

Einfluss der Substratgeometrie und -topografie auf die Selbsterneuerung muriner embryonaler Stammzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Mona Jaggy

aus

Mühlacker

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent: PD Dr. Dietmar Gradl

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2016

Erklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von April 2013 bis August 2016 am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Neurobiologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) durchgeführt.

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hinweise benutzt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis habe ich in der gültigen Fassung beachtet. Diese Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere außerdem, dass die beigelegte elektronische Version der Arbeit mit der schriftlichen übereinstimmt.

Karlsruhe, den 27.10.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	5
1 Einleitung	7
1.1 <i>Embryonale Stammzellen und ihre Besonderheiten</i>	7
1.1.1 Embryonale Stammzellen	7
1.1.2 Pluripotenz	9
1.1.3 Der besondere Zellzyklus pluripotenter Zellen.....	11
1.2 <i>Die Mikroumgebung embryonaler Stammzellen.....</i>	12
1.2.1 Die embryonale Stammzellnische	13
1.2.2 Allgemeine Zellkultursubstrate für embryonale Stammzellen	15
1.2.3 Steuerung des Stammzellverhaltens durch physikalische Parameter	16
1.3 <i>Mechanotransduktion</i>	18
1.3.1 Mechanotransduktion und die zentrale Rolle von YAP/TAZ	19
1.3.2 Mechanotransduktion in Stammzellen	20
1.4 <i>Zielsetzung</i>	22
2 Material und Methoden.....	24
2.1 <i>Substratherstellung.....</i>	26
2.1.1 Herstellung der 2D-FN-Mikroinseln mittels <i>Microcontact Printing</i> (μ CP).....	26
2.1.2 Herstellung der 3D-Substrate durch direktes Laserschreiben (DLS) und Abformung	29
2.1.3 Herstellung von HEMA-EDMA-Substraten mit unterschiedlicher Topografie.....	33
2.1.4 Herstellung von Kontrollsubstraten.....	34
2.2 <i>Allgemeine Zellkultivierung.....</i>	34
2.2.1 Beschichtung von Zellkulturflaschen mit Gelatine	35
2.2.2 Produktion des <i>leukemia inhibitory factors</i> (LIF).....	35
2.2.3 Herstellung von Feederzellen der Passage 3	35
2.2.4 Kultivierung und Inaktivierung von Feederzellen	35
2.2.5 Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen (mESZ) auf Feederzellen	36
2.3 <i>Zellexperimente.....</i>	37
2.3.1 Preplating.....	37

2.3.2	Aussaat und Kultivierung von mESZ auf strukturierten Substraten	37
2.3.3	Langzeitkultivierung von mESZ auf MN-Substraten	38
2.3.4	Differenzierung der mESZ zu <i>Embryoid Bodies</i> durch die <i>Hanging-Drop</i> Methode	38
2.4	<i>Färbemethoden</i>	39
2.4.1	Immunzytochemie	40
2.4.2	Markierung der S-Phase des Zellzyklus durch 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine	40
2.5	<i>Mikroskopie</i>	41
2.5.1	Zeitrafferaufnahmen	42
2.5.2	Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie	42
2.6	<i>Auswertung und Statistik</i>	42
2.6.1	Bestimmung der Proliferationsfähigkeit durch Zellzählung	42
2.6.2	Auswertung der EdU-Markierung	43
2.6.3	Quantifizierung des Oct4-eGFP Signals von mESZ Kolonien	43
2.6.4	Bestimmung der relativen YAP-Lokalisation	44
2.6.5	Bestimmung der Verteilung Oct4-positiver, gemischter und Oct4-negativer Kolonien	45
2.6.6	Bestimmung der Zirkularität von Stammzellkolonien über ImageJ	45
2.6.7	Statistische Tests	45
3	Ergebnisse	47
3.1	<i>Einfluss der 2D- und 3D-Geometrie auf die Selbsterneuerung von mESZ</i>	47
3.1.1	mESZ adhären auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikrokammern	48
3.1.2	In mESZ auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikrokammern unterschiedlicher Größe sind keine Unterschiede im Oct4-eGFP-Level detektierbar	50
3.1.3	Die Proliferationsfähigkeit der mESZ nimmt mit steigender 2D-Mikroinsel-Größe zu	52
3.1.4	Die Proliferation der mESZ auf 2D-Mikroinseln ist unabhängig vom Zell- <i>Spreading</i>	54
3.1.5	Die mESZ Proliferationsfähigkeit nimmt mit steigender 3D-Mikroammer-Größe ab	56
3.1.6	Die mESZ Proliferationsfähigkeit nimmt mit steigender 3D-Mikroammer-Größe zu, sofern die Wände nicht adhäsiv sind	57
3.1.7	mESZ spannen sich zwischen den Wänden kleiner adhäsiver Mikrokammern auf	60
3.1.8	Der Grad der YAP-Aktivierung variiert zwischen Mikrokammern unterschiedlicher Größe ..	62
3.2	<i>Einfluss der Topografie auf die Selbsterneuerung der mESZ</i>	64
3.2.1	Die Anzahl adhärenter mESZ variiert auf HEMA-EDMA-Substraten unterschiedlicher Topografie	65
3.2.2	mESZ bleiben während der Kultivierung auf MN-Substraten Oct4-positiv	67
3.2.3	Die Langzeitkultivierung von mESZ auf MN-Substraten erhält die Pluripotenz	69
3.2.4	Die Adhäsion der mESZ an MN-Substrate wird mit Hilfe von Zellausläufern realisiert	72
3.2.5	Die Adhäsion der mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten ist Integrin-unabhängig	74
3.2.6	Die Aktivierung der Integrin-Signaltransduktion auf MN-Substraten durch FN führt zu Oct4-Verlust	75

3.2.7	Die Topografie der HEMA-EDMA-Substrate beeinflusst die Aktivierung von YAP	77
4	Diskussion.....	80
4.1	<i>Die 2D- und 3D-Substratgeometrie beeinflusst die mESZ Proliferation.....</i>	<i>80</i>
4.1.1	Die mESZ Proliferationsrate ist abhängig von der 2D-Mikroinsel-Größe	81
4.1.2	Kleine adhäsive 3D-Mikrokammern fördern die mESZ Proliferation	84
4.1.3	Die Morphologie der mESZ wird durch die Größe der adhäsiven 3D-Mikrokammern beeinflusst.....	86
4.1.4	Die Kultivierung in kleinen adhäsiven 3D-Mikrokammern führt zu einer erhöhten YAP-Aktivität in mESZ	87
4.1.5	Messung des relativen Oct4-Levels in mESZ auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikrokammern anhand konfokaler Aufnahmen	90
4.1.6	Fazit und offene Fragen zum Einfluss der 2D- und 3D-Substratgeometrie auf das mESZ Verhalten	92
4.2	<i>Die Substrat-Topografie beeinflusst die Selbsterneuerung von mESZ.....</i>	<i>93</i>
4.2.1	Die Ausprägung der mESZ-Adhäsion variiert auf HEMA-EDMA-Substraten unterschiedlicher Topografie.....	94
4.2.2	Die Kultivierung der mESZ auf MN-Substraten fördert den Erhalt der Pluripotenz	96
4.2.3	Die YAP-Aktivität ist abhängig von der Substrat-Topografie.....	98
4.2.4	Fazit und offene Fragen zum Einfluss der Substrat-Topografie auf das mESZ Verhalten	100
4.3	<i>Allgemeines Fazit</i>	<i>101</i>
4.4	<i>Ausblick.....</i>	<i>103</i>
	Appendix	106
	Literaturverzeichnis	109
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	118
	Abkürzungsverzeichnis	120
	Veröffentlichungen und Manuskripte	121
	Danksagung.....	122

Zusammenfassung

Stammzellen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und durch ihr Potential zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen aus. Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie ein attraktives Studienobjekt im Bereich der Grundlagenforschung und Medizin. Dies setzt jedoch eine erfolgreiche Kultivierung und gezielte Differenzierung der Zellen voraus. Die Steuerung von Stammzellen *in vitro* kann durch exogene Faktoren erfolgen, die biochemischer oder biophysikalischer Natur sind. Der Einfluss physikalischer Faktoren gewann jedoch erst in den letzten Jahrzehnten Akzeptanz und wurde vor allem an adulten, mesenchymalen Stammzellen erforscht. Über die Mechanotransduktion in embryonalen und anderen pluripotenten Stammzellen ist bis heute nur wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses physikalischer Faktoren auf die Selbsterneuerung einzeln kultivierter muriner embryonaler Stammzellen (mESZ) und die Aufklärung damit verbundener Mechanismen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der 2D- und 3D-Geometrie auf die Selbsterneuerung der mESZ untersucht. Dies wurde anhand Fibronektin-beschichteter 2D-Mikroinseln und 3D-Mikrokammern mit quadratischer Grundfläche realisiert, wobei der Fokus auf der Variation der Strukturgröße lag. Während die Proliferationsfähigkeit der mESZ mit zunehmender 2D-Mikroinsel-Größe anstieg, nahm sie mit zunehmender 3D-Mikrokammer-Größe ab. Die Proliferationsfähigkeit der Stammzellen auf 2D-Mikroinseln korrelierte nicht mit der Zellmorphologie, jedoch zeigte sich, dass mESZ in den kleineren 3D-Mikrokammern zwischen den Wänden der Kammern aufgespannt waren, was auf eine erhöhte intrazelluläre Kontraktilität hinweist. Konsistent damit zeigten mESZ innerhalb kleiner Mikrokammern eine erhöhte Aktivität des *Yes-associated protein* (YAP), das in der zellulären Mechanotransduktion Signale in den Zellkern überträgt und einen positiven Einfluss auf die Selbsterneuerung pluripotenter Zellen hat.

In einem zweiten Ansatz wurde mit Hilfe chemisch identischer, jedoch unterschiedlich rauer Polymersubstrate der Einfluss der Oberflächentopografie auf die Selbsterneuerung der mESZ untersucht. Mikro-nano-raue Substrate förderten die Langzeit-Selbsterneuerung und funktionelle Pluripotenz der Zellen, wohingegen die Kultivierung auf nano-rauen oder glatten Substraten zu einer spontanen Differenzierung führte. Während bei keinem der Polymersubstrate Fokalkontakte in darauf kultivierten mESZ nachgewiesen werden konnten, bildeten die Zellen auf mikro-nano-rauen Substraten dünne Aktin-Zellausläufer aus, die der Verankerung an die raue Oberfläche des Substrats dienten. Desweiteren wiesen Zellen auf MN-Substrat eine erhöhte YAP-Aktivität im Vergleich zu Zellen auf G-Substrat auf.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit auf Einzelzellebene demonstriert werden, dass mESZ auf physikalische Reize aus der Mikroumgebung reagieren und dass ihre Selbsterneuerung mit einer erhöhten YAP-Aktivität korreliert, welche wiederum durch die Morphologie und Adhäsionsmechanismen der mESZ beeinflusst werden kann.

1 Einleitung

1.1 Embryonale Stammzellen und ihre Besonderheiten

Der Begriff der „Stammzelle“ umfasst eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, die sowohl während der Embryogenese als auch im adulten Organismus von Bedeutung sind. Alle tierischen Stammzellen besitzen zwei wesentliche Eigenschaften, die sie als Stammzellen ausweisen. Dabei handelt es sich zum einen um die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (aus dem Englischen: *self-renewal*), wodurch die bestehende Stammzellpopulation aufrecht erhalten wird. Zum anderen besitzen sie die herausragende Eigenschaft zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen. Während adulte Stammzellen meist multipotent sind, d.h. nur Zelltypen eines bestimmten Gewebetyps bilden können, besitzen embryonale Stammzellen (ESZ) die Fähigkeit zur Differenzierung in alle Zelltypen außer extraembryonalen Ursprungs (Abb. 1.1). Diese Fähigkeit wird Pluripotenz genannt. Auf die Eigenschaften und Besonderheiten von ESZ wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Der Ursprungsort von ESZ ist die innere Zellmasse (IZM) der Blastozyste, zum Zeitpunkt vor der Einnistung in den Uterus (Evans and Kaufman 1981, Thomson et al. 1998). Es handelt sich demnach um ein sehr frühes embryonales Entwicklungsstadium, das bei Mäusen drei bis vier und bei Menschen fünf bis sechs Tage nach der Befruchtung auftritt (Niakan et al. 2012). *In vivo* existiert dieses Stadium jedoch nur sehr transient. Im murinen Embryo beispielsweise spezialisiert sich die innere, pluripotente Zellmasse fünf Tage nach Befruchtung zum primitiven Ektoderm, das bereits ein verändertes Expressionsmuster im Vergleich zur IZM aufweist (Keller 2005). Der endgültige Verlust der Pluripotenz erfolgt während der Gastrulation (Stadium: E 6,5), bei der die Differenzierung in die drei verschiedenen Keimblätter stattfindet (Keller 2005). Diese Keimblätter – Endoderm, Mesoderm und Ektoderm – sind die Basis der final differenzierten Gewebearten wie Muskel- oder Nervengewebe, in die sie sich während der weiteren Embryonalentwicklung sukzessive umformen (Keller 2005). *In vitro* gelang es erstmals im Jahr 1981 ESZ aus der Blastozyste der Maus (mESZ) auf Dauer im pluripotenten Status zu kultivieren (Evans and Kaufman 1981, Martin 1981). Erst 17 Jahre später wurde dies auch für humane ESZ (hESZ) demonstriert (Thomson et al. 1998). Die unbegrenzte Selbsterneuerung der ESZ *in vitro* ist eine weitere Besonderheit dieses Zelltyps (Abb. 1.1), die jedoch nur unter speziellen Kultivierungsbedingungen möglich ist (siehe auch Kapitel 1.2.2). Zu diesen gehören

unter anderem die Zugabe von Serum oder dem Zytokin *Leukemia inhibitory factor* (LIF) ins Medium und das Wachstum der ESZ auf einer Nährschicht wie beispielsweise Feederzellen (Grivennikov 2008).

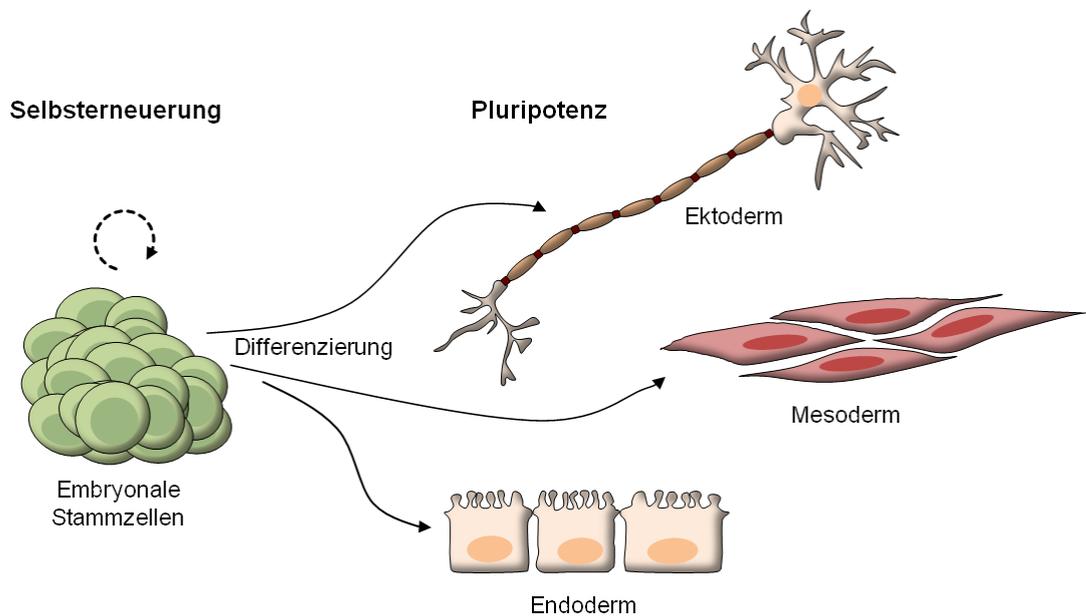


Abb. 1.1: Die zwei wesentlichen Eigenschaften embryonaler Stammzellen. ESZ (grün) stammen aus der IZM der Blastozyste und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung (gestrichelter Pfeil) aus. Des Weiteren sind sie pluripotent, das heißt sie haben das Potential zur Differenzierung in alle Zelltypen der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm (Pfeile) und der Keimbahn (nicht dargestellt).

Durch die Etablierung der Kultivierung von pluripotenten Zellen ergaben sich vielversprechende Möglichkeiten im Bereich der Forschung und Medizin. So können die ESZ als Modellsystem für die frühe Embryonalentwicklung angesehen werden. Desweiteren könnten durch die pluripotenten Eigenschaften der Zellen zukünftig spezifisch Gewebe herangezüchtet (*Tissue Engineering*) und beispielsweise für *Screenings* von Medikamenten verwendet werden (Avior, Sagi and Benvenisty 2016). Bahnbrechend für die Medizin waren auch die Entdeckungen von Takahashi und Yamanaka im Jahr 2006, die aus differenzierten somatischen Zellen durch die erzwungene Expression von vier Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Zellen mit pluripotenten Eigenschaften herstellten (Takahashi and Yamanaka 2006). Diese induziert pluripotente Stammzellen (iPSZ) erlauben möglicherweise in Zukunft, patientenspezifische Gewebe herzustellen, die keine Immunreaktion hervorrufen und daher nicht abgestoßen werden (Avior et al. 2016). Allerdings setzen solche Anwendung eine kontrollierte Vermehrung und Differenzierung der pluripotenten Zellen voraus. Deshalb befasst sich ein großer Zweig der Stammzellforschung mit der Frage, wie diese Zellen durch exogene Faktoren gesteuert werden

können. Auch die vorliegende Arbeit hat sich diese Frage zum Thema gemacht, wobei der Fokus hier auf der Kontrolle durch physikalische Faktoren liegt.

1.1.2 Pluripotenz

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten ist der Zustand der Pluripotenz auch heute noch nicht vollständig verstanden. Dadurch wird deutlich, wie komplex und vielseitig die Mechanismen sind, die in der Zelle zur Pluripotenz führen. Vor den Entdeckungen von Takahashi und Yamanaka (Takahashi and Yamanaka 2006) ging man davon aus, dass eine vollständig differenzierte Zelle nicht wieder in den pluripotenten Ursprungszustand zurückkehren kann. Die „Entdeckung“ der iPSZ revolutionierte die Stammzellforschung und führte zu einem neuen Verständnis der Pluripotenz. Takahashi und Yamanaka demonstrierten, dass die induzierte Expression der vier Transkriptionsfaktoren *Octamer-binding transcription factor 4* (Oct4; auch bekannt als Oct3/4 oder POU5F1), *Kruppel-like factor 4* (Klf4), *Sex determining region Y-box 2* (Sox2), und c-Myc ausreicht, um eine somatische Zelle in den pluripotenten Zustand zurückzuführen (Takahashi and Yamanaka 2006). Dieser Prozess wird auch Reprogrammierung genannt. Zwei dieser Faktoren, Oct4 und Sox2, sind Teil des *core pluripotency network*, das eine übergeordnete Rolle bei der Regulation des pluripotenten Zustandes einnimmt (Young 2011, De Los Angeles et al. 2015). Der dritte Transkriptionsfaktor dieses zentralen Netzwerks ist Nanog (Young 2011, De Los Angeles et al. 2015). Die Wirkung dieser drei Transkriptionsfaktoren, in Kombination mit exogenen Faktoren wie LIF oder *fibroblast growth factor* (FGF), führt zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung und Pluripotenz in embryonalen Stammzellen (Keller 2005, Zeineddine et al. 2014). Dabei wird zum einen die Selbsterneuerung aktiv gefördert und zum anderen die Differenzierung unterdrückt (De Los Angeles et al. 2015). Die Aktivitäten von Oct4, Sox2 und Nanog sind miteinander quervernetzt und bilden einen auto-regulatorischen *Loop*, indem sie gegenseitig an die Promotorregion der anderen Pluripotenzfaktoren sowie an den eigenen Promotor binden (Boyer et al. 2005). Unter diesen drei Transkriptionsfaktoren wird Oct4 als Haupt-Pluripotenzfaktor angesehen, denn obwohl auch Oct4 mittlerweile bei der Reprogrammierung durch andere Faktoren ersetzt werden kann, agieren diese in den meisten Fällen durch Reaktivierung des Oct4-Lokus (Radzishchanskaya and Silva 2014). Weiterhin wird die herausragende Rolle von Oct4 dadurch verdeutlicht, dass dessen Deletion in ESZ zur Differenzierung in extraembryonales Gewebe führt (Niwa, Miyazaki and Smith 2000), und dass die IZM von Oct4-negativen Embryonen keine pluripotenten Eigenschaften aufweist (Nichols et al. 1998). Trotzdem ist die Bezeichnung von Oct4 als „Pluripotenzgen“ nicht ganz korrekt. Montserrat *et al.* bewiesen in einer eleganten Studie aus dem Jahr 2013, dass die klassische Einteilung in „Pluripotenz- und Differenzierungsgene“ nicht der Wirklichkeit entspricht.

Vielmehr existieren innerhalb einer pluripotenten Zelle ausschließlich *lineage specifier*, also Faktoren, deren Aktivität mit der Differenzierung in bestimmte Entwicklungslinien assoziiert ist (Montserrat et al. 2013). Im pluripotenten Status muss die Aktivität dieser gegensätzlichen Faktoren wie auf einer Wippe korrekt ausbalanciert sein, sodass keiner davon überwiegt und eine Differenzierung einleitet. Auch Oct4 und Sox2 sind solche *lineage specifier*, wobei die Aktivität von Oct4 das mesendodermale Zellschicksal begünstigt und Sox2 das ektodermale (Radziskeuskaya and Silva 2014). Im Embryo wird Oct4 während der Gastrulation in fast allen Zellen außer den Urkeimzellen herunter reguliert (Zeineddine et al. 2014) und wird später im adulten Organismus nur in der Oozyte exprimiert (Schöler et al. 1989). Die Abwesenheit von Oct4 ist also ein eindeutiger Beweis für den differenzierten Zustand, wohingegen die Aktivität dieses Gens auch in Keimzellen und frühen mesendodermalen Zellen noch gegeben ist, sodass dies kein eindeutiges Kriterium für die Pluripotenz ist. Der Nachweis der Pluripotenz einer Zellgruppe sollte deshalb, wenn möglich, auf molekularer und funktioneller Ebene stattfinden (De Los Angeles et al. 2015). Auf molekularer Ebene bietet sich beispielsweise die Überprüfung der gleichzeitigen Aktivität der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog oder der Nachweis bestimmter epigenetischer Aktivitätsmuster an (De Los Angeles et al. 2015). Als funktioneller Nachweis der Pluripotenz sollte die Differenzierung der Zellen zu allen drei Keimblättern erfolgen, was *in vitro* beispielsweise durch die Herstellung von *embryoid bodies* (EBs) möglich ist. In Abwesenheit exogener Pluripotenzfaktoren wie LIF oder eines adhäsiven Substrats bilden ESZ diese dreidimensionalen Aggregate aus, in denen die Differenzierung zu allen drei Keimblättern spontan und in ungeordneter Weise stattfindet (Ader and Tanaka 2014). Der Nachweis der drei Keimblätter in EBs aus potentiellen pluripotenten Zellen ist also der Beweis für deren funktionelle Pluripotenz. Das *in vivo* Pendant hierzu ist der Teratom-Assay, bei dem pluripotente Zellen in immunsupprimierte Mäuse injiziert werden, woraus sich Tumore mit Zellen aller drei Keimblätter – sogenannte Teratome – bilden (De Los Angeles et al. 2015).

Die in der Forschung am häufigsten verwendeten pluripotenten Stammzellen sind mESZ, hESZ und hiPSZ. Es stellte sich jedoch die Frage, ob diese Zellen exakt gleiche Eigenschaften aufweisen. Mittlerweile ist klar, dass dies nicht der Fall ist. Erstens stammen mESZ und hESZ/hiPSZ aus unterschiedlichen Spezies, was bereits Unterschiede im Verhalten der Zellen hervorrufen kann. So lässt sich beispielweise die längere Zellzyklusdauer der hESZ im Vergleich zu mESZ vermutlich durch die relativ lange Dauer der Embryonalentwicklung von Menschen erklären. Unabhängig von den Unterschieden durch die verschiedenen Spezies, existieren auch Unterschiede im Entwicklungsniveau der Zellen. Obwohl sowohl hESZ als auch mESZ aus der Blastozyste vor deren Einnistung in den Uterus stammen, stellen mESZ den ursprünglicheren, naiven Zustand dar, wohingegen hESZ in der Entwicklung ein kleines Stück weiter vorangeschritten sind (englisch: *primed*) (De Los Angeles et al. 2015). Das bedeutet, dass das

humane und murine Blastozystenstadium zum Zeitpunkt der Zellentnahme nicht äquivalent ist, sondern dass die Taktung der Embryonalentwicklung in beiden Spezies unterschiedlich abläuft. Ein Unterschied, der sich daraus ergibt, ist zum Beispiel die Abhängigkeit der mESZ Selbsterneuerung von LIF, die bei hESZ nicht zwangsläufig gegeben ist (Grivennikov 2008). Des Weiteren existieren zwischen mESZ und hESZ Unterschiede in der Ausprägung von Oberflächenmarkern und Transkriptionsfaktoren, der Aktivität bestimmter Signalwege, in der Komplexität der EBs, sowie in der Morphologie der Kolonien und der Resistenz gegenüber der Dissoziation der Kolonien in Einzelzellen (Rao 2004, Grivennikov 2008, Viswanathan et al. 2014, De Los Angeles et al. 2015). Vor allem in Bezug auf die Genexpression und Epigenetik existieren ebenfalls Unterschiede zwischen iPSZ und ESZ einer Spezies, wodurch verdeutlicht wird, dass die Reprogrammierung zwar zu ESZ sehr ähnliche, aber keine identischen Stammzellen hervorbringt (Chin et al. 2009, Narsinh, Plews and Wu 2011). Trotz solcher Unterschiede sind die allgemeinen Strategien zu Regulation der Differenzierung und Selbsterneuerung zwischen verschiedenen pluripotenten Zelltypen konserviert oder zumindest sehr ähnlich (Ginis et al. 2004, De Los Angeles et al. 2015), sodass Ergebnisse aus Studien mit einem dieser Zelltypen oft auf die anderen übertragen werden können.

1.1.3 Der besondere Zellzyklus pluripotenter Zellen

Die wichtigste Funktion der ESZ *in vivo* ist die rasche Bildung einer ausreichend großen, homogenen Zellpopulation, die nachfolgend in mehrere differenzierte Untergruppen aufgeteilt wird. Aus diesem Grund haben ESZ einen zu somatischen Zellen sehr unterschiedlichen und stark verkürzten Zellzyklus. Dies führt zu sehr schnellen Verdopplungszeiten, die bei mESZ ungefähr acht bis zehn Stunden und bei hESZ bis maximal 16 Stunden beträgt (Abdelalim 2013). Im Vergleich dazu ist der Zellzyklus differenzierter Zellen mit 24 bis 32 Stunden deutlich langsamer (Kapinas et al. 2013). Die beschleunigte Zellteilung der ESZ wird durch eine Verkürzung der *Gap*-Phasen (G-Phasen) des Zellzyklus erreicht, sodass ungefähr 65% aller ESZ innerhalb einer nicht synchronisierten Population sich in der Phase der DNA-Synthese (S-Phase) befinden und nur 15% in der G1-Phase, in der hauptsächlich das Zellwachstum stattfindet (Becker et al. 2006). Konsistent damit sind ESZ nicht sehr groß (10-18 μm Durchmesser) und der größte Teil ihrer Masse macht der Zellkern aus (Wakayama et al. 1999, Keller 2005). Auch die Expression der Zykline und Zyklin-assoziierten Kinasen ist in ESZ verändert. Diese zentralen Zellzyklus-Regulatoren zeigen mit wenigen Ausnahmen eine durchgängige Aktivität im mESZ Zellzyklus, im Gegensatz zur zyklischen Aktivität in somatischen Zellen (Stead et al. 2002, Faast et al. 2004, White and Dalton 2005, Abdelalim 2013). Die Verknüpfung zwischen der Pluripotenz von Zellen und ihrer Zellzyklus-Struktur ist sehr stark. So ist zum Beispiel ein induzierter Zellzyklus-Arrest in hESZ ausreichend, um die Differenzierung auszulösen (Kapinas et al. 2013).

Desweiteren wurde gezeigt, dass ESZ in der G1-Phase eine höhere Neigung zur Differenzierung haben und dass Signalwege, die in der S- und G2-Phase agieren, den Erhalt des pluripotenten Status fördern (Pauklin and Vallier 2013, Gonzales et al. 2015). Einige Transkriptionsfaktoren, die mit der Pluripotenz von Zellen assoziiert sind, spielen eine zweite Rolle in der Regulation des Zellzyklus, darunter Oct4, Nanog, Sox2 und c-Myc (Abdelalim 2013). Aufgrund solcher Beispiele wurde lange angenommen, dass eine Entkopplung des ESZ-spezifischen Zellzyklus und der Aufrechterhaltung der Pluripotenz nicht möglich ist. Bei adulten Stammzellen ist eine spezielle Ruhephase, genannt Quieszenz, ein allgegenwärtiger Mechanismus zur „Lagerung“ von Stammzellen in der Nische, die gerade nicht gebraucht werden und erst bei Bedarf durch externe Faktoren wieder reaktiviert werden (Rezza, Sennett and Rendl 2014). Jedoch demonstrierten Scognamiglio *et al.*, erst kürzlich, dass auch mESZ in eine reversible Dormanz verfallen, wenn die Aktivität von Myc-Proteinen inhibiert wird, wobei der pluripotente Status der Zellen in diesem Fall unbeeinflusst bleibt (Scognamiglio et al. 2016). Trotz dessen ist der speziell strukturierte und verkürzte Zellzyklus in pluripotenten Zellen ein entscheidender Faktor zur Selbsterneuerung. Die Zellteilung zur Selbsterneuerung von ESZ ist symmetrisch, das heißt dass beide Tochterzellen undifferenziert und strukturell sowie funktionell identisch zur Mutterzelle sind (Savatier et al. 2002, White and Dalton 2005).

