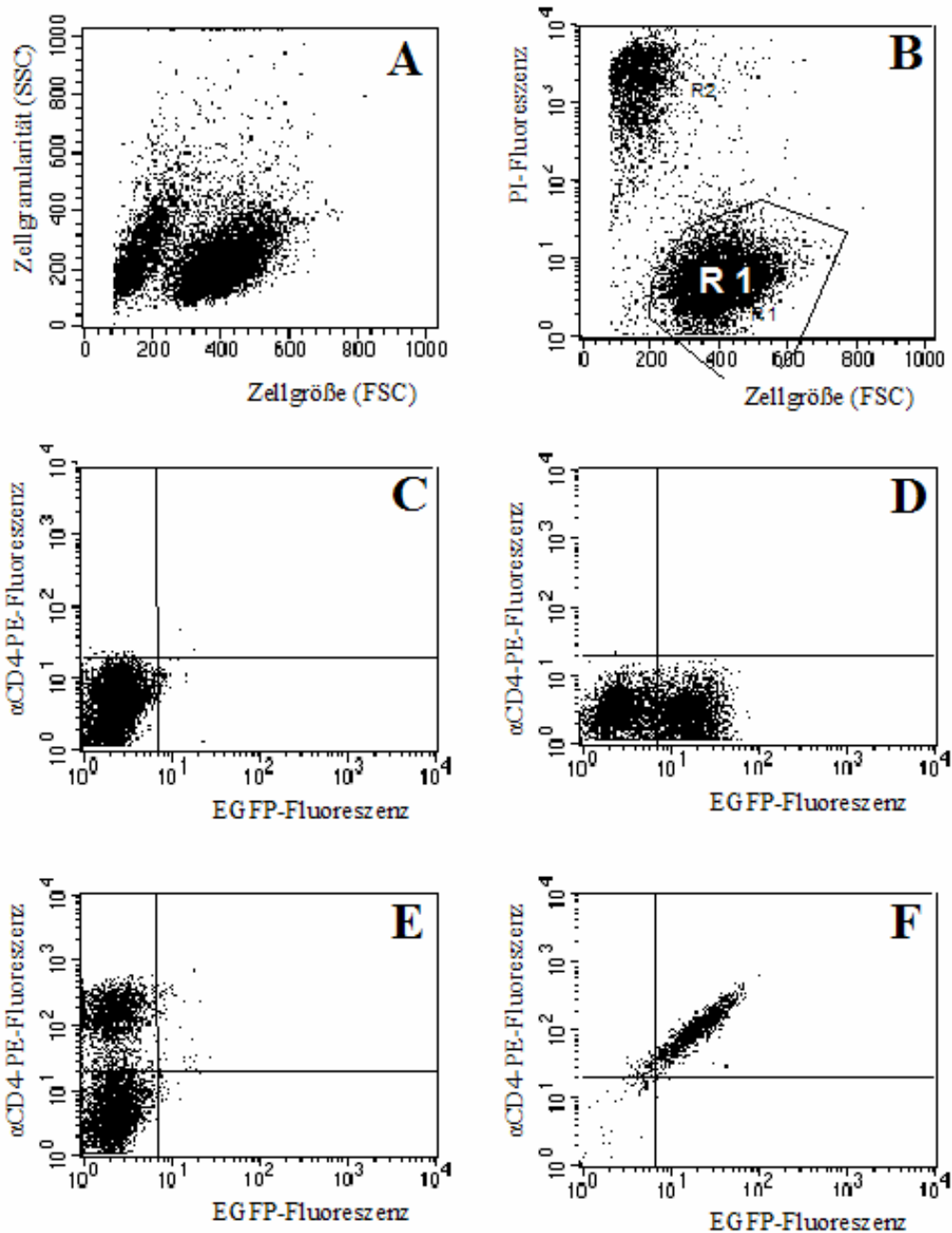


Abb. 13: Darstellung und Auswertung der 3-Farben-Durchflusszytometrie:

A: Darstellung nach Größe im Vorwärtsstreulicht (FSC-H) und Granularität im Seitwärtsstreulicht (SSC-H)
 B: Darstellung nach Größe (FSC-H) und PI-Fluoreszenz (FL3-H); Erfassen der lebenden Zellen in Region R1
 C-E: Darstellung verschiedener Populationen nach EGFP- (FL1-H) und CD4-Fluoreszenz (FL2-H)

Die Achsen geben die Intensität der Emission der Wellenlängen des Spektralmessbereiches der jeweiligen Fluoreszenz wieder, die x-Achse von EGFP, die y-Achse von PE. Doppelt-negative Zellen zeigen sich demnach im linken unteren Quadranten, die durch EGFP-Expression charakterisierten Zellen im rechten unteren Quadranten, die CD4 exprimierenden Zellen im linken oberen Quadranten. Der rechte obere Quadrant stellt Zellen dar, die sowohl CD4 als auch EGFP bilden.

2.2.7.3. Zellsortierung

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung erfolgte mit dem „Becton Dickinson FACS-Vantage“. EGFP wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm exzitert und in einem Emissions-Spektralbereich von 515-545 nm detektiert. Die zu sortierenden Zellen (Zellzahl $2-5 \times 10^5$) wurden wie unter 2.2.7.1. beschrieben vorbereitet. Die Zellsortierung basierte auf der Zellvitalität (Intensität PI-Fluoreszenz) und der Intensität der EGFP-Fluoreszenz, wobei nicht transfizierte Zellen als Kontrolle dienten. Die Zellen wurden direkt in ein Kulturmedium enthaltendes Glasröhrchen sortiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. *In vivo*-Markierung und MACS-Aufreinigung stabil transfizierter embryonaler Stammzellen

In diesem Teil der Arbeit wird die Etablierung eines Protokolls zur Markierung und Isolation stabil transfizierter ES-Zellen mit Hilfe magnetischer Zellsortierung (MACS) vorgestellt.

3.1.1. Etablierung eines optimierten Protokolls zur Zellvereinzelung

Weil Trypsin in der extrazellulären Domäne des Oberflächenmoleküls CD 4 schneidet, auf welcher Markierung und Aufreinigung der Zielzellen basieren, ist es zur Zellvereinzelung nicht geeignet. Als Alternative wurden deshalb Collagenase ($30 \mu\text{M}$; 1 ml pro 10cm-Schale; 40 min, 37°C) und PBS-EDTA (5 mM EDTA; 1 ml pro 10cm-Schale; 15 min bzw. 30 min, 37°C) untersucht, nachdem die Zellen zuvor zweimal mit PBS ohne Calcium gewaschen worden waren. Dabei zeigte sich, dass die 15-minütige Inkubation in PBS-EDTA mit anschließendem vorsichtigen Auf- und Abpipettieren in einer $1000 \mu\text{l}$ -Pipette das beste Ergebnis bezüglich der Lösung der Zelladhärenz und der Zell-Zell-Kontakte sowie der Verträglichkeit für die Zellen (mikroskopisch ca. 5% tote Zellen nach Trypanblaufärbung) lieferte. Eine längere Inkubation in PBS-EDTA führte bei gleichem Dissoziationsergebnis zu einem höheren Anteil toter Zellen (ca. 15%). Bei der Collagenase-Methode lösten sich Zellaggregate ab, die sich selbst durch kräftiges Auf- und Abpipettieren nur unzureichend dissoziieren ließen. Aufgrund dieser Ergebnisse fand im Folgenden die Inkubation in PBS-EDTA (5 mM EDTA; 15 min; 37°C) als Dissoziationsmethode Verwendung. Die vereinzelt Zellen wurden abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 2500 upm, 3 min, Raumtemperatur) und in $100 \mu\text{l}$ gekühltem MACS-Puffer (4°C) resuspendiert.

3.1.2. Ausschluss einer endogenen Expression des CD4-Oberflächenmoleküls in GSES-Zellen

Will man das Δ CD4-Molekül zur Markierung und Aufreinigung transgener ES-Zellen einsetzen, muss zunächst eine endogene CD4-Expression von ES-Zellen in verschiedenen Differenzierungszuständen ausgeschlossen werden, um eine Kontamination der Zielzellen zu verhindern.

Zu diesem Zweck erfolgte ein FACS-analytischer Vergleich α -CD4-PE-inkubierter und nicht inkubierter GSES-Zellen. Dabei ließ sich sowohl in undifferenziertem Zustand als auch an Tag 3 und Tag 11 nach Initiation der Differenzierung mittels PE-Fluoreszenz keine endogene CD4-Expression von GSES-Zellen nachweisen (Abb. 14).

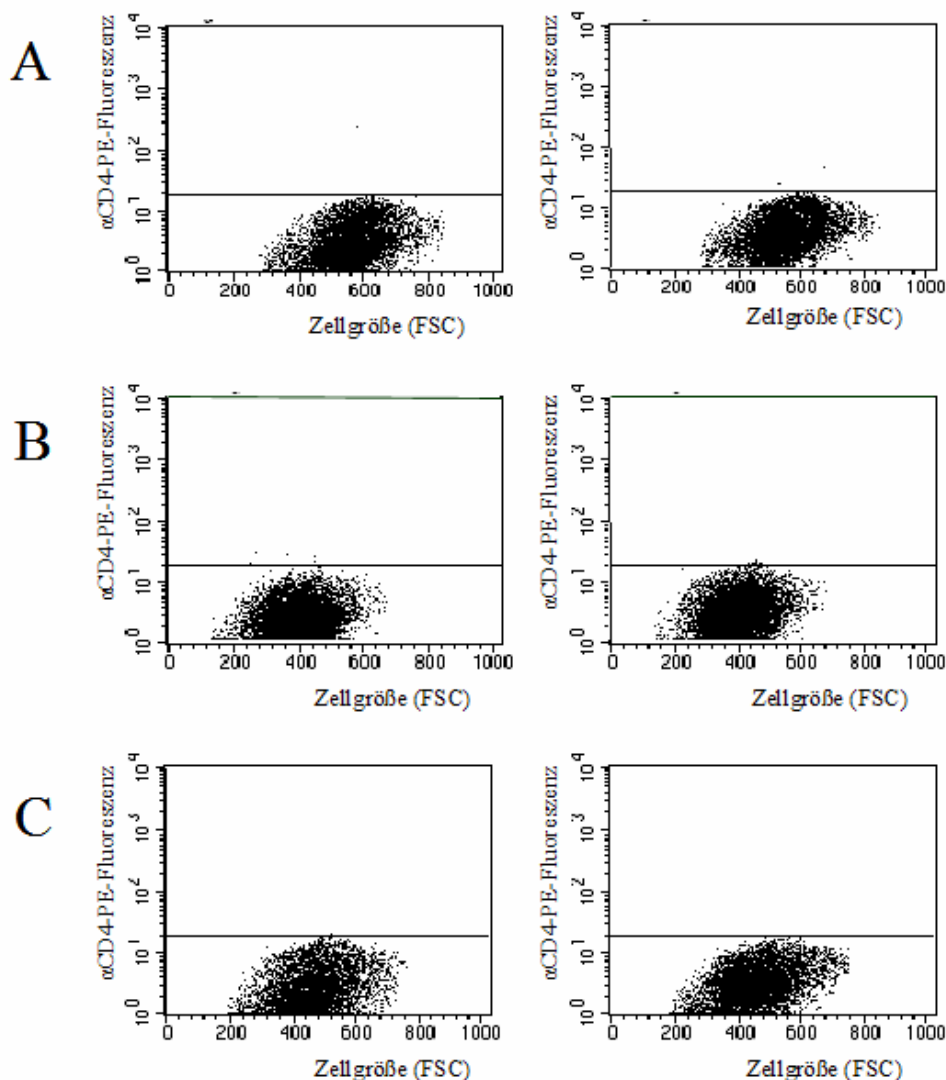


Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse nativer GSES-Zellen in undifferenziertem Zustand (A), in früher (B) und später Differenzierungsphase (C) zur Untersuchung einer möglichen endogenen Expression des CD4-Oberflächenmoleküls

Eine Markierung mit α -CD4-PE-Antikörper zeigt keine Erhöhung der PE-Fluoreszenz (linke Spalte) im Vergleich zur unmarkierten Kontrolle (rechte Spalte). Diese Daten schließen neben einer endogenen CD4-

Expression auch ein Auftreten von F_c-Rezeptoren auf GSES-Zellen aus, an denen der Antikörper unspezifisch binden würde.

Weil der α -CD4-PE-Antikörper nicht nur mit CD4 an den beiden F_{ab}-Fragmenten interagiert, sondern zudem mit dem F_c-Fragment unspezifisch an F_c-Rezeptoren bindet, schließen die Daten auch eine Expression von F_c-Rezeptoren an der Oberfläche von GSES-Zellen aus. Der indirekte Ausschluss unspezifischer Bindungen des verwendeten α -CD4-Antikörpers mit Hilfe eines PE-konjugierten Antikörpers vom entsprechenden Isotyp (IgG1a) ist damit nicht nötig.

Diese Analysen dienten neben dem Ausschluss einer CD4- und F_c-Rezeptoren-Expression nativer GSES-Zellen als Kontrollmessungen für die folgenden FACS-Auswertungen von mit Δ CD4EGFP bzw. Δ CD4 transfizierten Zellen (s. 3.1.4. bzw. 3.1.5.).

3.1.3. Analyse der Aktivität und der Stabilität der Promotoren CMV und PGK in GSES-Zellen

Bei der Suche nach einem geeigneten konstitutiv aktiven Promotor zur Etablierung der magnetischen Markierung und Aufreinigung von transgenen ES-Zellen wurden der Cytomegalie-Virus(CMV)-Promotor und der humane Phosphoglycerokinase(PGK)-Promotor mit Hilfe des Reportergens EGFP analysiert. Der den CMV-Promotor enthaltende Vektor pEGFP-N1 (Clontech) und der pPGK-EGFP-Vektor (s. 3.1.3.1.) wurden verwendet, um in stabil transfizierten GSES-Zellen Aktivität und Stabilität der Promotoren anhand der Intensität der *in vivo*-Fluoreszenz des EGFP im Fluoreszenzmikroskop zu vergleichen.

3.1.3.1. Klonierung des Plasmids pPGK-EGFP

Das Plasmid pPGK-EGFP (Abb. 15) ist ein Derivat des pEGFP-Vektors (Clontech). In dessen Multiple-Cloning-Site wurde nach Öffnung mit Xho1/BamH1 der PGK-Promotor (496 bp) eingesetzt. Dieser war durch PCR mit dem pPGK-Neomycin-Vektor (Schneider, nicht veröffentlicht) als Matrize unter Einführung von Xho1- und BamH1-Schnittstellen in die Primer isoliert worden (Primer: PGK-Xho1 sense; PGK-BamH1 anti-sense). Die korrekte Klonierung des pPGK-EGFP-Vektors wurde durch Restriktionsanalyse mit Xho1/BamH1 (Abb. 15) und Sequenzanalyse (Primer: EGFP-4104 sense; EGFP-149 anti-sense) nachgewiesen.

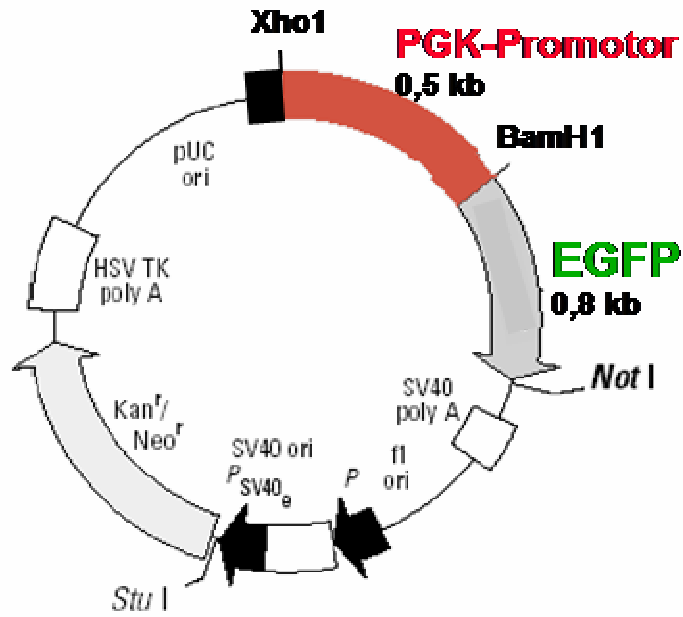


Abb. 15: Schematische Darstellung des hergestellten pPGK-EGFP-Vektors (4,7 kb)

Die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen XhoI/BamHI sind eingezeichnet. Der Vektor enthält unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors eine Kanamycin-Resistenz (Kan^r) sowie unter der Kontrolle des Simian-Virus 40 (SV40)-Promotors eine Neomycin-Resistenz (Neo^r) zur Selektion von transformierten Bakterien bzw. stabil transfizierten Zellklonen.

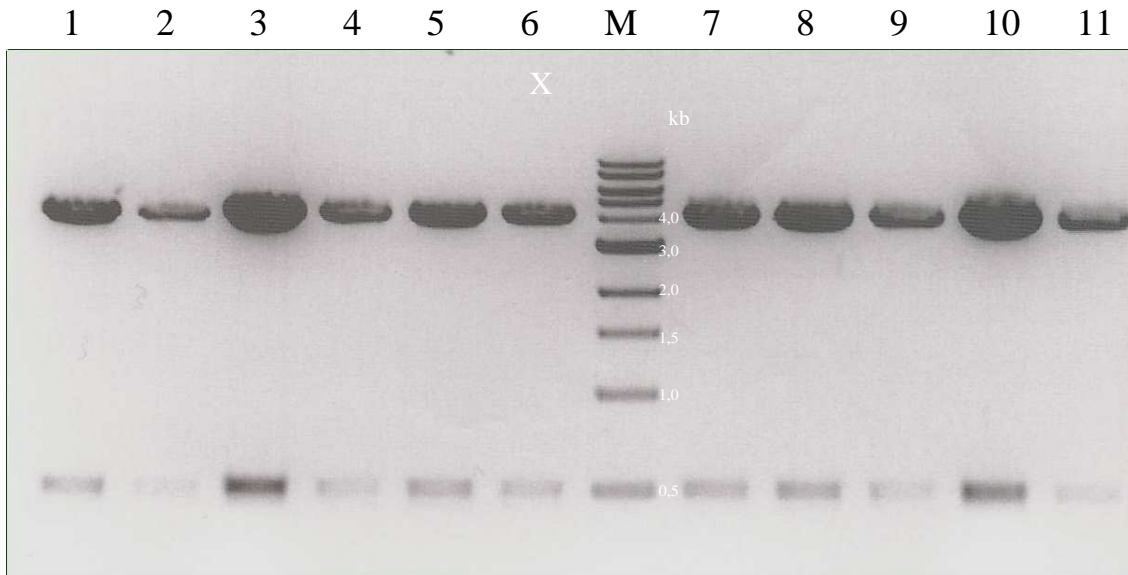


Abb. 16: 1% Agarosegel zur Kontrolle der korrekten Integration des PGK-Fragments (0,5 kb) in den pEGFP-Vektor

11 Bakterienklone wurden mit XhoI/BamHI verdaut. Alle Klone zeigen das korrekte Restriktionsmuster mit der 0,5kb-Bande des PGK-Promotors und der 4,2kb-Bande des Vektoranteils. Aus Klon 6 (X) wurde eine Maxi-Präparation hergestellt, die mit Hilfe der Primer EGFP-4104 sense und EGFP-149 anti-sense sequenziert wurde.

3.1.3.2. Herstellung von stabil mit PGK-EGFP und CMV-EGFP transfizierten GSES-Zellen

Zur Transfektion in GSES-Zellen wurde das pPGK-EGFP-Konstrukt mit Xho1, das pCMV-EGFP-Konstrukt mit Hind III linearisiert. Nach der G418-Selektion wurden jeweils vier resistente Klone mit EGFP-Fluoreszenz isoliert.

3.1.3.3. Fluoreszenzanalyse von stabil mit PGK-EGFP und CMV-EGFP transfizierten GSES-Zellen

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen (Abb. 17) zeigten, dass mit beiden Promotoren die zytosolische Expression des EGFP-Proteins in undifferenzierten GSES-Zellen gut detektierbar ist. Dabei war die Fluoreszenz in CMV-EGFP-Klonen deutlich intensiver als in PGK-EGFP-Klonen. Jedoch blieb die Aktivität des PGK-Promotors in der Differenzierungsphase in allen Zellklonen stabil (untersucht bis Tag 21), während die CMV-gesteuerte EGFP-Expression - abhängig vom Zellklon - ab Differenzierungstag 1 (Klon #3) - 3 (#2) abnahm und ab Tag 2 (#3) - 7 (#2) in der Fluoreszenzmikroskopie nicht mehr nachweisbar war.