1.2 Die Mikroumgebung embryonaler Stammzellen

In vivo ist jede Stammzelle in einer speziellen Mikroumgebung lokalisiert, bestehend aus benachbarten Zellen, extrazellulärer Matrix (EZM) und Signalmolekülen. Diese Mikroumgebung wird als Nische bezeichnet (Chen, Lewallen and Xie 2013). Jede Nische muss die Verankerung ihrer Stammzellen an der richtigen Stelle gewährleisten. Darüber hinaus muss sie durch das Zusammenspiel aller externen Einflüsse dafür sorgen, dass der Stammzellcharakter aufrechterhalten wird, dass jedoch zum korrekten Zeitpunkt die Differenzierung stattfindet. Solche regulatorischen Einflüsse können biochemischer als auch biophysikalischer Natur sein und variieren je nach Nischentyp. So vielfältig wie die verschiedenen Stammzellen sind, so vielfältig sind auch ihre Nischen. Die embryonale Stammzellnische unterscheidet sich in ihrer Lebensdauer, Funktion und Komplexität wesentlich von der adulten Stammzellen, da sie nur während eines kurzen Zeitraums in der Embryonalentwicklung existiert, wohingegen adulte Stammzellnischen lebenslang im Einsatz sind. Im Folgenden werden die Eigenschaften der embryonalen Stammzellnische in der Blastozyste im Detail vorgestellt. Des Weiteren soll die Kultivierung und Beeinflussung pluripotenter Zellen *in vitro* auf künstlichen Substraten näher thematisiert werden.

1.2.1 Die embryonale Stammzellnische

Das *in vivo* Pendant zu ESZ sind die pluripotenten Zellen der IZM einer Blastozyste. Die Isolation der klassischen ESZ erfolgt in der Regel, bevor sich die Blastozyste in den Uterus eingenistet hat (Martin 1981, Evans and Kaufman 1981, Thomson et al. 1998). Zumindest in murinen Embryonen stellen diese Zellen den naiven Ursprungszustand der Pluripotenz dar (De Los Angeles et al. 2015). Dieses Stadium der Blastozyste ist wenig komplex und besteht lediglich aus zwei verschiedenen Zelltypen. Die IZM der Blastozyste stellt das embryonale Gewebe dar und besteht nur aus einer homogenen, mesenchymalen Zellpopulation, den ESZ (Abb. 1.2). Das epitheliale Trophektoderm hingegen ist die äußere, extraembryonale Zellschicht, die eine wichtige Rolle bei der Einnistung der Blastozyste in den Uterus und bei der Ausbildung der Plazenta spielt (Cockburn and Rossant 2010). Die IZM hat nur auf einer Seite Kontakt zum Trophektoderm und grenzt auf der anderen Seite an die Blastozystenöhle an, ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum innerhalb der Blastozyste (Cockburn and Rossant 2010). Eine einzelne ESZ innerhalb der Blastozyste hat also Kontakt zu Nachbarzellen, zu Proteinen der EZM und zu löslichen Bestandteilen aus der extrazellulären Flüssigkeit. Bei den Nachbarzellen handelt es sich im Fall randständiger ESZ um Trophektoderm-Zellen. In dem meisten Fällen hat eine ESZ aber aufgrund der dreidimensionalen (3D)-Anordnung der IZM an allen Seiten engen Kontakt zu anderen ESZ (siehe Abb. 1.2) (Cockburn and Rossant 2010). An der Interaktion zwischen den Zellen ist unter anderem epitheliales Cadherin (E-Cadherin; Uvomorulin) beteiligt, das auf der Zelloberfläche innerhalb der IZM nachgewiesen (Vestweber et al. 1987) werden kann. In kultivierten ESZ spielt E-Cadherin eine wichtige Rolle in der Zell-Aggregation (Larue et al. 1996) sowie bei der Selbsterneuerung von hESZ und wird als Marker für undifferenzierte hESZ verwendet (Li, Bennett and Wang 2012). Ebenso wie E-Cadherin wurde das Adhäsionsmolekül *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1) in der Zellmembran innerhalb der IZM von Blastozysten detektiert, obwohl es ursprünglich als vaskuläres Adhäsionsmolekül beschrieben wurde (Robson et al. 2001). Neben benachbarten Zellen spielt die EZM eine weitere wichtige Rolle innerhalb einer Stammzellnische. Dabei hat die EZM neben der Zell-Matrix-Adhäsion weitere Funktionen, wie die Strukturbildung für Gewebe oder die Speicherung von Wachstumsfaktoren (Rozario and DeSimone 2010). Für diese Funktionen der EZM sind zwei unterschiedliche Typen von Makromolekülen verantwortlich - Proteoglykane und faserige Proteine (Frantz, Stewart and Weaver 2010). In der IZM der Blastozyste wurden unter anderem die Glykoproteine Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin (FN) als faserige Bestandteile der EZM nachgewiesen (Wartiovaara, Leivo and Vaheri 1979, Leivo et al. 1980). Alle diese Proteine besitzen das RGD-Peptid, eine Erkennungssequenz, die die Interaktion zwischen der EZM und den Zellen über Integrin-vermittelte Fokalkontakte zulässt (Ruoslahti 1996). Die Interaktion zwischen Zellen und der EZM ist dabei nicht nur rein adhäsiver Natur, sondern hat Einflüsse auf Prozesse wie das Wachstum, die Migration oder die Differenzierung

von Zellen (Ruoslahti 1996). Es existieren viele verschiedene Integrin-Heterodimere, wobei ESZ hauptsächlich Integrine aus der $\beta 1$ -Familie exprimieren, die essentiell für die Ausbildung der inneren Zellmasse sind (Stephens et al. 1995, Hayashi et al. 2007).

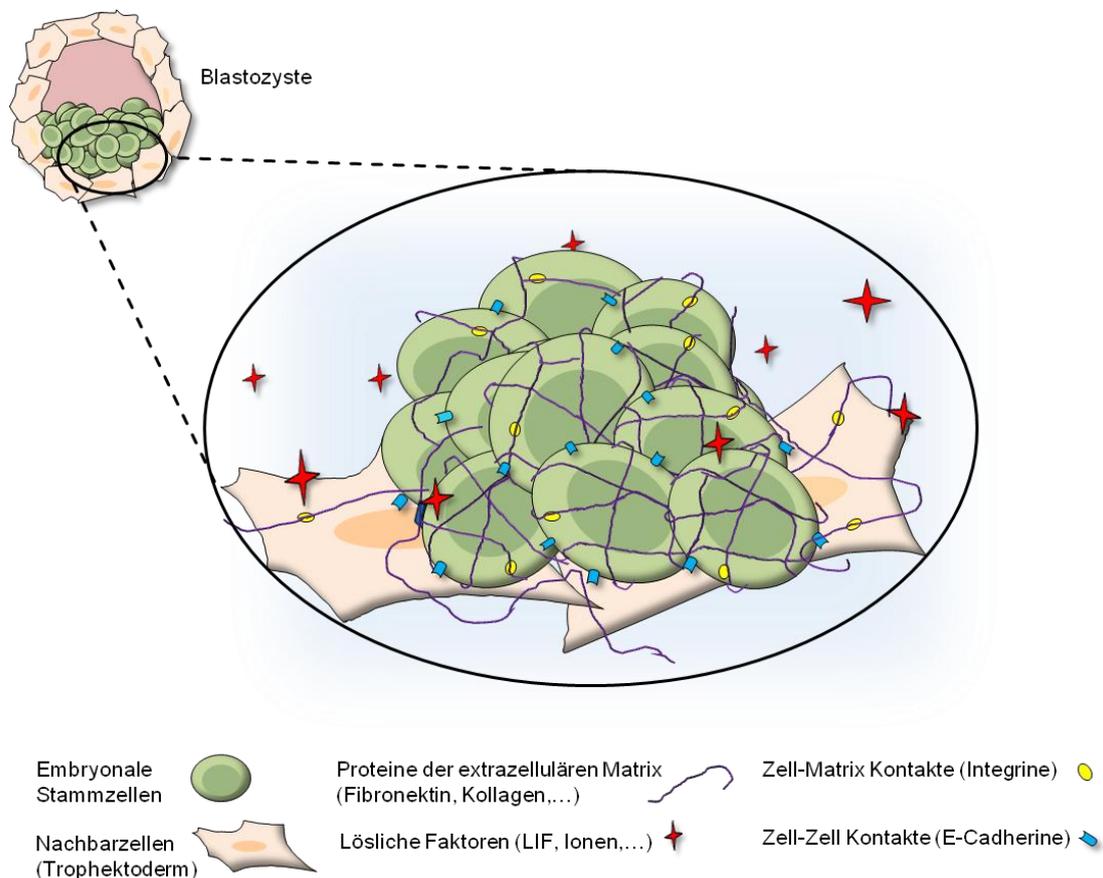


Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung der embryonalen Stammzellnische. In der Blastozyste bilden ESZ die IZM, mit Zell-Zell-Kontakten (blau) zu benachbarten ESZ und zu Zellen aus dem Trophektoderm (hautfarben), das die Blastozyste umgibt. Ebenso werden ESZ durch lösliche Faktoren (rot) aus der nahen Umgebung in ihrem Verhalten beeinflusst, wie auch durch den Kontakt zu Proteinen aus der extrazellulären Matrix (violett), vor allem über Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Kontakte (gelb).

Neben festen Bestandteilen der EZM spielen die löslichen Bestandteile der Zellumgebung eine nicht unerhebliche Rolle. Dazu gehören Faktoren wie Ionen, Zytokine oder Metaboliten, die das Zellverhalten beeinflussen können. Ein Beispiel dafür ist das Zytokin LIF, das im Fall von mESZ unabdingbar für die Selbsterneuerung der Zellen ist (Williams et al. 1988). LIF wird im frühen Embryo von Zellen des Trophektoderm gebildet (Nichols et al. 1996) und bindet über den heterodimeren Rezeptorkomplex aus LIFR β und gp130 an ESZ (Gearing et al. 1992, Nicola and Babon 2015). Dies hat unter anderem die Aktivierung des STAT3 Signalweges zur Folge, ein Hauptfaktor für das Wachstum und die Pluripotenz von mESZ (Niwa et al. 1998, Nicola and Babon 2015). hESZ hingegen sind nicht auf LIF angewiesen, sondern erfordern stattdessen die

Aktivität von FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) oder Activin A für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz (Nicola and Babon 2015). Letztendlich werden alle äußeren Einflüsse aus der Nische in komplexen Signalkaskaden innerhalb einer Stammzelle verarbeitet und führen zu einer spezifischen Zellantwort, wie der Selbsterneuerung, Differenzierung oder Apoptose.

1.2.2 Allgemeine Zellkultursubstrate für embryonale Stammzellen

Die Nutzung der pluripotenten Eigenschaften embryonaler und induziert pluripotenter Stammzellen in der Forschung und Medizin setzt eine effiziente Kultivierung der Zellen voraus. Die Aufrechterhaltung des pluripotenten Stammzellcharakters *in vitro* ist jedoch alles andere als trivial. Eine bewährte und häufig angewandte Methode stellt die Verwendung einer Feederzellschicht als Zellsubstrat dar, wie bereits im Jahr 1981 beschrieben (Evans and Kaufman 1981). Diese Schicht aus mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten bietet den Stammzellen eine Möglichkeit zur Adhäsion und sekretiert außerdem Faktoren, die für das Wachstum und die Aufrechterhaltung der Pluripotenz wichtig sind, beispielsweise LIF (Williams et al. 1988, Smith et al. 1988, Desai, Rambhia and Gishto 2015, Llamas et al. 2015). Als Zusatz wird bei dieser Kultivierungsmethode meist fetales Kälberserum (englisch: *fetal calf serum*, FCS) verwendet, das Hormone, Wachstumsfaktoren und essentielle Nährstoffe liefert (Tamm, Pijuan Galitó and Annerén 2013). Eine Alternative zu Feederzellen stellt die Kultivierung auf Hydrogelen, wie z.B. Matrigel® dar, das aus Bestandteilen der EZM zusammengesetzt ist und von murinen Sarkomzellen sekretiert wird (Kleinman et al. 1982, Xu et al. 2001). Sowohl Matrigel® als auch Feederzellen und Serum kommen dabei der komplexen Zusammensetzung der ESZ Nische relativ nahe, wobei sie den Nachteil haben, dass sie in dieser Hinsicht nicht definiert sind und dadurch eine Standardisierung der Stammzellkultivierung nicht erlauben. Desweiteren sind diese Methoden entweder zeitaufwändig oder kostspielig und bergen das Risiko von Kontaminationen mit artfremdem Material oder mit Mikroben (Villa-Diaz et al. 2013). Deshalb wird bei der Entwicklung von Stammzellsubstraten mittlerweile versucht, deren Komplexität zu verringern und wenige, jedoch definierte Komponenten einzusetzen (Villa-Diaz et al. 2013). Die Kultivierung von ESZ auf Gelatine in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren ist eine Feederzellfreie Möglichkeit zur Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften *in vitro* (Xu et al. 2001, Li et al. 2009, Tamm et al. 2013). Gelatine ist eine denaturierte, hydrolysierte Form von Kollagen (Wang et al. 2016) und fungiert demnach bei der Aufrechterhaltung der ESZ-Pluripotenz über die Bereitstellung von Adhäsionsmöglichkeiten. Daran anknüpfend gibt es weitere Substrate aus einzelnen EZM-Molekülen, die die Pluripotenz in Kultur aufrechterhalten. Beispiele hierfür sind Fibronectin, Laminin, Vitronectin oder Kollagen I (Joddar and Ito 2013). Auch E-Cadherin-Substrate werden für die ESZ-Kultivierung verwendet (Nagaoka et al. 2006). Jedoch besteht vor allem für einen therapeutischen Gebrauch der pluripotenten Zellen der Bedarf an

vollsynthetischen, definierten Substraten ohne biologische Komponente (Villa-Diaz et al. 2013). Bisher sind nur wenige solcher synthetischen Substrate bekannt, die eine langfristige und effiziente ESZ-Kultivierung ohne spontane Differenzierung ermöglichen (Joddar and Ito 2013). Die Gemeinsamkeit aller hier aufgezeigten Stammzellkultursysteme basiert auf der Kontrolle der Stammzellen durch biochemische Interaktionen zwischen den Zellen und dem Substrat. Abgesehen davon lässt sich das Zellverhalten jedoch auch durch physikalische Faktoren steuern. Da die Beschichtung von Oberflächen mit biochemischen Molekülen Nachteile wie Kontaminationen oder fehlende Standardisierungsmöglichkeiten nach sich ziehen, ist eine Kontrolle der Stammzell-Pluripotenz allein durch physikalische Faktoren des Substrats ein wichtiges Ziel in der Stammzellforschung. Solche Substrate werden jedoch noch nicht standardmäßig verwendet. Im folgenden Kapitel soll nun näher darauf eingegangen werden, welche Möglichkeiten zur physikalisch basierten Steuerung des Stammzellverhaltens existieren.

1.2.3 Steuerung des Stammzellverhaltens durch physikalische Parameter

Das allgemeine Zellverhalten wird durch exogene Einflüsse reguliert, die entweder biochemischer als auch biophysikalischer Natur sein können (Discher, Mooney and Zandstra 2009, Rezza et al. 2014). Die Stammzellforschung befasste sich bereits sehr früh mit der Untersuchung der biochemischen Einflüsse, sodass heute weitestgehend aufgeklärt ist, wie Stammzellen chemisch modifiziert werden können. Allerdings zeigte sich auch, dass physikalische Faktoren zusätzlich eine nicht unerhebliche Rolle spielen (Sun, Chen and Fu 2012a, Nava, Raimondi and Pietrabissa 2012, Higuchi et al. 2013). Zu diesen Parametern zählen neben vielen weiteren die Dimensionalität, Geometrie, Steifheit oder Topografie der Mikroumgebung (Kolind et al. 2012, Meng et al. 2014). Ein Vorteil dieser Faktoren über chemische Funktionalisierungen sind ihre Stabilität *in vitro* und ihre Vielfältigkeit. Die meisten Studien zur Beeinflussung des Stammzellverhaltens durch physikalische Aspekte wurden an adulten (mesenchymalen oder neuronalen) Stammzellen durchgeführt. Diese Studien demonstrieren, dass das Proliferations- beziehungsweise Differenzierungsverhalten durch Faktoren wie die Substrat-Steifheit oder die Topografie beeinflusst werden kann (Sun et al. 2012a, Higuchi et al. 2013, Murphy, McDevitt and Engler 2014). Bezüglich der Geometrie zeigte beispielsweise eine Einzelzellstudie aus dem Jahr 2004 an adulten mesenchymalen Stammzellen, dass die Größe der 2D-Adhäsionsfläche und die daraus resultierende Ausbreitung der Zellen das Zellschicksal beeinflussen (McBeath et al. 2004). Die Stammzellen konnten sich auf kleinen FN-Mikroinseln nicht ausbreiten und differenzierten vermehrt zu Adipozyten, wohingegen die Ausbreitung auf größeren Mikroinseln eine Differenzierung zu Osteoblasten begünstigte. McBeath *et al.* führten diese Ergebnisse auf eine erhöhte intrazelluläre Aktin-Myosin Kontraktilität der Zellen auf größeren Mikroinseln zurück (weitere Details in Kapitel

1.3.2). Die Topografie des Substrats kann beispielsweise das Wachstum neuronaler Stammzellen beeinflussen. Anhand strukturierter, mit Laminin beschichteter Rillensubstrate aus Polydimethylsiloxan (PDMS) wurde ein Zusammenhang zwischen Breite der Rillen und den Neuriten darin kultivierter neuronaler Stammzellen demonstriert. Dabei führten die Kultivierung in breiteren Rillen (größer als 10 μm) zur Steigerung der Länge und Anzahl auswachsender Neurite und zu einer verbesserten Differenzierungsrate als bei schmalen Rillen (Bédier et al. 2012). Auch die Dimensionalität der Zellumgebung beeinflusst das (Stamm-) Zellverhalten maßgeblich (Baker and Chen 2012). 2D-Substrate entsprechen nicht den 3D-Eigenschaften der natürlichen Zellumgebung und fördern beispielsweise eine erzwungene apikal-basal-Polarität, die *in vivo* nicht existiert (Baker and Chen 2012). Besonders für mesenchymale Stammzellen existieren hier eine Reihe von Studien, die eine gesteigerte Expansion oder Differenzierung der Zellen in 3D-Substraten wie Hydrogelen oder gerüstartigen Polymersubstraten belegen (zusammengefasst in (Higuchi et al. 2013)).

Wie physikalische Faktoren auf embryonale und induziert pluripotente Stammzellen wirken, wurde seltener untersucht. Es existieren zwar Studien, die zeigen, dass pluripotente Zellen durch externe physikalische Faktoren beeinflusst werden können (Chowdhury et al. 2010, Jeon et al. 2012, Chen et al. 2012, Sun et al. 2012b, Lyu et al. 2014, Bae et al. 2014, Lü et al. 2014), jedoch sind diese oft widersprüchlich zueinander. Zum Beispiel demonstrierten Sun *et al.*, dass die Kultivierung von hESZ auf harten (kurzen) PDMS-Mikrosäulen die Selbsterneuerung von hESZ fördert im Vergleich zur Kultivierung auf weichen (längeren) PDMS-Mikrosäulen (Sun et al. 2012b). In Kontrast dazu zeigten Chowdhury *et al.*, dass weichere unstrukturierte Polyacrylamid-Substrate in Abwesenheit von LIF die Selbsterneuerung von mESZ fördern (Chowdhury et al. 2010). Auch bezüglich des Effekts der Rauheit von Substraten auf das ESZ-Verhalten gibt es Diskrepanzen in der Literatur. So fördern nano-raue, unbeschichtete Goldsubstrate die Pluripotenz von mESZ im Vergleich zu mikro-rauen Substraten und vergleichbar zu glattem Gold (Lyu et al. 2014). Chen *et al.* stellten jedoch anhand unterschiedlich rauer, Vitronektin-beschichteter Glassubstrate einen negativen Effekt der Rauheit auf die hESZ Selbsterneuerung fest (Chen et al. 2012). Oft wurden die getesteten topografischen Substrate mit Proteinen wie Gelatine, Kollagen oder Vitronektin beschichtet (Chen et al. 2012, Lü et al. 2014, Bae et al. 2014), sodass die beobachteten Effekte nicht allein auf die physikalische Substrateigenschaft zurückgeführt werden können. Weiterhin wurden die meisten Studien zur Reaktion von ESZ auf physikalische Reize nicht auf Einzelzellebene durchgeführt, was den Nachteil hat, dass sich die Zellen innerhalb einer Kolonie gegenseitig beeinflussen. In solchen multizellulären Systemen herrscht also ein weiterer physikalischer Parameter – die benachbarten Zellen – vor, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Dadurch lassen sich zum Teil die hier beschriebenen Diskrepanzen erklären. Bezüglich der Dimensionalität der

Mikroumgebung wurde vor allem durch die Kultivierung pluripotenter Zellen in 3D-Hydrogelen gezeigt, dass diese einen Vorteil über die klassische 2D-Kultivierung bietet und die Expansion der Zellen fördert (Shao, Sang and Fu 2015). Die meisten verwendeten 3D-Hydrogele, beispielsweise Matrigel®, sind jedoch weder biochemisch noch geometrisch definiert und lassen eine Isolation der Zellen für weitere Zwecke meist nicht zu. Eine Alternative hierzu stellt die Verwendung von gerüstartigen, geometrisch definierten 3D-Substraten dar, wie sie beispielsweise mit der Technik des direkten Laserschreibens (DLS) hergestellt werden können (Klein et al. 2011). Die Kompatibilität solcher 3D-Substrate für die Zellkultivierung wurde bereits für somatische Zellen, aber auch für mesenchymale und embryonale Stammzellen demonstriert (Klein et al. 2011, Raimondi et al. 2013, Nava et al. 2016). Allerdings wurden solche Substrate bisher noch nicht genutzt, um gezielt den Einfluss physikalischer Faktoren, wie zum Beispiel der Geometrie, auf pluripotente Stammzellen zu untersuchen.

Die oben genannten Studien demonstrieren zwar alle, dass pluripotente Zellen mechanosensitiv sind, jedoch herrscht weiterhin ein Bedarf an wohl überlegten Studien, um ESZ gezielt und reproduzierbar durch physikalische Faktoren zu beeinflussen und möglicherweise zugrunde liegende Mechanismen aufzudecken.

1.3 Mechanotransduktion

Die Zellen unseres Körpers sind kein abgeschlossenes System, sondern interagieren vielmehr dauerhaft mit ihrer direkten Umgebung. Dabei werden sowohl chemische als auch physikalische Reize innerhalb der Zelle verarbeitet, wobei die Rolle der physikalischen Einflüsse auf Zellen in der Zellforschung lange Zeit vernachlässigt wurde (Halder, Dupont and Piccolo 2012). Die Übertragung solcher Einflüsse ins Zellinnere wird durch den Begriff der „Mechanotransduktion“ beschrieben, wobei zugrunde liegende Mechanismen sehr vielfältig sein können. So wird beispielsweise auch die direkte Aktivierung von Ionenkanälen durch Zugkräfte der Mechanotransduktion zugeordnet (Tschumperlin 2011). Der klassische Begriff der Mechanotransduktion beschreibt einen Mechanismus in adhärennten Zellen, bei der physikalische Kräfte aus der Zellperipherie über Zell-Matrix-Kontakte und das Zytoskelett ins Innere der Zelle übertragen werden und somit die Genregulation und letztendlich das Zellverhalten beeinflusst wird (Goldmann 2012). Auch Stammzellen sind mechanosensitiv, wobei der Fokus des Interesses bisher hauptsächlich auf adulten, insbesondere mesenchymalen Stammzellen lag (Sun et al. 2012a, Dupont 2016). Im Folgenden soll der Mechanismus der Integrin-abhängigen Mechanotransduktion genauer erläutert werden und anschließend auf dessen Rolle bei der Steuerung adulter und embryonaler Stammzellen eingegangen werden.

1.3.1 Mechanotransduktion und die zentrale Rolle von YAP/TAZ

Die Hauptakteure der klassischen Mechanotransduktion sind unter anderem die EZM, Fokalkontakte oder Zell-Zellkontakte, das Zytoskelett und schließlich die Genregulation im Zellkern. Allerdings wurde erst kürzlich herausgefunden, wie die Genregulation mit mechanischen Zellkomponenten verknüpft ist und welche Proteine daran beteiligt sind. Im Jahr 2011 wurden in mehreren Studien zwei Effektoren des Hippo-Signalweges – *Yes-associated protein* (YAP) und *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif* (TAZ) – erstmals mit der Mechanotransduktion in Verbindung gebracht (Sansores-Garcia et al. 2011, Wada et al. 2011, Fernández et al. 2011). Der hochkonservierte Hippo-Signalweg ist ein Hauptregulator beim Wachstum von Geweben und der Kontrolle der Organgröße (Varelas 2014). Eine Aktivierung des Hippo-Signalweges, zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren oder Polaritätsproteine, führt zur Degradation des transkriptionelle co-Aktivators YAP und seines Paralogs TAZ (Piccolo, Dupont and Cordenonsi 2014). Dies geschieht durch deren Phosphorylierung über die Kinase LATS1/2, worauf es zur Sequestrierung im Zytoplasma und zur proteasomalen Degradation der beiden Proteine kommt (Piccolo et al. 2014). Aktives YAP/TAZ hingegen befindet sich im Zellkern und interagiert dort mit Transkriptionsfaktoren wie TEADs (*TEA domain family member*), wodurch Gene zuständig für die Zellproliferation, Differenzierung oder Apoptose reguliert werden (Halder et al. 2012). Neben der Mechanotransduktion und der Wirkung als Effektoren des Hippo-Signalwegs spielen YAP und TAZ weiterhin eine Rolle im Wnt-Signalweg oder bei metabolischen Prozessen wie beispielsweise der Glykolyse (Dupont 2016). Zumindest bezüglich des Hippo-Signalwegs dominiert jedoch die mechanische Regulation der YAP/TAZ-Aktivität über die Hippo-vermittelte Degradation (Piccolo et al. 2014), wodurch die übergeordnete Rolle dieser Mediatoren bei der Mechanotransduktion verdeutlicht wird.

Der Mechanismus, über den der YAP/TAZ-Komplex die Übertragung externer mechanischer Signale in eine transkriptionelle Reaktion überträgt, ist jedoch noch nicht im Detail aufgeklärt. Am Anfang der Kaskade steht zweifelsfrei die extrazelluläre Matrix, deren Glykoproteine über die transmembranen Integrin-Heterodimere mit Fokalkontakten der Zelle verknüpft sind (Goldmann 2012). Über Adapterproteine wie Vinculin oder Paxillin stehen Fokalkontakte in Kontakt mit dem Aktin-Myosin-Zytoskelett (Harburger and Calderwood 2009) und regulieren zusammen mit vielen weiteren Proteinen wie der *Focal Adhesion Kinase* (FAK) oder Rho-GTPasen die Assemblierung, Disassemblierung oder Kontraktilität des filamentösen Aktins (Harburger and Calderwood 2009). Über einen noch unbekanntem Mechanismus führt eine erhöhte Aktin-Kontraktilität zur Aktivierung von YAP/TAZ und folglich zur Translokation des Komplexes in den Zellkern, wo es im Zusammenspiel mit TEAD Transkriptionsfaktoren zur Genexpression kommt (Dupont 2016). Die Reaktion epithelialer und endothelialer Zellen auf Substrateigenschaften wie die Steifheit oder Geometrie wird über diesen Mechanismus

vermittelt. Dabei führt die Kultivierung auf sehr harten Substraten oder Substraten, die die Ausbreitung (Englisch: *Spreading*) der Zellen erlauben, zur Erhöhung der Aktin-Myosin-Kontraktilität und folglich zur YAP/TAZ-Aktivierung und deren Translokation in den Zellkern. Dort fördert aktiviertes YAP/TAZ nun die Expression von Genen, die die Zellproliferation ermöglichen (Halder et al. 2012). In Zellen, die auf sehr weichen Substraten kultiviert werden, oder bei denen das *Spreading* verhindert wird, liegt YAP/TAZ hingegen in seiner inaktiven Form im Zytoplasma vor und wird proteasomal degradiert, wobei diese Zellen die Apoptose einleiten oder in den Zellzyklusarrest übergehen (Halder et al. 2012). Inwieweit dieser Mechanismus auch in Stammzellen zu tragen kommt, wird im nächsten Kapitel genauer erläutert.

1.3.2 Mechanotransduktion in Stammzellen

In der Stammzellforschung beschäftigt sich ein weites Feld mit der Untersuchung physikalischer Einflüsse zur Kontrolle der Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzellen. Diese Erkenntnisse können genutzt werden, um die Manipulation der Zellen durch chemische Faktoren zu ersetzen oder zu unterstützen. Dies hat vor allem für die Routinekultivierung von Stammzellen aber auch für klinische Anwendungen einen hohen Stellenwert, da physikalische Einflussgrößen oft stabiler, günstiger oder weniger anfällig für Kontaminationen sind als biochemische Faktoren. Auch in diesem Bereich wurde der Fokus bisher weitgehend auf mesenchymale Stammzellen gelegt, da diese Zellen besonders mechanosensitiv sind und als Stammzellen des Bindegewebes in einem mechanisch stark beanspruchten Gewebe lokalisiert sind. Die erste bahnbrechende Studie in diesem Feld stammt von McBeath *et al.*, die eine Abhängigkeit der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen vom *Spreading* der Zellen zeigten (McBeath et al. 2004)(siehe auch Kapitel 1.2.3). Die Autoren konnten zeigen, dass die Ausbreitung der Zellen auf großen 2D-Mikroinseln zu einer erhöhten Zytoskelett-Kontraktilität und RhoA Aktivität führt und folglich die osteogene über die adipogene Differenzierung begünstigt (McBeath et al. 2004). Erst später wurde dieser Effekt der damit einhergehenden Aktivität von YAP/TAZ zugeschrieben (Halder et al. 2012, Dupont 2016). Interessanterweise führt aktives YAP/TAZ in pluripotenten Stammzellen nicht zur Differenzierung, sondern wird vielmehr mit der Selbsterneuerung kultivierter ESZ assoziiert (Varelas 2014). In hESZ bindet aktives YAP/TAZ im Komplex mit Oct4 und anderen Genregulatoren an Gene, die wiederum für die Pufferung der Expression von Pluripotenzfaktoren sowie für die Repression von Differenzierungsgenen zuständig sind (Beyer et al. 2013). In mESZ führt der *Knockdown* von YAP zum Verlust von Oct4 und Sox2 und folglich zur Differenzierung der Zellen (Lian et al. 2010). In welchem Maße die Mechanotransduktion in diesen Zellen die YAP/TAZ-Aktivität beeinflusst, ist noch unklar. Allerdings wurde im Jahr 2015 eine Verbindung zwischen der YAP/TAZ-Aktivität in hESZ und der Rho-vermittelten Aktin-Zytoskelett-Dynamik hergestellt (Ohgushi, Minaguchi and

Sasai 2015). Dabei wurde gezeigt, dass die Aktivierung von YAP/TAZ über Rho-Kinasen und das Aktin-Zytoskelett essentiell für das Überleben und die Selbsterneuerung der hESZ in Kultur ist (Ohgushi et al. 2015). Interessanterweise zeigten Saha *et al.* bereits 2006, dass das *Stretching* von hESZ auf einer elastischen Membran die Differenzierung der Zellen inhibiert, wobei der zugrunde liegende Mechanismus hier nicht aufgeklärt wurde (Saha et al. 2006). Allerdings wurde diese Studie nicht auf Einzelzellebene durchgeführt, sodass der Einfluss der Mechanik nicht vom Einfluss der benachbarten Zellen getrennt werden kann und schwer zu sagen ist, wie stark die Mechanik das individuelle Zellverhalten beeinflussen kann. Wie wichtig mechanische Prozesse und die Aktivität von YAP/TAZ *in vivo* sind, wird auch durch die Vorgänge während der frühen Embryonalentwicklung verdeutlicht. Die erste Differenzierungsentscheidung zwischen IZM und Trophektoderm basiert auf der polaritätsabhängigen Verteilung von YAP/TAZ (Varelas 2014), wobei der dafür zuständige Mechanismus erst vor kurzem aufgedeckt wurde (Maître et al. 2016). Im 8-Zellsstadium des murinen Embryos polarisieren die Zellen, wobei bestimmte Proteine apikal verbleiben und dort eine apikale Domäne ausbilden. In der darauffolgenden asymmetrischen Zellteilung erhält eine Tochterzelle diese apikale Domäne, bleibt polarisiert und weist eine niedrige Kontraktilität auf. Die andere, apolare Tochterzelle hingegen erhält mehr Actomyosin und ist stark kontraktil (Plusa and Hadjantonakis 2016, Maître et al. 2016). Nach Maître *et al.* führen diese Kontraktilitätsunterschiede zu Unterschieden im Zellschicksal, wobei YAP im Zellkern der polaren Zellen ein Trophektoderm-spezifisches Zellschicksal einleitet. Apolare Zellen nehmen aufgrund ihrer starken Kontraktilität eine innere Position innerhalb des Embryos ein und weisen kein nukleäres YAP auf, wodurch die Stammzellen der IZM gebildet werden (Maître et al. 2016). Noch ungeklärt ist, wieso die kontraktilen Zellen der IZM, anders als *in vitro* kultivierte ESZ und andere kontraktile Zellen, kein nukleäres YAP aufweisen. Dadurch wird jedoch deutlich, dass die Vorgänge im frühen Embryo sehr komplex und nicht vollständig verstanden sind und dass bei der Kultivierung solcher Zellen außerhalb ihrer natürlichen Nische nur annähernd ein *in vivo*-ähnliches Milieu dargestellt wird. Eine Kultivierung von (Stamm-) Zellen *in vitro* ist und bleibt artifiziell, jedoch ist sie die Basis für viele Bereiche in der Grundlagenforschung und in klinischen Anwendungen. Losgelöst vom Gedanken, die Stammzellnische exakt imitieren zu wollen, lohnt sich deshalb die Untersuchung, wie (embryonale) Stammzellen durch eine Kombination aus bio-chemischen und bio-physikalischen Faktoren *in vitro* kultiviert werden können. Ob diese künstliche Nische nun möglichst naturgetreu nachgebildet oder komplett artifiziell ist, oder ob eine Kombination aus beiden Möglichkeiten die besten Ergebnisse liefert, müssen zukünftige Studien klären.

1.4 Zielsetzung

Die wesentlichen Eigenschaften aller Stammzellen sind ihr Selbsterneuerungspotential und die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen. Eine gezielte Kontrolle dieser beiden Prozesse ist sowohl für die Routine-Kultivierung als auch für klinische Anwendungen wünschenswert. Exogene Faktoren, die das Zellverhalten beeinflussen, können biochemischer Natur sein, beispielsweise Kontakte zu Nachbarzellen oder zur EZM. Des Weiteren werden Zellen durch biophysikalische Faktoren wie Zugkräfte oder die Topografie des Substrats beeinflusst. Nachdem die biophysikalischen Einflüsse auf adulte und pluripotente Stammzellen in der Forschung lange Zeit vernachlässigt wurden, zeigte sich in den letzten Jahren, dass solche Faktoren zusätzlich eine nicht unerhebliche Rolle spielen und eine gute Alternative beziehungsweise Unterstützung der Stammzellmodifikation auf biochemischer Basis darstellen. Die meisten Studien diesbezüglich wurden an adulten mesenchymalen oder neuronalen Stammzellen durchgeführt. Für pluripotente Stammzellen existieren, besonders auf Einzelzellebene, nur wenige Studien, die sich mit der biophysikalischen Beeinflussung dieser Zellen befassen und die des Weiteren oft widersprüchlich sind. Eine *in vitro* Inhibierung der spontanen Differenzierung pluripotenter Zellen mit biophysikalischen Parametern wäre jedoch eine große Errungenschaft für die Grundlagenforschung und Medizin. Einige wenige Studien liefern Hinweise, dass ESZ mechanosensitiv sind, wobei jedoch unklar ist, wie die Mechanotransduktion in den Zellen abläuft. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung des Einflusses biophysikalischer Faktoren auf die Selbsterneuerung von ESZ.

Herangehensweise

Als Untersuchungsobjekt wurde eine transgene murine embryonale Stammzelllinie verwendet, die den Pluripotenzmarker Oct4, gekoppelt an eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) exprimiert. Dadurch konnte eine spontane Differenzierung der Zellen anhand der Fluoreszenzabnahme rasch beurteilt werden. Die Untersuchungen wurden auf Einzelzellebene durchgeführt, um die Beeinflussung durch benachbarte Zellen zu verhindern und dadurch beobachtete Reaktionen direkt auf Änderungen der Substrateigenschaften zurückführen zu können. Es wurden exemplarisch zwei verschiedene physikalische Einflussgrößen untersucht – die Geometrie und die Topografie der Mikroumgebung:

Anhand verschieden großer FN-Mikroinseln wurde der Einfluss der 2D-Geometrie, in diesem Fall der Größe der adhäsiven Fläche, auf die mESZ untersucht. Parallel dazu sollte ein 3D-Ansatz durchgeführt werden, um den mESZ eine Mikroumgebung zu bieten, die der *in vivo* Situation etwas näher kommt. Dabei wurden verschieden große, mit FN beschichtete 3D-Mikrokammern hergestellt, die den mESZ unterschiedlich viel Platz zur Verankerung boten.

In einem zweiten Ansatz wurde der Effekt der Topografie, genauer der Rauheit des Wachstumssubstrats, auf die Selbsterneuerung von mESZ untersucht. Dafür wurden drei verschiedene Polymersubstrate verwendet, die chemisch identisch waren, jedoch unterschiedliche Rauheitsgrade aufwiesen und nicht biochemisch beschichtet waren.

Durch die Kultivierung der mESZ auf oben genannten Substraten sollten also folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Ist die Selbsterneuerung der mESZ abhängig von den oben genannten biophysikalischen Einflussgrößen?
- 2) Wie erkennen mESZ Unterschiede in der Geometrie und Dimensionalität der Wachstumsumgebung? Spielt die klassische Mechanotransduktion hierbei eine Rolle?
- 3) Über welche Signalwege registrieren die mESZ Unterschiede in der Substrat-Topografie?

2 Material und Methoden

Die für diese Arbeit verwendeten Standard-Chemikalien wurden - falls nicht anders vermerkt - von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Die verwendete Plastikware stammte von Greiner Bio-One (Frickenhausen) oder Sarstaedt (Nümbrecht). Das Wasser (H₂O dest.) für die verwendeten Puffer und Medien wurde mit einem Ionentauscher vollentsalzt und anschließend autoklaviert.

Tabelle 1: Nicht-Standard-Chemikalien, die für vorliegende Arbeit verwendet wurden - wird fortgesetzt

BEZEICHNUNG	DETAILS	HERSTELLER
BSA	bovines Serumalbumin; verwendet: 1% in PBS	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
EDMA	Ethylen Dimethacrylat, >97%	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
(EG)6-OH (Kurzbezeichnung)	HS-C11-(EG)6-OH, Ethylenglycol-6-OH Mercaptan; verwendet: 0,1 mM in Ethanol	Prochimia (Sopot, Polen)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum) (PANSera ES), für ESZ geeignet; verwendet: 15% in mESZ Medium	Pan Biotech (Aidenbach)
FN	Fibronektin; <i>from human plasma</i> ; Lyophilisat in ddH ₂ O, 1 mg/ml Stock; verwendet: 10 µg/ml in PBS	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Gelatine	<i>from porcine skin</i> ; verwendet: 0,1% in PBS	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glutaraldehyd	verwendet: 2% in PBS	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
HEMA	2-Hydroxyethyl Methacrylat; >97%	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Irgacure® 819 / 369	Photoinitiator; verwendet: 1% in Fotolack	BASF (Ludwigshafen am Rhein)
IP-L	Fotolack für DSL (<i>Negative-tone photoresist</i>)	Nanoscribe GmbH (Eggenstein-Leopoldshafen)
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> ; produziert von HEKα5- Zellen; verwendet: 1:50 oder 1:40 in mESZ Medium	Eigenherstellung
L-Glutamin	verwendet: 1 mM in MEM-α Medium	Life Technologies (Carlsbad, USA)
β-Mercaptoethanol	verwendet: 0,1 mM in mESZ Medium	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
MIBK	Methylisobutylketon	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mitomycin C	aus <i>Streptomyces caespitosus</i> ; verwendet: 0,2	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Mowiol	mg/ml in PBS verwendet: 20%; mit 1% n-Propylgallat	Hoechst (Frankfurt)
N ₂	Stickstoff; Reinheit 5.0	Linde (München)
NEAA	<i>Non-essential amino acid</i> ; verwendet: 1x in mESZ Medium	Life Technologies (Carlsbad, USA)
n-Propylgallat	verwendet: 1% in Mowiol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ODM	Octadecylmercaptan, verwendet: 1,5 mM in EtOH	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
OrmoComp®	Fotolack für DLS	Micro resist technology (Berlin)
PDMS	Polydimethylsiloxan (PDMS:Sylgard 184 = 1:9)	Dow Corning (Midland, USA)
Penicillin-Streptomycin	10 U/ml; 10 mg/ml; verwendet 1:500 oder 1:250 in Zellmedium	Life Technologies (Carlsbad, USA)
TPE-TA	Trimethylolpropan Ethoxylat Triacrylat; passivierender Fotolack für DLS	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trimethoxysilyl Propyl Methacrylate	≥ 98%	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin/EDTA	0,5%/0,2% ; verwendet: 1:4 in HBSS	Life Technologies (Carlsbad, USA)

Tabelle 2: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

BEZEICHNUNG	DETAILS	HERSTELLER
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium; high Glucose, Sodiumpyruvat</i>	PAN Biotech (Aidenbach)
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i> ; 1x, ohne Ca ²⁺ ; ohne Mg ²⁺	Life Technologies (Carlsbad, USA)
MEM-α Medium	α-MEM ;1.:500 Penicillin/Streptomycin; 10% FCS; 1mM L-Glutamin	Eigenherstellung
mESZ Medium	DMEM (<i>high Glucose, Sodiumpyruvat</i>); 15% FCS; 1x NEAA; 0,1 mM β-Mercaptoethanol; Penicillin/Streptomycin (1:500 oder 1:250)	Eigenherstellung
Mowiol Einbettmedium	20% Mowiol (Hoechst); 33,3% Glycerin; 1 Spatelspitze n-Propylgallat; in PBS; pH 8-8,5	Eigenherstellung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung; 1x, ohne Ca ²⁺ ; ohne Mg ²⁺	Pan Biotech (Aidenbach)
PFA Fixierlösung	4% PFA in PBS; pH 7,4	Eigenherstellung

2.1 Substratherstellung

2.1.1 Herstellung der 2D-FN-Mikroinseln mittels *Microcontact Printing* (μ CP)

Für die Untersuchung des Stammzellverhaltens in Bezug auf die 2D-Geometrie wurden verschieden große adhäsive 2D-Mikroinseln benutzt, die durch passivierte Bereiche voneinander getrennt waren. Diese mikrostrukturierten Substrate wurden mit Hilfe des indirekten Proteinstempels (*Microcontact-Printing*, μ CP) hergestellt (Kumar and Whitesides 1993). Diese Technik beruht auf der Gold-Thiol-Chemie, einer Wechselwirkung von Alkanthiolen mit Gold, wodurch sich ein sogenanntes *self-assembled monolayer* auf der Oberfläche ausbildet (Mrksich and Whitesides 1996). In dieser Arbeit wurde eine leicht modifizierte Stempeltechnik angewandt, welche in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde (Lehnert et al. 2004).

2.1.1.1 Stempelmuster für die 2D-Mikroinseln

Um den Einfluss der 2D-Geometrie auf die mESZ zu untersuchen, wurden verschieden große quadratische 2D-Mikroinseln aus Fibronectin (FN) mittels μ CP hergestellt. Dabei kamen 5 verschiedene Größen mit folgenden Maßen zum Einsatz: (15x15), (20x20), (25x25), (30x30) und (35x35) μm^2 . Mehrere gleich große Mikroinseln wurden durch die passivierenden Bereiche voneinander getrennt und bildeten ein Feld, wobei je 6 solcher Felder pro Größe auf dem Stempel vorhanden waren (Abb. 2.1) Die Größe der kleinsten Mikroinseln wurde so gewählt, dass sie gerade die Maße von einzelnen Stammzellen besitzt, welche zwischen 10 und 18 μm groß sind (Wakayama et al. 1999). Die passivierenden Bereiche um die Mikroinseln, bestehend aus dem Thiol (EG)6-OH, waren nicht mit FN bedeckt und dienten so als Barriere für die Ausbreitung der Zellen. Der Stempel für das μ CP wurde von einem inversen Siliziummaster (Kapitel 2.1.1.2) abgeformt.

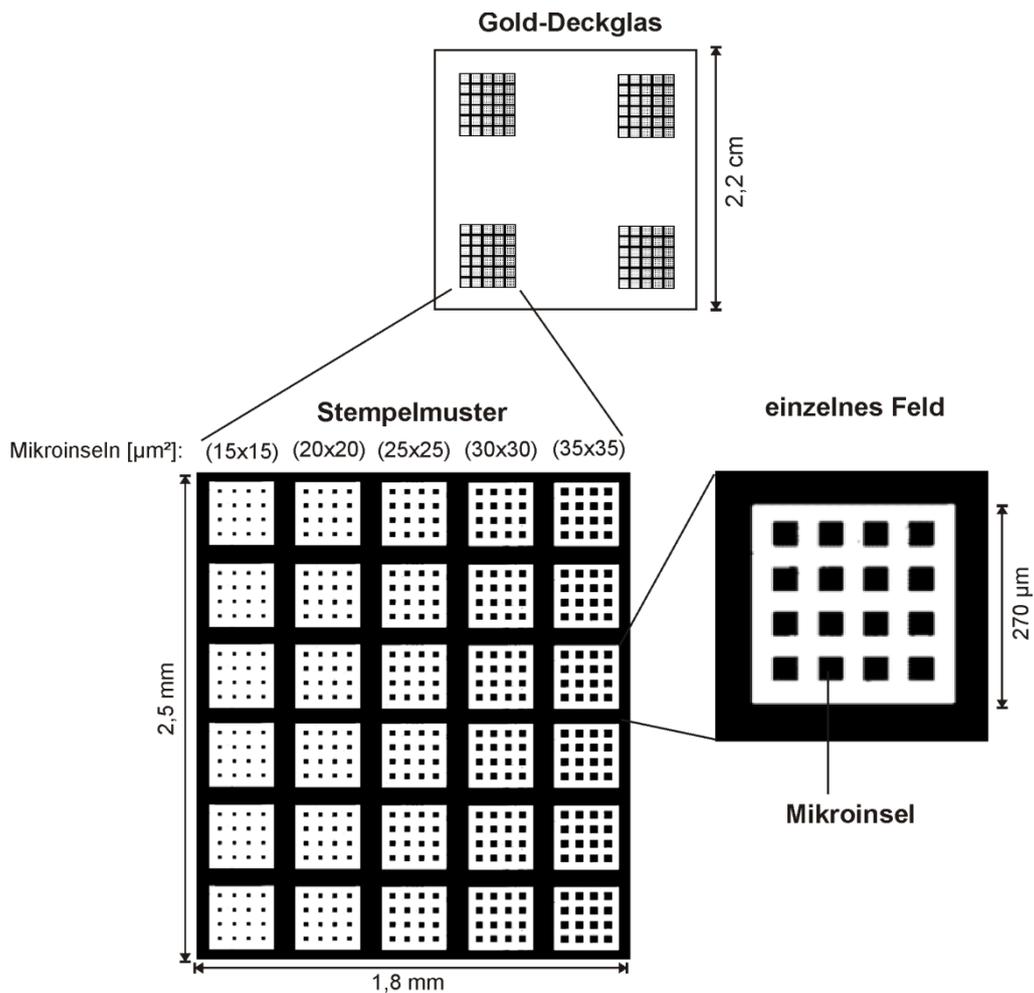


Abb. 2.1: Übersicht über das 2D-Stempelmuster. Bei der Herstellung der 2D-Mikroinseln wurde das Stempelmuster jeweils einmal in jede Ecke des Gold-Deckglases aufgebracht. Ein Stempelmuster bestand aus mehreren Feldern, die wiederum aus mehreren Mikroinseln zusammengesetzt waren.

2.1.1.2 Herstellung der Master

Für die Produktion der eigentlichen Silikonstempel wurde eine Abgussform aus Silizium verwendet, ein sogenannter Master, der mit Hilfe des Direkten Laserschreibens (DLS) produziert wurde. Die Herstellung des Masters erfolgte in Kooperation mit Benjamin Richter und Andrea Scheiwe am Institut für angewandte Physik des KIT. Das Prinzip des DLS wird in Abschnitt 2.1.2.3 genauer erläutert. Der Master wurde als inverses Muster aus dem Fotolack Pentaerythritol Triacrylat hergestellt, indem er mittels DLS auf ein silanisiertes Deckglas (siehe Kapitel 2.1.2.2) geschrieben wurde. Um eine zu starke Haftung zwischen dem Siliziummaster und der abzuformenden Struktur zu verhindern, folgte im Anschluss eine Passivierung des Masters.

2.1.1.3 Herstellung der Stempel für μ CP

Zur Stabilisierung des Silikonstempels wurde ein 1 cm breiter Glasstreifen aus Objektträgern hergestellt (1 mm Dicke), der dem Stempel als Rückgrat diente. Das Zuschneiden des Glasstreifens erfolgte mit Hilfe eines Diamantglasschneiders. Im Anschluss wurde der Glasstreifen mit Isopropanol gesäubert und mit N_2 getrocknet.

Für die Herstellung der Stempelstruktur wurde Silikon als Abgussmaterial verwendet. Dafür wurden 0,9 g Silikon mit 1 g Aushärter gemischt und 20 min inkubiert. Diese Mischung wurde nun auf den Siliziummaster (Kapitel 2.1.1.2) getropft, sodass das Muster bedeckt war, woraufhin der Glasstreifen aufgelegt wurde. Der Stempel wurde über Nacht bei 60 °C inkubiert, wodurch das Silikon vollständig aushärtete. Anschließend wurde der Glasstreifen vorsichtig vom Siliziummaster gelöst. Im Silikon befand sich nun die negative Zielstruktur des inversen Siliziummasters. Das überschüssige Silikon wurde nun mit einer Rasierklinge rund um die Struktur entfernt und der Glasstreifen wurde mit dem Diamantschneider auf die korrekte Größe in Form eines Quadrats zugeschnitten. Als Haltegriff diente ein Glaszylinder, der mittels Zweikomponentenkleber an den Stempel geklebt wurde.

2.1.1.4 Reinigung und Herstellung der Golddeckgläser für μ CP

Das μ CP erfolgte auf Deckgläser (quadratisch, 24 mm), welche vorher gereinigt und mit Titan und Gold bedampft wurden. Die Reinigung erfolgte für 15 min in einer Lösung aus Ammoniak, Wasserstoffperoxid und H_2O dest. (1:1:5), bei 80 °C. Die Deckgläser wurden nun mit H_2O dest. gespült, in eine Halterung gelegt und in die Aufdampfanlage eingebaut (tectura Mini-coater). Es folgte das Bedampfen mit Titan (Schichtdicke 0,5 nm) bei einem Druck von weniger als 10^{-9} bar. Das Titan ermöglichte eine bessere Haftung des Goldes, welches im nächsten Schritt mit einer Dicke von 2 nm aufgedampft wurde.

2.1.1.5 Microcontact Printing (μ CP)

Um verschieden große 2D-Mikroinseln aus FN herzustellen, wurde die Methode des μ CP angewandt (Lehnert et al. 2004). Dabei wurde der Stempel durch dreimaliges Abziehen mit Tesafilm und eine kurze Inkubation mit 100% Ethanol (unvergällt) gesäubert und mit N_2 getrocknet. Die goldbedampften Deckgläser (siehe Abschnitt 2.1.1.4) wurden ebenfalls mit Ethanol gespült und mit N_2 getrocknet. Daraufhin folgte die Inkubation der Stempelfläche für 20 s mit einer Lösung von 0,5 mM Octadecylmercaptan (ODM) in Ethanol. ODM ist ein hydrophobes Thiol und ermöglicht das Binden von Proteinen. Das ODM wurde anschließend abgenommen und der Stempel mit N_2 getrocknet und sanft auf das Golddeckglas gedrückt. Nach zweimaligem Stempeln wurde der Stempel erneut mit ODM für 5 s inkubiert. Anschließend wurde das

Deckglas mit Ethanol gespült und mit N₂ getrocknet. Nun wurde das Deckglas für 10 min lichtgeschützt mit dem zweiten, hydrophilen Thiol HS-C11-(EG)6-OH (kurz (EG)6-OH; 0,1 mM in Ethanol) inkubiert. (EG)6-OH bedeckt alle nicht durch ODM besetzten Bereiche und verhindert an diesen Stellen durch seine passivierende Eigenschaft eine Bindung von Proteinen. Danach wurden die Deckgläser erneut mit Ethanol gespült und getrocknet, woraufhin die Beschichtung mit FN folgte. Dafür wurden die Deckgläser für 30 min bei RT mit 10 µg/ml FN inkubiert. Dabei adsorbiert FN an die ODM-Bereiche, wodurch eine gleichmäßige, sogenannte *self-assembled monolayer* entsteht. Das überschüssige FN wurde abschließend 3-mal mit PBS abgewaschen. Die Substrate wurden in PBS bei 4 °C gelagert, bis die Zellen darauf ausgesät wurden. Für Zeitrafferaufnahmen an lebenden Zellen wurde FN verwendet, welches mit dem Alexa Fluor® 647 Protein Labeling Kit (Molecular Probes) fluoreszent markiert wurde. Dieses wurde bei der FN-Beschichtung im Verhältnis 1:10 zu einer Lösung aus nicht markiertem FN (siehe oben) zugegeben.

2.1.2 Herstellung der 3D-Substrate durch direktes Laserschreiben (DLS) und Abformung

Der Einfluss der 3D-Geometrie auf die mESZ wurde mit verschiedenen großen 3D-Mikrokammern untersucht, die mit Hilfe der Technik des DLS hergestellt wurden (Klein et al. 2011). Dies erfolgte in Kooperation mit Benjamin Richter, Andrea Scheiwe (Institut für angewandte Physik, KIT) und Michael Thiel (Nanoscribe GmbH). Für die verschiedenen Substrate wurden verschiedene modifizierte Herstellungsmethoden verwendet, welche jedoch alle auf der Technik des DLS basieren.

2.1.2.1 Stempelmuster für die 3D-Mikrokammern

Analog zu den 2D-Mikroinseln wurden auch im Fall der 3D-Substrate unterschiedlich große Strukturen hergestellt. Es kamen erneut 5 verschiedene Mikrokammer-Größen mit folgenden Grundflächen zum Einsatz: (15x15), (20x20), (25x25), (30x30) und (35x35) µm². Die Höhe der Wände betrug in jedem Fall 20 µm. Zur Vereinfachung wird deshalb in dieser Arbeit stets nur die Grundfläche für die verschiedenen 3D-Mikrokammern angegeben. Auf jedem Deckglas war ein Feld bestehend aus Gittern aller Größen zu finden, wobei ein Gitter aus aneinandergereihten Mikrokammern gleicher Größe zusammengesetzt war. Für jede Größe waren 4 solcher Gitter auf dem Deckglas vertreten (Abb. 2.2).

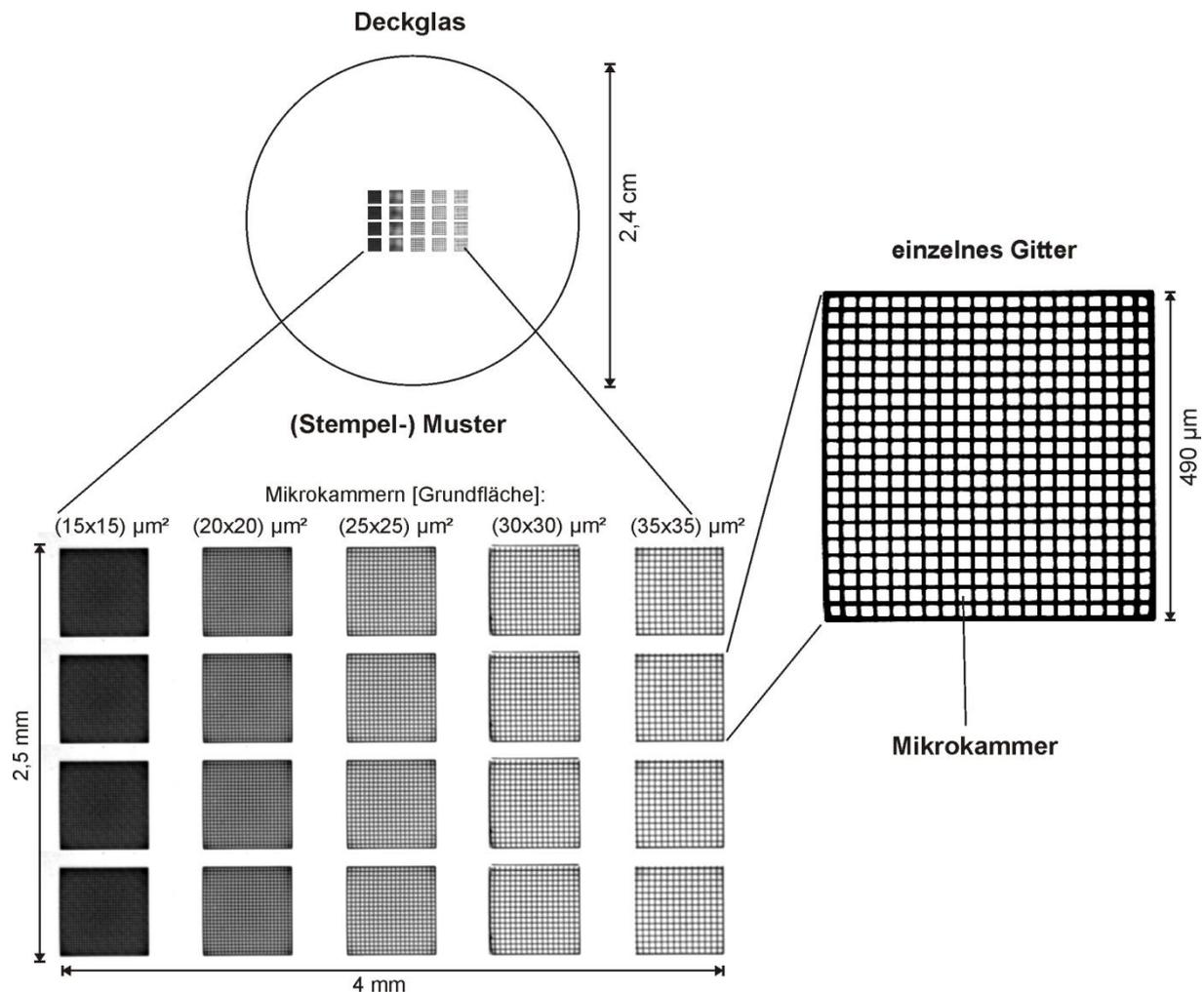


Abb. 2.2: Übersicht über das 3D-Muster für DLS und die Abformung der 3D-Substrate. Für die Herstellung der 3D-Mikrokammern wurde das Muster einfach und mittig auf ein Deckglas gestempelt bzw. mit DLS geschrieben. Das Muster bestand dabei aus verschiedenen Gittern mit Mikrokammern unterschiedlicher Grundfläche ((15x15) μm² - (35x35) μm²) und einer einheitlichen Höhe von 20 μm².