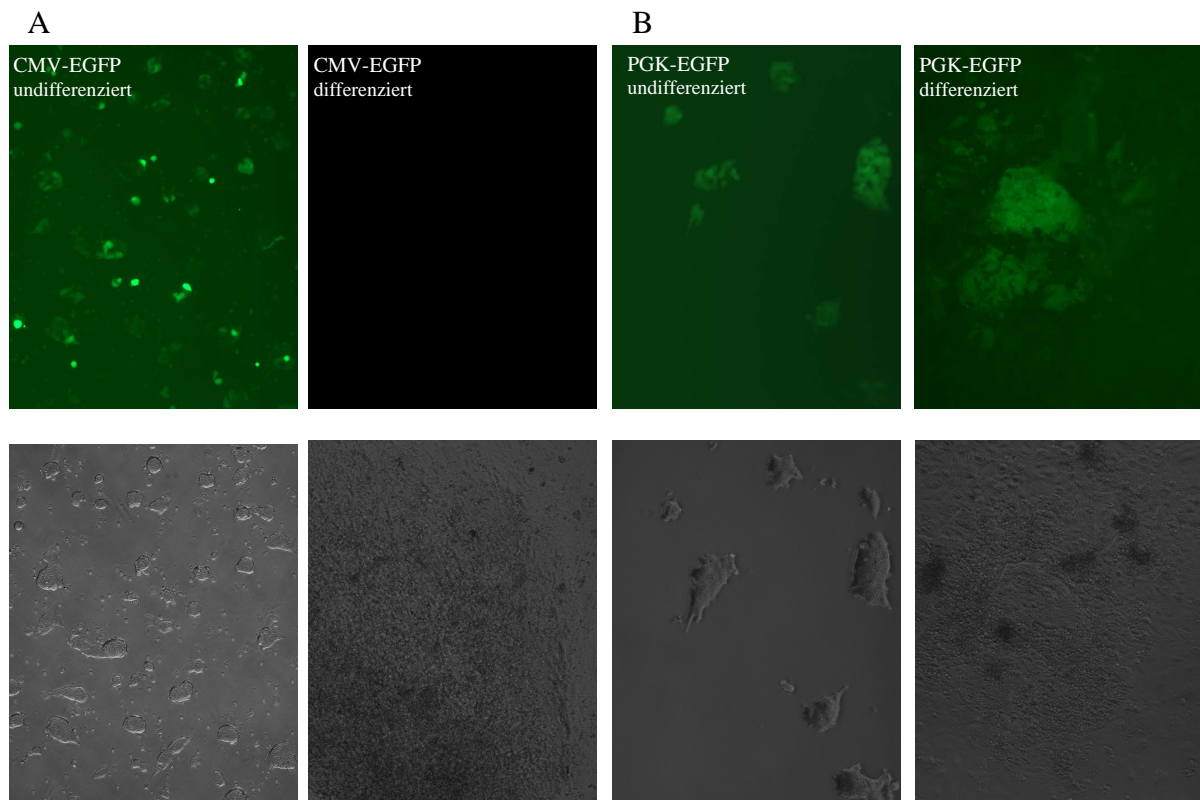


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische und lichtmikroskopische Aufnahmen der GSES-Zellklone CMV-EGFP #1 (A) und PGK-EGFP #2 (B) in undifferenziertem Zustand (jeweils links) und an Tag 10 der Differenzierung (jeweils rechts)

In undifferenzierten GSES-Zellen ist die CMV-gesteuerte EGFP-Fluoreszenz sehr intensiv, während ihre Detektierbarkeit in der Differenzierungsphase verloren geht. Der PGK-Promotor führt dagegen zur einer Reporterexpression, die in undifferenziertem Zustand schwächer ist als die durch den CMV-Promotor kontrollierte, jedoch in der Differenzierungsphase stabil bleibt.

Diese Beobachtungen stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen überein (223). Mit der Perspektive des Transfers auf spezifische Promotoren wurde für die Etablierung der MACS-Aufreinigung der PGK-Promotor gewählt: Dieser eukaryontische Promotor entspricht aufgrund seines Aktivitätsniveaus und seiner Stabilität in differenzierten Zellen den erwarteten Charakteristika spezifischer Promotoren wesentlich besser als der virale CMV-Promotor. Dessen im Vergleich zu spezifischen Promotoren unrealistisch hohes Aktivitätsmaximum und der Aktivitätsverlust während der Differenzierung ließen ein CMV-Konstrukt zur Etablierung der Aufreinigung differenzierter Zellen ungeeignet erscheinen.

3.1.4. *In vivo*-Markierung und MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4EGFP-Moleküls

Zur Etablierung der MACS-Aufreinigung für stabil transfizierte ES-Zellen wurde ein Δ CD4EGFP-Fusionskonstrukt erzeugt, das neben der extrazellulären Domäne des CD4-Oberflächenmarkers gleichzeitig eine EGFP-Fluoreszenzkassette enthält und somit auf einfache Weise im Fluoreszenzmikroskop zu detektieren sein sollte. Das Fusionskonstrukt würde nicht nur ein Hilfskonstrukt zur Etablierung der MACS-Aufreinigung mittels konstitutiv aktiven Promotors darstellen, sondern darüber hinaus die Charakterisierung von spezifischen Promotorkonstrukten in ES-Zellen wesentlich vereinfachen. Mit Hilfe der Fluoreszenzintensität positiver Zellen könnte *in vivo* der Zeitpunkt der maximalen Promotoraktivität bestimmt werden, um die Zellen dann unter optimalen Expressionsbedingungen über den Δ CD4-Anteil magnetisch sortieren zu können. Ohne Antikörperfärbungen durchführen zu müssen, würde die *in vivo*-EGFP-Fluoreszenz ferner die Überprüfung der Selektionseffizienzen sowie den Nachweis der gereinigten Zellen nach Transplantation im Tiermodell vereinfachen.

3.1.4.1. *In vitro*-Translation des Δ CD4EGFP-Konstrukts

Das Fusionskonstrukt Δ CD4EGFP wurde zunächst mittels *in vitro*-Transkription und *in vitro*-Translation getestet. Hierfür wurde das nicht linearisierte pSP6- Δ CD4EGFP-Konstrukt (Abb. 18) verwendet. Die radioaktive Markierung erfolgte mit [³⁵S]-Methionin. SDS-PAGE zeigt die korrekte Proteingröße von 74kD (Abb. 19)



Abb. 18: Schematische Darstellung des pSP6- Δ CD4EGFP-Vektors (6,2 kb)

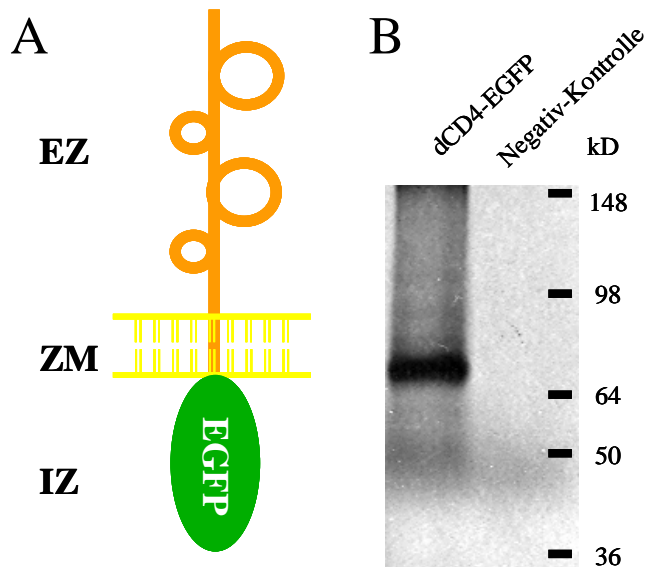


Abb. 19: Schematische Darstellung (A) und SDS-Page nach 35 S-markierter *in vitro*-Translation (B) des Fusionsproteins Δ CD4EGFP

Die intrazelluläre Domäne des nativen CD4-Moleküls wurde durch EGFP substituiert. Die *in vitro*-Translation lieferte für SP6- Δ CD4EGFP die richtige Proteingröße von 74 kD. Als Negativkontrolle wurde eine Translation mit promotorlosem Δ CD4EGFP-Konstrukt durchgeführt.

3.1.4.2. Klonierung des Plasmids pPGK- Δ CD4EGFP

Das Plasmid PGK- Δ CD4EGFP basiert auf dem pPGK-EGFP-Vektor (s. 3.1.3.1.). Die fusionierte Δ CD4EGFP-cDNA (1989 bp) war in Vorarbeiten mittels PCR mit überlappenden Primern gewonnen worden, wobei am 5'-Ende eine BamH1-, am 3'-Ende eine Not1-Schnittstelle angefügt worden war. Aus dem pPGK-EGFP-Vektor wurde die EGFP-cDNA herausgeschnitten (BamH1/Not1) und anschließend durch das Δ CD4EGFP-Fragment ersetzt (Abb. 20). Das Restriktionsmuster wurde nach BamH1/Not1-Verdau analysiert (Abb. 21). Die Sequenzierung der Übergänge an den Klonierungsstellen (Maxi-Präparation Klon 26 (Primer: CD4-143 anti-sense; EGFP-1561 anti-sense) lieferte die erwartete Basenabfolge.

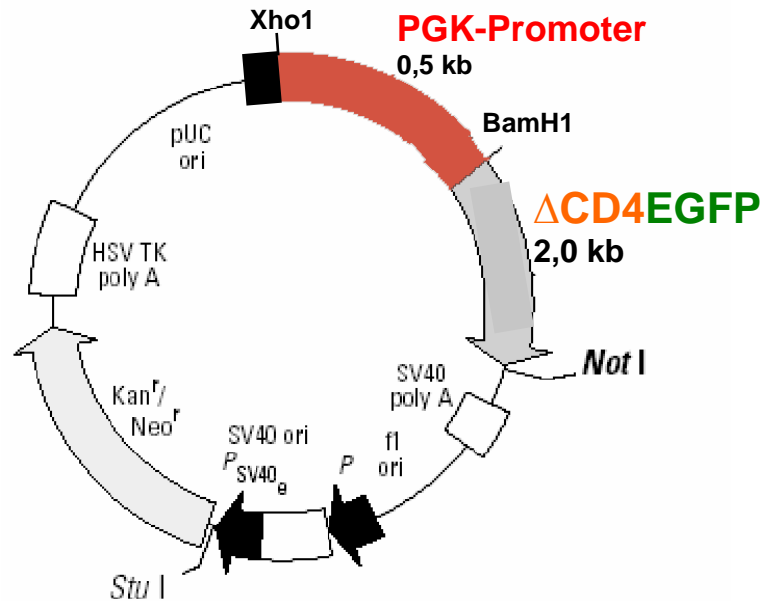


Abb. 20: Schematische Darstellung des hergestellten pPGK- Δ CD4EGFP-Vektors (5,9 kb).

Die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen BamHI und NotI sind eingezeichnet. Der Vektor enthält unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors eine Kanamycin-Resistenz (Kana^r) sowie unter der Kontrolle des Simian-Virus 40 (SV40)-Promotors eine Neomycin-Resistenz (Neo^r) zur Selektion von transformierten Bakterien bzw. stabil transfizierten Zellklonen.

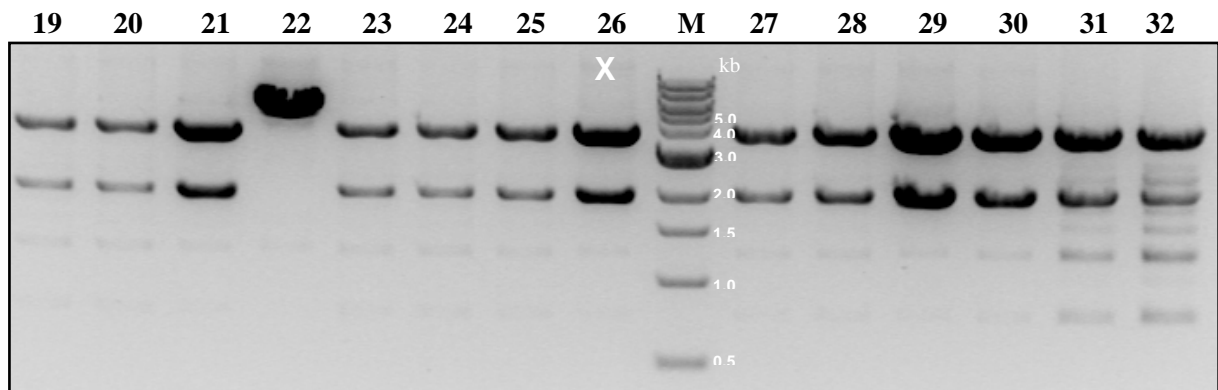


Abb. 21: 1% Agarosegel zur Kontrolle der korrekten Integration des Δ CD4EGFP-Fragments (2,0 kb) in den pPGK-EGFP-Vektor

14 Bakterienklone wurden mit BamHI und NotI verdaut. Mit Ausnahme des Klons 22 zeigen alle Klone das korrekte Restriktionsmuster mit der 2,0kb-Bande von Δ CD4EGFP und der 3,9kb-Bande des Vektoranteils. Nach Durchführung einer Maxi-Plasmid-Präparation aus Klon 26 (X) wurden die Übergänge an den Schnittstellen sequenziert (Primer: CD4-143 anti-sense; EGFP-1561 anti-sense).

3.1.4.3. Herstellung von stabil mit PGK- Δ CD4EGFP transfizierten GSES-Zellen

Zur Transfektion in GSES-Zellen wurde das pPGK- Δ CD4EGFP-Konstrukt mit XhoI linearisiert. Nach der G418-Selektion wurden vier resistente Klone mit fluoreszenzmikroskopisch detektierbarer EGFP-Fluoreszenz isoliert.

3.1.4.4. Nachweis der Funktionalität des Δ CD4EGFP-Konstrukts

Zum Nachweis der Funktionalität des Δ CD4-EGFP-Fusionsproteins in GSES-Zellen wurden beide Komponenten des chimären Proteins separat untersucht: der EGFP-Anteil bezüglich Detektierbarkeit und Lokalisation der *in vivo*-Fluoreszenz im Mikroskop, der Δ CD4-Anteil bezüglich seiner Darstellbarkeit im FACS nach Antikörperfärbung. Korrelierend mit der erwarteten Lokalisation des Fusionsproteins zeigte sich die EGFP-Fluoreszenz überwiegend im Bereich der Zellmembranen (Abb. 22).

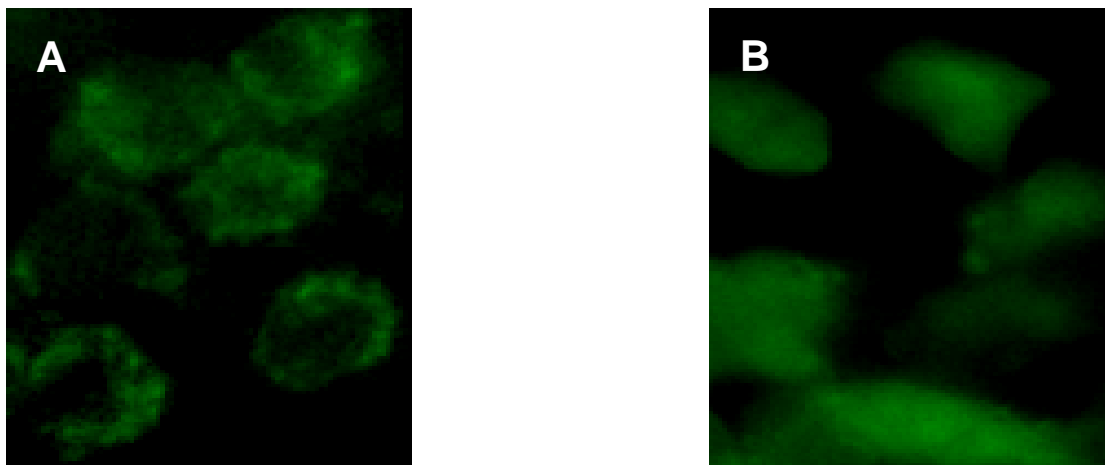


Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopie von mit PGK- Δ CD4-EGFP (A) und PGK-EGFP (B) transfizierten Zellen

A zeigt die Membranständigkeit des Fusionsproteins Δ CD4EGFP, B die zytosolische Lokalisation des EGFP-Proteins.

Der Anteil Δ CD4-positiver Zellen im FACS betrug 36,7% (Klon #3), 41,3% (#1), 49,4% (#4) bzw. 58,7% (#2) (Abb. 23), wobei alle EGFP-positiven Zellen innerhalb der Δ CD4-Positivfraktion lagen. Dagegen lag für einen Teil der Δ CD4 exprimierenden Zellen die EGFP-Fluoreszenz unterhalb der Nachweisgrenze. Daraus lässt sich bezüglich der Detektion des Fusionsproteins eine höhere Sensitivität der α -CD4-Markierung gegenüber der EGFP-Fluoreszenz ableiten.

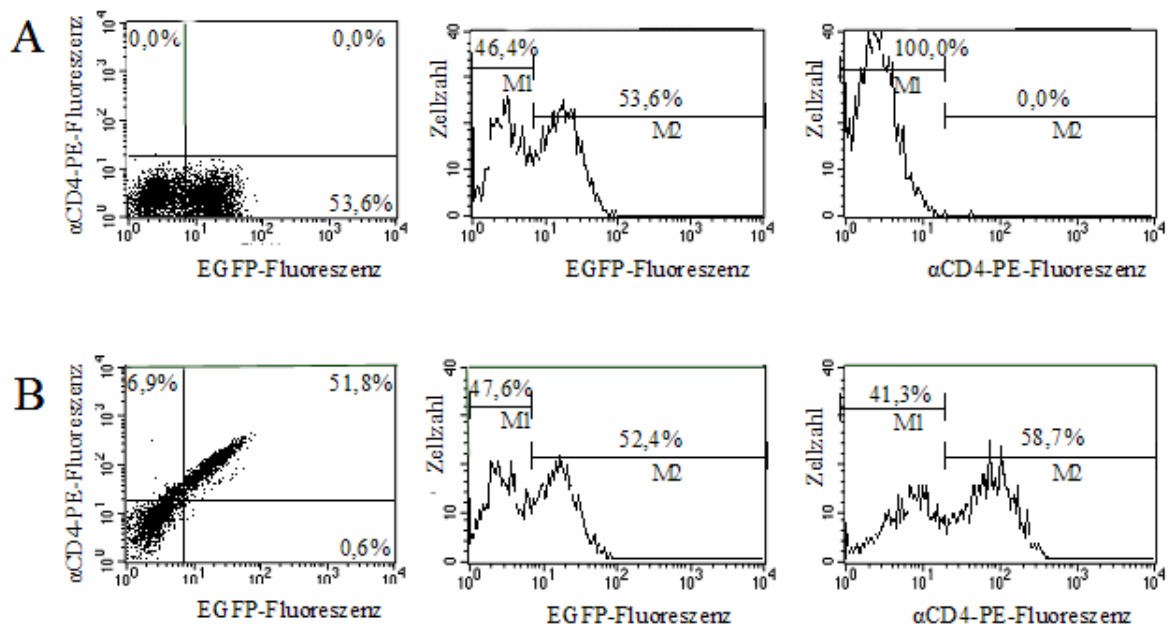


Abb. 23: Durchflusszytometrische Analyse des PGK- Δ CD4EGFP-Klons #2

53,6% der Zellen zeigen EGFP-Fluoreszenz (A). Nach Markierung mit α -CD4-PE-Antikörper ist über die PE-Fluoreszenz für 58,7% der Zellen die Expression des Δ CD4-Anteils nachweisbar, während nur 52,4% der Zellen EGFP-Fluoreszenz zeigen (B). Diese Diskrepanz spricht für die höhere Sensitivität der α -CD4-Antikörperfärbung gegenüber der EGFP-Fluoreszenz bei der durchflusszytometrischen Detektion des Δ CD4-EGFP-Fusionsproteins. Darstellung in Diagramm und Histogramm.

3.1.4.5. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten undifferenzierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4EGFP-Moleküls

Um die Eignung der magnetischen Zellsortierung (MACS) zur Aufreinigung transgener ES-Zellen zu untersuchen, wurde der PGK- Δ CD4EGFP-Klon #2 zunächst in undifferenziertem Zustand zur Zellsortierung eingesetzt. Vor MACS erfolgte dabei eine Titration mit nativen, zuvor ebenfalls mit α -CD4-PE-Antikörper inkubierten GSES-Zellen, sodass der Anteil Δ CD4-positiver Zellen zwischen 10% und 15% liegen sollte. Diese Verdünnung hatte zum Ziel, die magnetische Zellselektion mit einer Ausgangspopulation Δ CD4EGFP-positiver Zellen durchzuführen, die im Hinblick auf die künftige Aufreinigung von Kardiomyozyten für spezifische Promotoren realistisch ist. Nach Markieren der Zielzellen mit dem α -CD4-PE-Erstantikörper und dem α -PE-„Micro-Bead“-Zweitantikörper führte MACS bei einer Ausgangspopulation von 13,8% positiven Zellen zu einer Reinheit von 97,4% positiven lebenden Zellen (1,7% positive Zellen in der Negativfraktion) (Abb. 24). Wiederum lagen alle EGFP-positiven Zellen innerhalb dieser Fraktion, während einige Δ CD4-positive Zellen (9,5% der Positivfraktion) keine oder nur schwache EGFP-Fluoreszenz zeigten.

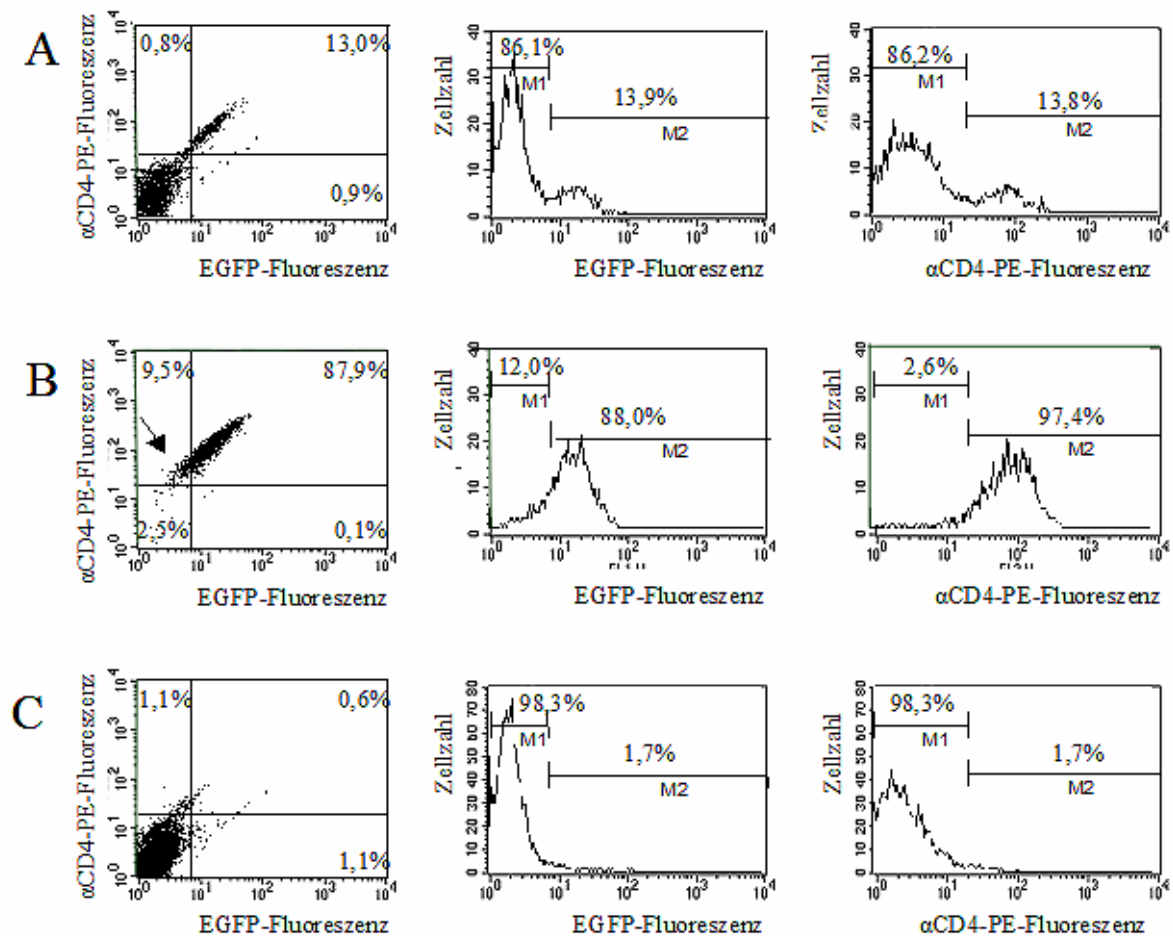


Abb. 24: Durchflusszytometrische Analyse von undifferenzierten Δ CD4EGFP exprimierenden GSES-Zellen (PGK- Δ CD4 #2) vor MACS (A), nach MACS-Positivselektion (B) und MACS-Negativselektion (C) Bei einer Ausgangsfrequenz positiver Zellen von 13,7% (A) wurde nach Separation eine Reinheit von 97,4% (B) erzielt. Die Negativfraktion enthielt 1,7% positive Zellen (C). Pfeil: In der Positivfraktion zeigen 9,5% der Zellen bei nachweisbarem Δ CD4 keine detektierbare EGFP-Fluoreszenz.