2.1.2.2 Silanisierung von Deckgläsern

Durch die Silanisierung von Deckgläsern mit 3-Trimethoxysilyl Propyl Methacrylat wird die Haftung von Fotolacken an die Glasoberfläche verstärkt. Deshalb wurden die Deckgläser vor dem DLS bzw. vor dem Stempeln mit diesem Silan funktionalisiert. Die Deckgläser wurden hierfür zuerst mit Isopropanol gereinigt und mit N₂ getrocknet. Damit sich eine gleichmäßige Silanschicht auf der Oberfläche ausbildet, wurden die Deckgläser nun für 10 min im Plasmaätzer (100-E PLASMA SYSTEM, Technics Plasma GmbH) mit ionisierter Luft geätzt, wodurch die Oberfläche der Deckgläser hydrophilisiert wurde. Die vorbehandelten Deckgläser wurden darauffolgend für 1 h in eine 1 mM Lösung aus 3-Trimethoxysilyl Propyl Methacrylat und Toluol gelegt. Anschließend wurden die Deckgläser mit H₂O dest. gespült und mit N₂ getrocknet. Bei der Polymerisierung von Fotolacken auf Acrylbasis bindet der Lack nun kovalent an das Methacrylat des silanisierten Deckglases.

2.1.2.3 Herstellung von 3D-Mikrokammern mit anti-adhäsiven Wänden durch DLS

Substrate mit 3D-Mikrokammern, bestehend aus FN-beschichtetem Glasboden und proteinabweisenden Wänden, wurden von Benjamin Richter durch die Technik des DLS hergestellt. Bei diesem Verfahren können beliebige räumliche Strukturen in einen speziellen Fotolack geschrieben werden (Klein et al. 2011). Hierfür wird ein Laserstrahl verwendet, in dessen Fokus es aufgrund einer Zwei-Photonen-Polymerisation zur Aushärtung des Fotolacks kommt. Die Wände der Mikrokammern wurden mit dem passivierenden Fotolack Trimethylolpropan Ethoxylat Triacrylat (TPE-TA; + Irgacure® 369) auf silanisierte Deckgläser geschrieben. Dafür wurde das Photonic Professional DSL-System von Nanoscribe verwendet. Es wurden lediglich die Wände geschrieben, sodass der Boden der Kammern durch das Deckglas repräsentiert wurde und die Adsorption von Proteinen ermöglichte. Die nicht polymerisierten Bereiche wurden später durch einen Entwickler (Methylisobutylketon:Isopropanol; 1:1) herausgelöst.

Zur Sterilisation wurden diese Substrate nun mit 70% Ethanol gewaschen und 30 min unter UV-Licht getrocknet. Es folgte ein Waschschriff mit 0,1% Triton X-100 für 5 min, um die Strukturen komplett mit Flüssigkeit zu benetzen und so einer Bildung von Luftblasen innerhalb der Kammern entgegenzuwirken. Nach einem erneuten Waschschriff mit PBS erfolgte die Beschichtung mit 10 µg/ml FN für 1 h bei RT. Das FN adsorbierte lediglich an den Glasboden der Mikrokammern und nicht an die aus TPE-TA bestehenden Wände. Das überschüssige FN wurde im Abschluss durch dreimaliges Spülen mit PBS abgewaschen, und die Substrate wurden in PBS bei 4 °C gelagert, bis die Zellen darauf ausgesät wurden.

2.1.2.4 Herstellung adhäsiver FN-Mikrokammern durch Abformung

Herstellung des DLS-Masters und des PDMS-Stempels

Eine modifizierte 3D-Abformtechnik wurde verwendet, um große Mengen an Substraten mit komplett adhäsiven Mikrokammern herstellen zu können (Schaap and Bellouard 2013) (Schema siehe Abb. 2.3). Hierfür wurde ein inverser Polydimethylsiloxan (PDMS) Stempel von einem DSL-basierten Master abgeformt (Abb. 2.3). Dieser Master (bestehend aus einem silanisierten Deckglas mit der 3D-Struktur aus polymerisiertem Fotolack; Muster siehe Abb. 2.2) wurde freundlicherweise von Michael Thiel an dem DLS-System Photonic Professional GT hergestellt. Dafür wurde der Fotolack IP-L verwendet.

Bevor dieser Master als Abgussform für den PDMS-Stempel verwendet werden konnte, wurde er mit einer 100 nm dicken Schicht aus Aluminiumoxid durch *Atomic Layer Deposition* stabilisiert (Savannah 100, Cambridge NanoTech Inc). Anschließend wurde PDMS 1:9 mit Aushärter gemischt und über den Master gegossen. Im PDMS vorliegende Luftblasen wurden durch

Anlegen eines Vakuums entfernt. Die Aushärtung erfolgte über 3 Tage bei RT. Anschließend wurde der PDMS-Stempel vorsichtig vom Master gelöst und mit einem Skalpell zugeschnitten.

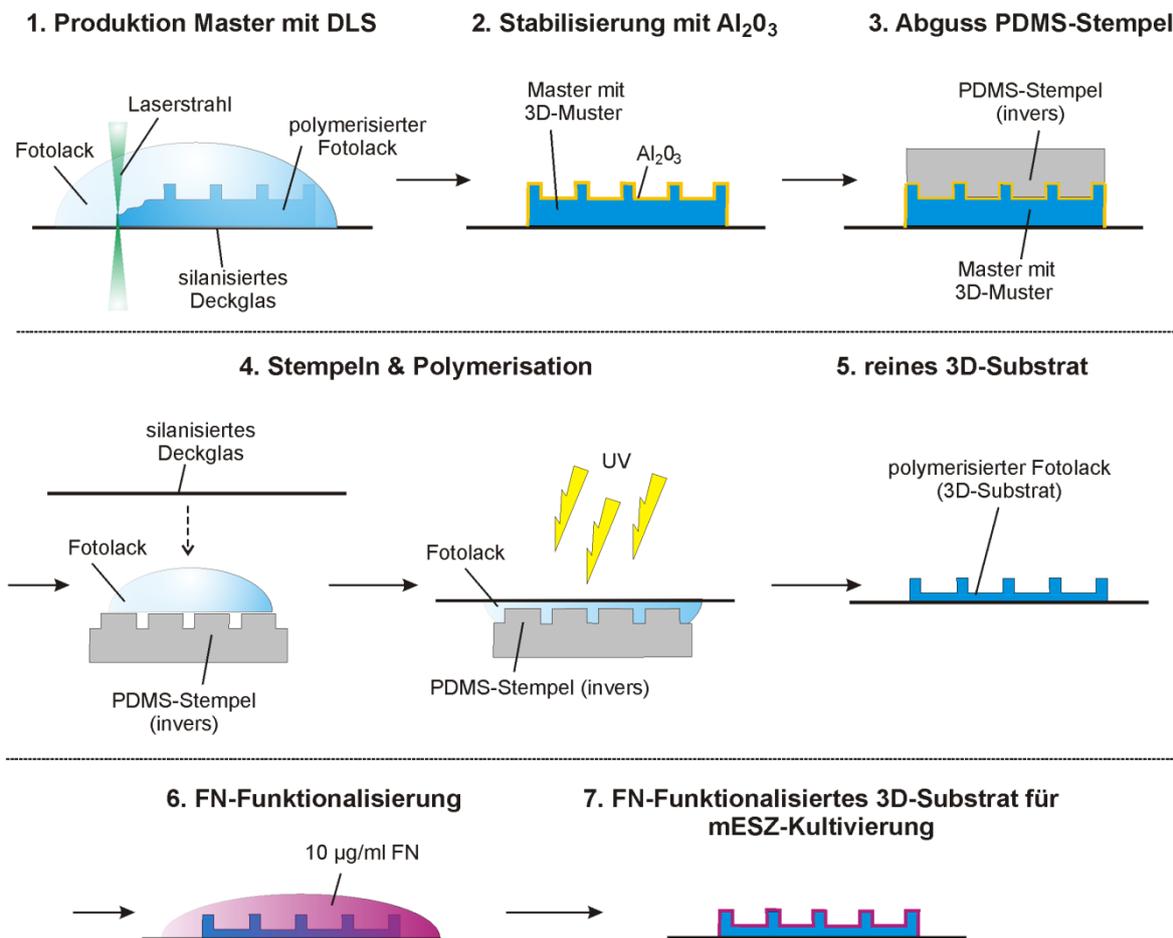


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Herstellung FN-funktionalisierter 3D-Mikrokammern durch Abformung. 1. Zuerst wurde die Zielstruktur mit DLS auf ein silanisiertes Deckglas geschrieben (=Master). 2. Der Master wurde durch eine Aluminiumoxid-Schicht stabilisiert. 3. Es folgte der Abguss des inversen PDMS-Stempels vom Master. 4. Auf den Stempel wurde Fotolack aufgetragen, gegen den ein silanisiertes Deckglas gedrückt wurde. Anschließend erfolgte die Polymerisation des Fotolacks durch UV-Licht. 5. Nach der Entfernung unpolymerten Fotolacks befand sich nun die polymerisierte Zielstruktur auf dem Deckglas. 6. Das 3D-Substrat wurde mit 10 µg/ml FN beschichtet. 7. Das FN-funktionalisierte 3D-Substrat wurde nun für Zellexperimente verwendet.

Replikation von 3D-Strukturen durch Abformung von einem PDMS-Stempel

Um Substrate mit adhäsiven 3D-Mikrokammern herzustellen, wurde der kommerziell erhältliche Fotolack OrmoComp® für die Replikation verwendet, welcher Proteinabsorption erlaubt. Von diesem wurde ein Tropfen auf das Muster des inversen PDMS-Stempels getropft und ein silanisiertes Deckglas dagegen gedrückt. Um den Fotolack zu polymerisieren, wurde das Deckglas samt Stempel für 1 min mit UV-Licht (Hönle UVAHAND 250) bestrahlt. Danach wurde das Deckglas vorsichtig vom PDMS-Stempel abgezogen, sodass das 3D-Muster nun an dem Deckglas haftete. Unpolymersierter Fotolack wurde nun durch einen 10-minütigen

Waschschritt im Entwickler (Methylisobutylketon:Isopropanol; 1:1) herausgelöst. Durch diese Abformtechnik befand sich der polymerisierte Fotolack nicht nur an den Wänden der Mikrokammern sondern er bedeckt auch den Boden (siehe Abb. 2.3). Die FN-Beschichtung erfolgte wie unter 2.1.1.5 beschrieben und resultierte in 3D-Mikrokammern, welche komplett von FN bedeckt waren.

2.1.3 Herstellung von HEMA-EDMA-Substraten mit unterschiedlicher Topografie

Um den Einfluss der Substrat-Topografie auf die mESZ zu untersuchen, wurden Substrate aus dem organischen Monomer 2-Hydroxyethyl Methacrylat (HEMA) und dem *crosslinker* Ethylene Dimethacrylat (EDMA) hergestellt. Dies erfolgte in Kooperation mit Pavel Levkin, Victoria Nedashkivska und Tina Tronser vom Institut für Toxikologie und Genetik des KIT. Die Methode basiert auf einer UV-initiierten Polymerisation der beiden Monomere in Anwesenheit von Porogenen. Die Zusammensetzung der beigefügten Porogene bestimmte dabei die Rauheit der HEMA-EDMA Oberfläche (Jaggy et al. 2015).

Für die Polymerisation wurde Gemische aus HEMA und EDMA sowie dem Fotoinitiator Dimethoxy-2-phenylacetophenon (DMPAP) und gegebenenfalls den Porogenen 1-Decanol und Cyclohexanol verwendet. Dieses Gemisch wurde zwischen zwei von Abstandshaltern getrennte, silanisierte Objektträger pipettiert und für 15 min unter UV-Licht polymerisiert. Die beiden Objektträger wurden anschließend durch ein Skalpell getrennt. Je nach Porogenverhältnis resultierte dies in HEMA-EDMA Oberflächen mit mikro-nano-Rauheit (MN-Substrate), nano-Rauheit (N-Substrate) oder glatter Polymerschicht (G-Substrate). Die Besonderheit der so hergestellten MN-Substrate ist die hierarchische Rauheit, welche diese Oberflächen aufweisen. Die Polymeroberfläche setzt sich aus globulären Polymer-Agglomeraten im Mikrometerbereich zusammen, welche selbst wiederum eine Strukturierung im Nanometerbereich aufweisen. Bei N-Substraten zeigt sich eine poröse, jedoch flache Beschichtung im Nanometerbereich. G-Substrate hingegen sind flach und wenig strukturiert.

Um die mit HEMA-EDMA beschichteten Objektträger für die Zellexperimente vorzubereiten, wurden sie mit einem Diamantglasschneider zugeschnitten, sodass sie in Petrischalen (94 mm Durchmesser) passten, und für 1 h auf dem Schüttler in 70% Ethanol inkubiert. Danach wurden sie unter UV-Licht für 30 min sterilisiert. Die HEMA-EDMA-Substrate mussten für die Zellexperimente nicht beschichtet werden und konnten direkt mit Zellen besiedelt werden. Lediglich die MN-FN Substrate wurden nach Sterilisation für 1 h mit 10 µg/ml FN in PBS beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen. Die MN-FN Substrate wurden in PBS bei 4 °C gelagert, bis die Zellen darauf ausgesät wurden.

2.1.4 Herstellung von Kontrollsubstraten

Als Positivkontrolle für die Kultivierung der mESZ dienten zum einen mit Gelatine beschichtete autoklavierte Deckgläser (Gelatine Substrat). Deren Beschichtung erfolgte 30 min mit 0,1% Gelatine in PBS bei RT. Eine weitere Positivkontrolle stellten Feederzell-Substrate her, welche zuerst wie beschrieben in eine kleine Petrischale (35 mm Durchmesser) gelegt, mit Gelatine beschichtet wurden und auf die einen Tag vor dem Experiment 1/4 inaktivierte Feederzellen aus einer konfluenten 25 cm² Zellkulturflasche (siehe Kapitel 2.2.4) ausgesät wurden.

2.2 Allgemeine Zellkultivierung

Falls nicht anders vermerkt, wurden die Zellen für die Routinekultivierung sowie während der Experimente unter Standard Zellkulturbedingungen (37 °C; 5 % CO₂ und saturierte Luftfeuchte) in einem Inkubator der Firma Binder (Tuttlingen) kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte, falls nicht anders vermerkt, durch Ablösen mit Trypsin/EDTA (1:4 in HBSS) für 3 min bei 37 °C. Zentrifugiert wurde stets bei 1000 rpm. Die verwendeten Medien und Zusätze können Tabelle 2 und 3 entnommen werden, die für die Zellexperimente verwendeten Aussaatdichten sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Zelllinien

BEZEICHNUNG	DETAILS	BEZOGEN VON
Maus embryonale Stammzellen mit Oct4-eGFP (mESZ Oct4-eGFP)	Embryonale murine Stammzellen, die ein Oct4-eGFP Reporterkonstrukt exprimieren (Kirchhof et al. 2000); kultiviert in mESZ-Medium + LIF	Doris Wedlich, KIT; Rolf Kemler, MPI Freiburg
Feederzellen	Embryonale murine Fibroblasten, kultiviert in mESZ-Medium ohne LIF	Doris Wedlich, KIT; Rolf Kemler, MPI Freiburg
LIF-Zellen	LIF-exprimierende HEK293 Zellen (humane Nierenepithelzellen), kultiviert in MEM α -Medium	Doris Wedlich, KIT; Erwin Wagner, Madrid

2.2.1 Beschichtung von Zellkulturflaschen mit Gelatine

Sowohl Feederzellen als auch mESZ wurden in Zellkulturflaschen oder Petrischalen kultiviert, die mit Gelatine beschichtet waren. Zur Beschichtung wurden die Flaschen und Schalen für 30 min mit einer Lösung von 0,1% Gelatine in PBS bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit PBS. Bis zur Verwendung wurden die beschichteten Flaschen mit PBS bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Produktion des *leukemia inhibitory factors* (LIF)

Das für die Kultivierung von mESZ benötigte Zytokin LIF wurde mit Hilfe von LIF-exprimierenden HEK293-Zellen (Tabelle 3) selbst hergestellt, welche in α MEM Medium kultiviert wurden. Zur LIF-Produktion wurden die Zellen zentrifugiert und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. 1×10^6 Zellen wurden in 5 ml α MEM Medium pro 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 48 h Kultivierung wurde der Überstand abgenommen und sterilfiltriert (0,2 μ m Porengröße). Es wurden 2 ml Aliquots hergestellt, die bei -20 °C gelagert wurden. Für mESZ auf Feederzellen wurde das Stammzellmedium 1:50 mit LIF versetzt, bei mESZ auf Gelatine wurde 1:40 des LIFs eingesetzt.

2.2.3 Herstellung von Feederzellen der Passage 3

Als Feederzellen wurden embryonale Maus-Fibroblasten (E15,5 – E16,5) der Passage 3 (P3) verwendet. Die Zellen wurden freundlicherweise von Doris Wedlich (KIT) zur Verfügung gestellt. Die P3-Feederzellen wurden aus Zellen der Passage 1 (P1) amplifiziert und in Aliquots eingefroren. Die P1-Feederzellen wurden dafür direkt beim Auftauen in mit 0,1% Gelatine beschichtete 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und in mESZ-Medium ohne LIF kultiviert. Dabei wurde ein Kryoröhrchen auf 2 Flaschen aufgeteilt. Bei 100% Konfluenz wurden die Zellen 1:10 gesplittet und bis zur Konfluenz in Gelatine-beschichteten Petrischalen (10 cm Durchmesser, Greiner Bio-One, Frickenhausen) kultiviert. Diese P3-Feederzellen wurden nun in mESZ-Medium mit 10% DMSO in Kryoröhrchen (VWR, Darmstadt) eingefroren, wobei Zellen aus einer konfluenten Petrischale in ein Kryoröhrchen überführt wurde. Die P3-Feederzellen wurden bis zur Verwendung für die Stammzellkultivierung bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Kultivierung und Inaktivierung von Feederzellen

Die Kultivierung der mESZ erfolgte auf Feederzellen der Passage 3. Um ein unkontrolliertes Wachstum der Feederzellen in der co-Kultur zu vermeiden, wurden diese zuvor mit dem Zytostatikum Mitomycin C mitotisch inaktiviert. Mitomycin C ist eine alkylierende Substanz, welche zur Quervernetzung von DNA-Strängen und dadurch zur Inhibierung der DNA-Replikation führt. Dadurch wird der Zellzyklus der Zellen gestoppt (Nieto et al. 2007). Die inaktivierten Feederzellen stellen eine optimale Wachstumsfläche für ESZ dar, indem sie zum einen Möglichkeiten zu Adhäsion bieten, zum anderen zusätzlich Faktoren wie z.B. LIF oder FGF sekretieren, die wichtig für das Wachstum von embryonalen Stammzellen sind (Desai et al. 2015, Llamas et al. 2015). Zur Vorbereitung für die mESZ-Kultivierung wurden die P3-Feederzellen aufgetaut und in mESZ-Medium in eine mit Gelatine beschichteten Zellkulturflasche (75 cm²) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mitotisch inaktiviert,

indem sie für 3 h in 0,01 mg/ml Mitomycin C in PBS bei 37 °C inkubiert wurden. Das Mitomycin C wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen wurden für 3 min mit Trypsin/EDTA (1:4) abgelöst und anschließend zentrifugiert. Danach wurden die Zellen auf 2 kleine Zellkulturflaschen (25cm²) mit mESZ-Medium ohne LIF verteilt und bis zur Aussaat der mESZ 1-3 Tage im Brutschrank inkubiert.

2.2.5 Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen (mESZ) auf Feederzellen

In dieser Arbeit wurde eine spezielle embryonale Stammzelllinie verwendet, die Oct4-eGFP als Reporter gen exprimiert. Die Zellen wurden freundlicherweise von Rolf Kemler (MPI Freiburg) und Doris Wedlich (KIT) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die mESZ-Oct4-eGFP stammen aus Embryonen (Blastozyste) einer Reportermaus, die das Oct4-eGFP Konstrukt trägt (Kirchhof et al. 2000). Das Konstrukt (GOF18-ΔPE-eGFP) wurde hergestellt, indem das Reporter gen „*enhanced Green Fluorescent Protein*“ (eGFP) zwischen ein modifiziertes Oct4-Promotorfragment und das strukturelle Oct4-Gen (bestehend aus 5 Exons) kloniert wurde. Der proximale *Enhancer* wurde vom genomischen Oct4-Fragment deletiert (ΔPE)(Kirchhof et al. 2000). Die Expression des genomischen Oct4-Fragments (GOF) entspricht der endogenen Oct4-Expression (Yeom et al. 1996). Durch das Oct4-Reporter gen kann also der Pluripotenzstatus anhand der Fluoreszenz an lebenden Zellen rasch beurteilt werden. Da für die ganze Arbeit ausschließlich diese transgene Stammzelllinie verwendet wurde, wird zur Vereinfachung lediglich von mESZ oder Stammzellen gesprochen.

Die Zellen wurden in mESZ-Medium und LIF (siehe Kapitel 2.2.2) auf einer Schicht von inaktivierten Feederzellen (in 25 cm² Zellkulturflaschen) kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Die Passagierung erfolgte, bevor die einzelnen Zellkolonien fusionierten. Dabei wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert. Das Gemisch aus mESZ und Feederzellen wurde anschließend in mESZ-Medium aufgenommen und 1/3 bis 1/5 der Zellsuspension in eine mit inaktivierten Feederzellen bedeckte Zellkulturflasche pipettiert. Das Medium wurde 1:50 mit LIF versetzt.

2.3 Zelleexperimente

2.3.1 Preplating

Um die mESZ für Zelleexperimente von den Feederzellen zu trennen, wurde ein sogenanntes *Preplating* durchgeführt. Dabei macht man sich zunutze, dass Feederzellen auf unbeschichteten Zellkulturflaschen adhären können, wohingegen mESZ nicht dazu in der Lage sind. Für das *Preplating* wurden die mESZ und Feederzellen aus der Routine-Zellkultur trypsinisiert und in eine unbeschichtete Flasche mit mESZ-Medium und LIF (1:40) überführt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde der Überstand, in dem sich nun lediglich die mESZ befanden, abgenommen, ausgezählt und auf die Substrate ausgesät (siehe Tabelle 4). Falls die mESZ aus dem *Preplating* nicht sofort für Experimente verwendet wurden, wurden sie in eine mit 0,1% Gelatine beschichtete Zellkulturflasche gesät und binnen 2 d verwendet.

2.3.2 Aussaat und Kultivierung von mESZ auf strukturierten Substraten

Für die Zelleexperimente wurden die sterilisierten und teilweise beschichteten (nicht für HEMA-EDMA-Oberflächen) Substrate in 6-well Platten oder Petrischalen (10 cm Durchmesser) gelegt und mit Medium und LIF (1:40) bedeckt. Um eine standardisierte experimentelle Durchführung gewährleisten zu können, wurden die mESZ aus dem *Preplating* mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und wie in Tabelle 4 angegeben als Einzelzellen auf die Substrate ausgesät. Die Aussaatdichte und Kultivierungsdauer variierte je nach Substrattyp und Fragestellung. Für die Kultivierung auf 2D-Mikroinseln sowie in 3D-Substraten wurde eine Kultivierungsdauer von 4 h (für die Analyse von Einzelzellen) bis hin zu 48 h verwendet. Nach dieser Zeit befanden sich die meisten Zellkolonien, die aus den ausgesäten Einzelzellen gewachsen waren, noch innerhalb des Bereichs einer Mikroinsel bzw. Mikrokommer. Längere Kultivierungsdauern führten zu einer Überwucherung der Strukturen aufgrund der Fusion einzelner Kolonien und wurden daher vermieden. Die Kultivierungsdauer auf HEMA-EDMA-Substraten lag für gewöhnlich zwischen 4 h und 5 d, außer bei der Langzeitkultivierung (siehe Kapitel 2.3.3). In allen Fällen wurde alle 2-3 Tage ein Medienwechsel durchgeführt.

Tabelle 4: Übersicht über verwendete mESZ Aussaatdichten und Kultivierungsdauern – wird fortgesetzt

EXPERIMENT	KULTIVIERUNGSDAUER	ZELLEN/cm ²
EdU-Markierung (Kapitel 2.4.2)	4 h	15 000 – 20 000
Proliferationsbestimmung (Kapitel 2.6.1)	24 h	5 000
Messung Oct4-eGFP-Level (Kapitel 2.6.3)	48 h	8 000 – 10 000

YAP-Lokalisation (Kapitel 2.6.4)	4 h	30 000
Elektronenmikroskopie (Kapitel 2.5.2)	4 h	30 000
Bestimmung der Verteilung Oct4-positiver, gemischter und Oct4-negativer Kolonien (Kapitel 2.6.5)	3 Tage	5 000 – 8 000
Zeitrafferaufnahmen (Kapitel 2.5.1)	4 h bis zum Start der Aufnahmen	40 000
Langzeitkultivierung auf MN-Substrat (Kap 2.3.3)	20 bis 25 Tage	20 000 – 22 000

2.3.3 Langzeitkultivierung von mESZ auf MN-Substraten

Für die Langzeitkultivierung der mESZ auf MN-Substraten wurden die Zellen über mehrere Wochen hinweg (maximal 25 Tage) kultiviert und regelmäßig passagiert. Hierfür wurde ein abgewandeltes Protokoll verwendet, da die Adhäsion der mESZ an MN-Substrate sehr stark war. Die Zellen wurden alle 4-6 Tage zuerst 3 Mal mit PBS gewaschen und dann mit unverdünntem Trypsin/EDTA bedeckt und bei 37 °C für 3-5 min kultiviert. Danach wurden die Zellen durch starkes Klopfen und Schütteln vom MN-Substrat gelöst und in mESZ-Medium aufgenommen und zentrifugiert. Die Zellen wurden auf frische, sterilisierte MN-Substrate in einer Zelldichte von 2000 Zellen/cm² ausgesät.

2.3.4 Differenzierung der mESZ zu *Embryoid Bodies* durch die *Hanging-Drop Methode*

Um zu überprüfen, ob die mESZ, welche für längere Zeit auf den MN-Substraten kultiviert wurden, noch pluripotent sind, wurden sie zu *Embryoid Bodies* (EBs) differenziert. EBs sind Aggregate aus pluripotenten Zellen, in denen in Abwesenheit von LIF die Entwicklung zu den drei Keimblättern Ektoderm, Mesoderm und Endoderm unkontrolliert und ungeordnet stattfindet (Ader and Tanaka 2014). Die EBs wurden mit Hilfe der *Hanging-Drop Methode* hergestellt, bei der die Zellen in hängenden Tropfen kultiviert werden, wodurch sie sich durch die Schwerkraft unten im Tropfen zusammenlagern (Keller 1995). Dazu wurden die auf MN-Substraten kultivierten Zellen wie unter Kapitel 2.2 beschrieben abgelöst, trypsiniert und ausgezählt. Es wurden Tropfen bestehend aus 25 µl mESZ-Medium ohne LIF mit 5000 Zellen an die Decke einer Petrischale appliziert und kopfüber inkubiert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Tropfen über einer Schicht von PBS in einer Petrischale kultiviert. Nach 2 d wurden die EBs von der Decke der Petrischale abgenommen, auf Deckgläser ausgesät, welche mit 10 µg/µl FN (1 h, RT) beschichtet waren, und in mESZ-Medium kultiviert. Nach weiteren 12 d Kultivierung mit regelmäßigem Medienwechsel wurden die EBs fixiert und mittels Immunzytochemie auf Marker für die drei Keimblätter untersucht. Als Marker für Endoderm,

Mesoderm und Ektoderm wurden die Proteine FOXA2 (alias HNF3 β), Brachyury bzw. Tuj1 (alias β 3-Tubulin) verwendet (Tabelle 5).

2.4 Färbemethoden

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper

ANTIGEN/NAME	TYP	STAMMLÖSUNG	VERDÜNNUNG	HERSTELLER
Brachyury	Ziege, pkl, IgG	0,2 mg/ml	1:500	R&D Systems/Fisher Scientific (Waltham, USA)
FN	Kaninchen, pkl, IgG	0,5-0,7 mg/ml	1:500	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FN	Maus, mkl, IgG	0,25 mg/ml	1:500	BD Biosciences (San Jose, USA)
FoxA2 (HNF3 β)	Ziege, pkl, IgG	0,2 mg/ml	1:500	R&D Systems/Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ki67	Kaninchen, pkl, IgG	1 mg/ml	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)
Paxillin	Maus, mkl, IgG	0,25 mg/ ml	1:500	BD Biosciences (San Jose, USA)
phospho-FAK (pTyr397)	Kaninchen, mkl, IgG	0,1 mg/ml	1:300	Life Technologies (Carlsbad, USA)
phospho-Paxillin (pTyr31)	Kaninchen, pkl, IgG	Keine Angabe	1:500	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Tuj1 (β III-Tubulin)	Kaninchen, pkl, IgG	0,3 mg/ml	1:500	Abcam (Cambridge, UK)
Vinculin	Maus, mkl, IgG	1 mg/ml	1:100	Abcam (Cambridge, UK)
YAP	Maus, mkl, IgG	0,1 mg/ml	1:300	Santa Cruz (Texas, USA)

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper und Affinitätssonden – wird fortgesetzt

ANTIGEN/NAME	KONJUGAT	STAMMLÖSUNG	VERDÜNNUNG	HERSTELLER
DAPI		1mg/ml	1:500–1:1000	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 568	2 mg/ml	1:200	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 647	1,5 mg/ml	1:200	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)

Maus IgG	Alexa Fluor® 568	2 mg/ml	1:200	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Maus IgG	Alexa Fluor® 647	2 mg/ml	1:200	Dianova (Hamburg)
Phalloidin	Alexa Fluor® 568	200 U/ml	1:200	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Phalloidin	Alexa Fluor® 647	200 U/ml	1:100 – 1:200	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Ziege IgG	Cy3	1,5 mg/ml	1:200	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)

Tabelle 7: Verwendete Kits zur fluoreszenten Markierung von Zellen bzw. Proteinen

BEZEICHNUNG	DETAILS	HERSTELLER
Alexa Fluor® 647 Protein Labeling Kit	keine Angaben	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Click-iT® EdU Imaging Kit	mit Alexa Fluor® 594	Life Technologies (Carlsbad, USA)

2.4.1 Immunzytochemie

Die Markierung von Proteinen innerhalb der Zellen erfolgte mit Hilfe der Immunzytochemie. Die Zellen wurden hierfür zuerst mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert. Es folgte die Permeabilisierung der Zellen durch 3-malige Inkubation mit PBS + 0,1% Triton für jeweils 5 min. Im Anschluss wurden die Zellen bei RT für 1 h mit dem Primärantikörpermisch (angesetzt in 1% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS) inkubiert (siehe Tabelle 5). Im Fall des YAP-Antikörpers wurde dieser Schritt über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die Proben wurden anschließend 3 mal 5 min mit PBS gewaschen und dann bei RT für 1 h mit den fluoreszent markierten Sekundärantikörpern (in 1% BSA in PBS) inkubiert (siehe Tabelle 6). Falls Affinitätssonden wie z.B. DAPI verwendet wurden, waren sie dem Sekundärantikörpermisch beigefügt. Anschließend wurden die Proben dreimal 5 min mit PBS gewaschen und in Mowiol+ 1% n-Propylgallat eingebettet.