3.1.4.6. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten differenzierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4EGFP-Moleküls

Im nächsten Schritt wurde die Anwendung von MACS für stabil Δ CD4EGFP exprimierende GSES-Zellen in der Differenzierungsphase (Tag 3 der Differenzierung) untersucht. Hierfür erfolgte wiederum eine Titration des PGK- Δ CD4EGFP-Klons #2 mit GSES-Zellen, sodass der Anteil Δ CD4-positiver Zellen 5,8% betrug. Der Separationsprozess führte zu einer Reinheit von 95,5% (1,3% positive Zellen in der Negativfraktion) (Abb. 25).

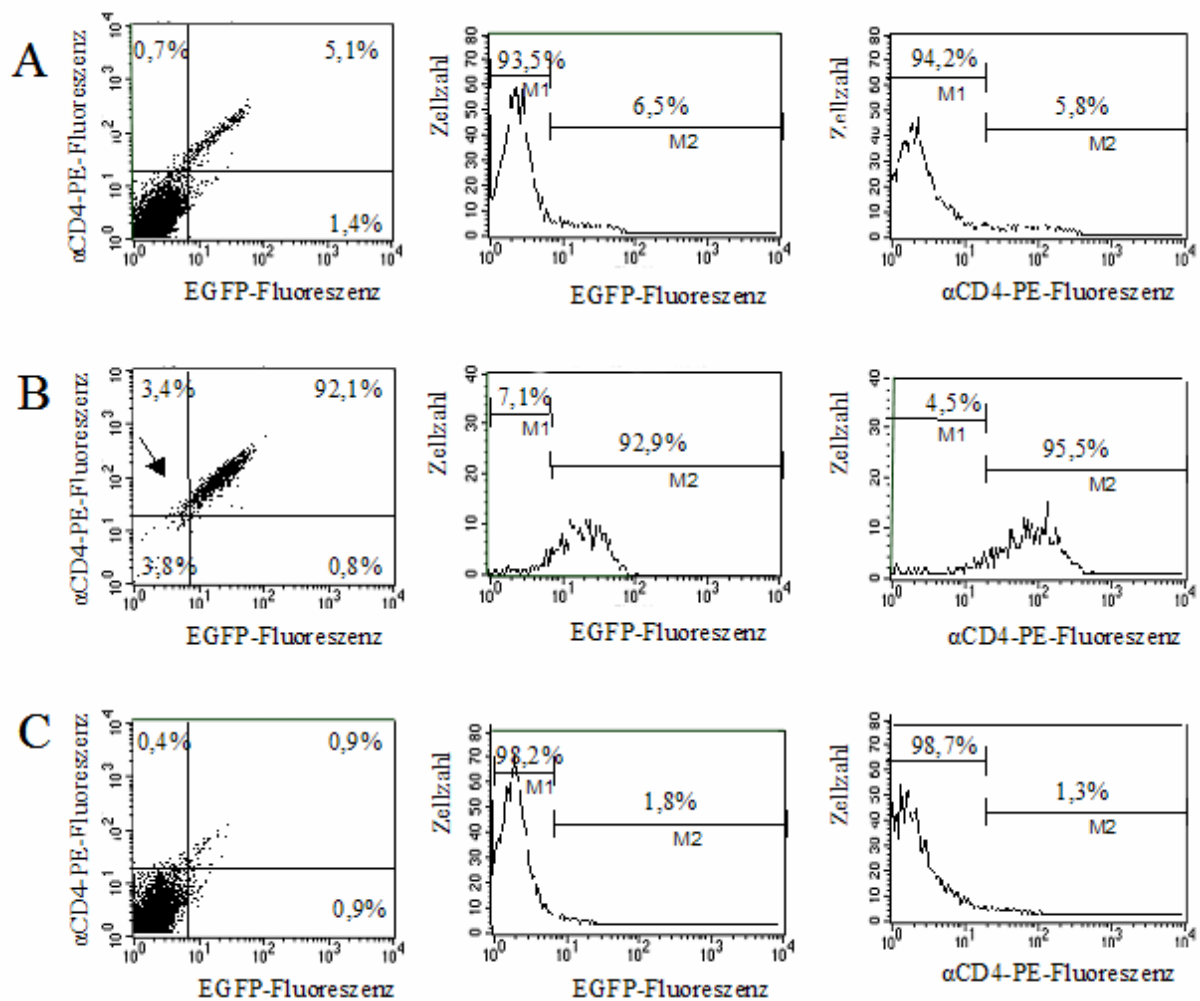


Abb. 25: Durchflusszytometrische Analyse von differenzierten Δ CD4EGFP exprimierenden GSES-Zellen (PGK- Δ CD4EGFP #2) vor MACS (A), nach MACS-Positivselektion (B) und MACS-Negativselektion (C) Bei einer Ausgangsfrequenz positiver Zellen von 5,8% (A) wurde nach Separation eine Reinheit von 95,5% (B) erzielt. Die Negativfraktion enthielt 1,3% positive Zellen (C). Pfeil: In der Positivfraktion zeigen 3,4% der Zellen bei nachweisbarem Δ CD4 keine detektierbare EGFP-Fluoreszenz.

3.1.5. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4-Moleküls

Nachdem die unter 3.1.4. dargestellten Ergebnisse die Eignung der MACS-Aufreinigung mittels Δ CD4EGFP gezeigt hatten, sollten die Übertragbarkeit der Methode auf das humane und damit nicht immunogene Δ CD4-Molekül ohne EGFP-Anteil überprüft werden. Als weiteres Ziel sollten Experimente auf niedrigere Ausgangsfrequenzen Δ CD4-positiver Zellen sowie einen späteren Zeitpunkt der Differenzierung (Tag 12) ausgeweitet werden.

3.1.5.1. Klonierung des Plasmids pPGK- Δ CD4

Das pPGK- Δ CD4-Plasmid (Abb. 26) basiert auf dem pPGK-EGFP-Vektor (s. 3.1.3.1.). Aus diesem wurde die EGFP-cDNA mit BamH1/NotI herausgeschnitten und durch die mittels PCR gewonnene Δ CD4-cDNA (1272 bp; „MACSelect 4.I“-Vektor als Matrize) ersetzt. Die Primer enthielten wiederum die Schnittstellen BamH1 und NotI (Primer: Δ CD4-BamH1 sense; Δ CD4-NotI anti-sense). Das Restriktionsmuster wurde nach BamH1/NotI-Verdau analysiert (Abb. 27). Die Sequenzierung von Klon 8 nach Maxi-Präparation (Sequenzierungsprimer CD4-BamH1 sense; CD4-143 anti-sense; EGFP-1561 anti-sense) lieferte die erwartete Basenabfolge.

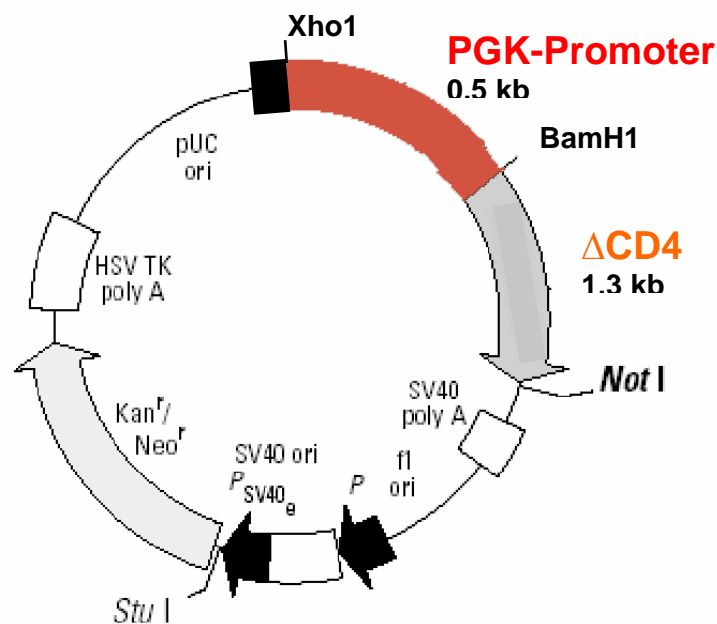


Abb. 26: Schematische Darstellung des hergestellten pPGK- Δ CD4-Vektors (5,2 kb)

Die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen BamH1 und NotI sind eingezeichnet. Der Vektor enthält unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors eine Kanamycin-Resistenz (Kana^r) sowie unter der Kontrolle des Simian-Virus 40 (SV40)-Promotors eine Neomycin-Resistenz (Neo^r) zur Selektion von transformierten Bakterien bzw. stabil transfizierten Zellklonen.

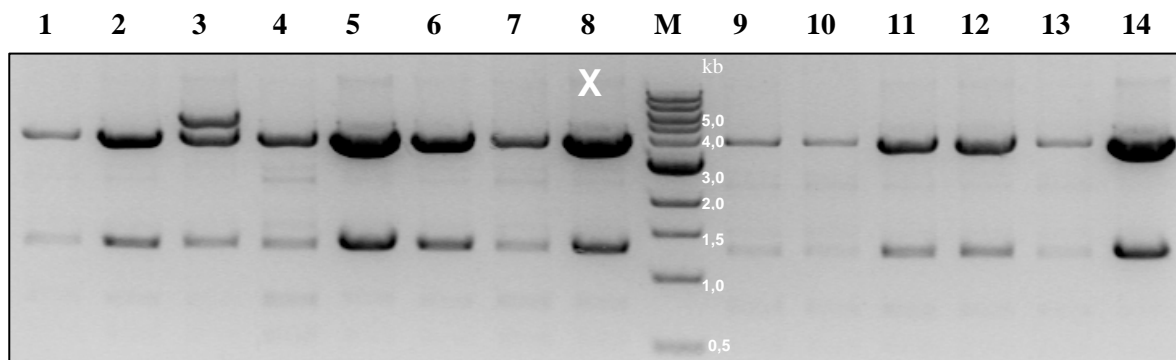


Abb. 27: 1% Agarosegel zur Kontrolle auf korrekte Integration des Δ CD4-Fragments (1,3 kb) in den PGK-EGFP-Vektor

14 Bakterienklone wurden mit BamH1/NotI verdaut. Alle Klone zeigen das korrekte Restriktionsmuster mit der 1,3kb-Bande von Δ CD4 und der 3,9kb-Bande des Vektoranteils. Bei Klon 3 ist der Verdau unkomplett. Klon 8 wurde zur Maxi-Präparation verwendet und mit Hilfe der Primer CD4-BamH1 sense; CD4-143 anti-sense; EGFP-1561 anti-sense sequenziert.

3.1.5.2. Herstellung von stabil mit PGK- Δ CD4 transfizierten GSES-Zellen

Zur Transfektion in GSES-Zellen wurde das pPGK- Δ CD4-Konstrukt (Maxi-Präparation aus Klon 8) mit XhoI linearisiert. Nach der G418-Selektion wurden fünf resistente Klone isoliert. Weil wegen des fehlenden EGFP-Anteils ein Screening mittels *in vivo*-Fluoreszenz nicht möglich war, wurde die stabile Integration des pPGK- Δ CD4-Plasmids mittels PCR untersucht. Bei vier der fünf resistenten Klone konnte die stabile Integration mit zwei verschiedenen Primerpaaren (Δ CD4-BamH1 sense; Δ CD4-Not1 anti-sense bzw. Δ CD4-BamH1 sense; Δ CD4-143 anti-sense) nachgewiesen werden (Abb. 28).

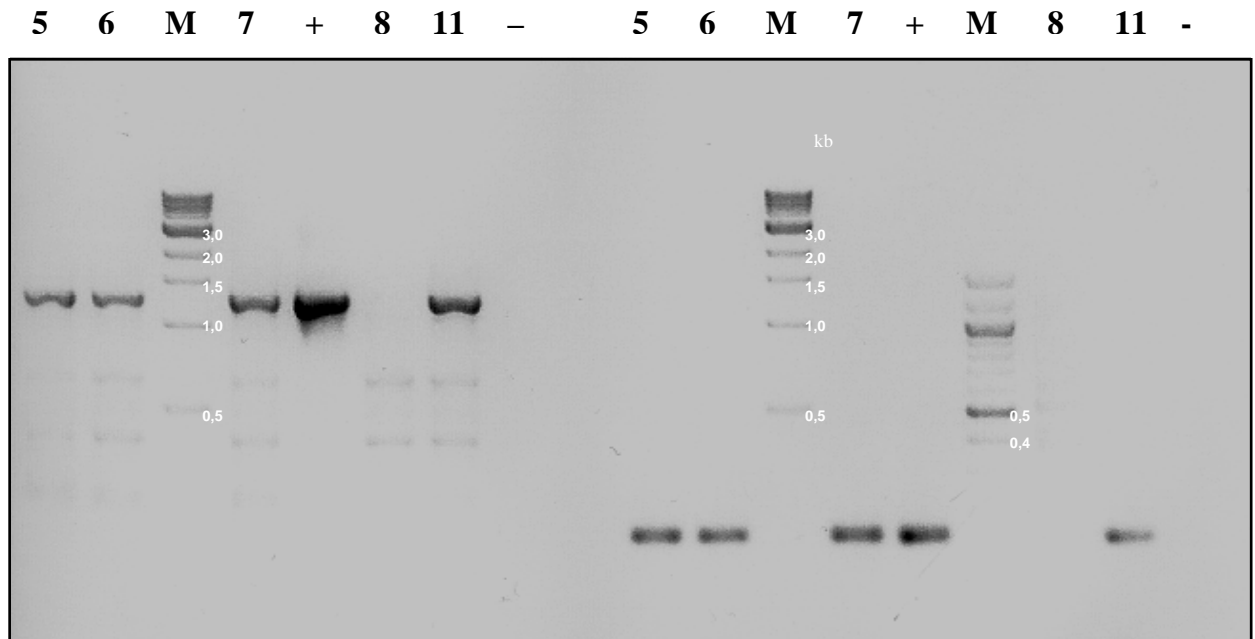


Abb. 28: 1% Agarosegel zum Nachweis der stabilen Integration des in GSES transfizierten PGK- Δ CD4-Konstrukts nach G418-Selektion

In der mit genomischer DNA durchgeführten PCR lässt sich das Transgen in den Klonen 5, 6, 7 und 11 mit beiden Primerpaaren (Δ CD4-BamH1 sense; Δ CD4-NotI anti-sense (Fragmentlänge 1272 bp) bzw. Δ CD4-BamH1 sense; Δ CD4-143 anti-sense (143 bp)) nachweisen, während für Klon 8 beide PCR-Analysen negativ sind. Als Positivkontrolle (+) wurde verdünntes Plasmid (ca. 2ng/ μ l), als Negativkontrolle (-) H₂O bidest in die PCR eingesetzt.

Die PCR-positiven Klone zeigten durchflusszytometrisch einen Anteil Δ CD4-positiver Zellen von 36,0% (Klon #11), 38,5% (#6), 44,2% (#7) und 58,4% (#5) (Abb. 29).

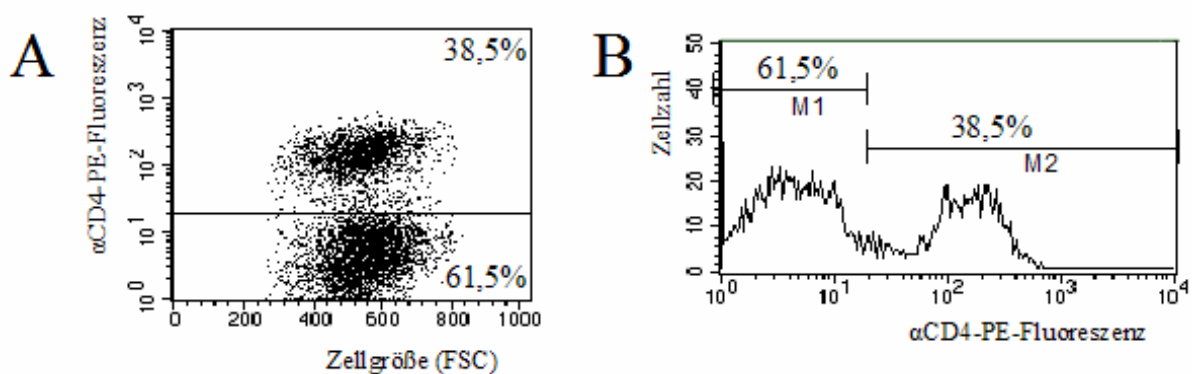


Abb. 29: Durchflusszytometrische Analyse des PGK- Δ CD4-Klons #6

Für 38,5% der Zellen ist nach Markierung mit α -CD4-PE-Antikörper über die PE-Fluoreszenz die Expression des Δ CD4-Moleküls nachweisbar. Darstellung in Diagramm (A) und Histogramm (B).

3.1.5.3. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten undifferenzierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4-Moleküls

Analog zur Vorgehensweise für das Δ CD4EGFP-Molekül wurde die MACS-Separation mit Hilfe des Δ CD4-Proteins zunächst für undifferenzierte GSES-Zellen untersucht. Der PGK- Δ CD4-Klon #6 wurde mit nativen GSES-Zellen titriert. Abb. 30 zeigt bei einer initialen Population von 15,9%, die nach α -CD4-Antikörper-Markierung PE-Fluoreszenz aufwies, eine Anreicherung auf 98,1% (1,5% positive Zellen in der Negativfraktion). Bei einer Ausgangsfrequenz positiver Zellen von 3,9% führte MACS zu einer Reinheit von 97,6% (0,4% positive Zellen in der Negativfraktion) (s. Abb. 31).

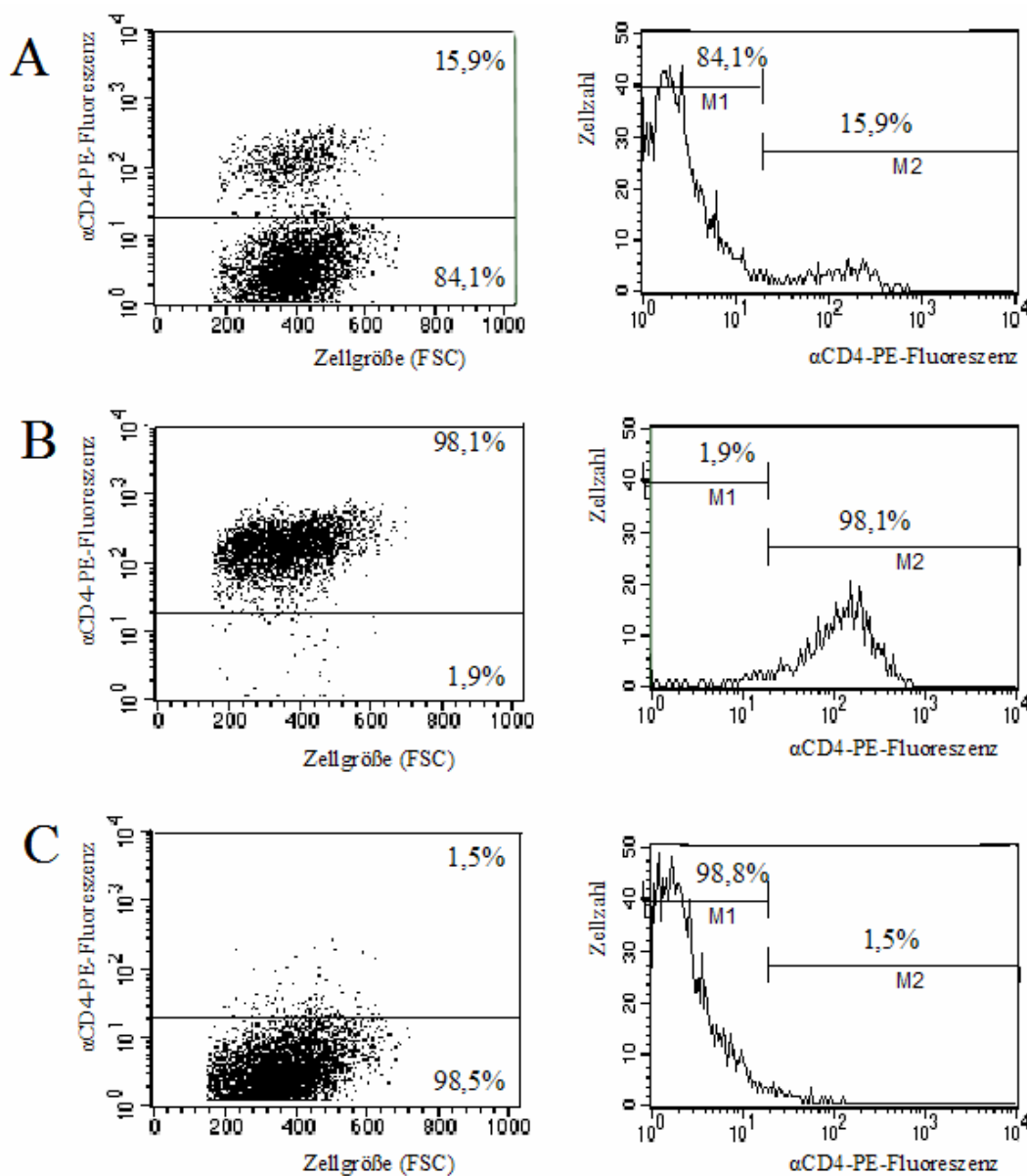


Abb. 30: Durchflusszytometrische Analyse von undifferenzierten Δ CD4 exprimierenden GSES-Zellen (PGK- Δ CD4 #6) vor MACS (A), nach MACS-Positivselektion (B) und MACS-Negativselektion (C)

Bei einer Ausgangsfrequenz positiver Zellen von 15,9% (A) wurde nach Separation eine Reinheit von 98,1% (B) erzielt. Die Negativfraktion enthielt 1,5% positive Zellen (C).

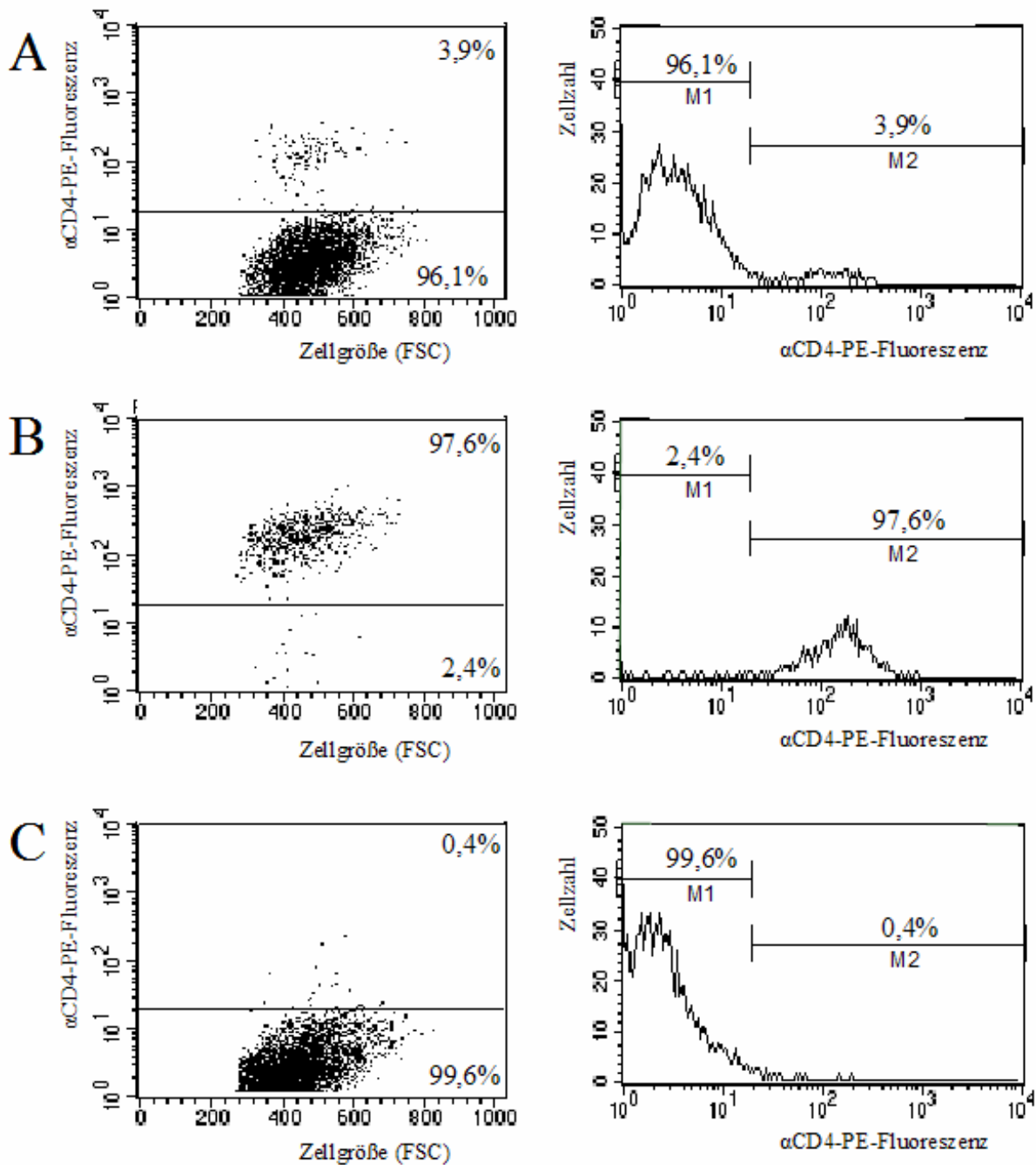


Abb. 31: Durchflusszytometrische Analyse von undifferenzierten ΔCD4 exprimierenden GSES-Zellen (PGK- ΔCD4 #6) vor MACS (A), nach MACS-Positivselektion (B) und MACS-Negativselektion (C)

Bei einer Ausgangsfrequenz positiver Zellen von 3,9% (A) wurde nach Separation eine Reinheit von 97,6% (B) erzielt. Die Negativfraktion enthielt 0,4% positive Zellen (C).

3.1.5.4. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten differenzierten GSES-Zellen mit Hilfe des ΔCD4 -Moleküls

Im nächsten Schritt wurde die Anwendung von MACS für stabil ΔCD4 exprimierende GSES-Zellen in der Differenzierungsphase untersucht. Für Tag 3 als frühem und Tag 12 als spätem Zeitpunkt der Differenzierung erfolgte ein Vergleich verschiedener Ausgangsfrequenzen

Δ CD4-positiver Zellen. MACS mit einer Population von 0,6% Δ CD4-positiven Zellen führte am dritten Tag nach Initiation der Differenzierung zu einer Reinheit von 98,5% (Abb. 32). In einem parallelen Versuchsansatz erfolgte eine Anreicherung von 7,3% positiven Zellen auf 96,8% (ohne Abb.). Am Differenzierungstag 12 wurde MACS mit einer Ausgangsfrequenz von 10,7% durchgeführt, wobei eine Reinheit von 96,2% erreicht wurde (Abb. 33).

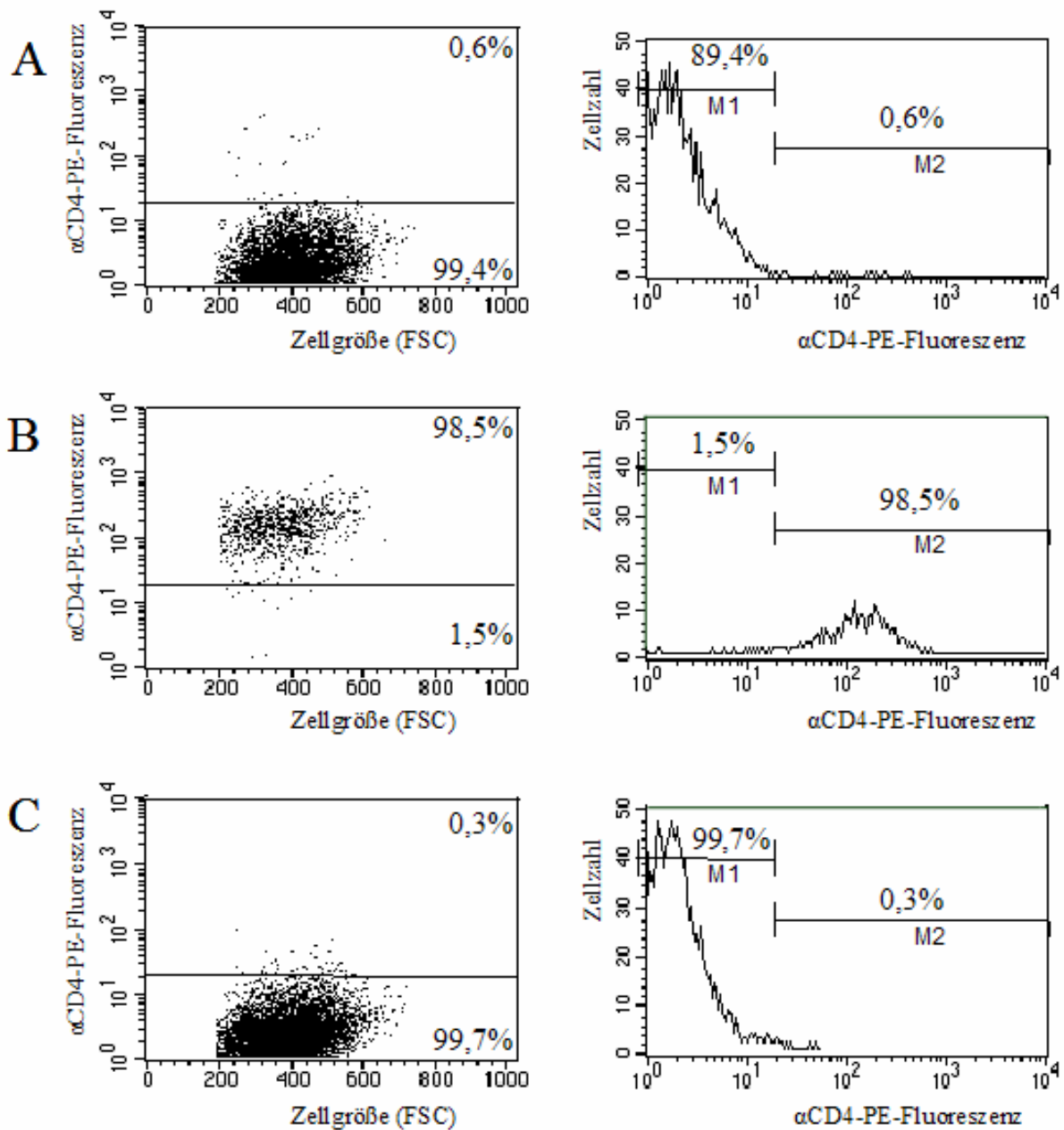


Abb. 32: Durchflusszytometrische Analyse von differenzierten Δ CD exprimierenden GSES-Zellen (PGK-dCD4 #6; Tag 3 der Differenzierung) vor MACS (A), nach MACS-Positivselektion (B) und MACS-Negativselektion (C)

Bei einer Ausgangsfrequenz positiver Zellen von 0,6% (A) wurde nach Separation eine Reinheit von 98,5% (B) erzielt. Die Negativfraktion enthielt 0,3% positive Zellen (C).

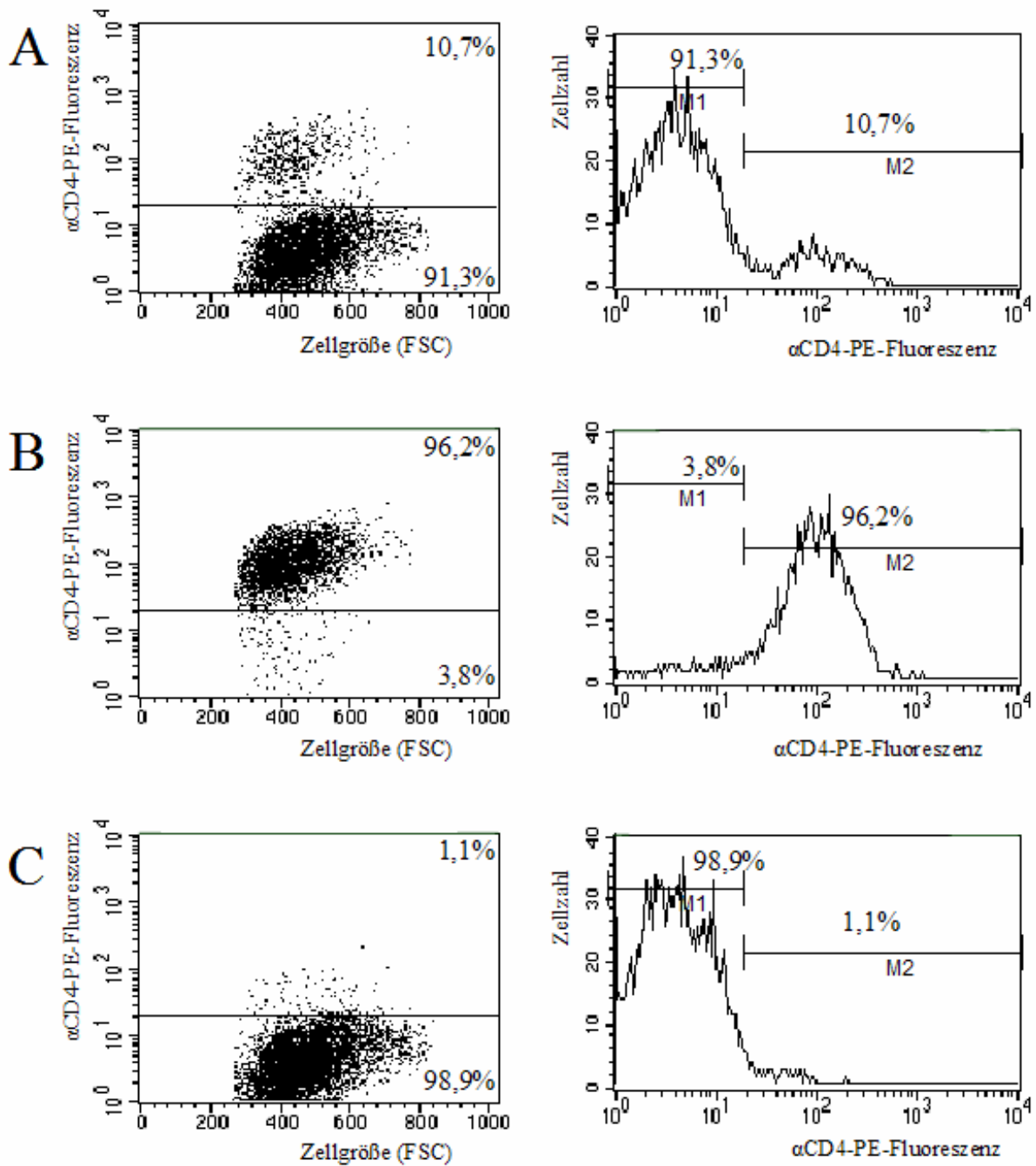


Abb. 33: Durchflusszytometrische Analyse von differenzierten Δ CD4 exprimierenden GSES-Zellen (PGK- Δ CD4 #6; Tag 12 der Differenzierung) vor MACS (A), nach MACS-Positivselektion (B) und MACS-Negativselektion (C)

Bei einer Ausgangsfrequenz positiver Zellen von 10,7% (A) wurde nach Separation eine Reinheit von 96,2% (B) erzielt. Die Negativfraktion enthielt 1,1% positive Zellen (C).

3.1.6. Analyse der MACS-aufgereinigten stabil transfizierten differenzierten GSES-Zellen

Nachdem die unter 3.1.4. und 3.1.5. vorgestellten Ergebnisse gezeigt hatten, dass die MACS-Methode einen hohen Reinheitsgrad Δ CD4- bzw. Δ CD4EGFP-positiver GSES-Zellen

gewährleistet, sollte nun - als Kriterium für eine zellschonende Methode - die Vitalität der aufgereinigten ES-Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck erfolgte eine Reaktivierung der MACS-sortierten Zellen mit anschließenden fluoreszenzmikroskopischen und RT-PCR-Analysen.

3.1.6.1. Reaktivierung der MACS-aufgereinigten stabil transfizierten differenzierten GSES-Zellen

Nach dem MACS-Aufreinigungsprozess an Differenzierungstag 3 wurde die Fraktion Δ CD4EGFP- bzw. Δ CD4-positiver Zellen in Differenzierungsmedium reaktiviert. Die nach MACS-Aufreinigung dissoziierten PGK- Δ CD4(Klon #6)- und PGK- Δ CD4EGFP(Klon #2)-positiven Einzelzellen zeigten dasselbe Reaggregationsverhalten wie die Kontrollen aus dissoziierten Zellen derselben Klone, die nicht mit MACS behandelt worden waren. Auch die für sich differenzierende ES-Zellen typische Ausbildung von „Embryoid Bodies“ trat bei den MACS-gereinigten PGK- Δ CD4- und Δ CD4-EGFP-Zellen auf. Dies galt sowohl für die Suspensionsphase (durchgeführt bis Tag 4 nach MACS; entspricht Tag 7 der Differenzierung) als auch in der Adhärenzphase (ab Tag 4 nach MACS). Abb. 34 zeigt repräsentativ dieses Reaggregations- und Entwicklungsverhalten sowie die Persistenz der fluoreszenzmikroskopisch detektierbaren EGFP-Expression (PGK- Δ CD4-EGFP Klon #2).

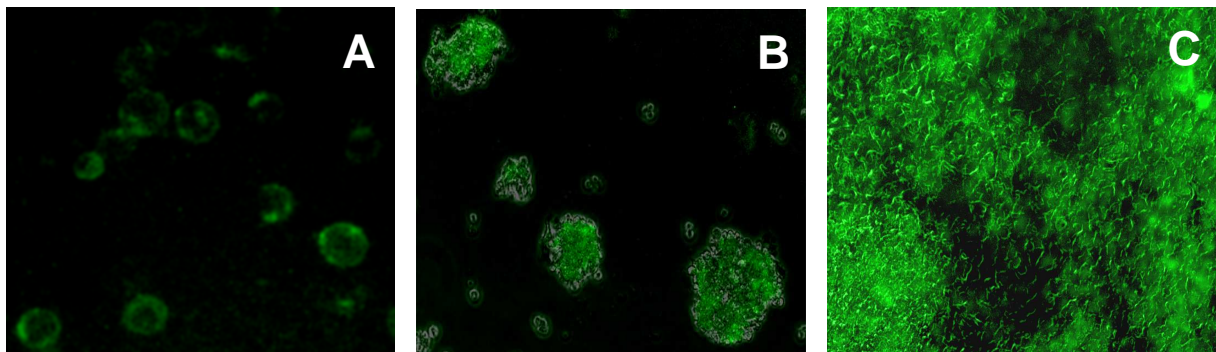


Abb. 34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Δ CD4-EGFP exprimierenden GSES-Zellen nach MACS

(A) zeigt dissoziierte Δ CD4-EGFP exprimierende GSES-Zellen unmittelbar nach MACS-Selektion am Differenzierungstag 3. Diese Zellen reaggregierten und bildeten Embryoid Bodies in Suspension (B, Tag 4 nach MACS-Reinigung) und Adhärenz (C, Tag 12 nach MACS-Reinigung)

3.1.6.2. Expressionsanalyse der reaggregierten Embryoid Bodies

Für die MACS-Aufreinigung von ES-Zellen ist es von entscheidender Bedeutung, dass der Separationsprozess die Differenzierungsrichtung der Zellen nicht beeinflusst. Um die normale

Entwicklung der nach MACS-Reinigung reaggregierten ES-Zellen zu prüfen, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Expressionsmuster von MACS-gereinigten PGK- Δ CD4EGFP(Klon #2)- und PGK- Δ CD4(Klon #6)-Zellen an Differenzierungstag 7 (MACS-gereinigt an Differenzierungstag 3, reaggregiert und weiterdifferenziert über vier Tage) und von nach Standardprotokoll (ohne MACS-Behandlung) differenzierten Zellen derselben Zellklone an Differenzierungstag 7 verglichen. Es wurden Markergene aller drei Keimblätter untersucht (Endoderm: HNF-4; Mesoderm: Brachyury und Ektoderm: Involucrin, Neurogenin). Dabei war die Expression dieser Gene – unabhängig von einer MACS-Behandlung - in allen Populationen nachweisbar. Abb. 35 zeigt, dass der Prozess der MACS-Selektion die Expression endodermaler, mesodermaler und ektodermaler Marker nicht signifikant beeinflusst.