2.4.2 Markierung der S-Phase des Zellzyklus durch 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine

Zur Bestimmung der Proliferationsrate der mESZ auf den Substraten wurde das Click-iT® EdU Imaging Kit von Invitrogen/Life Technologies verwendet. Diese Methode basiert auf der Markierung aller Zellen, die sich in der DNA-Synthese des Zellzyklus befinden, der sogenannten

S-Phase. 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine (EdU) ist ein Nukleosid-Analog von Thymidin und wird während der DNA-Synthese in diese eingebaut. Damit das EdU in der DNA detektiert werden kann, wird es an ein Alkin gekoppelt, das in einem nachfolgenden Schritt durch ein fluoreszent markiertes Azid kovalent gebunden wird, sofern Kupfer als Katalysator vorhanden ist. Die EdU-Markierung erfolgte an mESZ, welche 4 h auf den Substraten kultiviert worden waren. Danach wurde das EdU-Alkin in einer Endkonzentration von 10 μM direkt ins Stammzellmedium pipettiert. Die Proben wurden dann für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert. Sie wurden nun entweder direkt gefärbt, oder bei 4 °C in PBS bis zur späteren Markierung gelagert. Zur EdU-Detektion wurden die Zellen zuerst durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit PBS + 0,1% Triton permeabilisiert. Anschließend wurde für 30 min bei RT mit 1% BSA blockiert. Danach wurde das Detektionsgemisch (siehe Angaben Kit-Hersteller, Tabelle 7) auf die Proben gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal 5 min mit PBS gewaschen und in Mowiol+ 1% n-Propylgallat eingebettet. Falls weitere Strukturen in der Zelle markiert werden sollten, wurde alternativ eine Immunfärbung (siehe Kap 2.4.1) direkt im Anschluss durchgeführt.

2.5 Mikroskopie

Tabelle 8: Verwendete Mikroskope

BEZEICHNUNG	OBJEKTIVE/BELEUCHTUNG/DETAILS	HERKUNFT
Axio Imager.Z1 mit Einschubmodul ApoTome	Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil EC-Plan-Neofluar 10x/0,25 Ph1 EC-Plan-Neofluar 20x/0,5 Ph2 HXP 120 (Halogen)	Carl Zeiss (Oberkochen)
Axiovert 200M	EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Ph 1 Plan-Neofluar 20x/0.50 Ph 2 X-Cite (Halogen)	Carl Zeiss (Oberkochen)
LEO 1530 Field Emission Scanning Electron Microscope	Elektronenmikroskop mit Feldemission	Carl Zeiss (Oberkochen)
LSM 510 Meta	LCI Plan-Neofluar 63x/1.3 DIC ImKorr Argon/2 DPSS 561-10 HeNe 633 Diode 405-30	Carl Zeiss (Oberkochen)

2.5.1 Zeitrafferaufnahmen

Zur Visualisierung des Zellverhaltens auf 2D-Substraten wurden Zeitrafferaufnahmen an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M) durchgeführt. Um das FN-Muster sichtbar zu machen, wurde bei der Substratbeschichtung der FN-Lösung fluoreszent markiertes FN zugegeben (siehe Kapitel 2.1.1.5). Die Zellen wurden 4 h vor Start der Aufnahmen auf das 2D-Substrat in einer kleinen Petrischale (35 mm Durchmesser) ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Zellverhalten am Mikroskop unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂, Stammzellmedium + LIF) über eine Dauer von einem Tag festgehalten, indem alle 10 Minuten eine Aufnahme gemacht wurde (20x-Objektiv, Phasenkontrast). Zu Beginn und nach Ende des Films wurde zusätzlich eine Aufnahme des Oct4-eGFP-Signals sowie vom FN-Muster gemacht.

2.5.2 Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie

Die Morphologie der mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten wurde am Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Um die Morphologie der Zellen und feinsten Zellstrukturen aufrecht zu erhalten, wurden die Proben speziell fixiert und getrocknet. Dafür wurden die Zellen nach 4 h Kultivierungsdauer in 2% PFA mit 2% Glutaraldehyd in PBS für 1 h bei RT fixiert. Es folgte eine sukzessive Dehydrierung durch die Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Aceton. Dafür wurden die Proben jeweils für 10 min in 10, 30, 50, 70 und 90% Aceton inkubiert und danach 3-mal in 100% Aceton gewaschen. Die Proben wurden bis zur Kritisch-Punkt-Trocknung in 100% Aceton gelagert. Diese erfolgte an einem EM CPD030 Kritisch-Punkt Trockner (Leica) mit Aceton als Substitutionsflüssigkeit. Dabei wurden die Zellen mindestens 6-mal mit flüssigem Kohlenstoffdioxid gespült und bei 40 °C und 75 bar getrocknet. Die getrockneten Proben wurden dann auf eine Halterung geklebt und mit einer dünnen Schicht aus Gold (3-5 nm) beschichtet. Anschließend wurden die Aufnahmen an einem LEO 1530 Rasterelektronenmikroskop mit Feldemission gemacht.

2.6 Auswertung und Statistik

2.6.1 Bestimmung der Proliferationsfähigkeit durch Zellzählung

Die Proliferationsfähigkeit wurde definiert als der prozentuale Anteil proliferierter Zellen nach einer Kultivierungsdauer von 24 h. Um die Proliferationsfähigkeit der mESZ auf 2D-Mikroinseln bzw. in 3D-Mikrokammern zu bestimmen, wurde 4 h nach Zellaussaat eine Aufnahme von bestimmten Bereichen auf dem Substrat erstellt. Diese Aufnahmen wurden benutzt, um Einzelzellen auszumachen, welche zu diesem Zeitpunkt noch Oct4-positiv waren. Nach weiteren

20 h wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch gefärbt, um die bereits aufgenommenen Bereiche erneut auszuwerten. Mit Hilfe der DAPI-Färbung wurde analysiert, ob die Zellen den Zellzyklus durchlaufen hatten (Proliferation, >2 Zellkerne/Struktur) oder ob sie immer noch einzeln vorlagen (keine Proliferation, 1 Zellkern/Struktur).

2.6.2 Auswertung der EdU-Markierung

Die Auswertung der EdU-Markierung einzelner mESZ (nach 4 h Kultivierung auf den verschiedenen Substraten) wurde an fixierten Proben durchgeführt. Für die Bestimmung der Zellteilungsrate auf HEMA-EDMA-Substraten wurden zufällige Bereiche mit identischen Einstellungen durch ein 20x-Objektiv aufgenommen und unbearbeitet ausgewertet. Es wurden 10 Aufnahmen pro Kondition ausgewertet, wobei nur einzeln vorliegende Oct4-positive Zellen in EdU-positiv und EdU-negativ eingeteilt wurden. Für mESZ auf Mikroinseln oder in Mikrokammern wurde das Fluoreszenzsignal direkt am Mikroskop bestimmt, da die 3D-Substrate durch ihre Autofluoreszenz das EdU-Signal sowie das Oct4-Signal oft überlagerten, sodass die Aufnahmen schwer auswertbar waren. Auch hier wurden einzeln vorliegenden Oct4-positiven mESZ in EdU-positive und EdU-negative Zellen eingeteilt.

2.6.3 Quantifizierung des Oct4-eGFP Signals von mESZ Kolonien

Um das Oct4-level der mESZ auf 2D-Mikroinseln bzw. in 3D-Mikrokammern zu bestimmen, wurde 4 h nach Zellaussaat eine Aufnahme von bestimmten Bereichen auf dem Substrat erstellt. Diese Aufnahmen wurden dazu genutzt, um Einzelzellen zu bestimmen, welche noch Oct4-positiv waren. Die Zellen wurden anschließend für weitere 44 h inkubiert und nach insgesamt 48 h fixiert und gefärbt. Die Zellen waren in dieser Zeit auf den Mikroinseln oder in den Mikrokammern zu mehrzelligen Kolonien herangewachsen. Die zuvor aufgenommenen Bereiche wurden erneut am konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (LSM; 510 Meta) aufgenommen, um nun das Oct4-eGFP Signal in den Kolonien auf den entsprechenden Inseln bzw. in den Kammern zu messen. Hierfür wurden z-Stapel mit einem z-Intervall von 0,5 μm durch die Kolonien erstellt (63x Ölobjektiv, NA 1,4). Die Messung erfolgte an nicht bearbeiteten z-Schnitten des Oct4-eGFP Kanals mit Hilfe des „*Measure*“ Werkzeugs der Software ImageJ. Diese Funktion liefert einen Mittelwert der Pixelintensitäten über die gemessene Fläche. Da die Kolonien durch ihre Größe oft über den Rand der 2D-Mikroinseln hinausgewachsen waren, und somit nicht alle Zellen mit dem Muster in Kontakt geblieben waren, wurde für 2D-Substrate lediglich in einer definierten Region oberhalb des Zentrums der 2D-Inseln gemessen. Desweiteren wurden hier nur die niedrigsten drei Schnitte eines Stapels für die Messung verwendet, da nur diese Zellen definitiv noch Kontakt zur FN-Fläche hatten. Innerhalb der 3D-Substrate hatten die Zellkolonien die

Mikrokammern nach 48 h jedoch noch nicht überwachsen, sodass hier alle Zellen einer Kolonie Kontakt zum Kammerboden oder zu den Wänden hatten. Deshalb wurde hier das Oct4-eGFP Signal des gesamten z-Stapels nacheinander gemessen, wobei die gesamte Fläche der Kolonie mit einbezogen wurde.

2.6.4 Bestimmung der relativen YAP-Lokalisation

Das YAP Protein ist an der Mechanotransduktion von Zellen beteiligt und ist im aktiven Zustand vermehrt im Zellkern lokalisiert (Halder et al. 2012). Um die Verteilung des YAP-Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma vergleichen zu können, wurden die Zellen auf den unterschiedlichen Substraten 4 h nach Aussaat fixiert und immunologisch gefärbt. YAP wurde mit einem monoklonalen Antikörper (Tabelle 5) markiert. Um die Zellgrenze bzw. die Ausmaße des Zellkerns bestimmen zu können, wurde zusätzlich das Aktin Zytoskelett bzw. der Zellkern mit Phalloidin bzw. DAPI gefärbt. Einzelne Zellen wurden nun am konfokalen LSM (LSM 510 Meta) aufgenommen, um die Verteilung des YAP-Signals bestimmen zu können. Hierfür wurden z-Stapel mit einem z-Intervall von 0,45 μm durch die Zellen erstellt (63x Ölobjektiv, NA 1,4). Die Messung der YAP-Intensität erfolgte an nicht bearbeiteten Aufnahmen im YAP-Kanal mit Hilfe des „Measure“ Werkzeugs der Software ImageJ. Für die Berechnung der relativen YAP Intensität wurde die mittlere YAP-Intensität im Zellkern (I_{ZK}) und die mittlere Intensität im Zytoplasma (I_{Z}) benötigt.

Zur Bestimmung von I_{ZK} wurde mit dem Freihand-Werkzeug von Image J der Zellkern umrundet und dies als Maske benutzt, um die absolute Intensität (*Integrated Density*) in diesem Bereich zu messen. Da die Zellen oft große Nukleoli (Nuk) innerhalb des Zellkerns aufwiesen, in denen weder ein YAP noch ein DAPI-Signal vorhanden war, wurden diese Bereiche ebenfalls markiert und gemessen. Anschließend wurde diese absolute Intensität von der absoluten Intensität im Zellkern subtrahiert. Um nun die mittlere Intensität zu erhalten, wurden die Werte auf die gemessene Fläche normalisiert:

$$I_{\text{ZK}} = (\textit{Integrated density}_{\text{ZK}} - \textit{Integrated density}_{\text{Nuk}}) / (\textit{Fläche}_{\text{ZK}} - \textit{Fläche}_{\text{Nuk}})$$

Ähnlich wurde verfahren, um I_{Z} zu bestimmen. Es wurde im Aktin-Kanal die komplette Zelle umrundet und eine Maske erstellt, in deren Bereich die *Integrated Density* von YAP ermittelt wurde. Davon wurden die Werte aus dem Bereich des Zellkerns abgezogen und alles auf die gemessene Fläche normalisiert, um die mittlere Intensität zu erhalten:

$$I_{\text{Z}} = (\textit{Integrated density}_{\text{Z}} - \textit{Integrated density}_{\text{ZK}}) / (\textit{Fläche}_{\text{Z}} - \textit{Fläche}_{\text{ZK}})$$

Die relative YAP-Lokalisation wurde definiert als das Verhältnis zwischen der mittleren YAP-Intensität im Zellkern (I_{ZK}) und der mittleren zytoplasmatischen YAP-Intensität (I_{Z}):

$$YAP \text{ Lokalisation} = I_{ZK}/I_Z$$

Pro Zelle wurden 3 zentrale Schnitte aus dem z-Stapel wie oben beschrieben ausgewertet und gemittelt. Insgesamt wurden pro Kondition und Experiment 10 Zellen ausgewertet.

2.6.5 Bestimmung der Verteilung Oct4-positiver, gemischter und Oct4-negativer Kolonien

Die Verteilung Oct4-positiver, gemischter und Oct4-negativer Kolonien auf HEMA-EDMA-Substraten wurde nach 3 d Kultivierung an fixierten und fluoreszent markierten (Aktin, DAPI) Zellkolonien bestimmt. Dafür wurden pro Kondition an zufälligen Stellen 15 Aufnahmen am Axio Imager.Z1 mit dem 10x Objektiv gemacht. Es wurden für alle Aufnahmen identische Einstellungen und Belichtungszeiten gewählt. In allen 15 Bildern wurden die Kolonien (definiert als >10 miteinander verbundene Zellen) nach ihrem Oct4-Signal kategorisiert. Oct4-eGFP-positiv waren alle Kolonien, bei denen jede Zelle noch ein Oct4-eGFP-Signal aufwies, unabhängig von der Intensität. Bei Oct4-negativen Kolonien besaß keine Zelle innerhalb der Kolonie mehr ein detektierbares Signal, wohingegen gemischte Kolonien sowohl Oct4-positive als auch Oct4-negative Zellen beinhalteten.

2.6.6 Bestimmung der Zirkularität von Stammzellkolonien über ImageJ

Die Zirkularität von Stammzellkolonien kann als Maß für deren Stammzellcharakter genutzt werden, da differenzierte Kolonien oft unregelmäßige Ränder aufweisen, aufgrund vermehrter Zellmigration aus der Kolonie heraus (Rosowski et al. 2015). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Zirkularität von mESZ Kolonien auf MN-Substraten im Vergleich zu Kolonien auf Feederzellen bestimmt. Die Zirkularität beschreibt die Kreisähnlichkeit, d.h. das Verhältnis zwischen Umfang und Fläche. Eine Zirkularität von 1 beschreibt einen gleichmäßigen Kreis und ein Wert gegen 0 beschreibt eine Zellkolonie mit vielen Invaginationen und unregelmäßigem Rand. Die Bestimmung der Zirkularität der Stammzellkolonien erfolgte an nicht bearbeiteten Aufnahmen im Oct4-eGFP Kanal mit Hilfe des „Measure“ Werkzeugs der Software ImageJ. Die zugrunde liegende Formel lautet:

$$\text{Zirkularität} = 4\pi (\text{Fläche} / \text{Umfang}^2)$$

2.6.7 Statistische Tests

Für den Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den Ergebnissen wurde ein zweiseitiger t-Test bzw. bei der Analyse von kategorialen Ausprägungen der Chi²-Test (unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade) durchgeführt. Jedes Experimente wurde mindestens dreimal wiederholt (Details im Ergebnisteil). Ein p-Wert kleiner gleich 0,05 wurde dabei als

signifikant (*) bezeichnet. Ein p-Wert kleiner gleich 0,01 wurde mit ** und ein p-Wert kleiner gleich 0,001 wurde mit *** gekennzeichnet. Bestand kein signifikanter Unterschied, wurde dies als nicht signifikant (n.s.) vermerkt.

3 Ergebnisse

Die zwei wesentlichen Eigenschaften aller Stammzellen sind ihre Selbsterneuerung und die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen (Sun et al. 2012a). Eine gezielte Kontrolle dieser beiden Prozesse ist sowohl für die Routine-Kultivierung als auch für medizinische Zwecke wünschenswert. Faktoren, die das allgemeine Zellverhalten steuern, können biochemischer als auch biophysikalischer Natur sein. Während heute weitestgehend aufgeklärt ist, wie Stammzellen chemisch modifiziert werden können, ist bezüglich der Kontrolle auf physikalischer Basis weniger bekannt – vor allem im Fall pluripotenter Stammzellen. In dieser Arbeit sollte deshalb der Einfluss von physikalischen Faktoren auf die Selbsterneuerung von mESZ auf Einzelzellebene untersucht werden. In allen Experimenten wurde dabei eine spezielle Stammzelllinie verwendet, die ein Oct4-eGFP Reporterkonstrukt trägt (Kirchhof et al. 2000). Über das Fluoreszenzsignal lässt sich dadurch bereits für lebende Zellen ermitteln, ob sie differenziert sind oder nicht. Desweiteren kann damit die Unterscheidung zwischen Stammzellen und Kontaminationen durch Feederzellen aus der Routine-Kultivierung rasch erfolgen. Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile, wobei sich der erste Teil mit der Geometrie der Zellumgebung auf 2D- und 3D-Ebene befasst (Kapitel 3.1). Im zweiten Teil wurde untersucht, welchen Einfluss die Topografie eines Substrats auf das Verhalten von mESZ hat (Kapitel 3.2).

3.1 Einfluss der 2D- und 3D-Geometrie auf die Selbsterneuerung von mESZ

Die innere Zellmasse der Blastozyste – der Ursprungsort von ESZ – ist sehr dicht gepackt und die Zellen finden sich hier in einer dreidimensionalen Umgebung wieder, mit Zell-Zell beziehungsweise Zell-Matrix-Kontaktstellen zu allen Seiten. Ob solche geometrischen Begebenheiten neben den chemischen Einflüssen die Selbsterneuerung oder Differenzierung von pluripotenten Zellen beeinflussen, ist noch weitestgehend ungeklärt. Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich deshalb mit der Fragestellung, inwiefern die Geometrie der zellulären Umgebung einen Einfluss auf die Selbsterneuerung von mESZ hat. Eine Einzelzellstudie aus dem Jahr 2004 mit adulten mesenchymalen Stammzellen zeigte, dass die Größe der 2D-Adhäsionsfläche und die daraus resultierende Ausbreitung der Zellen das Zellschicksal beeinflussen (McBeath et al. 2004). Inwieweit die angebotene Adhäsionsfläche einen Einfluss auf pluripotente Zellen hat, wurde bislang noch nicht untersucht. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein zu McBeath *et al.*, ähnlicher Ansatz mit FN-Mikroinseln unterschiedlicher Größe verwendet.

Dabei wurde das Oct4-Level, die Proliferation, die Zellmorphologie und Adhäsion sowie die relative YAP-Lokalisation in murinen Stammzellen in Abhängigkeit von der Mikroinsel-Größe untersucht. Da eine 2D-Umgebung für Zellen generell nicht physiologisch und sehr artifizial ist, wurde in zusätzlichen Experimenten ein 3D-Aufbau verwendet. Hier kamen geometrisch definierte, FN-beschichtete 3D-Mikrokammern unterschiedlicher Größe zum Einsatz.

3.1.1 mESZ adhären auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikrokammern

Um den Einfluss der Geometrie auf das Verhalten von mESZ zu untersuchen, wurden geometrisch definierte, quadratische 2D-Mikroinseln und 3D-Mikrokammern als Zellsubstrate verwendet. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf einer Variation der Mikrostruktur-Größe, wobei in der Regel fünf verschiedene Größen verwendet wurden. Die Maße der Grundfläche einer einzelnen Struktur betragen (15x15), (20x20), (25x25), (30x30) oder (35x35) μm^2 . Bei den 2D-Mikroinseln variierte die FN-Bedeckung also zwischen 225 μm^2 und 1225 μm^2 . Die kleinste Mikroinsel-Größe entsprach dabei ungefähr den Ausmaßen einer embryonalen Stammzelle, die einen Durchmesser von 10-18 μm hat (eigene Erfahrungswerte sowie (Wakayama et al. 1999)). Abb. 3.1 A zeigt exemplarische Fluoreszenzaufnahmen aus der Routine-Kultivierung der hier verwendeten transgenen Stammzellen (mESZ-Oct4-eGFP, kurz: mESZ). Die mESZ wuchsen in kuppelartigen Kolonien auf der Schicht aus mitotisch inaktivierten Feederzellen (Abb. 3.1 A). Die mESZ-Kolonien waren Oct4-eGFP positiv. Für die Experimente wurden die Stammzellen von den Feederzellen getrennt und als Einzelzellen auf die Substrate ausgesät. 2D-Mikroinseln aller Größen wurden mittels μCP auf ein Golddeckglas gestempelt und mit Fibronectin beschichtet. Daraus resultierten FN-Mikroinseln, die durch passivierte Bereiche, bestehend aus dem Thiol EG-6-OH, voneinander getrennt wurden (Abb. 3.1 B). Die 3D-Mikrokammern wurden in Kooperation mit Michael Thiel (Nanoscribe GmbH), Andrea Scheiwe und Benjamin Richter (angewandte Physik, KIT) mit Hilfe des DLS hergestellt. Genauer wurde ein 3D-Master per DLS produziert und davon ein negativer PDMS-Stempel abgegossen. Von diesem Stempel wurden in großer Anzahl die positiven 3D-Strukturen abgeformt und anschließend mit FN beschichtet. Auch hier waren Felder mit Mikrokammern aller Größen auf einem Deckglas vertreten. Die 3D-Mikrokammern hatten eine quadratische Grundfläche und waren innerhalb eines Feldes direkt aneinandergereiht (Abb. 3.1 B'). Da alle Mikrokammern stets eine Höhe von 20 μm besaßen, werden im Folgenden zur Vereinfachung für die Benennung der 3D-Mikrokammern lediglich die Maße der Grundfläche angegeben ((15x15) bis (35x35) μm^2). Die entsprechenden Volumina betragen 4500 μm^3 für die kleinsten Mikrokammern und ungefähr das Fünffache für die größten Kammern (24500 μm^3).

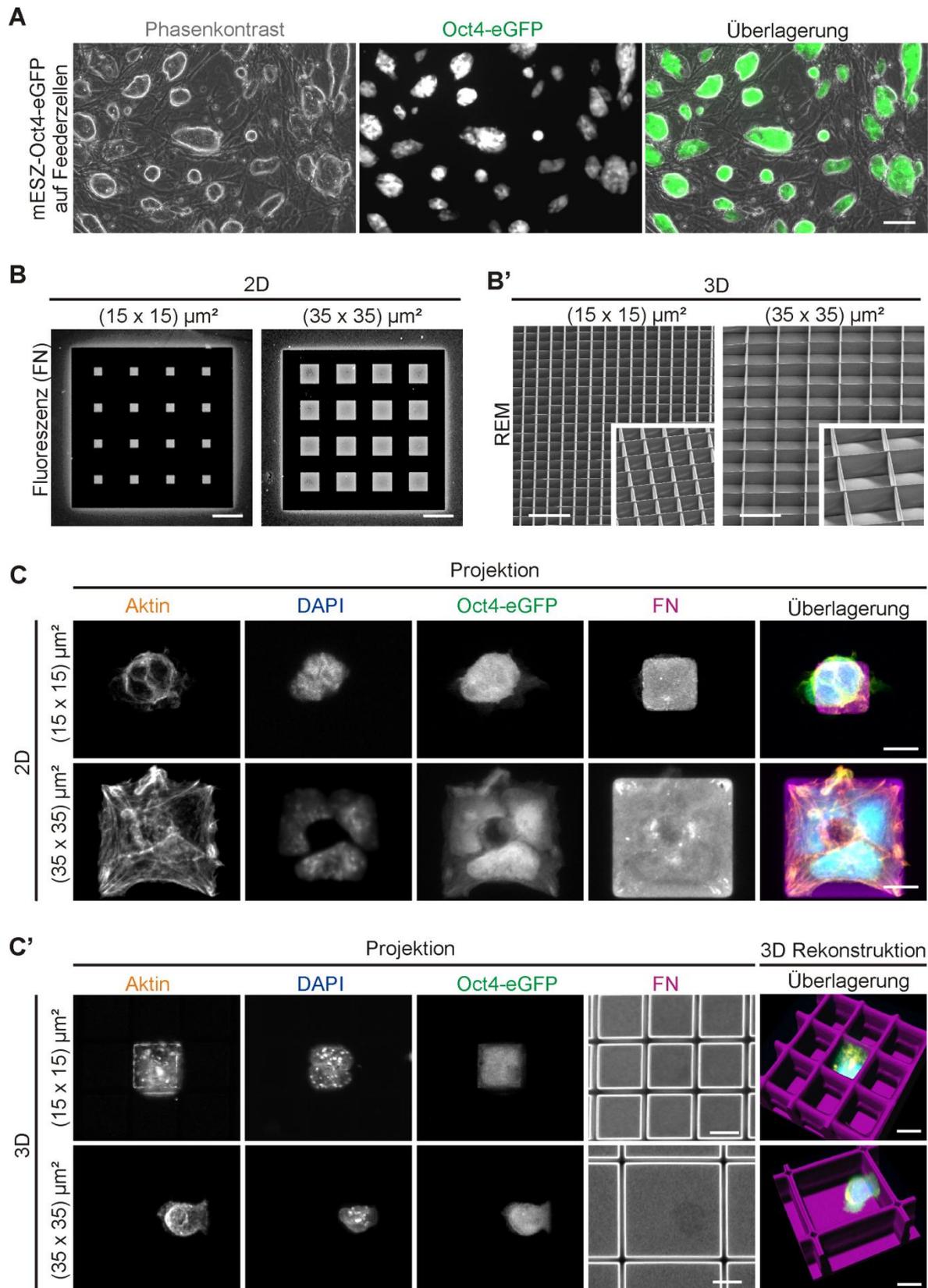


Abb. 3.1: Adhäsion der mESZ auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikroammern. **A** Beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen aus der mESZ Routine-Kultur. Die mESZ-Oct4-eGFP wuchsen in runden bis ovalen Kolonien auf der Feederzellschicht und hoben sich von diesen ab. Oct4-eGFP (grün) wurde spezifisch in den Stammzellkolonien exprimiert. Maßstab: 100 μm . **B** Fluoreszenzaufnahmen von 2D-Mikroinseln. Die 2D-Substrate wurden durch *Microcontact printing* (μCP) hergestellt. Die adhäsiven quadratischen Mikroinseln wurden mit Fibronektin (FN, grau) beschichtet, um die Zelladhäsion zu ermöglichen.

Dargestellt sind die kleinsten ((15x15) μm^2) und größten ((35x35) μm^2) Mikroinseln. Zusätzlich wurden Inseln der Maße (20x20) μm^2 , (25x25) μm^2 und (30x30) μm^2 verwendet, wobei alle Größen auf einem Deckglas vertreten waren. Das FN-Muster wurde immunfluoreszent gefärbt. Maßstab: 50 μm . **B'** Mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) erstellte Aufnahmen der 3D-Mikrokammern, welche mit Hilfe des direkten Laserschreibens (DLS) hergestellt wurden. Die Grundflächen der quadratischen Mikrokammern entsprechen in ihren Ausmaßen den 2D-Mikroinseln (siehe **B**). Alle Kammern hatten eine Höhe von 20 μm . Alle Größen waren auf einem Deckglas vertreten. Für Zellexperimente wurden die Substrate mit FN beschichtet. Die kleinen Bilder zeigen die Schrägansicht. Maßstab: 50 μm . **C** Repräsentative Aufnahmen von mESZ bzw. mESZ-Kolonien nach 24 h Kultivierung auf den kleinsten und größten FN-Mikroinseln bzw. in FN-funktionalisierten Mikrokammern (**C'**). Dargestellt ist das endogene Oct4-eGFP (grün), das Aktin-Zytoskelett (gelb), FN (magenta) sowie der Zellkern (blau). Die Zellen adhärten auf allen Oberflächen, passten sich in ihrer Form den Inseln und Kammern an und ignorierten die passivierten 2D-Bereiche (schwarz). Teilweise hatten sich die Zellen nach 24 h bereits geteilt. Maßstab: 10 μm .

Zuerst wurde getestet, ob die mESZ auf den 2D-Mikroinseln und in den 3D-Mikrokammern adhärten. Hierfür wurden die Zellen auf die Substrate ausgesät und nach 24 Stunden Kultivierung fixiert und gefärbt. Generell adhärten die Zellen an Strukturen aller Größen in 2D- als auch auf 3D-Substraten (Abb. 3.1 C und C'). Aufgrund des kurzen mESZ Zellzyklus von 8-10 Stunden (Lawson, Meneses and Pedersen 1991, Stead et al. 2002) hatten sich die Zellen in den verschiedenen Substraten nach 24 Stunden Kultivierung häufig bereits geteilt. Die Morphologie der daraus resultierenden Kolonien variierte je nach Substratgröße und -typus. Auf 2D-Mikroinseln der kleinsten Größe nahmen die Kolonien meist eine runde, kugelförmige Form an (Abb. 3.1 C, oben). Größere Mikroinseln hingegen förderten das *Spreading* (Ausbreitung) der Kolonien (Abb. 3.1 C, unten). Innerhalb kleiner 3D-Mikrokammern hatten die mESZ-Kolonien wenig Platz und passten ihre Form der engen Kammer an (Abb. 3.1 C', oben). In größeren Mikrokammern waren häufig nach 24 Stunden noch Einzelzellen vorhanden. Diese zeigten eine eher kugelförmige Morphologie und hatten meist Kontakt zu einer oder zwei Wänden der Mikrokammer (Abb. 3.1 C', unten).