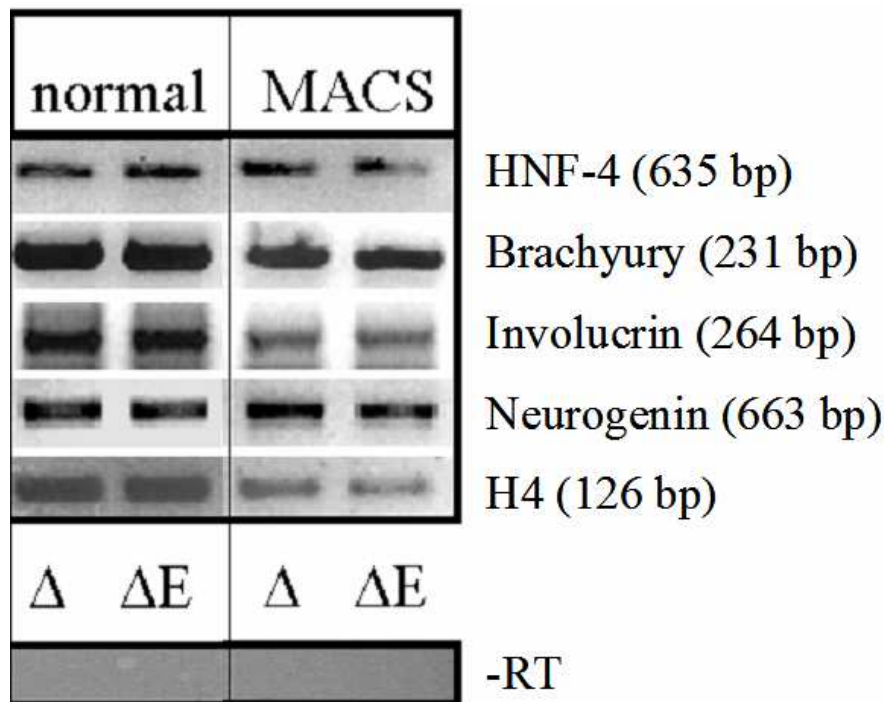


Abb. 35: RT-PCR-Analysen von Δ CD4- und Δ CD4EGFP exprimierenden Zellen nach MACS-Reinigung

Die Abbildung zeigt die Markergenexpression von Δ CD4 bzw. Δ CD4EGFP exprimierenden Zellen nach MACS-Reinigung an Differenzierungstag 7 (MACS-gereinigt an Differenzierungstag 3, reaggregiert und weiterdifferenziert über vier Tage) im Vergleich mit Zellen jeweils desselben Zellklons ebenfalls an Differenzierungstag 7, die nicht mit MACS behandelt wurden. Die MACS-Aufreinigung beeinflusst die Expression endodermaler (Hepatozytenkernfaktor HNF-4), mesodermaler (Brachyury) und ektodermaler Markergene (Involucrin, Neurogenin) nicht. (Verwendete Primer: mHNF4-6 sense, mHNF4-640 anti-sense, mNeurogenin-18 sense, mNeurogenin-680 anti-sense, mInvolucrin-7 sense, mInvolucrin-270 anti-sense, mHiston H4-64 sense; mHiston H4-189 anti-sense)

3.2. Markierung kardialer Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen mit Hilfe des humanen Nkx2.5-Promotors

Parallel zur Etablierung der MACS-Methode für embryonale Stammzellen sollte der Nkx2.5-Promotor über die Expression des *in vivo*-Markers EGFP in embryonalen Stammzellen auf seine Funktionalität untersucht werden. Würde sich dieser frühe kardiale Expressionsfaktor zur Markierung kardialer Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen eignen, könnte die MACS-Methode künftig auf die Nkx2.5-Promotor-Kassetten übertragen werden, um kardiale Vorläuferzellen effektiv und zellschonend aus embryonalen Stammzellen aufzureinigen. Im Hinblick auf den Transfer des Systems auf humane embryonale Stammzellen für spätere therapeutische Anwendungen sollte für sämtliche Experimente der humane Promotor Nkx2.5 verwendet werden.

3.2.1. *In vivo*-Markierung, FACS-Aufreinigung und Charakterisierung von stabil mit hNkx2.5-EGFP transfizierten früh differenzierten embryonalen Stammzellen

Zur Markierung von Nkx2.5 exprimierenden früh differenzierten embryonalen Stammzellen sollte ein Vektor erzeugt werden, der unter der Kontrolle des herzmuskelspezifischen humanen Nkx2.5-Promotors die Expression des Markerproteins EGFP ermöglicht. Auf diese Weise könnte man Nkx2.5 exprimierende Zellen fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch einfach detektieren und charakterisieren. Mittels RT-PCR-Untersuchungen sollten die Nkx2.5-positiven Zellen im Hinblick auf die Expression kardialer Markergene analysiert werden.

3.2.1.1. Klonierung des Plasmids pNkx2.5-EGFP

Ein 2750bp-Fragment des humanen Nkx2.5-Promotors (vom Translationsstart: bp -1 bis bp -2750) war in Vorarbeiten aus humaner genomischer DNA isoliert und in den pCR-XL-Topo-Vektor kloniert worden. Hieraus wurde der Nkx2.5-Primer mittels PCR unter Einführung von Kpn1- und Age1-Schnittstellen in die Primer amplifiziert (Primer: Nkx2.5-Kpn1 sense; Nkx2.5-Age1 anti-sense). Dieses Fragment wurde in die „Multiple-Cloning-Site“ des pEGFP-Vektors (Clontech) nach Öffnung mit Kpn1/Age1 eingesetzt. Die korrekte Klonierung des pNkx2.5-EGFP-Vektor wurde durch Restriktionsanalyse mit Kpn1/Age1 (Abb. 37) und Sequenzanalyse (Primer: EGFP-4104 sense; EGFP-149 anti-sense) nachgewiesen.

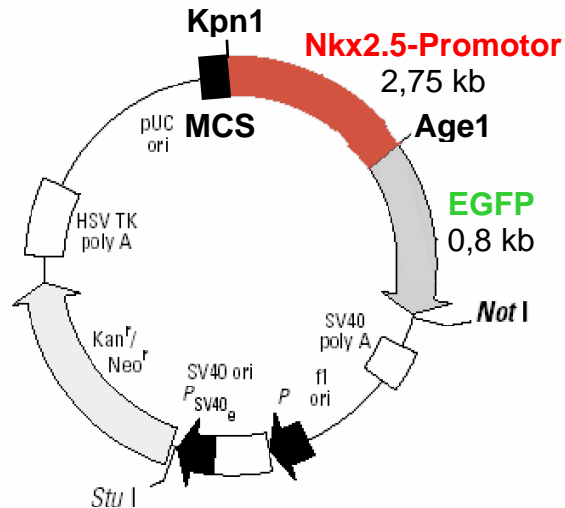


Abb. 36: Schematische Darstellung des hergestellten pNkx2.5-EGFP-Vektors (7,0 kb)

Die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen Kpn1/Age1 sind eingezeichnet. Der Vektor enthält unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors eine Kanamycin-Resistenz (Kana^r) sowie unter der Kontrolle des Simian-Virus 40 (SV40)-Promotors eine Neomycin-Resistenz (Neo^r) zur Selektion von transformierten Bakterien bzw. stabil transfizierten Zellklonen.

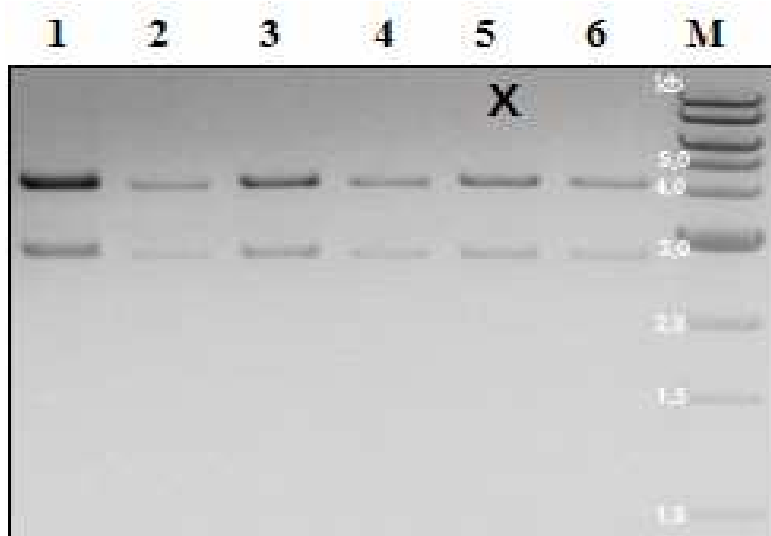


Abb. 37: 1% Agarosegel zur Kontrolle der korrekten Integration des Nkx2.5-Fragments (2,75 kb) in den pEGFP-Vektor

Sechs Bakterienklone wurden mit Kpn1/Age1 verdaut. Alle Klone zeigen das korrekte Restriktionsmuster mit der 2,75kb-Bande des Nkx2.5-Promotors und der 4,2kb-Bande des Vektoranteils. Nach Durchführung einer Maxi-Plasmid-Präparation aus Klon 5 wurden die Übergänge an den Schnittstellen sequenziert (Primer: EGFP-4104 sense; EGFP-149 anti-sense).

3.2.1.2. Herstellung von stabil mit Nkx2.5-EGFP transfizierten GSES-Zellen

Zur Transfektion in GSES-Zellen wurde das pNkx2.5-EGFP-Konstrukt mit Kpn1 linearisiert. Nach der G418-Selektion wurden 36 resistente Klone isoliert und lichtmikroskopisch bezüglich Zellmorphologie und Proliferationsverhalten untersucht. 14 Klone, welche unter dem Lichtmikroskop eindeutig die Charakteristika undifferenzierter ES-Zellen (Wachstum in scharf begrenzten Kolonien ohne erkennbare Zellgrenzen) zeigten und sich gut vermehren ließen, wurden in die Differenzierungsphase gebracht.

3.2.1.3. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von stabil mit Nkx2.5-EGFP transfizierten früh differenzierten embryonalen Stammzellen

Die Nkx2.5-EGFP-Klone wurden zunächst fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie aufgrund der fehlenden Aktivierung des Nkx2.5-Promotors bei undifferenzierten ES-Zellen erwartet, war in undifferenziertem Zustand in keinem der untersuchten 14 Klonen EGFP-Fluoreszenz detektierbar. Grün fluoreszierende Zellen zeigten sich in 5 Klonen ab Tag 3 nach Initiation der Differenzierung (Klone #5, #8, #9, #10, #25), in zwei weiteren Klonen ab Tag 4 (#3, #33). Die Fluoreszenz persistierte dabei bis Tag 5 (#5, #10), Tag 7 (#3, #8, #9, #10, #25) bzw. Tag 8 (#33) (Abb. 38). In den restlichen sieben Klonen war zu keinem Zeitpunkt EGFP-Fluoreszenz nachzuweisen. Exemplarisch sind für Klon #25 licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in Abb. 39 dargestellt.

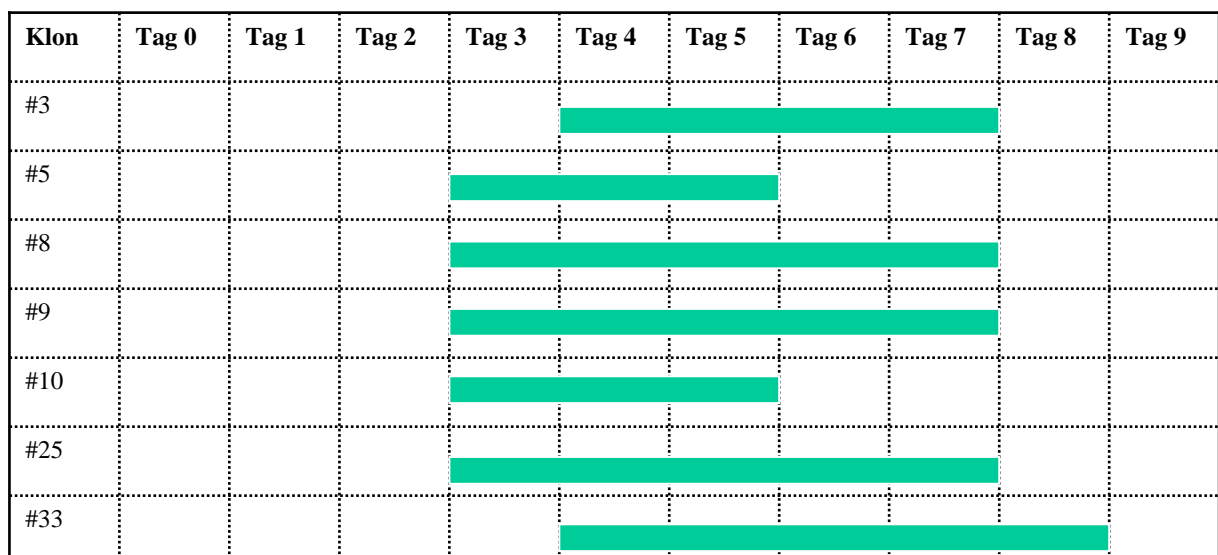


Abb. 38: Fluoreszenzmikroskopisch detektierbare EGFP-Expression von stabil mit Nkx2.5-EGFP transfizierten früh differenzierten embryonalen Stammzellen

Die Zeitachse bezieht sich auf die Anzahl der Tage nach Initiation der Differenzierung. Die EGFP-Fluoreszenz trat zwischen Differenzierungstag 3 und 8 auf, wobei an den Tagen 4 und 5 alle positiven Klone EGFP-Fluoreszenz zeigten.

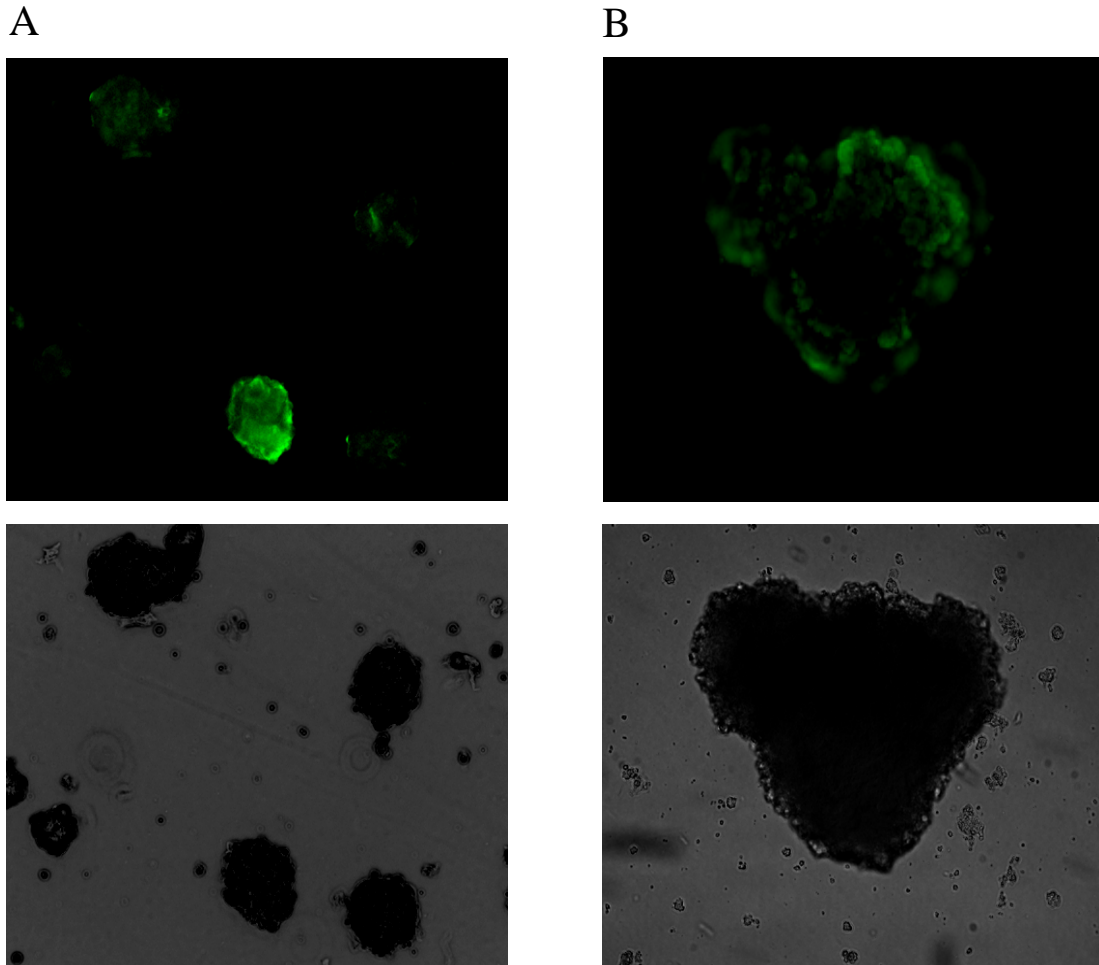


Abb. 39: Fluoreszenzmikroskopische (obere Reihe) und lichtmikroskopische Analysen (untere Reihe) des Nkx2.5-EGFP-Klons #25 an Tag 3 (A) und Tag 5 (B) der Differenzierungsphase

Zu beiden Zeitpunkten sind EGFP-positive Zellen in den „Embryoid Bodies“ nachweisbar.

3.2.1.4. Durchflusszytometrische Analyse und FACS-Aufreinigung Nkx2.5-positiver früh differenzierter GSES-Zellen

Aufgrund der höheren Sensitivität und der besseren Quantifizierungsmöglichkeit im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie sollten die Nkx2.5-EGFP-Klone mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert werden. Als Zeitpunkt wurde Differenzierungstag 4 gewählt, da zu diesem Tag sämtliche sieben positiven Klone mikroskopisch EGFP-Fluoreszenz gezeigt hatten (s. 3.2.1.3.). In der durchflusszytometrischen Analyse bestätigte sich für die fluoreszenzmikroskopisch positiven Klone #3, #5, #8, #9, #10, #25 und # 33 die EGFP-Expression. Zudem konnte im Durchflusszytometer für drei Klone, die in der Fluoreszenzmikroskopie negativ waren, EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Klone #7, #34, #35). Dieses Ergebnis bestätigt die höhere Sensitivität der FACS-Methode gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie. Der Anteil positiver Zellen lag zwischen 1,5% (Klon #35) und 9,4% (#9; #25) (Tab. 13), was mit der Ausbeute an Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen

(s. 1.3.) und damit der zu erwartenden Frequenz Nkx2.5-positiver Zellen korreliert. Ausgehend von der in Abb. 40 dargestellten durchflusszytometrischen Analyse erfolgte für die Klone #25 und #33 eine FACS-Sortierung Nkx2.5-EGFP-positiver bzw. Nkx2.5-EGFP-negativer Zellen. Diese Populationen wurden für die folgenden Untersuchungen (s. 3.2.1.5.) verwendet.

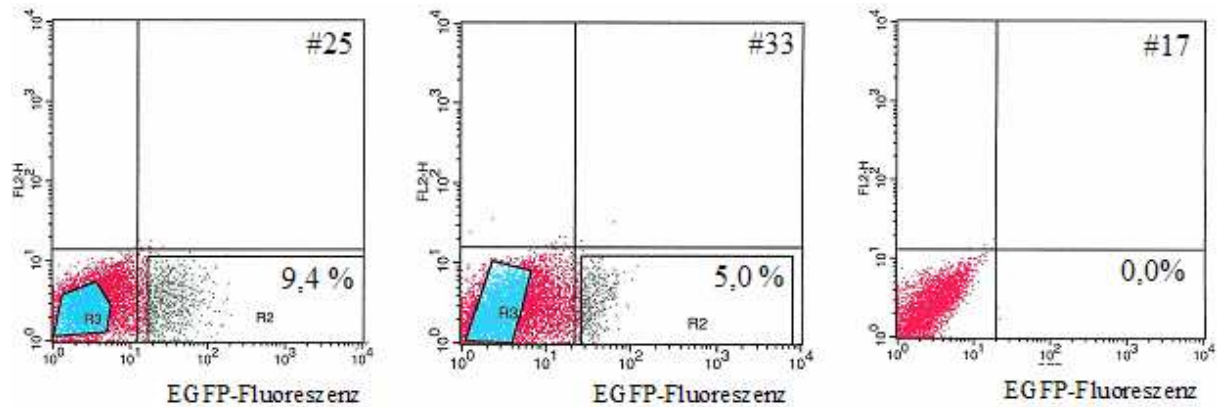


Abb. 40: Durchflusszytometrische Analyse von Nkx2.5-EGFP-Klonen am Tag 4 der Differenzierungsphase

Abgebildet sind die Klone #25 und #33 als Beispiele für Klone mit EGFP-Fluoreszenz. Dabei betrug der Anteil positiver Zellen (Region R2) bei #25 9,4%, bei #33 5,0%. Die Regionen R3 wurden für die anschließenden durchflusszytometrischen Zellsortierungen als Negativfraktionen verwendet. C zeigt mit #17 exemplarisch einen Klon, in welchem keine EGFP-Fluoreszenz detektierbar war.

Nkx2.5-EGFP-Klon	EGFP-Fluoreszenz in der Fluoreszenzmikroskopie	EGFP-Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie (Anteil positiver Zellen)
# 3	+	+ (4,0%)
# 4	+	+ (6,1%)
# 5	+	+ (3,3%)
# 6	-	-
# 7	-	+ (3,9%)
# 8	+	+ (9,3%)
# 9	+	+ (9,4%)
# 15	-	-
# 17	-	-
# 25	+	+ (9,4%)
# 33	+	+ (5,0%)
# 34	-	+ (1,9%)
# 35	-	+ (1,5%)
# 36	-	-

Tab. 13: Übersicht der fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Nkx2.5-EGFP-Klone

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen erfolgten an den Tagen 0 bis 9 der Differenzierung, die Durchflusszytometrie an Tag 4.

3.2.1.5. mRNA-Expressionsanalyse Nkx2.5-positiver früh differenzierter GSES-Zellen

Die separierten Fraktionen Nkx2.5-EGFP-positiver und Nkx2.5-EGFP-negativer Zellen der Klone #25 und #33 sollten nun bezüglich der Expression früher kardialer Marker verglichen werden. Dies erfolgte mittels RT-PCR aus der mRNA der jeweiligen Populationen. In einem ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass in beiden Klonen die murine mRNA für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 in den EGFP-positiven Zellen, in denen der transgene humane Nkx2.5-Promotor aktiviert ist, gegenüber der Negativfraktion signifikant angereichert ist (Abb. 41). Diese Daten weisen auf die Funktionalität des humanen Nkx2.5-Promotorkonstrukts in murinen embryonalen Stammzellen hin.

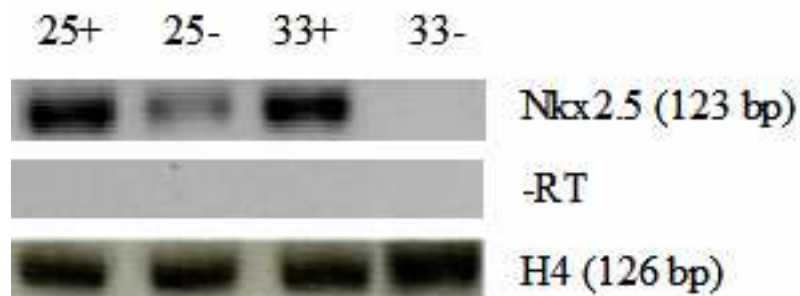


Abb. 41: RT-PCR-Analyse der Nkx2.5-EGFP-Klone #25 und #33 an Tag 4 der Differenzierungsphase

Für beide Klone ist die mRNA des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 in der mittels Nkx2.5-Promotor markierten Fraktion signifikant höher als in der negativen Population. Die Analyse wurde als „Nested-PCR“ durchgeführt (Primer: mNkx2.5-1314 sense; mNkx2.5-1471 anti-sense; Nested-Primer: mNkx2.5-1332 sense; mNkx2.5-1454 anti-sense)

Zudem wurde die Expression von GATA-4, Mef-2c und NCX1 untersucht, welche weitere frühe kardiale Marker darstellen (s. 1.5.2., 1.5.3.). Für GATA-4 und Mef-2c zeigte sich dabei in beiden Klonen eine signifikante Anreicherung der mRNA in den positiv selektierten Zellen. NCX1-mRNA nahm in Klon #33 in der Positiv-Fraktion deutlich zu, während in Klon #25 NCX1-mRNA weder in der Positiv- noch in der Negativpopulation nachweisbar war (Abb. 42). Diese RT-PCR-Daten zeigen, dass der hNkx2.5-Promotor Zellen markiert, die für kardiale Vorläuferzellen charakteristische Gene exprimieren.