3.1.2 In mESZ auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikrokammern unterschiedlicher Größe sind keine Unterschiede im Oct4-eGFP-Level detektierbar

Kapitel 3.1.1 zeigt morphologische Unterschiede der mESZ nach eintägiger Kultivierung auf verschieden großen Mikroinseln beziehungsweise in verschieden großen Mikrokammern auf. Bei mesenchymalen Stammzellen führen solche morphologische Unterschiede zu Unterschieden im Zellschicksal (McBeath et al. 2004, Gao, McBeath and Chen 2010). Deshalb sollte in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob eine Kultivierung der mESZ auf den verschiedenen 2D- und 3D-Substraten Unterschiede im Differenzierungsverhalten hervorruft. Aus diesem Grund wurde das relative Oct4-Level mit Hilfe des Oct4-eGFP Reportergens quantifiziert. Oct4 ist neben Nanog und Sox2 einer der drei Transkriptionsfaktoren, die das zentrale Pluripotenznetzwerk (engl.: *core pluripotency network*) darstellen. Die Wirkung dieser drei Faktoren ist unabdingbar für den Pluripotenzerhalt der Zellen, weshalb sie als Marker für

50

pluripotente Zellen verwendet werden (De Los Angeles et al. 2015). Die Messung der relativen Oct4-eGFP Fluoreszenzintensität der mESZ in den verschiedenen 2D- und 3D-Strukturen wurde anhand konfokaler mikroskopischer Aufnahmen mit der Software *ImageJ* durchgeführt. Die Messung erfolgte an fixierten Kolonien, die nach einer Kultivierungsdauer von zwei Tagen aus Oct4-eGFP-positiven Einzelzellen hervorgegangen waren. Eine Messung zu späteren Zeitpunkten war aufgrund der Überwucherung der 2D- und 3D-Strukturen durch die herangewachsenen Kolonien nicht möglich. Nach zwei Tagen Kultivierung waren in 2D- und 3D-Strukturen aller Größen mehrzellige Kolonien vorzufinden (Abb. 3.2 A und B).

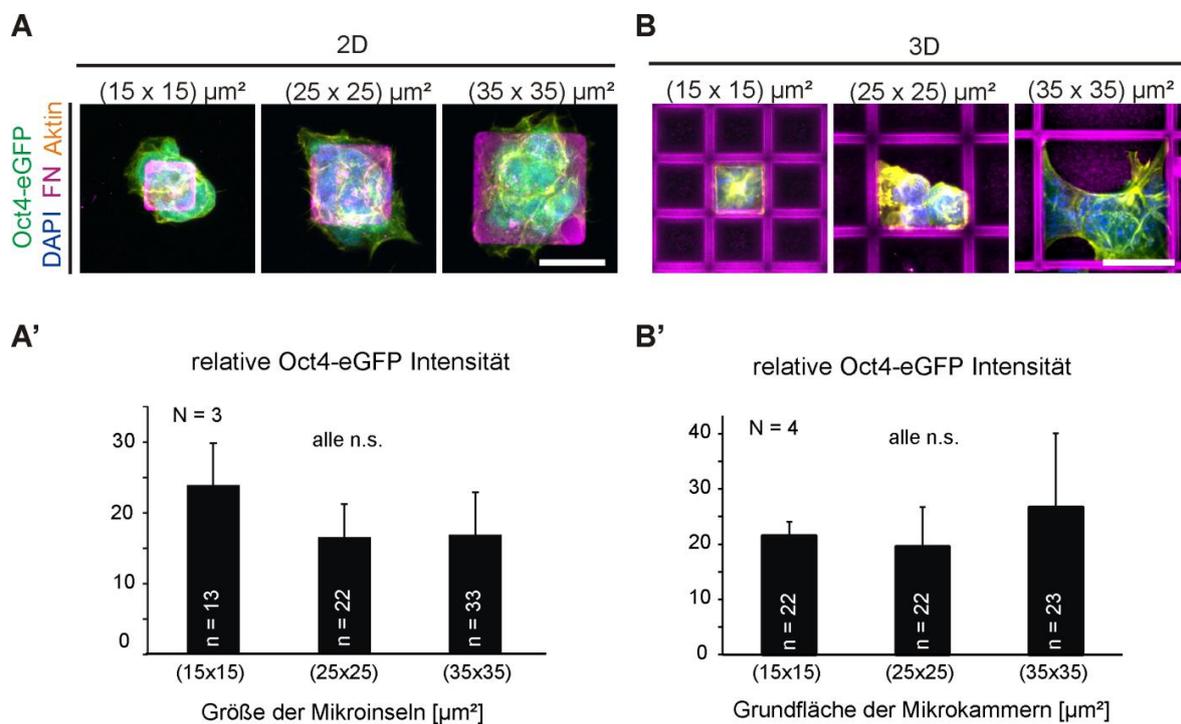


Abb. 3.2: Nach Kultivierung auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikroammern unterschiedlicher Größe sind keine Unterschiede im Oct4-eGFP-Level der mESZ detektierbar. **A** und **B** Repräsentative konfokale Aufnahmen (Maximumintensitätsprojektion) von mESZ Kolonien, die 48 h auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikroammern kultiviert wurden. Dargestellt ist das Reporterogen Oct4-eGFP (grün), das Aktin-Zytoskelett (gelb), FN (magenta) sowie der Zellkern (blau). Maßstab 20 μm . **A'** und **B'** Quantifizierung der Oct4-eGFP Intensität. Die Oct4-eGFP exprimierenden mESZ wurden auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikroammern unterschiedlicher Größe kultiviert und nach 48 h fixiert und gefärbt. Anhand konfokaler Aufnahmen wurde die Fluoreszenzintensität von Oct4-eGFP mit *ImageJ* (*mean intensity*) in einzelnen z-Ebenen gemessen. Es wurden nur Kolonien ausgewertet, die aus eGFP-positiven Einzelzellen hervorgingen. Die Größe der Mikroinseln und Mikroammern hatte keinen Einfluss auf die Oct4-eGFP Signalintensität (zweiseitiger t-Test: n.s. = $p > 0,05$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung). Die Daten aus **A** und **A'** stammen aus einer im Rahmen dieser Dissertation angefertigten Masterthesis (Baur 2014).

Die relative Quantifizierung des Oct4-eGFP-Levels ergab für mESZ auf 2D-Mikroinseln keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.2 A'). Ebenso konnte auch für 3D-Mikroammern keine Relation zwischen der relativen Oct4-eGFP Signalintensität und der Mikroammer-Größe

festgestellt werden (Abb. 3.2 B'). Eine zweitägige Kultivierung von mESZ auf unterschiedlich großen Mikroinseln beziehungsweise in unterschiedlich großen Mikrokammern führt demnach zu keinen detektierbaren Unterschieden im Oct4-eGFP-Level.

3.1.3 Die Proliferationsfähigkeit der mESZ nimmt mit steigender 2D-Mikroinsel-Größe zu

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1 zeigten unter anderem, dass sich die mESZ nach einer Kultivierung von 24 Stunden nicht auf beziehungsweise in allen 2D- und 3D-Strukturen geteilt hatten. Eine herausragende Charakteristik muriner ESZ ist deren schnelle Teilungsrate, die im Laufe der Differenzierung abnimmt (Stead et al. 2002, White and Dalton 2005). Auch wenn bezüglich des Oct4-Levels zum Zeitpunkt der Messung (zwei Tage Kultivierung) keine Unterschiede detektiert werden konnten (Kapitel 3.1.2), ist eine veränderte Proliferationsfähigkeit aufgrund beginnender Differenzierung in mESZ trotzdem denkbar. Um mehr Einblicke in das Teilungsverhalten der mESZ zu bekommen, wurde zunächst ihre Fähigkeit zur Proliferation auf verschiedenen großen 2D-Mikroinseln bestimmt. Dies wird normalerweise indirekt durch die Markierung der S-Phase über EdU oder BrdU bestimmt. Da ESZ einen besonderen Zellzyklus aufweisen, bei dem sich der Großteil der Zellen in der S-Phase befindet (Stead et al. 2002, White and Dalton 2005), sollte zunächst eine direkte Methode zur Bestimmung der Zellteilung erfolgen. Hierfür wurden die mESZ auf die Mikroinseln ausgesät und mit Hilfe von Fluoreszenzaufnahmen ermittelt, ob sich die Einzelzellen nach 24 Stunden geteilt hatten oder nicht (Abb. 3.3 A und B). Abbildung 3.3 B' zeigt die Quantifizierung der Zellproliferation. Der Begriff „Proliferationsfähigkeit“ wird als prozentualer Anteil der proliferierten Zellen nach 24 Stunden definiert. Ungefähr die Hälfte aller Zellen auf den kleinsten Mikroinseln ((15x15) μm^2) hatte sich nach einem Tag Kultivierung geteilt. Die Proliferationsfähigkeit stieg mit steigender Mikroinsel-Größe stetig an und betrug bei den größten Mikroinseln ((35x35) μm^2) ca. 85%. Der Unterschied in der Proliferationsfähigkeit zwischen den beiden kleinsten Mikroinseln ((15x15) und (20x20) μm^2) und der größten ((35x35) μm^2) war signifikant, wohingegen ab (25x25) μm^2 mit steigender Inselgröße keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsfähigkeit mehr detektiert werden konnten. Ab dieser Größe zeichnete sich also ein Plateau im Proliferationsverhalten ab, bei dem eine Vergrößerung der Mikroinseln durch die Zellen nicht mehr wahrgenommen werden konnte. Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung des Proliferationsmarkers EdU in weiteren Experimenten erhalten (Abb. 3.3 C). Auf den beiden kleinsten Mikroinseln ((15x15) und (20x20) μm^2) waren knapp 60% der mESZ EdU-positiv, während dies bei ca. 75% der Zellen auf den drei größeren Mikroinseln der Fall war ((25x25) bis (35x35) μm^2).

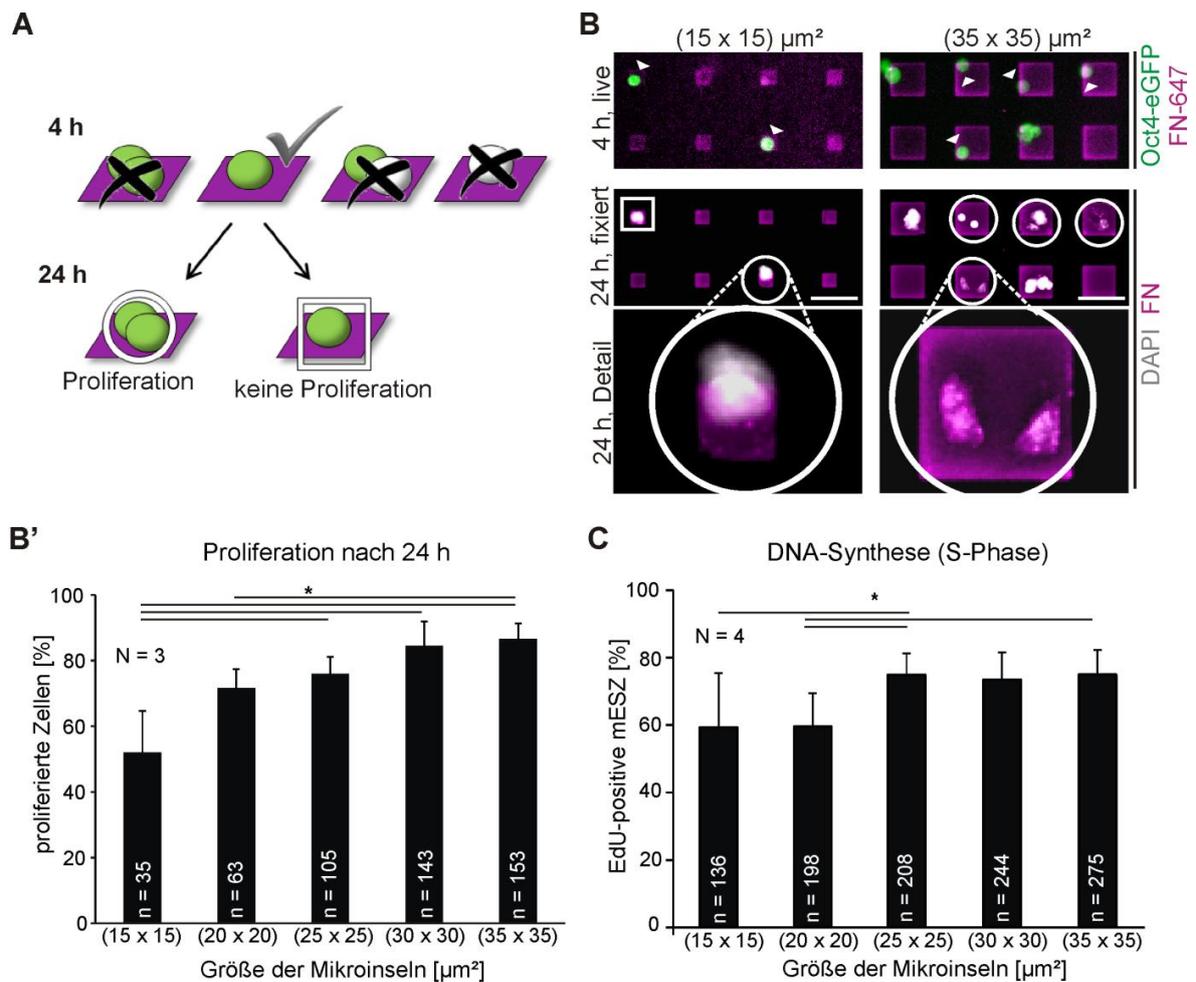


Abb. 3.3: Die mESZ Proliferationsfähigkeit nimmt mit steigender 2D-Mikroinsel-Größe zu. A Schema zur Auswertung der mESZ-Proliferationsfähigkeit auf 2D-Mikroinseln. Einzelne Oct4-positive mESZ wurden nach 4 h Kultivierung auf den Mikroinseln anhand *live* erstellter Fluoreszenzaufnahmen ausfindig gemacht und nach 24 h Kultivierungsdauer fixiert und gefärbt. Anhand von neu erstellten Fluoreszenzaufnahmen der fixierten Proben wurde die Proliferation analysiert. Falls eine Zelle nach 24 h noch einzeln auf der Mikroinsel vorhanden war, wurde dies als „keine Proliferation“ (weißes Quadrat) gewertet. Waren zwei oder mehr Zellen vorhanden, so galt dies als „Proliferation“ (weißes Kreis). **B** Repräsentative Aufnahmen von mESZ auf kleinen ((15x15) μm^2) und großen ((35x35) μm^2) 2D-Mikroinseln nach 4 bzw. 24 h Kultivierungsdauer. Zur Visualisierung des FN bei der Aufnahme von unfixierten Proben (4 h) wurde fluoreszent markiertes FN verwendet. Die Fluoreszenzaufnahmen nach 24 h wurden an fixierten und gefärbten Proben gemacht. Dargestellt ist das Reporter gen Oct4-eGFP (grün), FN (magenta) sowie der Zellkern (DAPI, weiß). Pfeilspitze: auswertbare Zelle; Kreis: Proliferation; Quadrat: keine Proliferation; Maßstab: 50 μm . **B'** Quantifizierung der mESZ Proliferationsfähigkeit auf 2D-Mikroinseln nach 24 h Kultivierung. Mit steigender 2D-Mikroinsel-Größe wurde eine erhöhte Proliferationsfähigkeit der mESZ beobachtet; (zweiseitiger t-Test: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung). Die Daten aus B und B' stammen aus einer im Rahmen dieser Dissertation angefertigten Masterthesis (Baur 2014) **C** Quantifizierung der Markierung der mESZ auf 2D-Mikroinseln mit dem S-Phasen-Marker EdU. Die Zellen wurden 4 h auf den Substraten kultiviert, anschließend 10 min mit 10 μM EdU inkubiert und fixiert. Eine Kultivierung auf kleineren Mikroinseln ((15x15) und (20x20) μm^2) führte zu einer Reduktion der EdU-Aufnahme in den mESZ (zweiseitiger t-Test: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung).

Das Protein Ki-67, das nur in Zellen mit aktivem Zellzyklus aktiv ist (Gerdes et al. 1984), konnte in allen mESZ nachgewiesen werden - auch auf den kleinsten Mikroinseln, die zu einer

Reduktion der Proliferation führten ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$; Appendix, Abb. A1). Dies legt nahe, dass die Zellen auf kleinen Mikroinseln nicht in den Zellzyklusarrest (G0-Phase) übergehen, sondern möglicherweise ihren Zellzyklus verlangsamen. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse auf eine Abhängigkeit der mESZ Proliferationsfähigkeit von der 2D-Mikroinsel-Größe hin, wobei kleine Mikroinseln zu einer Reduktion in der Anzahl proliferierter Zelle führen.

3.1.4 Die Proliferation der mESZ auf 2D-Mikroinseln ist unabhängig vom Zell-Spreading

Die Ergebnisse aus dem vorherigen Kapitel (Kap. 3.1.3) veranschaulichen, dass die mESZ die Größe der Mikroinseln wahrnehmen und darauf reagieren können. Deshalb sollte die Hypothese überprüft werden, ob dies über das *Spreading* der Zellen geschieht. Um die Dynamik und das *Spreading*-Verhalten der Zellen auf den 2D-Mikroinseln zu untersuchen, wurden Zeitrafferaufnahmen durchgeführt. Die mESZ wurden vier Stunden nach Aussaat auf die Mikroinseln im Intervall von zehn Minuten im Phasenkontrast aufgenommen. Abbildung 3.4 zeigt eine exemplarische Zusammenstellung der Aufnahmen einer sich teilenden Zelle auf einer Mikroinsel mittlerer Größe ($(25 \times 25) \mu\text{m}^2$). Zu Beginn der Aufnahmen waren die Zellen meist kugelförmig und sehr wenig *gespreaded* (Abb. 3.4). Die Zellen blieben meist auf einer Stelle und migrierten nicht auf den Inseln. Allerdings waren in der Peripherie der Zelle kleinere Zellausläufer und sogenannten *Blebs* zu erkennen, die in die nähere Umgebung der Zelle reichten (Abb. 3.4, Pfeile). *Blebs* sind Membranausstülpungen, die durch eine lokale Dissoziation des Aktin-Cortex zustande kommen und in verschiedenen Zelltypen bereits beschrieben wurden (Charras 2008). Die *Blebs* und Zellausläufer beschränkten sich dabei nicht nur auf die mit FN beschichteten Inseln (weißer Rahmen), sondern gingen oft in den passivierten Bereich hinein (Abb. 3.4 *) und zogen sich nach einiger Zeit wieder daraus zurück. Zu keinem Zeitpunkt besetzte die Zelle die komplette Mikroinsel, sondern tastete vielmehr Teilbereiche davon ab. Nach der Zellteilung (Zeitpunkt 12:20) blieben die Zellen dicht beieinander. Auch zum Ende der Zeitrafferaufnahmen (Abb. 3.4; Zeitpunkt 17:10) waren die Zellen noch Oct4-positiv und vital, sodass hier ein *Blebbing* aufgrund von Apoptose ausgeschlossen werden kann. Die Analyse weiterer Zeitrafferaufnahmen zeigte, dass die Zellen in ihrem *Spreading*-Verhalten sehr unterschiedlich sind, wobei manche Zellen sich etwas abflachen und ausbreiten, wohingegen andere Zellen rund bleiben. Jedoch konnte keine Korrelation zwischen dem *Spreading* und der Fähigkeit zur Proliferation festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Zellen auf den Mikroinseln vor der Zellteilung Zellausläufer und *Blebs* ausbilden, dass die Fähigkeit zur Zellteilung aber unabhängig vom *Spreading* der Zellen ist.

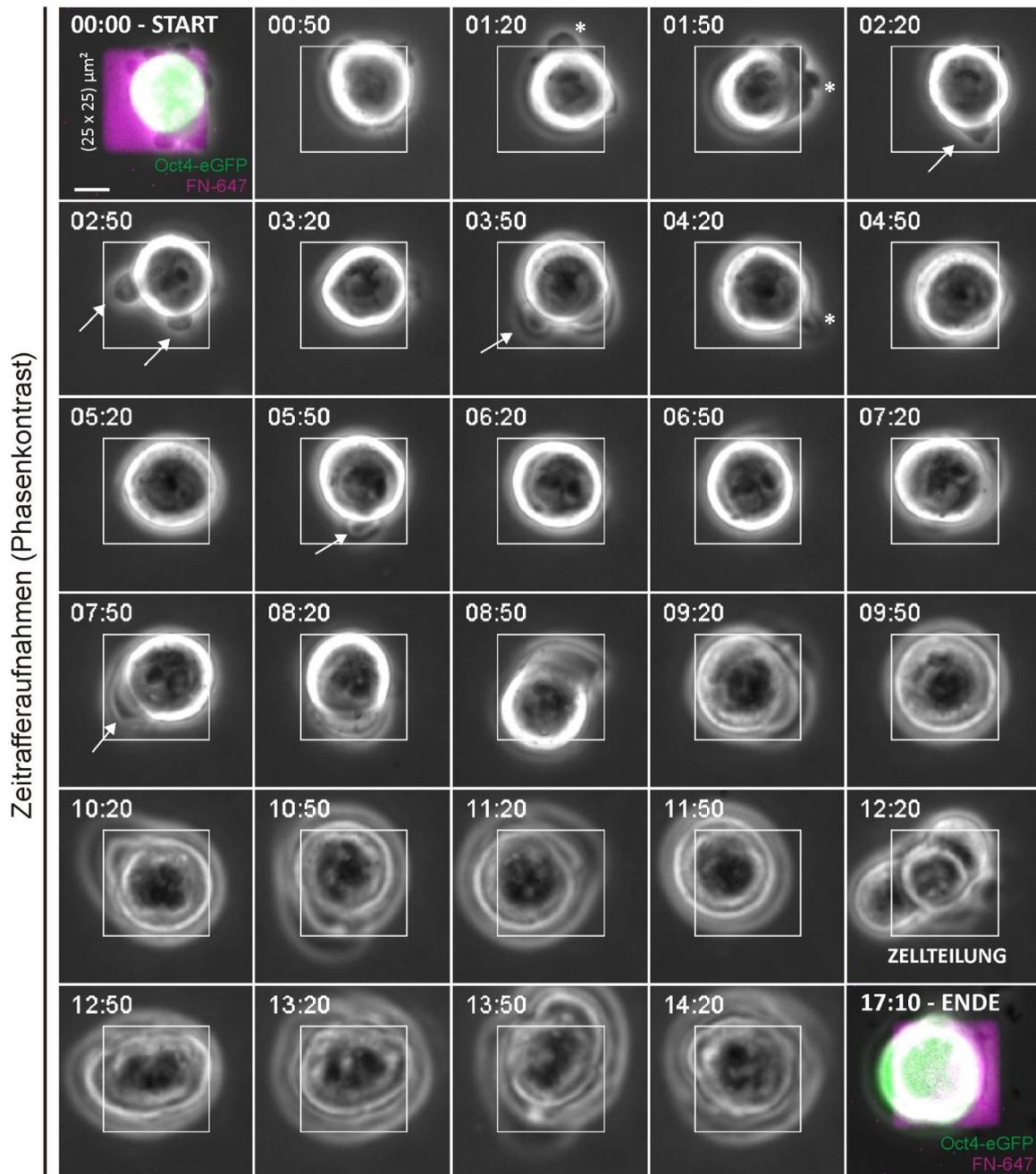


Abb. 3.4: Die Proliferation der mESZ auf 2D-Mikroinseln ist unabhängig vom Zell-Spreading. Repräsentative Ausschnitte von Zeitrafferaufnahmen einer Stammzelle auf einer Mikroinsel mittlerer Größe ((25x25) μm^2). Die Aufnahmen im Phasenkontrast wurden im Intervall von 10 Minuten unter Zellkultur Standardbedingungen durchgeführt. Gestartet wurden die Aufnahmen 4 h nach Zellaussaat. Zur Visualisierung der fluoreszent-markierten 2D-Mikroinsel (magenta) und des Oct4-eGFP Signals (grün) wurden vor Beginn und am Ende der Zeitrafferaufnahmen Fluoreszenzaufnahmen erstellt. Die zu Beginn runden Zellen migrierten wenig auf den Inseln, tasteten jedoch ihre Umgebung samt passivierter Bereiche mit Hilfe von *Blebs* und Zellausläufern (Pfeile) ab. * = *Blebs*/Ausläufer im passivierten Bereich. Zeit in h:min. Maßstab: 10 μm .

3.1.5 Die mESZ Proliferationsfähigkeit nimmt mit steigender 3D-Mikrokammer-Größe ab

Die Untersuchung der mESZ Proliferationsfähigkeit auf 2D-Mikroinseln (Kap 3.1.3) zeigte, dass sehr kleine Mikroinseln die Proliferation hemmen. Demnach benötigen die Zellen eine ausreichend große adhäsive Fläche zur korrekten Proliferation. Im Vergleich zu den 2D-Mikroinseln finden die Zellen in Mikrokammern eine 3D-Umgebung wieder, bei der das angebotene FN nicht nur auf einer horizontalen Ebene präsentiert wird, sondern auch an den Seiten der Zelle, wodurch sich Unterschiede im Verhalten darin kultivierter Zellen ergeben könnten. Im nächsten Schritt sollte deshalb die Proliferationsfähigkeit in 3D-Mikrokammern unterschiedlicher Größe untersucht werden. Selbst in den kleinsten Kammern war hier die Gesamtfläche an FN durch die beschichteten Wände mit einem Wert von $1425 \mu\text{m}^2$ deutlich größer als auf den kleinsten 2D-Mikroinseln ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2 = 225 \mu\text{m}^2$). Experimente mit kleineren Mikrokammern ($(10 \times 10) \mu\text{m}^2$) zeigten, dass diese von den mESZ nicht besiedelt werden können (Daten nicht gezeigt). Solche Kammern konnten daher nicht für die Versuche verwendet werden. Zur Bestimmung der Proliferationsfähigkeit wurden die mESZ als Einzelzellen in verschieden große 3D-Mikrokammern ausgesät. Mit Hilfe von Fluoreszenzaufnahmen wurde anschließend ermittelt, ob sich die Zellen nach 24 Stunden Kultivierung in den Kammern geteilt hatten (Abb. 3.5 A und B). Interessanterweise zeigte sich hier ein gegenteiliger Effekt als beim Experiment mit 2D-Mikroinseln: Die Proliferationsfähigkeit der mESZ nahm mit steigender Mikrokammer-Größe ab (Abb. 3.5 B'). Dabei hatten sich nach einem Tag Kultivierung 90% der Zellen in den Mikrokammern mit kleinster Grundfläche ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$) geteilt, wohingegen dies für nur knapp 37% der Zellen in den größten Mikrokammern ($(35 \times 35) \mu\text{m}^2$) der Fall war. Ab einer Grundfläche von $(25 \times 25) \mu\text{m}^2$ zeigte sich ein Abfall der mESZ Proliferationsfähigkeit auf 66%. Die Proliferationsunterschiede zwischen den beiden kleinsten Mikrokammern ((15×15) und $(20 \times 20) \mu\text{m}^2$) zur größten ($(35 \times 35) \mu\text{m}^2$) waren signifikant. Diese Ergebnisse wurden in einem alternativen EdU-Proliferationsassay reproduziert (Abb. 3.5 C. Hier war der Anteil EdU-positiver mESZ in größeren Mikrokammern ((30×30) und $(35 \times 35) \mu\text{m}^2$) signifikant reduziert im Vergleich zum Anteil in den kleinsten Mikrokammern ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$). Die Färbung der mESZ innerhalb von 3D-Mikrokammern mit dem Protein Ki-67 zeigte, dass sich alle lebenden Zellen noch im aktiven Zellzyklus befanden (Appendix, Abb. A1). Demnach ist die Proliferation der mESZ abhängig von der 3D-Mikrokammer-Größe, wobei mit steigender Grundfläche der Mikrokammern die Fähigkeit zur Proliferation innerhalb einer eintägigen Kultivierung abnimmt. Die Tendenz der Proliferationsfähigkeit war hier also gegenläufig zu den Ergebnissen aus Experimenten mit 2D-Mikroinseln, bei denen eine erhöhte Proliferation mit steigender Inselgröße festgestellt wurde (Kapitel 3.1.3).

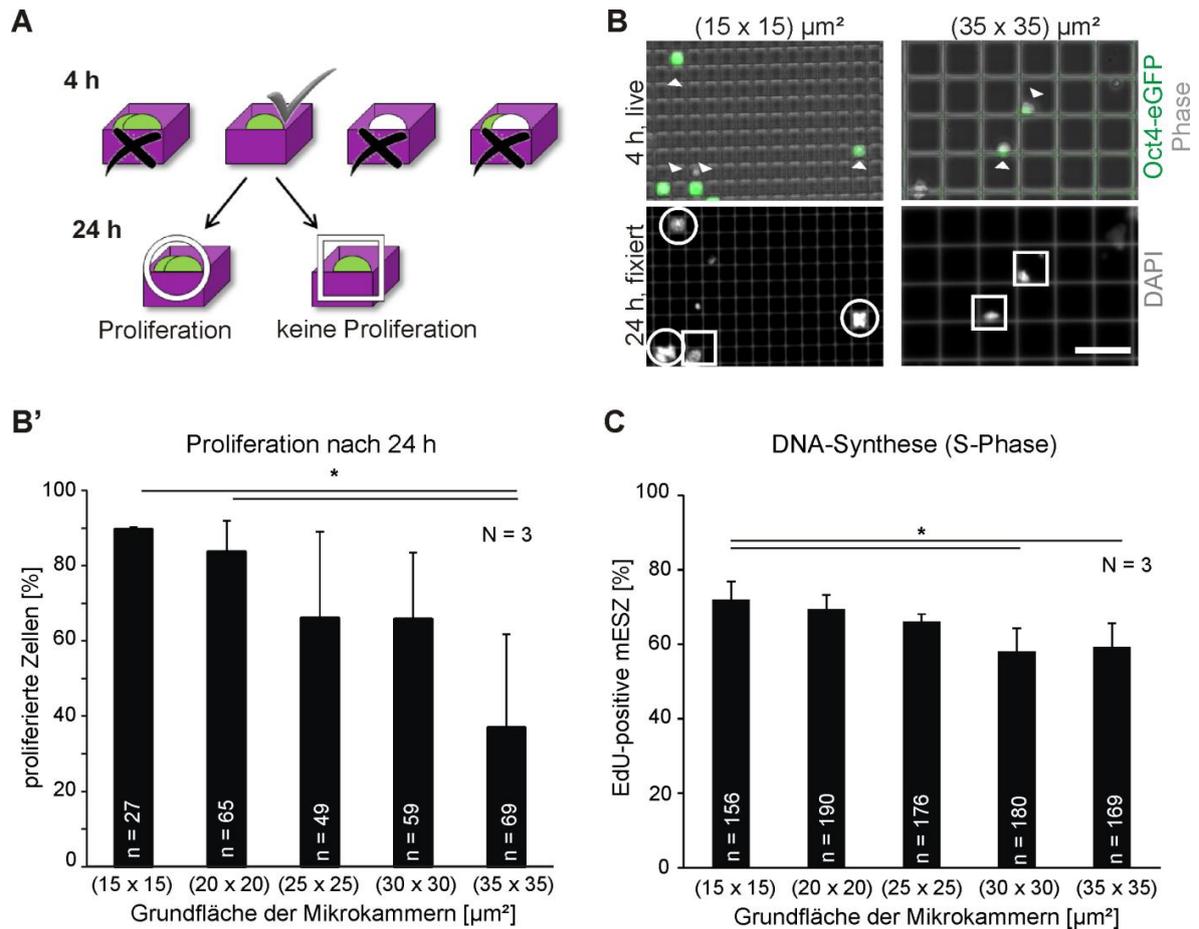


Abb. 3.5: Die mESZ Proliferationsfähigkeit nimmt mit steigender 3D-Mikroammer-Größe ab. **A** Schema zur Auswertung der mESZ-Proliferationsfähigkeit in 3D-Mikroammern. Einzelne Oct4-positive mESZ in Mikroammern wurden nach 4 h Kultivierung anhand von Fluoreszenzaufnahmen ausfindig gemacht, nach 24 h Kultivierungsdauer fixiert und gefärbt. Anhand neu erstellter Fluoreszenzaufnahmen der fixierten Proben wurde die Proliferation analysiert. Wenn eine Zelle nach 24 h noch einzeln in der Mikroammer vorhanden war, wurde dies als „keine Proliferation“ (Quadrat) gewertet. Waren zwei oder mehr Zellen vorhanden, so galt dies als „Proliferation“ (Kreis). **B** Repräsentative Aufnahmen von mESZ in 3D-Mikroammern mit kleinster ((15x15) μm^2) und größter Grundfläche ((35x35) μm^2) nach 4 bzw. 24 h Kultivierungsdauer. Die Fluoreszenzaufnahmen nach 24 h wurden an fixierten und gefärbten Proben gemacht. Dargestellt ist das endogene Oct4-eGFP (grün), FN (magenta), das Substrat (oben: grau; unten: weiß (Autofluoreszenz)) sowie der Zellkern (DAPI, weiß). Pfeilspitze: auswertbare Zelle; Kreis: Proliferation; Quadrat: keine Proliferation; Maßstab: 20 μm . **B'** Quantifizierung der mESZ Proliferationsfähigkeit in 3D-Mikroammern nach 24 h Kultivierung. Mit steigender 3D-Mikroammer-Größe wurde eine abnehmende mESZ Proliferationsfähigkeit beobachtet (zweiseitiger t-Test: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung). **C** Quantifizierung der Markierung der mESZ in 3D-Mikroammern mit dem S-Phasen-Marker EdU. Die Zellen wurden 4 h auf den Substraten kultiviert, anschließend 10 min mit 10 μM EdU inkubiert und fixiert. Eine Kultivierung auf größeren Mikroammern ((30x30) und (35x5) μm^2 Grundfläche) führte zu einer Reduktion der EdU-Aufnahme in den mESZ (zweiseitiger t-Test: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung).

3.1.6 Die mESZ Proliferationsfähigkeit nimmt mit steigender 3D-Mikroammer-Größe zu, sofern die Wände nicht adhäsiv sind

Die unterschiedlichen Tendenzen der mESZ-Proliferationsfähigkeit in 2D-Mikroinseln gegenüber 3D-Mikroammern (Kap. 3.1.3 und 3.1.5) machen deutlich, dass die Dimensionalität ein wichtiger Parameter für das Stammzellverhalten ist. Möchte man wissen, wie diese

Unterschiede zu Stande kommen, sollte man sich klar machen, welche wesentlichen Unterschiede sich durch die Einführung einer weiteren Dimension ergeben. Der wesentliche Unterschied zwischen den Mikroinseln zu den Mikroammern sind die „eingezogenen“ Wände, welche für die Zelle als physikalische Barriere wahrgenommen werden. Zudem führen diese Wände möglicherweise zu einer geringeren Diffusion von Nährstoffen oder Signalen, was im 2D-System nicht der Fall ist. Desweiteren liegt in den Mikroammern das FN nicht nur auf einer Ebene vor, wie es bei den Mikroinseln der Fall ist, sondern es wird mehrdimensional präsentiert. Um einige dieser Möglichkeiten als Grund für die vorangegangenen Beobachtungen ausschließen zu können, wurde im nächsten Schritt eine modifizierte Art an 3D-Mikroammern produziert. Diese wurden mit DLS aus dem Fotolack TPE-TA hergestellt, an den Proteine wie z.B. FN nicht adsorbieren (Claus et al. 2016). Da lediglich die Wände aus dem Fotolack geschrieben wurden, adsorbierte bei der Beschichtung das FN an den Glasboden der Deckgläser. Dies resultierte in 3D-Mikroammern, die anti-adhäsive Wände aufwiesen, bei denen der Boden jedoch mit FN beschichtet war (Abb. 3.6 A). Im Vergleich zu den herkömmlichen Mikroammern ist die physikalische, dreidimensionale Barriere hier also gegeben, die dreidimensionale Verteilung des FN jedoch nicht. Die Substrate bestanden aus Mikroammern mit drei verschiedenen großen Grundflächen ((15x15), (25x25) sowie (35x35) μm^2) und wurden genutzt, um die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu bestimmen. Die Durchführung der Experimente erfolgte analog zu den Experimenten aus Kapitel 3.1.3 und 3.1.5. Dabei wurden die mESZ als Einzelzellen in verschieden große anti-adhäsive 3D-Mikroammern ausgesät. Mit Hilfe von Fluoreszenzaufnahmen wurde ermittelt, ob die Zellen sich nach 24 Stunden Kultivierung in den modifizierten Kammern geteilt hatten (Abb. 3.6 B und C). Interessanterweise war hier das Proliferationsverhalten der mESZ gegenteilig als bei Experimenten mit komplett adhäsiven Mikroammern. Nur 1/3 der Zellen innerhalb kleiner modifizierter Mikroammern ((15x15) μm^2) hatten sich nach 24 Stunden geteilt, wohingegen es in großen Kammern ((35x35) μm^2) mehr als doppelt so viele waren (Abb. 3.6 C). Dieser Unterschied erwies sich als signifikant. Bei einem alternativ durchgeführten Assay mit dem Proliferationsmarker EdU wurden weitere Unterschiede zwischen der mESZ-Proliferation in adhäsiven und modifizierten Mikroammern sichtbar. Anders als bei adhäsiven 3D-Mikroammern konnte hier in den Zellen keine reduzierte EdU-Aufnahme mit zunehmender TPE-TA-Mikroammern-Größe ermittelt werden (Abb. 3.6 D). Daraus lässt sich folgern, dass bei 3D-Mikroammern mit anti-adhäsiven Wänden die Proliferationsfähigkeit mit steigender Kammergröße nicht abnimmt, wie es für adhäsive Mikroammern beobachtet wurde. Das Verhalten der mESZ ist eher vergleichbar zu den Ergebnissen aus 2D-Experimenten. Folglich scheint die dreidimensionale Verteilung des FN den Ausschlag zu geben, dass die Ergebnisse zur Proliferation aus Versuchen mit 2D-Mikroinseln und adhäsiven 3D-Mikroammern gegensätzlich sind.

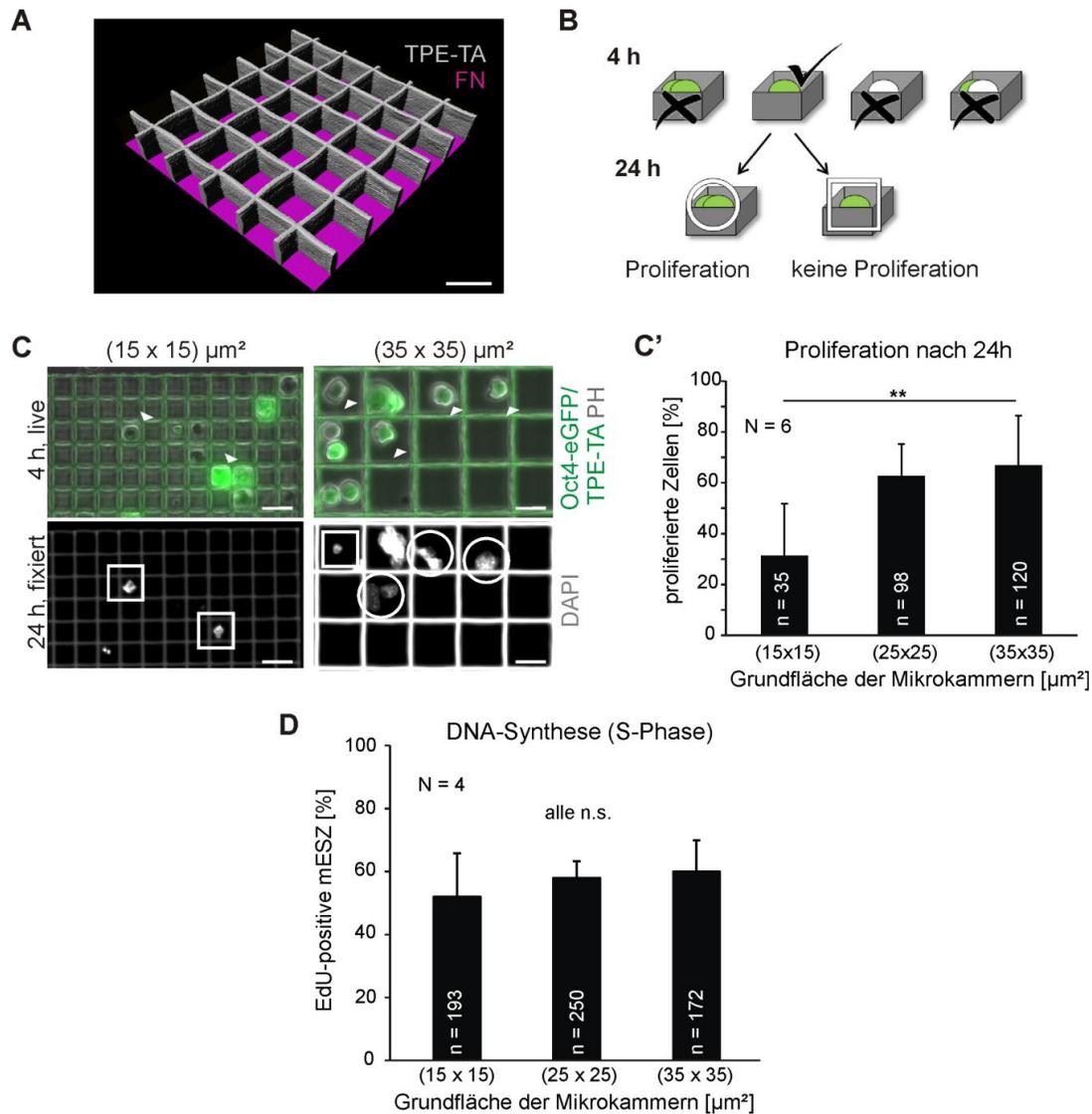


Abb. 3.6: Die mESZ Proliferationsfähigkeit nimmt mit steigender 3D-Mikrokammer-Größe zu, sofern die Wände nicht adhäsiv sind. **A** Beispielhafte 3D-Rekonstruktion von 3D-Mikrokammern ((25x25) μm^2) mit anti-adhäsiven Wänden. Die Wände wurden mittels DLS aus einem Fotolack hergestellt, der keine Proteinadsorption erlaubt (TPE-TA, grau). Das Fibronektin (magenta), das lediglich an den Glasboden des Substrats adsorbiert, wurde mittels Immunfärbung sichtbar gemacht. TPE-TA besitzt eine hohe Autofluoreszenz im grünen und blauen Kanal. Maßstab 20 μm . **B** Schema zur Auswertung der mESZ-Proliferationsfähigkeit in 3D-Mikrokammern mit anti-adhäsiven Wänden. Einzelne Oct4-positive mESZ in Mikrokammern wurden nach 4 h Kultivierung anhand von Fluoreszenzaufnahmen ausfindig gemacht, nach 24 h Kultivierungsdauer fixiert, gefärbt und anhand von neu erstellten Fluoreszenzaufnahmen analysiert. Wenn eine Zelle nach 24 h noch einzeln in der Mikrokammer vorhanden war, wurde dies als „keine Proliferation“ (weißes Quadrat) gewertet. Waren mehrere Zellen vorhanden, so galt dies als „Proliferation“ (weißer Kreis). **C** Repräsentative Aufnahmen von mESZ in kleinen ((15x15) μm^2) und großen ((35x35) μm^2) TPE-TA-Mikrokammern nach 4 bzw. 24 h Kultivierungsdauer. Die Fluoreszenzaufnahmen nach 24 h wurden mit fixierten und gefärbten Proben hergestellt. Dargestellt sind das Reportergen Oct4-eGFP (grün), FN (magenta), das Substrat (grau und Autofluoreszenz) sowie der Zellkern (weiß). Pfeilspitze: auswertbare Zelle; Kreis: Proliferation; Quadrat: keine Proliferation; Maßstab: 20 μm . **C'** Quantifizierung der mESZ Proliferationsfähigkeit in 3D-Mikrokammern mit anti-adhäsiven Wänden nach 24 h Kultivierung. Es wurden nur kleine ((15x15) μm^2), mittlere ((25x25) μm^2) und große ((35x35) μm^2) Mikrokammern verwendet. Mit steigender TPE-TA-Mikrokammer-Größe wurde eine zunehmende Proliferationsfähigkeit festgestellt (zweiseitiger t-Test: ** = p < 0,01; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung). **D** Quantifizierung der EdU-Markierung der mESZ in modifizierten TPE-TA-3D-Mikrokammern. Die Zellen wurden 4 h auf den Substraten kultiviert, anschließend 10 min mit 10 μM EdU inkubiert und fixiert. Die EdU-Inkorporation war unabhängig von der Mikrokammer-Größe (zweiseitiger t-Test: n.s. = p > 0,05; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung).

3.1.7 mESZ spannen sich zwischen den Wänden kleiner adhäsiver Mikrokammern auf

Die vorherigen Kapitel verdeutlichen, dass mESZ nur dann in kleinen Mikrokammern vermehrt proliferieren, wenn deren Wände mit FN bedeckt sind. Diese dreidimensionale Verteilung des FN könnte Unterschiede in der 3D-Zellausbreitung der mESZ hervorrufen, was erwiesenermaßen das Verhalten vieler Zelltypen beeinflussen kann (Baker and Chen 2012). Im nächsten Schritt wurde deshalb die Morphologie der mESZ in den verschiedenen Substrattypen auf Einzelzellebene untersucht. Dafür wurden die Zellen nach vier Stunden Kultivierung auf den Substraten fixiert und das Aktin-Zytoskelett gefärbt. Aus konfokalen Aufnahmen wurden mit Hilfe der Software *Imaris* 3D-Rekonstruktionen (*surface rendering*) der Proben angefertigt, die eine Visualisierung der Zellmorphologie innerhalb der Substrate ermöglichten (Abb. 3.7 A). Dabei zeigte sich, dass auf 2D-Mikroinseln aller Größen die Morphologie der Zellen eher rundlich und wenig *gespreaded* war (Abb. 3.7 A oben). Es konnten hier jedoch geringe morphologische Unterschiede festgestellt werden. Auf den kleinsten Mikroinseln ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$) waren die Zellen häufig nicht *gespreaded* und eher in z-Richtung Ballon-artig aufgerichtet. Auf großen Mikroinseln hingegen waren die Zellen etwas flacher, mit mehr Kontakt zur FN-Fläche. In 3D-Mikrokammern mit anti-adhäsiven Wänden war die Zellmorphologie analog zu den mESZ auf 2D-Mikroinseln (Abb. 3.7 A, unten). Lediglich in adhäsiven 3D-Mikrokammern kontaktierten die Zellen die Wände der Kammern (Abb. 3.7 A, Mitte). Hier zeigten sich die größten morphologischen Unterschiede zwischen mESZ in kleinen und großen Mikrokammern. Waren die Zellen in großen Mikrokammern ($(35 \times 35) \mu\text{m}^2$) eher kugelförmig und hatten nur Kontakt zu einer oder zwei Wänden, so spannten sich die Zellen in den kleinsten Kammern ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$) zwischen allen vier Wänden auf. Dabei berührten sie häufig nicht den Boden der Kammern, sondern waren vielmehr in der oberen Kammer-Hälfte zwischen den Wänden aufgespannt (Abb. 3.7 B) Eine exemplarische Aufsicht (Abb. 3.7 A') verdeutlicht, dass dieses kreuzförmige Aufspannen lediglich in kleinen 3D-Mikrokammern mit adhäsiven Wänden möglich ist, und nicht auf 2D-Mikroinseln oder in anti-adhäsiven 3D-Mikrokammern. Die kreuzförmige Morphologie konnte teilweise auch in FN-Mikrokammern der Größe $(20 \times 20) \mu\text{m}^2$ festgestellt werden (Appendix, Abb. A2). Die Morphologie der mESZ variiert also sehr stark zwischen adhäsiven 3D-Mikrokammern der kleinsten und größten Größe, wobei das Aufspannen zwischen den Wänden der Kammer nur in kleineren Mikrokammern möglich ist.

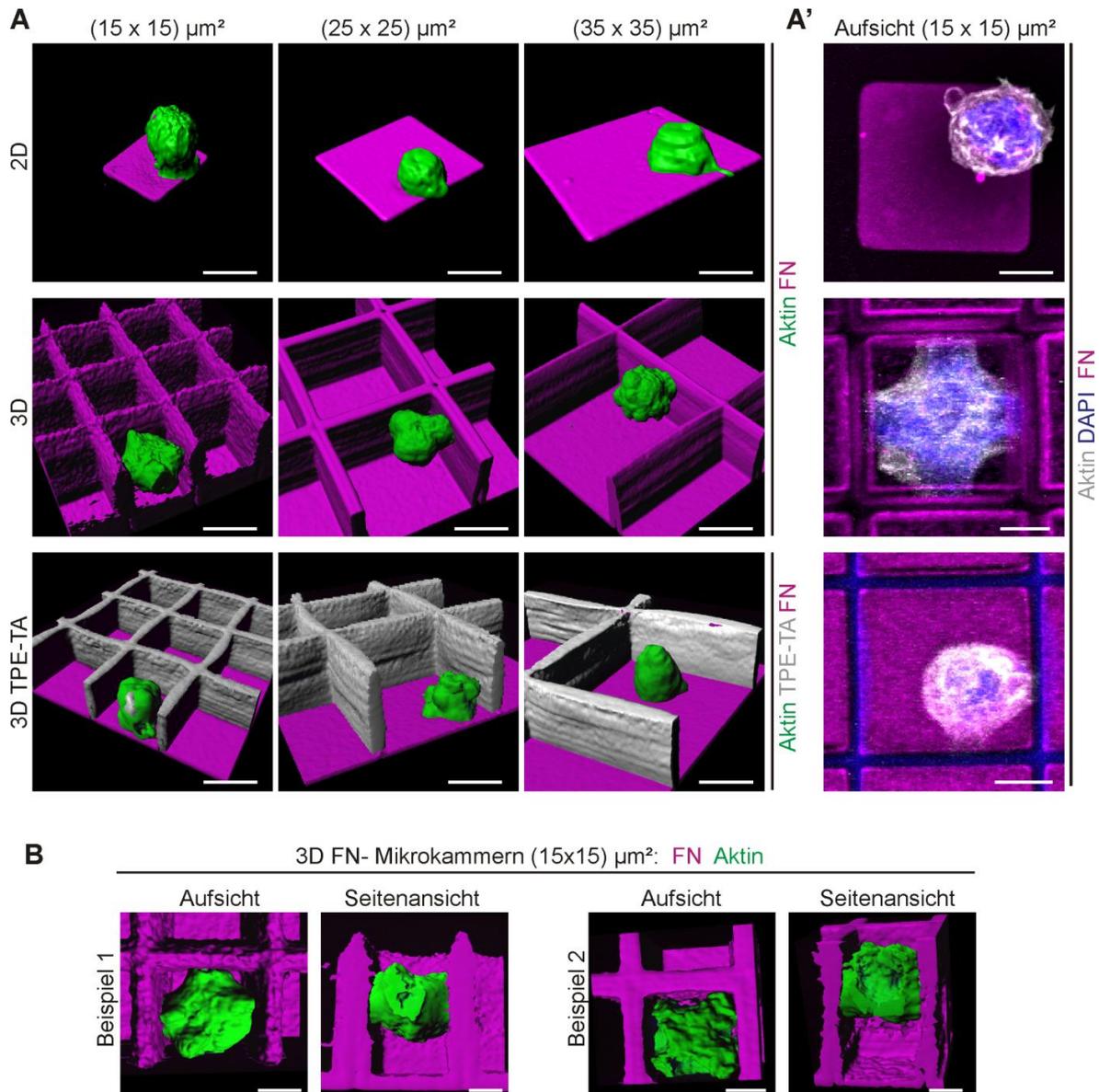


Abb. 3.7: Kleine adhäsive Mikrokammern fördern die Ausbreitung von mESZ. **A** Exemplarische 3D-Rekonstruktionen (*surface rendering*) von mESZ, die 4 h auf 2D-Mikroinseln (oben), in adhäsiven 3D-Mikrokammern (Mitte) oder in Mikrokammern mit antiadhäsiven TPE-TA Wänden (unten) kultiviert wurden. Die fixierten Proben wurden mit Phalloidin (Aktin) und einem FN-Antikörper gefärbt. Dargestellt ist Aktin (grün), FN (magenta) und der fluoreszierende Fotolack TPE-TA (grau). In den meisten Fällen waren die mESZ wenig ausgebreitet und eher kugelförmig. In adhäsiven 3D-Mikrokammern (Mitte) suchten die Zellen Kontakt zu den Wänden. Lediglich in kleinen adhäsiven Mikrokammern ((15x15) μm^2 Grundfläche) spannten sich die Zellen zwischen allen 4 Wänden auf. Maßstab 10 μm . **A'** Exemplarische Maximalprojektionen (Aufsicht) von mESZ, die 4 h auf kleinen 2D-Mikroinseln (oben), in kleinen adhäsiven 3D-Mikrokammern (Mitte) oder in kleinen Mikrokammern mit anti-adhäsiven TPE-TA Wänden (unten) kultiviert wurden. Die fixierten Proben wurden mit Phalloidin (weiß), DAPI (blau) und einem FN-Antikörper (magenta) fluoreszent markiert. Lediglich in den Mikrokammern mit adhäsiven Wänden spannte sich die Zelle kreuzförmig zwischen den 4 Wänden der Kammer auf. Maßstab. 5 μm . **B** Aufsicht und Seitenansicht von mESZ in adhäsiven Mikrokammern mit einer Grundfläche von (15x15) μm^2 . Die mESZ wurden nach 4 h Kultivierung in den Mikrokammern fixiert, fluoreszent markiert (Aktin: grün; FN: magenta) und am konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt exemplarische 3D-Rekonstruktionen (*surface rendering*) zweier Zellen innerhalb der Mikrokammern. Die mESZ adhärten häufig im oberen Bereich kleiner Mikrokammern ((15x15) μm^2), ohne dabei Kontakt zum Boden der Kammer zu haben. Maßstab: 5 μm .

3.1.8 Der Grad der YAP-Aktivierung variiert zwischen Mikrokammern unterschiedlicher Größe

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.7 zeigen, dass große morphologische Unterschiede in mESZ zwischen kleinen und großen adhäsiven 3D-Mikrokammern bestehen und geringere Unterschiede zwischen verschiedenen großen Mikroinseln (Kapitel 3.1.7). Zellen in kleinen 3D-Mikrokammern waren stärker aufgespannt, als jene in großen Kammern. Interessanterweise waren kleine Kammern diejenigen Strukturen, die eine Proliferation der mESZ begünstigten. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob es eine Verbindung zwischen der Ausbreitung von Zellen in ihrer Umgebung und deren Proliferation gibt. Diese Frage kann durch den Vorgang der Mechanotransduktion geklärt werden, bei dem physikalische Kräfte aus der Zellumgebung ins Innere der Zelle übertragen werden und somit das Zellverhalten beeinflusst wird (Tschumperlin 2011). Das Protein YAP wird beispielsweise bei starkem *Zell-Spreading* über das Zytoskelett und die Wirkung von Rho-GTPasen aktiviert und häuft sich im Zellkern an, wo es die Zellproliferation steuert (Halder et al. 2012). In ESZ ist YAP ebenfalls an der Selbsterneuerung der Zellen beteiligt (Lian et al. 2010, Beyer et al. 2013). Ob YAP auch bei der Kultivierung von mESZ auf unterschiedlich großen 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikrokammern eine Rolle spielt, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden. Dafür wurde die relative Lokalisation von YAP in den mESZ nach einer vierstündigen Kultivierung auf Mikroinseln und in Mikrokammern ermittelt. Die relative YAP Lokalisation ist das Verhältnis zwischen dem nukleären, aktiven YAP zum zytoplasmatischen, inaktiven YAP (Abb. 3.8 A). YAP wurde in den Zellen im Rahmen einer Immunfärbung markiert und die Zellen wurden anschließend am LSM aufgenommen. Die Intensitätsmessung der YAP-Färbung im Zellkern und im Zytoplasma erfolgte mit dem *Measure* Werkzeug von Image J an einzelnen optischen z-Schnitten. Dabei wurden anhand der DAPI- und Aktinfärbung die zu messenden Bereiche eingegrenzt (Abb. 3.8 A). Der Nukleolus wurde nicht mit einbezogen. Anhand der Fluoreszenzbilder konnte kein großer Unterschied zwischen der YAP-Lokalisation auf 2D-Mikroinseln kleinster und größter Größe festgestellt werden (Abb. 3.8 B). Demensprechend war der ermittelte Wert für die relative YAP-Lokalisation bei mESZ auf großen Mikroinseln ((35x35) μm^2 Grundfläche) nur minimal und nicht signifikant erhöht im Vergleich zur YAP-Lokalisation auf kleinen Mikroinseln ((15x15) μm^2 Grundfläche) (Abb. 3.8 B'). Ein anderes Bild ergab sich für mESZ, die in 3D-Mikrokammern kultiviert wurden. Hier war häufig mehr nukleäres YAP in Zellen innerhalb kleiner Mikrokammern zu detektieren, als bei mESZ in großen Mikrokammern (Abb. 3.8 C). Die Quantifizierung der Daten ergab eine signifikante Reduktion der relativen YAP-Lokalisation von 1,9 auf 1,4 bei mESZ in großen Mikrokammern im Vergleich zu mESZ in kleinen Kammern (Abb. 3.8 C'). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Kultivierung von mESZ in kleineren Mikrokammern zu einer erhöhten Lokalisation des YAP-Proteins im Zellkern und somit zu einer gesteigerten YAP-Aktivität führt.