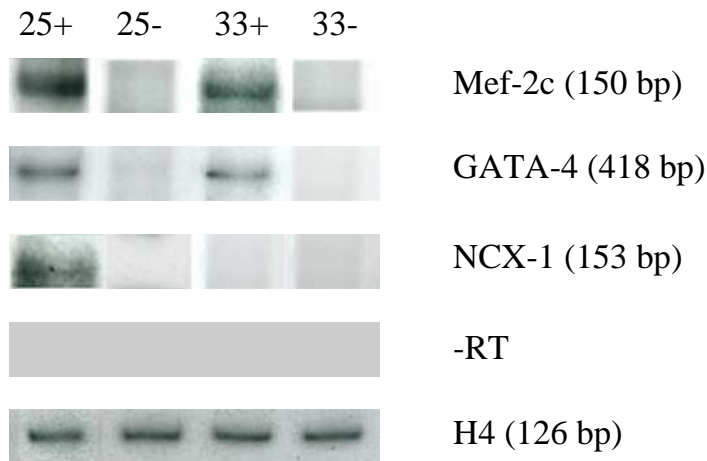


Abb. 42: RT-PCR-Analyse der Nkx2.5-EGFP-Klone #25 und #33 an Tag 4 der Differenzierungsphase

Es wurde die Expression früher kardialer Markergene untersucht. Für beide Klone zeigt sich eine signifikante Zunahme der mRNA für GATA-4 und Mef-2c in der mittels Nkx2.5-Promotor markierten Fraktion gegenüber der negativen Population. Die mRNA für NCX1 ist in Klon #33 in der Positivfraktion höher als in der Negativfraktion, in Klon #25 jedoch in beiden Populationen nicht nachweisbar. Die Analysen wurden als RT-PCR mit radioaktiver ³²P-Markierung durchgeführt (Primer: mGATA4-641 sense; mGATA4-1058 anti-sense; mMef2c-1326 sense; mMef2c-1476 anti-sense; mNCX1-2050 sense; mNCX1-2203 anti-sense)

4. DISKUSSION

Embryonale Stammzellen gelten auf der Basis grundlagenwissenschaftlicher Erkenntnisse und präklinischer Studien gegenwärtig als vielversprechende Ressource für die Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen. Im Gegensatz zu adulten Stammzellen ist für embryonale Stammzellen definitiv gezeigt, dass sie zahlreiche funktionelle Kardiomyozyten ausbilden können (s. 1.2. und 1.3.). Ihre hohe hypoxische Toleranz, u.a. bedingt durch eine gesteigerte VEGF-Produktion und VEGF-Rezeptor-2-Expression (224), stellt ein weiteres Argument für ihre Eignung insbesondere bei ischämischer Herzerkrankung dar. Die kardiale Differenzierung wurde für murine embryonale Stammzellen in zahlreichen Publikationen gezeigt (171); (172); (173); (174); (175); (176). Die Generierung von Kardiomyozyten aus humanen ES-Zellen (167); (169); (110); (184); (185); (186); (187) eröffnet die Perspektive einer möglichen klinischen Anwendung von ES-Zellen bei Herzerkrankungen. Wie unter 1.4.1. dargestellt, konnte in verschiedenen Tiermodellen, darunter auch klinisch relevanten Großtierversuchen, gezeigt werden, dass nach Myokardinfarkt transplantierte ES-Zellen in das ischämische Myokard integrieren und die kardiale Pumpfunktion verbessern können (s. 1.4.1, Tab. 8).

Die in einigen dieser Studien verwendete Strategie, ES-Zellen in undifferenziertem Zustand zu transplantieren, führte in syngenem und allogenen Mäusen zur intramyokardialen

Teratombildung (28) und stellt damit für die Anwendung an Patienten keine Alternative dar. Auch bei der Applikation des heterogenen Spektrums differenzierter Zellen stellt die Gefahr, undifferenzierte ES-Zellen zu verschleppen, ein wesentliches Hindernis für eine klinische Anwendung dar (s. 1.4.2.). Die Therapie mit humanen ES-Zellen würde innerhalb derselben Spezies erfolgen, wodurch das Risiko einer Tumorentwicklung erhöht scheint (225).

Im Mittelpunkt der Forschung steht gegenwärtig die Optimierung der Sicherheit sowie des funktionellen Effekts einer Zelltherapie mit embryonalen Stammzellen. Hier kommt der Frage nach dem für die Transplantation bestgeeigneten kardialen Zelltyp und Differenzierungsstadium herausragende Bedeutung zu. Zur Minimierung des Teratomrisikos ist es essentiell, Reinkulturen des gewünschten Zelltyps zu transplantieren.

Obwohl durch modifizierte Kulturbedingungen mit Hilfe spezieller Moleküle, Wachstumsfaktoren und Zytokine (s. Tab. 9) die Ausbeute an Kardiomyozyten bei der Differenzierung von embryonalen Stammzellen von weniger als 10% bei spontaner Differenzierung auf bis zu 70% erhöht werden konnte (110), ist nicht zu erwarten, dass eine weitere Optimierung der Differenzierungsprotokolle zu einer Reinkultur definierter kardiomyozytärer Subtypen führen wird. Um die für Transplantationen erforderlichen Reinheiten zu generieren, müssen andere Strategien zur Isolation entwickelt werden. Für die Selektion von Kardiomyozyten bzw. deren Subtypen ist bisher kein geeigneter spezifischer Marker bekannt, der endogen exprimiert wird. Deshalb ist es Ziel der gegenwärtigen Forschung, funktionelle transplantierbare Kardiomyozyten durch genetische Manipulation zu identifizieren und für Aufreinigungszwecke zu markieren.

Bisher gibt es jedoch kein geeignetes Aufreinigungsprotokoll, um transplantierbare Zelltypen aus embryonalen Stammzellen zu gewinnen. Die vorliegende Dissertation zeigt die Markierung und Isolation von stabil transfizierten ES-Zellen mit Hilfe der zellschonenden und zeitsparenden magnetischen Zellsortierung (MACS). Diese Methode könnte ein bedeutendes Instrument für die Promotor-gestützte Selektion eines spezifischen aus embryonalen Stammzellen differenzierten Zelltyps mit hoher Ausbeute und Reinheit darstellen und somit die Grundlage für sichere und effektive klinische Zelltransplantationen bilden.

Für die kardiale Zellersatztherapie könnte dabei der parallel zur Etablierung der MACS-Methode isolierte und in embryonalen Stammzellen charakterisierte humane Nkx2.5-Promotor eine wichtige Rolle spielen, weil dieser Zellen markiert, deren Expressionsmuster dem Typ kardialer Vorläuferzellen entspricht. Das Potenzial dieser früh differenzierten

kardiomyogenetisch determinierten Abkömmlinge von ES-Zellen zur kardialen Regenerationstherapie wird besonders hoch eingeschätzt.

4.1. Aufreinigung markierter embryonaler Stammzellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)

Das Protokoll zur magnetischen Zellsortierung (MACS) von embryonalen Stammzellen basiert auf der Transfektion mit dem nicht immunogenen humanen Δ CD4-Oberflächenmolekül, dessen intrazelluläre Domäne deletiert ist. Δ CD4 wurde bisher erfolgreich für die MACS-Selektion verschiedener Zelltypen eingesetzt (226); (227); (228), wobei das System fast ausschließlich als Transfektionsmarker über virale Promotoren angewandt wurde.

Die Perspektive aus dieser Arbeit besteht letztlich darin, MACS als Instrument zur zellschonenden und zeitsparenden Selektion von bestimmten aus ES-Zellen differenzierten Subtypen über spezifische Promotoren zu nutzen. Weil das verwendete Markergen CD4 ausschließlich in Zellen des Immunsystems exprimiert wird, tritt das Problem einer Kontamination mit endogen CD4 exprimierenden Zellen in nativen ES-Zellkulturen nicht auf, wie in 3.1.2. gezeigt werden konnte.

4.1.1. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4EGFP-Moleküls

Um das MACS-Protokoll für genetisch manipulierte ES-Zellen zu etablieren, wurde ein Δ CD4EGFP-Fusionskonstrukt generiert, das zugleich den Vorteil einer *in vivo*-Detektierbarkeit mittels Grünfluoreszenz bietet. Die Daten zeigen, dass mit Hilfe des Δ CD4EGFP-Systems Reinheiten von über 97% an positiven vitalen Zellen erzielt werden. Die Ergebnisse sind dabei unabhängig vom Stadium der Differenzierung und dem initialen Anteil Δ CD4EGFP-positiver Zellen. Damit ist MACS bezüglich der erzielten Reinheiten gleichwertig mit der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS), zugleich aber wesentlich verträglicher für die Zellen sowie unabhängig von einem kostenintensiven Zellsortiergerät. Δ CD4EGFP sollte die Charakterisierung von Promotorkonstrukten in ES-Zellen erheblich vereinfachen, weil der aktive Promotor, der die Δ CD4EGFP-Expression steuert, unter dem Fluoreszenzmikroskop einfach zu detektieren ist. Somit ist auch der optimale Zeitpunkt für die MACS-Sortierung einfach zu evaluieren. Zugleich kann das Aufreinigungsergebnis auf technisch einfache sowie zeitsparende Weise visuell unter dem Fluoreszenzmikroskop

festgestellt werden. Nach Transplantation im Tiermodell könnten die applizierten Zellen detektiert werden, ohne dass Antikörper-Färbungen notwendig werden würden.

In der durchflusszytometrischen Analyse fällt auf, dass ein geringer Teil der positiv markierten Zellen keine detektierbare EGFP-Fluoreszenz zeigt. Diese geringfügig schwächere Sensitivität der EGFP-Fluoreszenz des Fusionsmoleküls im Vergleich zur Antikörpermarkierung des CD4-Anteils wird aber die oben beschriebenen Vorteile keineswegs aufheben, da der Großteil der Zellen für beide Detektionsmethoden positiv ist. Vielmehr könnte diese Konstellation im Hinblick auf die Übertagung des Δ CD4EGFP-Systems auf spezifische Promotoren von Vorteil sein: Somit kann nämlich für jede fluoreszierende Zelle eine Δ CD4-Expression – die Voraussetzung für die MACS-Aufreinigung – angenommen werden.

4.1.2. MACS-Aufreinigung von stabil transfizierten GSES-Zellen mit Hilfe des Δ CD4-Moleküls

Der Transfer der MACS-Technik auf das Δ CD4-Molekül ohne EGFP-Anteil sollte die nicht immunogenen Eigenschaften dieses humanen Antigens im Hinblick auf künftige klinische Anwendungen sicherstellen. Vergleichbar mit den Δ CD4EGFP-Ergebnissen lieferte das Δ CD4-System bis zu 98,5% positive vitale Zellen. Die Aufreinigung war wiederum unabhängig sowohl vom Differenzierungszustand als auch von der Ausgangsfrequenz. Selbst für sehr niedrige Ausgangspopulationen positiver Zellen (0,6%) zeigte sich die Eignung des MACS-Systems mit einer Reinheit von über 98%. Die Ergebnisse könnten dazu führen, dass diese Technik in näherer Zukunft in der Klinik Anwendung finden könnte.

4.1.3. MACS als Alternative zur Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) und Antibiotikumselektion

Ein wesentliches Hindernis einer klinischen Anwendung embryonaler Stammzellen besteht darin, dass bisher keine effizienten Methoden verfügbar sind, um die gewünschte Zellpopulation aufzureinigen (229); (230), (231); (232). Für viele Zelltypen wie z.B. Kardiomyozyten fehlt ein geeigneter endogener Oberflächenmarker, sodass die Einführung eines Markergens unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors notwendig ist.

In einem solchen Ansatz markierte die Arbeitsgruppe Franz ventrikuläre Kardiomyozyten mittels EGFP, dessen Expression von einem ventrikelspezifischen 2,1kb-Promotor für MLC2v gesteuert wurde (170). Die EGFP-basierte FACS-Sortierung führte zu einer Population mit 97% fluoreszierenden Zellen. Verschiedene andere Gruppen verwendeten

ebenfalls die FACS-Methode für Selektionen über herzmuskelspezifische Promotoren (205); (203); (195). Für eine klinische Anwendung ist das EGFP-Molekül als nicht humanes und damit immunogenes Protein jedoch nicht geeignet. Zudem besteht die Gefahr, dass der FACS-Prozess durch die mechanische Beschleunigung sowie die Bestrahlung und Ionisierung die elektrophysiologischen Eigenschaften der hochspezifizierten kardialen Zielzellen verändert. Eine zusätzliche Limitation der FACS-Methode stellt ihre niedrige Sortierkapazität dar. Zwar könnten hier neue Hochgeschwindigkeits-Sortiergeräte, die mit Raten von bis zu 35000 Zellen pro Sekunde arbeiten, eine Alternative darstellen, doch führt ihr Einsatz zu einem Verlust von bis zu 50% der Zellen im Vergleich zu Standard-Sortiergeräten. FACS-Sortierung mit hohen Geschwindigkeiten, die einen Durchfluss von bis zu 120 Millionen Zellen pro Stunde bei einer fünf- bis zehnfachen Anreicherung ermöglicht, kann für eine Voranreicherung bestimmter Zellpopulationen sinnvoll sein. Die angereicherte Population muss anschließend aber für Anwendungen, für welche die zu erzielenden Reinheiten von ca. 50% nicht ausreichen, in einem zweiten Sortierschritt mit einem FACS-Standardgerät aufgereinigt werden. Zudem scheint die Hochgeschwindigkeits-Sortierung insbesondere für empfindliche und schlecht wachsende Zellen wie Kardiomyozyten ungeeignet, weil die erhöhte Sortiergeschwindigkeit einen zusätzlichen mechanischen Stress für die Zellen darstellt.

MACS dagegen macht es bei einer Sortierleistung von bis zu 10^{11} pro Stunde möglich, große Zellzahlen zu separieren und – im Gegensatz zu FACS - selbst sehr geringe Zellpopulationen zu identifizieren.

Eine andere Aufreinigungsstrategie basiert auf der Transfektion der ES-Zellen mit einem Antibiotikum-Resistenzgen zur gezielten antibiotischen Selektion von Subpopulationen (204); (20); (201); (202). Die Nachteile dieser Technik liegen in der langen Selektionsdauer, wodurch die Gefahr besteht, dass sich die Antibiotikumbehandlung schädlich auf terminal differenzierte Zellen auswirkt und andererseits Resistenzen auftreten. Wie für die EGFP-Fluoreszenz ist auch für die Antibiotikumresistenz die Expression eines nicht humanen Proteins in den transplantierten Zellen erforderlich, wodurch zusätzliche immunologische Probleme bei künftigen klinischen Anwendungen zu erwarten sind. Der MACS-basierte Ansatz, der sich auf die Expression eines nicht immunogenen Oberflächenmarkers stützt, könnte einen entscheidenden Schritt darstellen, um diese Probleme zu lösen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass MACS die Anforderungen an ein geeignetes Aufreinigungssystem für aus murinen ES-Zellen differenzierte Zellen erfüllt.

4.1.4. Anwendungsmöglichkeiten und Perspektiven

Die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen die Perspektive, dass in naher Zukunft die effiziente, zellschonende und zeitsparende Selektion eines jeden aus ES-Zellen differenzierbaren Zelltyps möglich wird, der über einen spezifischen Promotor markiert werden kann. Die Tatsache, dass MACS in gleichem Maße im frühen wie im späten Differenzierungsstadium geeignet ist, bildet die Voraussetzung für die erfolgreiche Selektion sowohl von Vorläuferzellen als auch von enddifferenzierten Zellen, abhängig von der zeitlichen Aktivität des verwendeten Promotors. Im Hinblick auf therapeutische Zelltransplantationen kommt neben der Isolation von kardialen Zellen insbesondere der Selektion von β -Zellen des Pankreas und von Neuronen herausragende klinische Bedeutung zu.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass MACS auch für undifferenzierte ES-Zellen geeignet ist. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, undifferenzierte Zellen gezielt zu markieren und von spontan differenzierenden Zellen zu diskriminieren. Dieser Ansatz könnte dazu verwendet werden, die bei *in vitro*-Kulturen undifferenzierter Zellen immer wieder zu beobachtende Kontamination mit Zellen, die trotz der definierten Kulturbedingungen spontan differenzieren, zu beseitigen. Für diese Anwendung bieten sich Promotoren für embryonale Stammzellmarker wie Oct-4 (s. Tab. 4) an, die ausschließlich in undifferenziertem Zustand exprimiert werden. MACS könnte auf diese Weise Reinkulturen undifferenzierter ES-Zellen gewährleisten.

4.2. Markierung kardialer Vorläuferzellen mit Hilfe des hNkx2.5-Promotors.

4.2.1. Limitationen bisher publizierter Promotoren zur Selektion von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen

Verschiedene Arbeitsgruppen gewannen durch Selektion mittels des kardial spezifischen α -MHC-Promotors hochreine Herzmuskelzellkulturen mit den charakteristischen immunzytologischen und ultrastrukturellen Eigenschaften (20) (201); (202). Nach Injektion in den linken Ventrikel von Dystrophin-„Knock-out“-Mäusen (*mdx*) waren die genetisch manipulierten Transplantatzellen mit dem Empfängermyokard assoziiert, zeigten einen kardiomyozytären Phänotyp sowie die Expression von herzmuskelspezifischen Proteinen und Zell-Zell-Verbindungen mit dem Empfängermyokard (20). Obwohl diese tierexperimentellen Daten mittels α -MHC selektierte Zellen für eine intramyokardiale Transplantationstherapie grundsätzlich geeignet erscheinen lassen, ist zu kritisieren, dass hierbei Mischpopulationen von kardialen Zellen eingesetzt wurden. Es ist davon auszugehen, dass diese ein arrhythmogenes Potenzial besitzen, was im Patienten die Langzeitfunktion des Herzens

beeinträchtigen könnte. Mittels des α -MHC-Promotors ist nämlich keine Diskriminierung zwischen den verschiedenen Subtypen von Kardiomyozyten möglich. Diese Limitation gilt auch für die Selektion mit Hilfe des α -Aktin-Promotors (203). α -Aktin zählt ebenso wie α -MHC zu den Genen, die im adulten Herz präferentiell in atrialen Kardiomyozyten, im frühen Stadium der Embryogenese jedoch auch in ventrikulären Zellen exprimiert werden (196); (198); (195).

Einen wesentlichen Fortschritt im Hinblick auf die gezielte Transplantation bestimmter Subtypen von Herzmuskelzellen stellte die spezifische Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten aus den „Embryoid Bodies“ dar. Die Markierung, Anreicherung und Charakterisierung des ventrikulären Zelltyps gelang Müller et al. mit Hilfe des MLC2v-Promotors (170). Diesen aus der Ratte isolierten 2,1 kb langen Promotor hatte die Arbeitsgruppe Franz zuvor an transgenen Tieren und im adenoviralen Kontext als Ventrikel-spezifischen Marker charakterisiert (199); (200); (233).

Jüngste präklinische Studien zur myokardialen Zelltherapie mit ES-Zellen sprechen dafür, dass im frühen Differenzierungsstadium transplantierte ES-Zellen die attraktivste Ressource für die kardiale Regenerationstherapie bei ischämischer Herzerkrankung darstellen (24); (29); (32). Yang et al. zeigten, dass früh differenzierte murine ES-Zellen im Infarktmodell der Maus sechs Wochen nach Transplantation im geschädigten Myokard regenerieren und die linksventrikuläre Funktion signifikant verbessern konnten (24). Die Autoren postulieren dabei, dass die injizierten früh differenzierten ES-Zellen *in vivo* proliferieren und den kardialen Differenzierungsprozess fortsetzen. Nach Isolation aus dem behandelten Herz lag die Anzahl markierter Transplantatzellen um das Vierfache höher als die der ursprünglich ins Herz implantierten Zellen. Die transplantierten Zellen erreichten die funktionelle und morphologische Kompetenz von reifen Herzmuskelzellen, einhergehend mit der für reife Kardiomyozyten charakteristischen Expression der Strukturproteine cTN-I und α -MHC.

Jüngste Daten der Transplantation von aus humanen ES-Zellen differenzierten Zellen in gesunde Rattenherzen legen nahe, dass das *in situ*-Proliferationspotenzial für aus humanen ES-Zellen gewonnene Kardiomyozyten noch stärker ausgeprägt ist (32). Die Expression von Ki-67 und BrdU 4 war mit einem siebenfachen Anstieg der Transplantatgröße über vier Wochen assoziiert. Innerhalb dieses Zeitraums entwickelten sich die Transplantatzellen zunehmend zu reifen Kardiomyozyten und bildeten architektonisch und funktionell eine Einheit mit dem Empfängermyokard. Für diese gerichtete Form der *in vivo*-Differenzierung wird parakrinen Faktoren wie TGF- β und BMP-2, die von umgebenden Empfänger-Herzmuskelzellen produziert werden, eine entscheidende Rolle zugeschrieben (25).

Die Fähigkeit, *in vivo* zu proliferieren und kardial weiterzudifferenzieren, gilt bei der Auswahl geeigneter Zelltypen zur myokardialen Regeneration als entscheidender Vorteil von noch nicht terminal differenzierten Zellen. Deshalb gewinnt die Charakterisierung früher kardialer Promotoren zur spezifischen Markierung und Isolation von kardialen Vorläuferzellen herausragende Bedeutung.