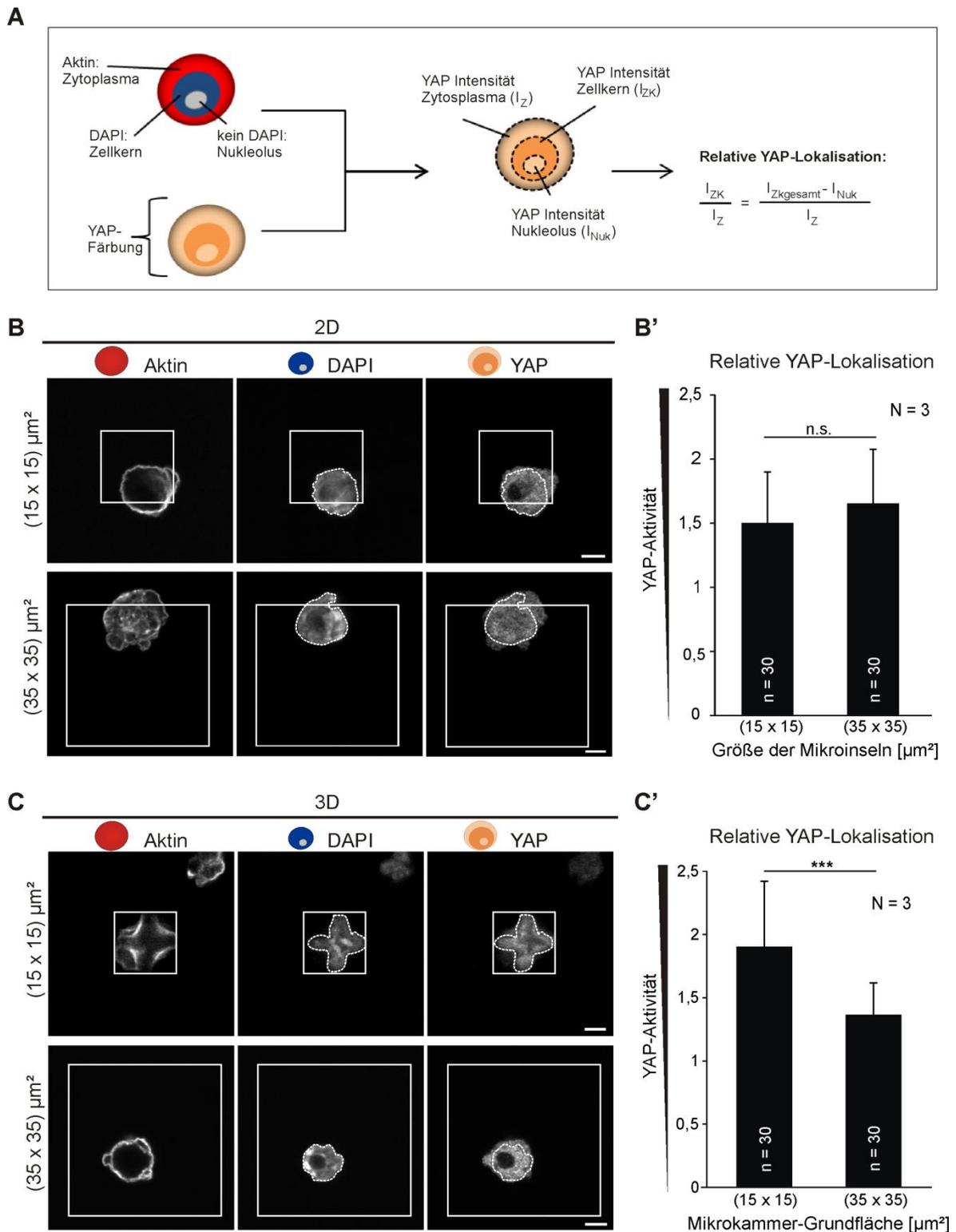


Abb. 3.8: Differenzielle YAP-Aktivierung in 3D-Mikrokammern unterschiedlicher Größe. **A** Schema zur Auswertung der relativen YAP-Lokalisation in immunzytochemisch gefärbten mESZ. Aktives YAP befindet sich im Zellkern. Um die Grenze der relevanten Zellstrukturen bestimmen zu können, wurde das Aktin-Zytoskelett (rot) und der Zellkern (blau) mit Phalloidin bzw. DAPI gefärbt. Die Intensitätsmessung der YAP-Immunfärbung erfolgte im Bereich des Zytoplasmas (Aktinfärbung ohne Zellkernbereich) und im Bereich des Zellkerns (DAPI-Färbung ohne Nukleolus) an nicht bearbeiteten konfokalen Aufnahmen. Die Messung wurde mit Hilfe der Software *ImageJ* (*Measure tool*) durchgeführt. Die relative YAP Lokalisation setzt sich aus dem Verhältnis der Intensität im Zellkern (I_{ZK}) und im Zytoplasma (I_Z) zusammen. Der Bereich des Nukleolus wurde für I_{ZK} nicht mit ausgewertet. Es wurden stets mittlere Signalintensitäten (Signal/Fläche) für die Rechnung verwendet (für Details siehe Material und Methoden, Kapitel 2.6.4).

B Exemplarische Aufnahmen von mESZ auf kleinen (oben) und großen (unten) 2D-Mikroinseln für die YAP-Quantifizierung. Die mESZ wurden 4 h nach Aussaat fixiert und fluoreszent gefärbt. YAP wurde mit einem monoklonalen Antikörper markiert, zusätzlich wurde das Aktin-Zytoskelett und der Zellkern (Grenze dargestellt durch gestrichelte Linie) gefärbt. Die Quadrate stellen die Grenzen der Mikroinseln dar. Maßstab: 5 μm . **B'** Quantifizierung der Daten aus (B). Die relative YAP-Lokalisation unterschied sich nicht signifikant zwischen mESZ auf großen und kleinen Mikroinseln. (zweiseitiger t-Test: n.s. = $p > 0,05$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung). **C** Exemplarische Aufnahmen von mESZ in kleinen ((15x15) μm^2 Grundfläche, oben) und großen ((35x35) μm^2 Grundfläche, unten) 3D-Mikrokammern für die YAP-Quantifizierung. Die Zellen wurden 4 h nach Aussaat fixiert und gefärbt. YAP wurde mit einem monoklonalen Antikörper gefärbt, zusätzlich wurde das Aktin-Zytoskelett und der Zellkern (Grenze dargestellt durch gestrichelte Linie) markiert. Die Quadrate stellen die Grenzen der Mikrokammern dar. Maßstab: 5 μm . **C'** Quantifizierung der Daten aus (C). Die relative YAP-Lokalisation unterschied sich signifikant zwischen mESZ in großen und kleinen Mikrokammern. Dabei zeigte sich eine vermehrte nukleäre YAP-Lokalisation (=Aktivierung) bei mESZ in kleinen Mikrokammern (zweiseitiger t-Test: *** = $p \leq 0,001$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung).

Zusammengefasst konnte im ersten Teilprojekt dieser Arbeit (Kapitel 3.1) gezeigt werden, dass die Proliferationsfähigkeit von mESZ in 2D-Mikroinseln und 3D-Mikrokammern unterschiedlicher Größe variiert. Genauer führt eine Kultivierung auf zu kleinen FN-beschichteten 2D-Mikroinseln zu einer verstärkten Hemmung der Proliferation. Dem entgegengesetzt steht die Kultivierung von mESZ in kleinen FN-beschichteten Mikrokammern, die förderlich für deren Proliferation ist. Mit steigender Mikrokammer-Größe nimmt die Proliferationsfähigkeit der mESZ ab. Dabei spielt eine vollständige FN-Beschichtung der 3D-Mikrokammern eine entscheidende Rolle. Es existieren geringe morphologische Unterschiede zwischen den Zellen auf kleinen und großen 2D-Mikroinseln und drastische Unterschiede zwischen Zellen innerhalb von 3D-Mikrokammern unterschiedlicher Größe. Die Kultivierung der mESZ in kleineren Mikrokammern führt zu einer kreuzförmigen Ausbreitung der Zellen zwischen den Wänden der Kammer. Diese Zellreaktion ist in größeren Mikrokammern nicht möglich. Analog dazu führt die Kultivierung in kleinen Mikrokammern zu einer erhöhten Aktivität des transkriptionellen *co*-Aktivators YAP, ein an der Mechanotransduktion beteiligtes Protein, das einen positiven Einfluss auf die Proliferation und Selbsterneuerung von Zellen hat (Lian et al. 2010, Halder et al. 2012, Beyer et al. 2013).

3.2 Einfluss der Topografie auf die Selbsterneuerung der mESZ

Die pluripotenten Eigenschaften embryonaler und induziert pluripotenter Stammzellen bieten eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Grundlagenforschung und für medizinische Zwecke, zum Beispiel *Tissue Engineering* (Mimeault, Hauke and Batra 2007). Die Aufrechterhaltung des pluripotenten Stammzellcharakters *in vitro* ist jedoch alles andere als trivial. Derzeit angewandte Methoden sind entweder zeitaufwändig oder kostspielig und bergen

das Risiko von Kontaminationen mit artfremdem Material oder anderen Verunreinigungen. Deshalb ist eine Kontrolle der Stammzell-Pluripotenz allein durch physikalische Faktoren des Substrats ein wichtiges Ziel in der Stammzellforschung. Eine vielseitig einsetzbare und modifizierbare physikalischer Einflussgröße stellt die Topografie von Oberflächen dar. Bereits existierende Untersuchungen zum Einfluss der Topografie auf ESZ sind jedoch sehr widersprüchlich und wurden selten auf Einzelzellebene durchgeführt. Dieser Teil der Arbeit befasste sich deshalb mit der Frage, ob und wie die Selbsterneuerung von mESZ durch die Topografie des Substrats beeinflusst werden kann. Hierfür wurden drei verschiedene organische Polymersubstrate verwendet, die chemisch identisch sind, jedoch in ihrem Grad an Rauheit variieren. Um Einflüsse von Nachbarzellen und EZM-Proteinen auszuschließen, wurden die Experimente auf Einzelzellebene an nicht beschichteten Substraten durchgeführt.

3.2.1 Die Anzahl adhärenter mESZ variiert auf HEMA-EDMA-Substraten unterschiedlicher Topografie

Um den Einfluss der Topografie auf das Verhalten der mESZ zu untersuchen, wurden in Kooperation mit Pavel Levkin, Victoria Nedashkivska und Tina Tronser (ITG, KIT) Polymersubstrate unterschiedlicher Topografie hergestellt. Die Herstellung der Substrate basiert auf einer UV-initiierten *co*-Polymerisation der beiden organischen Monomere HEMA und EDMA. Die Anwesenheit beziehungsweise das Verhältnis der beiden Porogene Decanol und Cyclohexanol während der Polymerisation bestimmt dabei den Grad der Rauheit des Substrats (Jaggy et al. 2015). Während glatte G-Substrate flach und nur geringfügig strukturiert sind, weisen nano-raue N-Substrate eine poröse Strukturierung auf, die jedoch in z-Richtung nur geringe Ausmaße hat (Abb. 3.9 A). Mikro-nano-raue MN-Substrate hingegen besitzen eine hierarchische Rauheit im Mikro- und Nanometerbereich. Das bedeutet, dass die Oberfläche übersät ist mit rundkörnigen Polymer-Partikeln, welche wiederum selbst eine eigene Feinstrukturierung aufweisen (Abb. 3.9 A sowie (Jaggy et al. 2015)). Um zu testen, ob die mESZ auf den nicht beschichteten Oberflächen adhäreren, wurden sie als Einzelzellen auf die verschiedenen Substrate ausgesät und nach einem Tag Kultivierung am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Dabei wurde festgestellt, dass die Zellen prinzipiell auf allen drei Substraten adhäreren, dass jedoch Unterschiede in der Zellzahl bestehen. Dabei waren deutlich mehr mESZ auf dem MN-Substrat im Vergleich zu den anderen beiden Substraten aufzufinden (Abb. 3.9 B). Die Anzahl der Zellen auf MN-Substrat war ungefähr doppelt so hoch als auf dem N- und G-Substrat (Abb. 3.9 C).

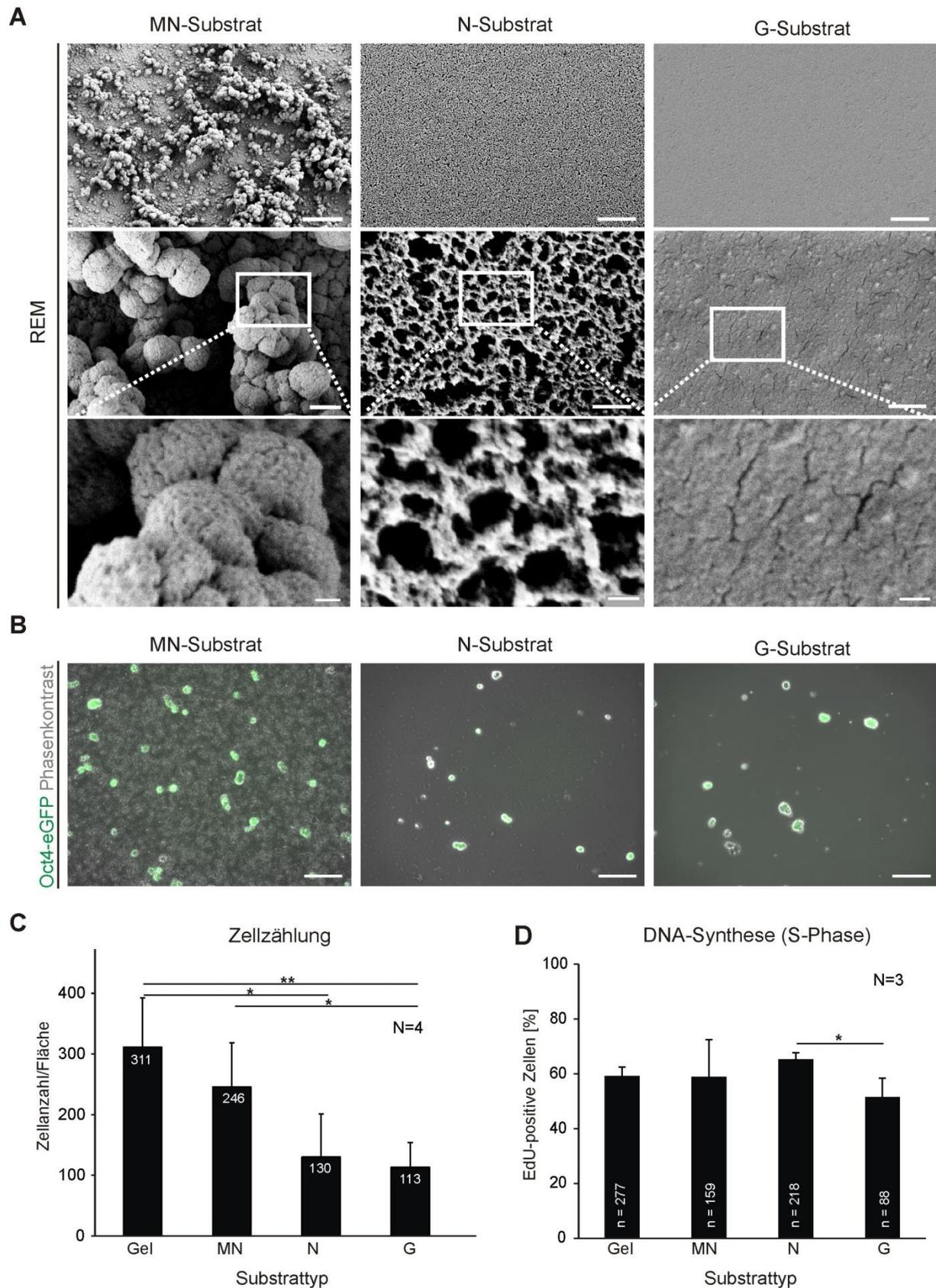


Abb. 3.9: Die Anzahl adhärenter mESZ variiert auf HEMA-EDMA-Substraten unterschiedlicher Topografie. A Elektronenmikroskopische Übersichts- (oben) und Detailaufnahmen (Mitte und unten) von mikro-nano-rauen (MN), nano-rauen (N) oder glatten (G) HEMA-EDMA-Substraten (Aufnahmen von V. Nedashkivska, ITG). Der weiße Rahmen markiert den unten vergrößerten Bereich der Detailaufnahme. MN-Substrate sind sehr rau, mit globulären Polymerstrukturen, die zufällig auf der Oberfläche verteilt

sind. Diese Strukturen weisen wiederum eine Strukturierung im Nanometerbereich auf. MN-Substrate besitzen demnach eine hierarchische Rauheit im Micro- und Nanometerbereich. N-Substrate sind schwammartig strukturiert, mit poröser, jedoch relativ planer Oberfläche. G-Substrate sind annähernd glatt und unstrukturiert. Maßstab: 5 μm (oben), 500 nm (Mitte), 100 nm (unten). **B** Beispielhafte Aufnahmen von mESZ, die 24 h auf HEMA-EDMA Oberflächen kultiviert wurden. Dargestellt sind Oct4-eGFP (grün) und Phasenkontrast (grau). Auf MN-Substrat waren mehr Zellen detektierbar, als auf N- und G-Substraten. Maßstab: 50 μm . **C** Quantifizierung der Daten aus (B). Nach 24 h Kultivierung waren im Vergleich zur Kontrolle auf Gelatine und zum MN-Substrat signifikant weniger Zellen auf N- und G-Substrat vorhanden (t-Test: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung). **D** Quantifizierung der Proliferationsrate der mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten mit dem S-Phasen-Marker EdU. Die Zellen wurden 4 h auf den Substraten kultiviert, anschließend 10 min mit 10 μM EdU inkubiert und fixiert. Im Vergleich zur Positivkontrolle (Gelatine) waren keine Unterschiede an EdU-positiven Zellen auf den HEMA-EDMA-Substraten zu verzeichnen. Es zeigte sich lediglich eine signifikante Reduktion der EdU-positiven mESZ auf dem G-Substrat im Vergleich zum N-Substrat (zweiseitiger t-Test: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung).

Ein Vergleich mit Gelatine-beschichtetem Glas als Positivkontrolle zeigte eine signifikante Abnahme der Zellzahl bei der Kultivierung auf N- und G-Substrat (Abb. 3.9 C). Der Vergleich zwischen der Zellzahl auf Gelatine und dem MN-Substrat zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.9 C). Da eine unterschiedliche Zellzahl auch durch Unterschiede im Proliferationsverhalten hervorgerufen werden kann, wurde zusätzlich getestet, ob sich die Proliferationsrate der Zellen in Bezug auf die Topografie ändert. Hierfür wurden die Zellen auf den verschiedenen Oberflächen vier Stunden nach Aussaat mit dem Proliferationsmarker EdU markiert, und der prozentuale Anteil an EdU-positiven Zellen ermittelt (Abb. 3.9 D). Sowohl auf Gelatine als auch auf dem MN- und N-Substrat lag der Prozentsatz an EdU-positiven Zellen bei ungefähr 60%, was für pluripotente Zellen normal ist (Stead et al. 2002, Becker et al. 2006). Lediglich auf dem G-Substrat war eine leichte Reduktion EdU-markierter Zellen auf 52% zu verzeichnen, was sich im Vergleich zum N-Substrat als signifikant erwies (Abb. 3.9 D). Somit scheint die Kultivierung auf glatten Substraten die Proliferation der mESZ leicht zu hemmen, jedoch unverhältnismäßig zur beobachteten Abnahme der Zellzahl auf diesen Substraten. Insgesamt adhären die mESZ also gut auf MN-Substraten und weniger gut auf N- und G-Substraten.

3.2.2 mESZ bleiben während der Kultivierung auf MN-Substraten Oct4-positiv

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1 legen nahe, dass die Adhäsionskraft der mESZ zwischen MN-, N- und G-Substraten variiert. Für viele Stammzelltypen ist eine korrekte Verankerung an die jeweilige Nische wichtig für die Aufrechterhaltung des Stamzellcharakters (Rezza et al. 2014, Viswanathan et al. 2014). Demnach könnte die stärkere Adhäsion auf MN-Substraten einen positiven Effekt auf die Selbsterneuerung der mESZ haben. Diese Hypothese wurde mit Hilfe des Oct4-eGFP Reportergens überprüft. Hierfür wurden die Zellen auf die drei verschiedenen HEMA-EDMA-Substrate sowie auf Feederzellen (Positivkontrolle) ausgesät und während der

dreitägigen Kultivierung am Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Bereits nach einem Tag zeigten sich auf dem N- und G-Substrat einzelne, nicht Oct4-positive Zellen, was bei der Kultivierung auf MN-Substraten und Feederzellen weniger zu beobachten war (Abb. 3.10 A, oben).

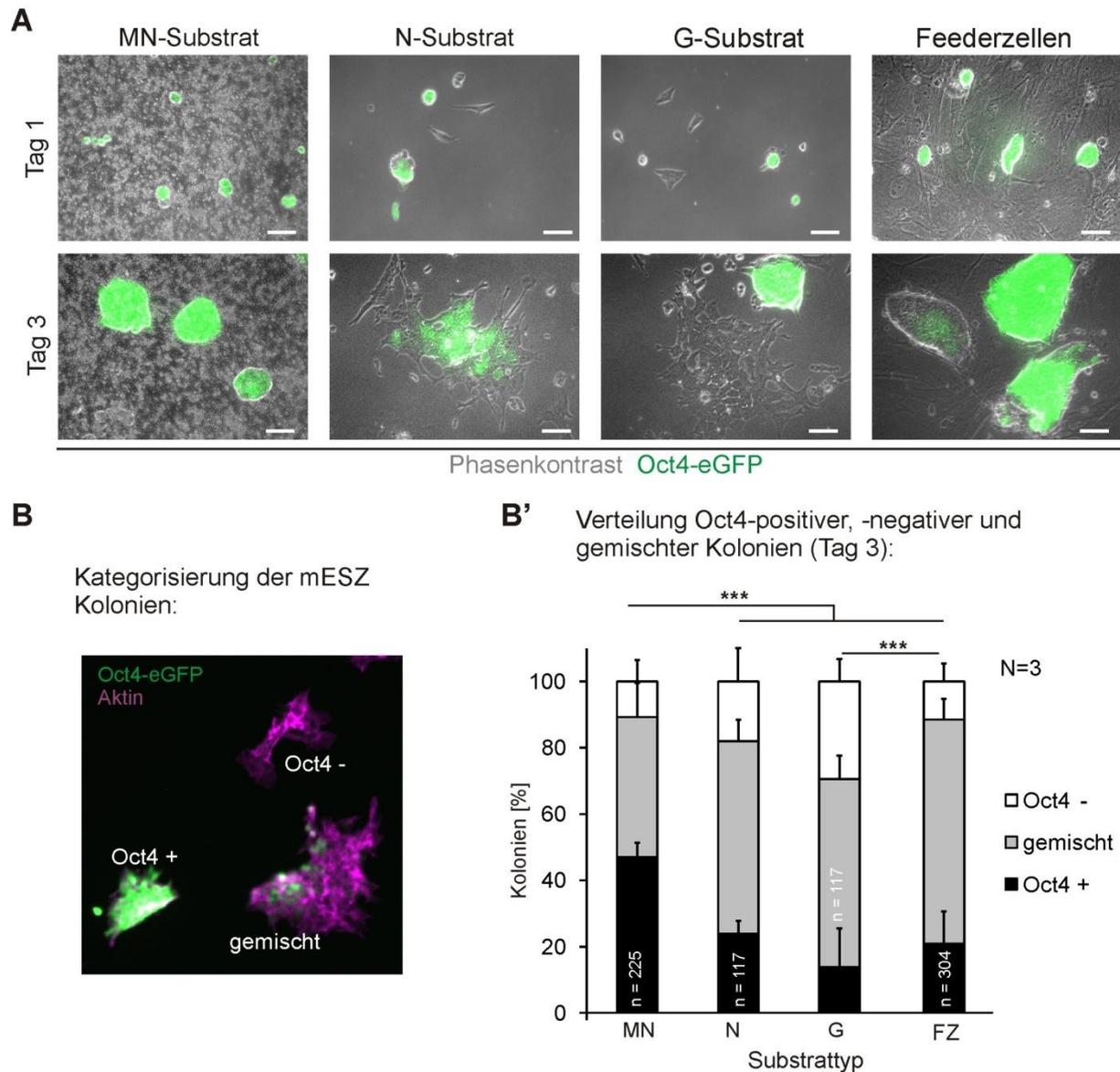


Abb. 3.10: Das Oct4-eGFP Signal der mESZ bleibt während der Kultivierung auf MN-Substraten erhalten. **A** Die Oct4-eGFP-exprimierenden mESZ wurden für 1 bzw. 3 Tage in mESZ Medium+LIF auf MN- N- und G-Substraten sowie auf Feederzellen (FZ, Positivkontrolle) kultiviert. Dargestellt sind Oct4-eGFP (grün) und der Phasenkontrast (grau). mESZ-Kolonien blieben weitestgehend Oct4-positiv auf MN-Substraten und Feederzellen, verloren jedoch teilweise ihr Oct4-Signal auf N-, G-Substraten. Maßstab. 50 μ m. **B** Beispiel von Oct4-positiven (Oct4+), Oct4-negativen (Oct4-) und gemischten Kolonien. Dargestellt sind Oct4-eGFP (grün) und das Aktin-Zytoskelett (magenta). **B'** Quantifizierung der Daten aus (A). Prozentsatz an Oct4-eGFP-positiven (schwarz), -negativen (weiß) und gemischten (grau) mESZ Kolonien nach dreitägiger Kultivierung auf HEMA-EDMA-Substraten und Feederzellen. Auf MN-Substrat war der Prozentsatz an Oct4-eGFP-positiven Kolonien mehr als doppelt so hoch als auf allen anderen getesteten Substraten (Chi² Test: *** = $p < 0,001$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung).

Nach drei Tagen Kultivierung verschärfte sich dieser Effekt. Hier waren sowohl auf dem MN-Substrat als auch auf Feederzellen viele Oct4-positive Kolonien aufzufinden, welche eine für ESZ typische runde Morphologie aufwiesen (Abb. 3.10 A, unten). Dies war jedoch nur in Anwesenheit von LIF im Stammzellmedium zu beobachten. Wenn die mESZ in Medium ohne LIF auf MN- und Feederzell-Substraten kultiviert wurden, so verloren sie bereits nach drei Tagen das Oct4-Signal und zeigten ein reduziertes Wachstum der Kolonien (Appendix, Abb. A3). Auf N- und G-Substraten hingegen waren auch in Anwesenheit von LIF nach drei Tagen häufig weniger kompakte Kolonien mit einem großen Anteil an Oct4-negativen Zellen zu verzeichnen (Abb. 3.10 A, unten), was ein starkes Anzeichen für einen Pluripotenzverlust ist (De Los Angeles et al. 2015). Um diese Ergebnisse zu quantifizieren, wurde die Verteilung verschiedener Kategorien an Stammzellkolonien nach drei Tagen auf den verschiedenen Substraten in Anwesenheit von LIF ausgezählt. Dabei wurden Oct4-positive Kolonien als jene Kolonien definiert, die lediglich Oct4-positive Zellen beinhalteten. Eine gemischte Kolonie besaß sowohl Oct4-positive als auch Oct4-negative Zellen und Oct4-negative Kolonien bestanden ausschließlich aus Oct4-negativen Zellen (Abb. 3.10 B). Die Auswertung erfolgte an fixierten Proben, bei denen zur Markierung Oct4-negativer Zellen das Aktin-Zytoskelett angefärbt war. Nach dreitägiger Kultivierung war knapp die Hälfte aller Kolonien auf MN-Substraten Oct4-positiv und der Prozentsatz gemischter Kolonien und Oct4-negativer Kolonien war am niedrigsten im Vergleich zu allen andern getesteten Substraten (Abb. 3.10 B'). Diese Unterschiede waren hoch signifikant. Auf dem G-Substrat hingegen waren am wenigsten Oct4-positive Kolonien zu verzeichnen und am meisten differenzierte, Oct4-negative Kolonien, was im Vergleich zur Positivkontrolle (FZ) einen signifikanten Unterschied ergab. Demnach scheint eine kurzzeitige Kultivierung (drei Tage) von mESZ auf MN-Substraten die Oct4-Expression zu erhalten, wohingegen die Zellen auf N- und G-Substraten vermehrt spontan differenzieren.

3.2.3 Die Langzeitkultivierung von mESZ auf MN-Substraten erhält die Pluripotenz

Die vorangegangenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die besondere hierarchische Rauheit der MN-Substrate die Pluripotenz der mESZ aufrecht erhält, was bei den anderen beiden HEMA-EDMA-Substraten nicht der Fall ist. Allerdings könnte es sich im Fall des MN-Substrats auch nur um eine Verzögerung der Differenzierung handeln. Deshalb wurde im nächsten Schritt eine Langzeitkultivierung der mESZ auf MN-Substraten und zur Kontrolle auf Feederzellen mit regelmäßiger Subkultivierung durchgeführt. Auch nach dreiwöchiger Kultivierung war die Mehrheit der Kolonien auf dem MN-Substrat noch sehr kompakt und Oct4-positiv, vergleichbar zum Verhalten auf Feederzellen (Abb. 3.11 A). Zudem fiel auf, dass die Homogenität der Kolonien bezogen auf die Oct4-eGFP-Signalintensität sowie Zirkularität der Kolonien im Laufe der Zeit auf MN-Substraten zunahm. Eine hohe Zirkularität kann als Anzeichen für

undifferenzierte Kolonien angesehen werden (eigene Beobachtungen und (Rosowski et al. 2015)). Anhand der Fluoreszenzbilder wurde deshalb die Entwicklung der Zirkularität der Oct4-positiven Kolonien auf MN-Substrat mit denen auf Feederzellen während der Langzeitkultivierung verglichen (Abb. 3.11 B). Dabei zeigte sich, dass die Kolonien auf Feederzellen über die Kultivierungsdauer von vier Wochen eine relativ konstante Zirkularität von ca. 0,5 aufwiesen. Auf MN-Substraten war die Zirkularität der mESZ-Kolonien zu Beginn bei 0,4 und hatte am Ende der Kultivierung einen Wert von ungefähr 0,65. Demnach scheint die Langzeitkultivierung von mESZ auf MN-Substraten zu einer homogenen, undifferenzierten Zellpopulation zu führen. Um einen möglichen Pluripotenzerhalt jedoch zweifelsfrei zu beweisen, sollte ein funktioneller Nachweis zur Pluripotenz, das heißt die Fähigkeit zur Differenzierung in alle drei Keimblätter, durchgeführt werden. Eine Möglichkeit hierfür ist die Differenzierung der potentiellen pluripotenten Zellen zu *Embryoid Bodies* (EBs). Das sind 3D-Agglomerate von ESZ, in denen unter Abwesenheit von LIF die Differenzierung in alle drei Keimblätter in ungeordneter Weise stattfindet (Ader and Tanaka 2014). Dem folgend wurden die mESZ für 2,5 Wochen auf dem MN-Substrat in Anwesenheit von LIF kultiviert und danach vereinzelt (Abb. 3.11 C). Die Zusammenlagerung der Zellen zu EBs erfolgte durch zweitägige Kultivierung ohne LIF in kopfüber-hängenden Mediumstropfen - sogenannten *Hanging Drops* (Abb. 3.11 C). Danach wurden die EBs für weitere zwölf Tage auf FN kultiviert. Der Nachweis der verschiedenen Keimblätter erfolgte an fixierten Proben durch eine Immunfärbung. Dabei wurde als Marker für das Endoderm FOXA2, für das Mesoderm Brachyury und für ektodermale Zellen TUJ1 (auch bekannt als β III-Tubulin) verwendet (Martí et al. 2013). Innerhalb der so gewonnenen EBs wurden Subpopulationen von Zellen identifiziert, die positiv für den Endoderm-Marker FOXA2 waren (Abb. 3.11 D links, Pfeil). Das Signal trat im Bereich der Zellkerne auf, wie es für einen Transkriptionsfaktor zu erwarten ist. Auch der mesodermale Transkriptionsfaktor Brachyury war im Zellkern einiger Zellen innerhalb der EBs nachzuweisen (Abb. 3.11 D Mitte, Pfeil). Desweiteren wurden