Das Nkx2.5-Gen ist der am besten charakterisierte Marker der frühen Kardiomyogenese und gilt aufgrund seiner unter 1.5.2. beschriebenen Eigenschaften als vielversprechender Kandidat zur Markierung von kardialen Vorläuferzellen. Hidaka et al. generierten 2003 (195) eine murine ES-Zelllinie mit einem „Knock in“ des GFP-Reportergens in einen der beiden Nkx2.5-Loci. Diese Publikation zeigte, dass Nkx2.5-positive Zellen kardiale Vorläuferzellen repräsentieren, die zu Sinusknotenzellen sowie atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten weiterdifferenzierten. Der durch „Knock in“ bedingte Verlust von einer Nkx2.5-Kopie beeinträchtigte zwar – anders als in der Arbeit von Biben et al. beschrieben (234) – die kardiale Morphogenese nicht. Jedoch zeigten real-time RT-PCR-Analysen, dass das Nkx2.5-Transkriptionsniveau in Nkx2.5GFP-Zellen gegenüber Kontroll-ES-Zellen um etwa die Hälfte vermindert war, was mit einer reduzierten Transkription der MLC2v- und ANP-Gene einherging. Ein weiterer Nachteil des verwendeten Modells besteht darin, dass die Intensität des GFP-Signals erst an Tag 8 ausreichend war, um Nkx2.5-positive Zellen mittels FACS zu separieren, während das endogene Nkx2.5-Transkript bereits ab Differenzierungstag 5 nachgewiesen werden konnte.

Die Daten von Hidaka et al. zeigen, dass Nkx2.5 einen hochspezifischen Marker darstellt, der sich zur Selektion kardialer Vorläuferzellen aus ES-Zellen hervorragend eignet. Für die Gewinnung von Zellen dieses Subtyps, deren Expression von kardialen Genen nicht durch ein „Knock in“ in den Nkx2.5-Lokus manipuliert ist, liefert die vorliegende Dissertation mit einer Nkx2.5-Promotor-gestützten Isolation einen wichtigen Ansatz.

4.2.2. Charakterisierung des hNkx2.5-Promotors in embryonalen Stammzellen

Aufgrund seiner hohen Spezifität und seiner frühen Aktivität während der Kardiogenese wurde der Nkx2.5-Promotor als Marker für kardiale Vorläuferzellen ausgewählt. In Mäusen beginnt die Nkx2.5-Expression an Embryonaltag 7.5 (209), während in murinen embryonalen Stammzellen Nkx2.5-mRNA ab Tag 5 der Differenzierung (209) und damit noch vor dem Beginn der spontanen Kontraktilität der Herzmuskelzellen nachweisbar ist.

Weil die Regulationskaskaden der Mesoderminduktion und der Kardiomyogenese hoch konserviert sind (209) und das humane Nkx2.5-Gen zum „Tinman“-Gen in *Drosophila* hoch

homolog ist (211); (235), ist davon auszugehen, dass die Regulationsmechanismen der Nkx2.5-Expression in der Evolution ebenfalls konserviert sind. Zwischen murinem und humanem Nkx2.5-Promotor wurden hoch homologe Sequenzen verschiedener regulatorischer Regionen (236); (237) nachgewiesen, sodass wir eine Funktionalität des humanen Nkx2.5-Promotors im murinen ES-Zellsystem postulierten. Das verwendete 2,75 kb lange Nkx2.5-Promotor-Fragment enthält die zur Maus homologen positiven cis-Regulationselemente CSX-RE1 und CSX-RE-2, welche die Herzmuskelzell-spezifische Expression und die Promotoraktivität steuern (237).

Die Identifizierung Nkx2.5-positiver Zellen erfolgte über das in der Arbeitsgruppe Franz seit Jahren etablierte EGFP-System (170). Fluoreszenzmikroskopisch zeigten sich bei sieben der 14 untersuchten Nkx2.5-EGFP-Klone grün fluoreszierende Zellen ab der Frühphase der Differenzierung (Tag 3 bzw. 4) und damit dem Zeitpunkt, ab welchem Nkx2.5-Promotoraktivität erwartet wird. Dass die zeitlichen Fluoreszenzverläufe aller EGFP-positiven Klone eng korrelierten (s. Abb. 38), ist ein weiteres Indiz dafür, dass die EGFP-Fluoreszenz nicht durch Integrationsphänomene, sondern durch die Aktivität des transgenen humanen Nkx2.5-Promotors in früh differenzierten murinen ES-Zellen bedingt ist. Der durchflusszytometrisch quantifizierte Anteil fluoreszierender Zellen der positiven Klone zwischen 1,5% und 9,4% (Mittelwert: 5,6%; s. Tab. 13) korreliert mit den Frequenzen Nkx2.5-positiver Zellen, die Hidaka et al. in ihrem Nkx2.5-„Knock-in“-Modell beschrieben (195). Auf die Funktionalität des humanen Nkx2.5-Promotorkonstrukts in murinen ES-Zellen weist zudem hin, dass in den untersuchten Klonen die murine mRNA für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 in den EGFP-positiven Zellen signifikant angereichert ist (s. Abb. 41). Dass das Nkx2.5-Transkript bereits an Tag 4 der Differenzierung nachgewiesen wurde, während andere Publikationen dieses erst ab Tag 5 beschreiben (209); (195), ist als Folge der verwendeten sensitiveren Detektionsmethode der „Nested-PCR“ zu interpretieren.

Der 2.75 kb hNkx2.5-Promotor gewährleistet in murinen ES-Zellen eine Expressionsstärke des Markerproteins EGFP, welche die Sortierung von Nkx2.5-positiven Zellen mit Beginn der endogenen Nkx2.5-Expression an Tag 4 der Differenzierungsphase ermöglicht (s. Abb. 40). Dagegen zeigte sich bei Hidakas Nkx2.5-„Knock in“ eine Diskrepanz zwischen dem Beginn der Nkx2.5-Expression (Tag 5) und dem Zeitpunkt, ab dem ein für die FACS-Sortierung ausreichendes GFP-Signal zu detektieren war (Tag 8). In der früheren Detektierbarkeit liegt ein entscheidender Vorteil der konventionellen Transfektion einer Promotor-Expressionskassette, um frühe kardial determinierte Zellen für zelltherapeutische Anwendungen zu markieren und zu isolieren.

In den Nkx2.5-positiven Zellen zeigten sich signifikante Anreicherungen der mRNA für die Transkriptionsfaktoren GATA-4 und Mef-2c, welche in der Interaktion mit Nkx2.5 die kardiale Myogenese steuern. Auch das Transkript des frühen kardialen Markers NCX1 war in den positiv selektierten Zellen erhöht. Diese RT-PCR-Daten zeigen, dass der hNkx2.5-Promotor Zellen markiert, deren Expressionsmuster dem früher kardial determinierter Zellen entspricht.

Um den frühkardialen Typus der hNkx2.5-selektierten Zellen zu bestätigen und genauer zu spezifizieren, sind RT-PCR-Untersuchungen von zusätzlichen herzspezifischen (auch in späteren Stadien der Differenzierung) und nicht kardialen Markern ebenso erforderlich wie die Analyse der jeweiligen Gene auf Proteinebene sowie elektrophysiologische Untersuchungen.

4.2.3. Anwendungsmöglichkeiten und Perspektiven

Der 2,75 kb lange hNkx2.5-Promotor bietet einen vielversprechenden Ansatz, kardiale Vorläuferzellen innerhalb des heterogenen Zellspektrums sich differenzierender ES-Zellen zu identifizieren und für Zelltransplantationen zu isolieren. Dass die Injektion dieser spezifischen Subpopulation die Ergebnisse der Therapie ischämischer Herzerkrankungen mittels ES-Zellen optimieren könnte, legt eine im Jahr 2005 von Menard et al. publizierte Studie nahe (29). Im Infarktmodell des Schafs zeigte sich eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach Transplantation früh differenzierter mES-Zellen, welche *in vitro* mit dem kardiogenen Faktor BMP-2 vorbehandelt worden waren (s. Tab. 9). Die Transplantatzellen proliferierten in der humoralen Umgebung des Empfängermyokards als kardiale Vorläuferzellen *in situ* weiter, gekennzeichnet durch die gleichzeitige Positivität für Nkx2.5 und den Proliferationsmarker Ki-67, und bildeten reife Kardiomyozyten aus. Diese Daten zeigen, dass Nkx2.5-positiv Zellen als Population, die *in vivo* proliferiert und zugleich ihre kardial determinierte Entwicklung gezielt fortsetzt, eine herausragende Rolle für die kardiale Regeneration nach ES-Zell-Transplantation spielen. Die Applikation einer Reinkultur Nkx2.5-positiver Zellen durch eine hNkx2.5-Promotor-gestützte Isolation könnte Integration und Funktionalität des Transplantats optimieren und die funktionellen Effekte einer ES-Zell-Therapie nach Myokardinfarkt noch steigern.

Während in den bisher publizierten präklinischen Studien zur myokardialen Zellersatztherapie früh differenzierte ES-Zellen als heterogenes Zellspektrum injiziert wurden, könnte eine Nkx2.5-Promotor-gestützte Isolierung erstmals die gezielte Transplantation früher Kardiomyozyten ermöglichen. Damit könnte möglicherweise eine entscheidende Limitation

bisheriger präklinischer Studien überwunden werden: das Risiko einer Teratombildung (s. 1.4.2.). Dieses besteht auch bei Verwendung vordifferenzierter Zellen, solange der Transplantat-Zelltyp nicht zuvor aufgereinigt und damit eine mögliche Kontamination mit undifferenzierten Zellen verhindert wird.

Während das verwendete EGFP-System wegen der einfachen *in vivo*-Detektierbarkeit zur Promotorcharakterisierung gut geeignet ist, kommt es aufgrund der unter 4.2.3. diskutierten Nachteile für eine schonende Aufreinigung von Transplantatzellen nicht in Frage.

Ein künftiger Transfer auf die parallel entwickelte Methode der magnetischen Zellsortierung mittels des trunkierten Oberflächenmoleküls Δ CD4 könnte die spezifische Markierung kardialer Vorläuferzellen mit dem Goldstandard einer zellschonenden und zeitsparenden Aufreinigung kombinieren. Die vorgestellten Daten zeigen, dass MACS hervorragend zur Aufreinigung früh differenzierter ES-Zellen geeignet ist. Weil der humane Nkx2.5-Promotor in murinen ES-Zellen zu diesem Zeitpunkt (ab Tag 3 der Differenzierungsphase) aktiv ist, erscheint ein Transfer des Nkx2.5-Promotoransatzes auf das MACS-System erfolgversprechend.

Die Funktionalität des humanen Nkx2.5-Promotors im murinen ES-Zellsystem lässt erwarten, dass dieser auch in humanen embryonalen Stammzellen spezifisch für frühe kardial determinierte Zellen ist und eine ausreichende Expressionsstärke eines Transgens für die Markierung dieses Zelltyps gewährleistet. Die MACS-Aufreinigung von Nkx2.5-positiven kardialen Vorläuferzellen mittels des nicht immunogenen humanen Δ CD4-Proteins könnte die Zelltherapie ischämischer Herzmuskelerkrankungen mit Hilfe embryonaler Stammzellen der klinischen Anwendung einen entscheidenden Schritt näher bringen. Voraussetzung hierfür wäre, dass das in den verwendeten Vektoren enthaltene G418-Resistenzgen zur Selektion stabil transfizierter Klone entweder durch das „Cre-Lox“-System entfernt oder durch ein für ein humanes Oberflächenprotein kodierendes Gen ersetzt wird. So könnte sichergestellt werden, dass die selektierten Transplantatzellen keine nicht humanen Proteine exprimieren, die in Patienten immunologische Reaktion hervorrufen könnten.

Neben der Isolierung von frühen kardialen Zellen für die Zelltherapie könnte der 2,75kb lange hNkx2.5-Promotor eingesetzt werden, um im Tiermodell die Mechanismen der *in situ*-Differenzierung zu Kardiomyozyten zu studieren. Die intramyokardiale Transplantation von mit dem Nkx2.5EGFP-Vektor transfizierten ES-Zellen in undifferenziertem Stadium wäre hierfür ein geeignetes Modell (vgl. (29)). Eine zelltypspezifische hNkx2.5-Promotor-gesteuerte Überexpression wäre in diesem Kontext ein interessantes Instrument, um den

Einfluss bestimmter Gene auf die *in situ*-Kardiomyogenese zur kardialen Regeneration zu evaluieren.

Darüber hinaus bietet der hNkx2.5-Promotor verschiedene Optionen für *in vitro*-Experimente. Die spezifische Markierung früher kardial determinierter Zellen könnte als Zellmodell zur Untersuchung von Faktoren und Signalwegen fungieren, welche die kardiale Genese und die terminale Differenzierung von Kardiomyozyten steuern. Das hNkx2.5EGFP-System könnte die Effektivität der Kardiomyogenese in Abhängigkeit von variablen Kulturbedingungen auf einfache Weise evaluieren. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit liegt in der zelltypspezifischen Überexpression bestimmter Gene, um deren Rolle in der *in vitro*-Kardiomyogenese zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Embryonale Stammzellen stellen aufgrund ihrer Fähigkeit, *in vitro* in verschiedene Subtypen von Kardiomyozyten zu differenzieren, eine vielversprechende Quelle für eine spezifische Zellersatztherapie ischämischer Herzerkrankungen dar. Ein wesentliches Hindernis, das große therapeutische Potenzial embryonaler Stammzellen für klinische Zelltransplantationen zu nutzen, besteht darin, dass es bisher kein geeignetes Verfahren gibt, den gewünschten Zelltyp zu isolieren. Die Applikation hochaufgereinigter definierter Subpopulationen ist jedoch Voraussetzung, um optimale funktionelle Effekte zu erzielen und andererseits eine potenzielle intramyokardiale Teratomformation aus mittransplantierten undifferenzierten ES-Zellen zu vermeiden. Die Verwendung Zelltyp-spezifischer Promotoren zur Expression eines transgenen Oberflächenmarkers könnte die zellschonende und nicht immunogene Aufreinigung eines gewünschten aus ES-Zellen gewonnenen Zelltyps mit hoher Ausbeute ermöglichen und damit eine wichtige Basis für künftige Zelltransplantationen liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll etabliert, um mittels der magnetischen Zellsortierung (MACS), dem gegenwärtigen Goldstandard einer zellschonenden und effizienten Zellseparation, stabil transfizierte murine embryonale Stammzellen aufzureinigen. Für MACS wurden ES-Zellen markiert, die ein intrazellulär trunkiertes CD4-Oberflächenprotein (Δ CD4) unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven PGK-Promotors stabil exprimierten. Um die markierten Zellen *in vivo* fluoreszenzmikroskopisch detektieren zu können, erfolgte in einem Parallelansatz eine Fusion des Δ CD4 mit einem intrazellulären EGFP-Teil (Δ CD4EGFP). Die Funktionalität dieses Fusionsproteins wurde ebenso gezeigt wie dessen Eignung für die MACS-Aufreinigung, mit welcher Reinheiten von über 97% erzielt wurden. Die Expression des Δ CD4-Moleküls ohne EGFP-Anteil führte nach MACS zu

über 98% positiven vitalen Zellen. Dabei waren die jeweils erzielten Reinheiten unabhängig von dem Differenzierungszustand der Zellen und der initialen Frequenz positiver Zellen (0,6% bis 16%). Die Vitalität der aufgereinigten Zellen nach dem MACS-Prozess wurde dadurch belegt, dass diese in der Lage waren, zu reaggregieren und normale „Embryoid Bodies“ auszubilden, die Marker aller drei embryonalen Keimblätter exprimierten.

Parallel zur Etablierung der MACS-Methode wurde der kardial spezifische humane 2,75kb Nkx2.5-Promotor über die Expression des *in vivo*-Markers EGFP in murinen embryonalen Stammzellen untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen und durchflusszytometrischen Ergebnisse korrelierten mit dem erwarteten embryonalen Aktivitätsprofil des Nkx2.5-Promotors. RT-PCR-Analysen früher kardialer Marker zeigten, dass der hNkx2.5-Promotor Zellen markiert, deren Expressionsmuster dem früher kardial determinierter Zellen entspricht. Der 2,75 kb lange hNkx2.5-Promotor bietet damit einen vielversprechenden Ansatz, kardiale Vorläuferzellen innerhalb des heterogenen Zellspektrums sich differenzierender ES-Zellen zu identifizieren.

Ein Transfer auf das in dieser Arbeit etablierte MACS-System könnte die effiziente, zellschonende und nicht immunogene Aufreinigung kardialer Vorläuferzellen aus humanen ES-Zellen ermöglichen. Dieser Ansatz könnte die Therapie ischämischer Herzmuskelerkrankungen mit embryonalen Stammzellen der klinischen Anwendung einen entscheidenden Schritt näher bringen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Rivkees SA, Chen M, Kulkarni J, Browne J, Zhao Z. Characterization of the murine A1 adenosine receptor promoter, potent regulation by GATA-4 and Nkx2.5. *J Biol Chem* 1999;274(20):14204-9.
2. Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *Embo J* 1997;16(18):5687-96.
3. Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development* 1997;124(4):793-804.
4. Sepulveda JL, Belaguli N, Nigam V, Chen CY, Nemer M, Schwartz RJ. GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Mol Cell Biol* 1998;18(6):3405-15.
5. Shiojima I, Komuro I, Oka T, et al. Context-dependent transcriptional cooperation mediated by cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *J Biol Chem* 1999;274(12):8231-9.
6. (AHA) AHA. Heart Disease and Stroke Statistics 2005. In: AHA Dallas, Texas; 2005:3.
7. Statistisches Bundesamt. Amtlich gemeldete Sterbefälle nach den häufigsten Todesursachen. Fortschreibung des Bevölkerungsstandes und Todesursachenstatistik. 2004.
8. Lowel H, Meisinger C, Heier M, Hormann A. The Population-Based Acute Myocardial Infarction (AMI) Registry of the MONICA/KORA Study Region of Augsburg. *Gesundheitswesen* 2005;67(Suppl 1):31-7.
9. Kessler PD, Byrne BJ. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol* 1999;61:219-42.
10. Persijn G, Cohen B. Eurotransplant mInternational Foundation: Annual Report 1999. In: Leiden; 2000:37.
11. Cohen B, Persijn G. Eurotransplant International Foundation: Annual Report 2003. In: Leiden; 2004:37.
12. Krakauer H, Lin MJ, Bailey RC. Projected survival benefit as criterion for listing and organ allocation in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(6):680-9.
13. Hunt SA. Current status of cardiac transplantation. *Jama* 1998;280(19):1692-8.
14. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 2002;415(6868):240-3.

15. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114(6):763-76.
16. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12313-8. Epub 2003 Oct 6.
17. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005;85(4):1373-416.
18. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(24):8692-7 Epub 2005 Jun 2.
19. Braunwald E, Pfeffer MA. Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. *Am J Cardiol* 1991;68(14):1D-6D.
20. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996;98(1):216-24.
21. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000;408(6808):92-6.
22. Min JY, Yang Y, Converso KL, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 2002;92(1):288-96.
23. Min JY, Yang Y, Sullivan MF, et al. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125(2):361-9.
24. Yang Y, Min JY, Rana JS, et al. VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells. *J Appl Physiol* 2002;93(3):1140-51.
25. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *Faseb J* 2002;16(12):1558-66.
26. Hodgson DM, Behfar A, Zingman LV, et al. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(2):H471-9.
27. Himes N, Min JY, Lee R, et al. In vivo MRI of embryonic stem cells in a mouse model of myocardial infarction. *Magn Reson Med* 2004;52(5):1214-9.

28. Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, et al. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 2005;112(9 Suppl):I166-72.
29. Menard C, Hagege AA, Agbulut O, et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 2005;366(9490):1005-12.
30. Kehat I, Khimovich L, Caspi O, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22(10):1282-9. Epub 2004 Sep 26.
31. Xue T, Cho HC, Akar FG, et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 2005;111(1):11-20. Epub 2004 Dec 20.
32. Laflamme MA, Gold J, Xu C, et al. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 2005;167(3):663-71.
33. Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, Kao RL, Chiu RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992;1(6):383-90.
34. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;4(8):929-33.
35. Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120(5):999-1005.
36. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122(4):699-705.
37. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999;100(19 Suppl):II247-56.
38. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:221-9; discussion 9-30.
39. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410(6829):701-5.

40. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;14:14.
41. Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, et al. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:208-18; discussion 18-20.
42. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107(11):1395-402.
43. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7(4):430-6.
44. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964-7.
45. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105(1):93-8.
46. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5(4):434-8.
47. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92(2):362-7.
48. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al. Postnatal is11+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005;433(7026):647-53.
49. Goumans MJ, de Boer TP, Doevendans P. Human Cardiac Progenitor Cells are Able to Differentiate into Cardiomyocytes in Vitro. *American Heart Association; Scientific Sessions 2005:Abstract 337*.
50. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004;95(9):911-21 Epub 2004 Oct 7.
51. Tateishi K, Takahashi T, Oh H. Single Cardiac Stem Cells from Adult Mammalian Heart Are Pluripotent and Can Regenerate Ischemic Myocardium. *American Heart Association; Scientific Sessions 2005:Abstract 331*.
52. Barile L, Messina E, Pittenger MF. Engraftment, Migration And Functional Improvement in Ischemic Mouse Hearts Injected With Human Cardiosphere-derived Stem Cells. *Circ Res* 2005;97(11):Abstract 5011.

53. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 2005;115(3):572-83.
54. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005;85(2):635-78.
55. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996;183(4):1797-806.
56. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95(1):9-20.
57. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30(8):896-904.
58. Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200(2):123-35.
59. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12313-8 Epub 2003 Oct 6.
60. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357(9252):279-80.
61. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(12):2063-9.
62. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(7):1078-83.
63. Menasche P. Skeletal myoblast for cell therapy. *Coron Artery Dis* 2005;16(2):105-10.
64. Menasche P. The MACIG Study (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy): Clinical Trial Information. 2005.
65. Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(13):7808-11. Epub 2003 Jun 12.
66. Abraham MR, Henrikson CA, Tung L, et al. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res* 2005;97(2):159-67 Epub 2005 Jun 23.

67. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106(15):1913-8.
68. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106(24):3009-17.
69. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003;107(18):2294-302. Epub 003 Apr 21.
70. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364(9429):141-8.
71. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85(3):221-8.
72. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(8):1690-9.
73. Britten M, Assmus B, Zeiher M. Preserved Functional Improvement and Evidence for Reverse Left Ventricular Remodelling 2 Years after Intracoronary Progenitor Cell Therapy in Patients with Acute Myocardial Infarction. American Heart Association; Scientific Sessions 2005:Abstract 2985.
74. Schächinger V. REPAIR-AMI: Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodelling in Acute Myocardial Infarction. Medscape 2005.
75. Lunde K. The Effects on Left Ventricular Function by Intracoronary Injections of Autologous Mononuclear Bone Marrow Cells in Acute Anterior Wall Myocardial Infarction: the ASTAMI Randomized Controlled Study. American Heart Association; Scientific Sessions 2005:Meeting Report.
76. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;108(18):2212-8. Epub 003 Oct 13.

77. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004;95(7):742-8. Epub 2004 Sep 9.
78. Erbs S, Linke A, Adams V, et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res* 2005;97(8):756-62 Epub 2005 Sep 8.
79. Hambrecht R, Erbs S, Schuler G. Intracoronary Transplantation of Circulating Progenitor Cells After Recanalization of Chronic Coronary Artery Occlusions: Long Term Effects on Left Ventricular Function. American Heart Association; Scientific Sessions 2005(Abstract 2752).
80. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Forfang K. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J* 2005;39(3):150-8.
81. Assmus B, Honold J, Schächinger V, Zeiher AM. Transcoronary Transplantation of Progenitor Cells in Patients with Persistent Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction: A Randomized Controlled Trial (TOPCARE-CHD). American Heart Association; Scientific Sessions 2005:Abstract 2984.
82. Köstering M, Zeus T, Strauer BE. Improvement of Heart Function in Chronic Coronary Heart Disease with Chronic Myocardial Infarction: Controlled Study with Intracoronary Autologous Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation. American Heart Association; Scientific Sessions 2005:Abstract 1408.
83. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361(9351):47-9.
84. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(10):1721-4.
85. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110(11 Suppl 1):II213-8.
86. Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2005;65(8):3025-9.

87. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396-401.
88. Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109(25):3154-7. Epub 2004 Jun 14.
89. Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(2):241-9.
90. Rodic N, Rutenberg MS, Terada N. Cell fusion and reprogramming: resolving our transdifferences. *Trends Mol Med* 2004;10(3):93-6.
91. Wurmser AE, Gage FH. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* 2002;416(6880):485-7.
92. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004;10(5):494-501. Epub 2004 Apr 25.
93. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428(6983):664-8 Epub 2004 Mar 21.
94. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428(6983):668-73 Epub 2004 Mar 21.
95. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103(5):697-705.
96. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2002;105(3):380-6.
97. Badorff C, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003;107(7):1024-32.
98. Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant* 2000;9(3):359-68.
99. Thompson RB, Emani SM, Davis BH, et al. Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation* 2003;108(Suppl 1):II264-71.

100. Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Leseche G, Tedgui A. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000;101(21):2450-3.
101. Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 1996;94(9 Suppl):II332-6.
102. Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus AM. Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicol In Vitro* 2001;15(6):741-53.
103. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003;300(5623):1251-6.
104. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(20):11457-62.
105. (NIH) NIOH. Scientific Progress and Future Research Directions. In: Report on Stem Cells. Bethesda (UAS): NIH; 2001:21.
106. Solter D, Knowles BB. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75(11):5565-9.
107. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, et al. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002;20(4):329-37.
108. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;18(4):399-404.
109. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.
110. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;91(6):501-8.
111. Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 1984;152(1):212-9.
112. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 1):5-10.
113. Kania G, Corbeil D, Fuchs J, et al. Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells* 2005;23(6):791-804.

114. Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, et al. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn* 2004;229(2):243-58.
115. Pesce M, Anastassiadis K, Scholer HR. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 1999;165(3-4):144-52.
116. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003;113(5):631-42.
117. Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;113(5):643-55.
118. Ginis I, Luo Y, Miura T, et al. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 2004;269(2):360-80.
119. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17(1):126-40.
120. Richards M, Tan SP, Tan JH, Chan WK, Bongso A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* 2004;22(1):51-64.
121. Armstrong L, Lako M, Lincoln J, Cairns PM, Hole N. mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mech Dev* 2000;97(1-2):109-16.
122. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292(5819):154-6.
123. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984;309(5965):255-6.
124. Pease S, Braghetta P, Gearing D, Grail D, Williams RL. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* 1990;141(2):344-52.
125. Furue M, Okamoto T, Hayashi Y, et al. Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005;41(1-2):19-28.
126. Gough NM, Williams RL, Hilton DJ, et al. LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev* 1989;1(4):281-8.
127. NIH Human Embryonic Stem Cell Registry. NIH, 2005. (Accessed at <http://stemcells.nih.gov/research>.)

128. Lanzendorf SE, Boyd CA, Wright DL, Muasher S, Oehninger S, Hodgen GD. Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. *Fertil Steril* 2001;76(1):132-7.
129. Mitalipova M, Calhoun J, Shin S, et al. Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* 2003;21(5):521-6.
130. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 2004;350(13):1353-6. Epub 2004 Mar 3.
131. Strelchenko N, Verlinsky O, Kukhareno V, Verlinsky Y. Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2004;9(6):623-9.
132. Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, Johnson J, West MD, Lanza R. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* 2005;365(9471):1636-41.
133. Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril* 2005;83(5):1517-29.
134. Amit M, Itskovitz-Eldor J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat* 2002;200(Pt 3):225-32.
135. Suss-Toby E, Gerecht-Nir S, Amit M, Manor D, Itskovitz-Eldor J. Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. *Hum Reprod* 2004;19(3):670-5. Epub 2004 Jan 29.
136. Park JH, Kim SJ, Oh EJ, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod* 2003;69(6):2007-14. Epub 3 Aug 20.
137. Park SP, Lee YJ, Lee KS, et al. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Hum Reprod* 2004;19(3):676-84. Epub 2004 Jan 29.
138. Lee JB, Lee JE, Park JH, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol Reprod* 2005;72(1):42-9. Epub 2004 Aug 18.
139. Kim SJ, Lee JE, Park JH, et al. Efficient derivation of new human embryonic stem cell lines. *Mol Cells* 2005;19(1):46-53.
140. Oh SK, Kim HS, Ahn HJ, et al. Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. *Stem Cells* 2005;23(2):211-9.

141. Hampl A. Derivation and characterisation of new human embryonic stem cell lines in Czech Republic. not published 2003.
142. Dvorak P, Dvorakova D, Koskova S, et al. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;13:13.
143. Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, et al. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* 2004;22(5):790-7.
144. Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2002;20(9):933-6.
145. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2003;18(7):1404-9.
146. Inzunza J, Gertow K, Stromberg MA, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* 2005;23(4):544-9.
147. Heins N, Englund MC, Sjoblom C, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;22(3):367-76.
148. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Tae A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. *Differentiation* 2004;72(5):224-9.
149. Li T, Zhou CQ, Mai QY, Zhuang GL. Establishment of human embryonic stem cell line from gamete donors. *Chin Med J (Engl)* 2005;118(2):116-22.
150. Chen H, Qian K, Hu J, et al. The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores. *Hum Reprod* 2005;20(8):2201-6 Epub 005 Jun 9.
151. Wang Q, Fang Z, Jin F, Lu Y, Gai H, Sheng HZ. Derivation and Growing Human Embryonic Stem Cells on Feeders. *Stem Cells* 2005;13:13.
152. Simon C, Escobedo C, Valbuena D, et al. First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. *Fertil Steril* 2005;83(1):246-9.
153. Amit M, Margulets V, Segev H, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2003;68(6):2150-6.

154. Stojkovic P, Lako M, Stewart R, et al. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23(3):306-14.
155. Stojkovic P, Lako M, Przyborski S, et al. Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23(7):895-902 Epub 2005 May 11.
156. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 2005;11(2):228-32 Epub 2005 Jan 30.
157. Jaenisch R. Human cloning - the science and ethics of nuclear transplantation. *N Engl J Med* 2004;351(27):2787-91.
158. Drukker M, Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends Biotechnol* 2004;22(3):136-41.
159. Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 2001;292(5517):740-3.
160. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004;303(5664):1669-74 Epub 2004 Feb 12.
161. Hwang WS, Roh SI, Lee BC, et al. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* 2005;308(5729):1777-83. Epub 2005 May 19.
162. Summary of the Final Report on Hwang's Research Allegation. Seoul National University, 2006. (Accessed at <http://www.snu.ac.kr/engsnu/>.)
163. Stojkovic M, Stojkovic P, Leary C, et al. Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11(2):226-31.
164. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 2005;37(10):1099-103 Epub 2005 Sep 4.
165. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 2002;91(3):189-201.
166. Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 2003;58(2):278-91.

167. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001;108(3):407-14.
168. Sauer H, Theben T, Hescheler J, Lindner M, Brandt MC, Wartenberg M. Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(1):H411-21.
169. Kehat I, Gepstein A, Spira A, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circ Res* 2002;91(8):659-61.
170. Muller M, Fleischmann BK, Selbert S, et al. Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. *Faseb J* 2000;14(15):2540-8.
171. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985;87:27-45.
172. Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 1993;44(1):41-50.
173. Mummery C, Ward D, van den Brink CE, et al. Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J Anat* 2002;200(Pt 3):233-42.
174. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 1994;75(2):233-44.
175. Westfall MV, Pasyk KA, Yule DI, Samuelson LC, Metzger JM. Ultrastructure and cell-cell coupling of cardiac myocytes differentiating in embryonic stem cell cultures. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997;36(1):43-54.
176. Metzger JM, Lin WI, Johnston RA, Westfall MV, Samuelson LC. Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis. *Circ Res* 1995;76(5):710-9.
177. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(6):1525-39.
178. Skerjanc IS. Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. *Trends Cardiovasc Med* 1999;9(5):139-43.

179. Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(14):9550-5. Epub 2002 Jul 1.
180. Kanno S, Kim PK, Sallam K, Lei J, Billiar TR, Shears LL, 2nd. Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(33):12277-81. Epub 2004 Aug 10.
181. Ventura C, Zinellu E, Maninchedda E, Maioli M. Dynorphin B is an agonist of nuclear opioid receptors coupling nuclear protein kinase C activation to the transcription of cardiogenic genes in GTR1 embryonic stem cells. *Circ Res* 2003;92(6):623-9. Epub 2003 Mar 6.
182. Wu X, Ding S, Ding Q, Gray NS, Schultz PG. Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *J Am Chem Soc* 2004;126(6):1590-1.
183. Kawai T, Takahashi T, Esaki M, et al. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* 2004;68(7):691-702.
184. He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 2003;93(1):32-9. Epub 2003 Jun 5.
185. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003;107(21):2733-40. Epub 003 May 12.
186. Snir M, Kehat I, Gepstein A, et al. Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(6):H2355-63.
187. Satin J, Kehat I, Caspi O, et al. Mechanism of spontaneous excitability in human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *J Physiol* 2004;559(Pt 2):479-96. Epub 2004 Jul 8.
188. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(21):11307-12.
189. Muthuchamy M, Pajak L, Howles P, Doetschman T, Wieczorek DF. Developmental analysis of tropomyosin gene expression in embryonic stem cells and mouse embryos. *Mol Cell Biol* 1993;13(6):3311-23.

190. Rohwedel J, Sehlmeier U, Shan J, Meister A, Wobus AM. Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell Biol Int* 1996;20(8):579-87.
191. Sanchez A, Jones WK, Gulick J, Doetschman T, Robbins J. Myosin heavy chain gene expression in mouse embryoid bodies. An in vitro developmental study. *J Biol Chem* 1991;266(33):22419-26.
192. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, et al. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 1997;36(2):149-62.
193. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 1991;48(3):173-82.
194. Yutzey KE, Bader D. Diversification of cardiomyogenic cell lineages during early heart development. *Circ Res* 1995;77(2):216-9.
195. Hidaka K, Lee JK, Kim HS, et al. Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *Faseb J* 2003;17(6):740-2. Epub 2003 Feb 19.
196. Christoffels VM, Habets PE, Franco D, et al. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol* 2000;223(2):266-78.
197. Franz WM, Mueller OJ, Hartong R, Frey N, Katus HA. Transgenic animal models: new avenues in cardiovascular physiology. *J Mol Med* 1997;75(2):115-29.
198. Zammit PS, Kelly RG, Franco D, Brown N, Moorman AF, Buckingham ME. Suppression of atrial myosin gene expression occurs independently in the left and right ventricles of the developing mouse heart. *Dev Dyn* 2000;217(1):75-85.
199. Franz WM, Breves D, Klingel K, Brem G, Hofschneider PH, Kandolf R. Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. *Circ Res* 1993;73(4):629-38.
200. Franz WM, Rothmann T, Frey N, Katus HA. Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. *Cardiovasc Res* 1997;35(3):560-6.
201. Zandstra PW, Bauwens C, Yin T, et al. Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng* 2003;9(4):767-78.

202. 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(5):399-413.
203. Kolossov E, Fleischmann BK, Liu Q, et al. Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J Cell Biol* 1998;143(7):2045-56.
204. Fijnvandraat AC, van Ginneken AC, Schumacher CA, et al. Cardiomyocytes purified from differentiated embryonic stem cells exhibit characteristics of early chamber myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35(12):1461-72.
205. Meyer N, Jaconi M, Landopoulou A, Fort P, Puceat M. A fluorescent reporter gene as a marker for ventricular specification in ES-derived cardiac cells. *FEBS Lett* 2000;478(1-2):151-8.
206. Srivastava D, Olson EN. A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 2000;407(6801):221-6.
207. Gilbert S. Lateral Late Mesoderm - The Heart. In: *Developmental Biology*. 7th ed. Sunderland (USA); 2003:496.
208. Komuro I, Izumo S. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(17):8145-9.
209. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 1993;119(2):419-31.
210. Turbay D, Wechsler SB, Blanchard KM, Izumo S. Molecular cloning, chromosomal mapping, and characterization of the human cardiac-specific homeobox gene hCsx. *Mol Med* 1996;2(1):86-96.
211. Shiojima I, Komuro I, Mizuno T, et al. Molecular cloning and characterization of human cardiac homeobox gene CSX1. *Circ Res* 1996;79(5):920-9.
212. Evans SM. Vertebrate tinman homologues and cardiac differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10(1):73-83.
213. Jamali M, Rogerson PJ, Wilton S, Skerjanc IS. Nkx2-5 activity is essential for cardiomyogenesis. *J Biol Chem* 2001;276(45):42252-8. Epub 2001 Aug 28.
214. Kasahara H, Bartunkova S, Schinke M, Tanaka M, Izumo S. Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2.5 homeodomain protein. *Circ Res* 1998;82(9):936-46.
215. Mohun T, Sparrow D. Early steps in vertebrate cardiogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1997;7(5):628-33.

216. Akazawa H, Komuro I. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol Ther* 2005;107(2):252-68.
217. Zweigerdt R, Schröder M, Werner A, et al. Clinical scale generation of enriched embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Keystone Symposia Abstract Book: 2003;From Stem Cells To Therapy:136.*
218. Kudriavtsev BN, Anatskaia OV, Nilova VK, Komarov SA. [Interconnection of parameters of the mitochondrial and myofibrillar apparatus of cardiomyocytes and ploidy and hypertrophy in certain mammalian species, differing in body mass]. *Tsitologiya* 1997;39(10):946-64.
219. Huang WY, Aramburu J, Douglas PS, Izumo S. Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2000;6(5):482-3.
220. MACS Technology: Gold standard in cell separation. 2005. (Accessed at www.miltenyibiotec.com.)
221. Dugaiczky A, Boyer HW, Goodman HM. Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* 1975;96(1):171-84.
222. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
223. Thomson JA. Genetic Manipulation of Human Embryonic Stem Cells. *Keystone Symposia Abstract Book: 2003;From Stem Cells To Therapy:43.*
224. Brusselmans K, Bono F, Collen D, Herbert JM, Carmeliet P, Dewerchin M. A novel role for vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for embryonic stem cells during hypoxia. *J Biol Chem* 2005;280(5):3493-9 Epub 2004 Nov 29.
225. Erdo F, Buhrlé C, Blunk J, et al. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(7):780-5.
226. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11(2):231-8.
227. Siebenkotten G, Behrens-Jung U, S. M. Employing surface markers for the selection of transfected cells. *Cell separation methods and applications Book article; Marcel Dekker, NY* 1998:271-81.
228. Gaines P, Wojchowski DM. pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS- or FACS-based selection of transfected cells. *Biotechniques* 1999;26(4):683-8.
229. Lawrenz B, Schiller H, Willbold E, Ruediger M, Muhs A, Esser S. Highly sensitive biosafety model for stem-cell-derived grafts. *Cytotherapy* 2004;6(3):212-22.

230. Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, et al. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford)* 2003;Jan;42(1):162-5.
231. Conley BJ, Young JC, Trounson AO, Mollard R. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(4):555-67.
232. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 2004;37(1):23-34.
233. Rothmann T, Katus HA, Hartong R, Perricaudet M, Franz WM. Heart muscle-specific gene expression using replication defective recombinant adenovirus. *Gene Ther* 1996;3(10):919-26.
234. Biben C, Weber R, Kesteven S, et al. Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene *Nkx2-5*. *Circ Res* 2000;87(10):888-95.
235. Shiojima I, Komuro I, Inazawa J, et al. Assignment of cardiac homeobox gene *CSX* to human chromosome 5q34. *Genomics* 1995;27(1):204-6.
236. Lien CL, McAnally J, Richardson JA, Olson EN. Cardiac-specific activity of an *Nkx2-5* enhancer requires an evolutionarily conserved Smad binding site. *Dev Biol* 2002;244(2):257-66.
237. Shiojima I, Oka T, Hiroi Y, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I. Transcriptional regulation of human cardiac homeobox gene *CSX1*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272(3):749-57.

Eigene Publikationen

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare Medizin - Förderung für Forschung und Lehre der LMU München“. Zudem wurde die Arbeit unterstützt durch die „Deutsche Forschungsgemeinschaft“ (DFG FR-705/11-01/02) und die Fritz-Bender-Stiftung.

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht.

Artikel in wissenschaftlichen Zeitschriften:

David R*, Groebner M*, Franz WM

Magnetic Cell Sorting Purification of Differentiated Embryonic Stem Cells Stably Expressing Truncated Human CD4 as Surface Marker

Stem Cells 2005; 23; 477-482. (Erratum: Stem Cells 2005; 23; 861.)

* Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zur Publikation beigetragen

Groebner M, David R, Franz WM

Embryonale Stammzellen: zukünftige Möglichkeiten

Der Internist 2006. Dieser Artikel wird zur Zeit gedruckt.

Wissenschaftliche Vorträge:

David R, Groebner M, Franz WM

Promotor based magnetic labelling and purification (MACS) of stably transfected ES cells as a basis for cellular transplantations in endstage heart failure

70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim 2004: Supplement der Zeitschrift für Kardiologie 2004; 93-3; III/290

Groebner M, David R, Franz WM

Promotor-gestützte *in vivo*-Markierung und MACS-Aufreinigung stabil transfizierter ES-Zellen als Basis zur Zelltherapie degenerativer Herzerkrankungen

Statusseminar „FöFoLe Molekulare Medizin“ Herrsching 2004

Groebner M, David R, Franz WM

Klonierung und Charakterisierung der Promotoren hMLC-2v und hMLC-2a
zur Aufreinigung ventrikulärer und atrialer Kardiomyozyten
aus embryonalen Stammzellen

Statusseminar „FöFoLe Molekulare Medizin“ Herrsching 2003

Posterpräsentationen:

David R, Groebner M, Brenner C, Franz WM

Magnetic cell sorting of genetically engineered embryonic stem cells provides a basis for
cardiac ES cell therapy

Keystone Symposia Abstract Book 2005; Molecular Biology of Cardiac Diseases and
Regeneration:35.

David R, Groebner M, Brenner C, Brunner S, Franz WM

Stable expression of transgenic truncated human CD4 as surface marker enables MACS
purification of differentiated ES cells

3rd Durch-German Joint Meeting of Molecular Cardiology Groups: Münster, 2005.

David R, Groebner M, Akkaya E, Zaruba M, Franz WM

Nkx2.5-promoter based *in vivo* labelling of cardiac progenitor cells derived from ES-cells

Keystone Symposia Abstract Book: 2004;Stem Cells:93.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ac	Azetat
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
cDNA	Komplementäre DNA
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
F	Farad
FCS	Fetales Kälberserum
G	Gramm
G	Guanosin
H	Stunde
Kana	Kanamycin
KanaR	Kanamycin-Resistenzgen
Kb	Kilobasen
M	Mol pro Liter
mAK	Monoklonaler Antikörper
Mg	Milligramm
Min	Minute
mRNA	Messenger RNA
Ng	Nanogramm
Nt	Nukleotid(e)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Prompidiumiodid
RNAse	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	PCR nach RT
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
Sek	Sekunde
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxy-Aminoethan
U	Einheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

8. LEBENSLAUF

Name Michael Gröbner

Adresse Kaulbachstraße 27-29
Newmanhaus, Zi.nr. 159
80539 München

Geburtstag 02. August 1978

Geburtsort Passau

Familienstand Ledig

Schulische Ausbildung:

1984-1988 Grundschule Hauzenberg
1988-1995 Gymnasium Untergriesbach (naturwissenschaftlicher Zweig)
1995-1997 Gymnasium Leopoldinum Passau (Kollegstufe)
06/1997 Abitur

Universitäre Ausbildung:

05/1999 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU München
03/2001 Ärztliche Vorprüfung
08/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/2002-05/2004 Förderung für Forschung und Lehre der LMU München:
Promotionsstudiengang Molekulare Medizin

9. DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare Medizin - Förderung für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU München“ in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz in der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Franz für die Vergabe des Themas und die ausgezeichnete Förderung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann, Leiter des „FöFoLe“-Programms, danke ich herzlich für die wertvolle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstudiengangs.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Robert David bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit sowie die zahlreichen Anregungen und eingehenden Diskussionen.

Frau Christiane Groß danke ich für Einarbeitung und Unterstützung bei Zellkultur- und molekularbiologischen Arbeiten.

Für die stets konstruktive und kollegiale Zusammenarbeit bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe.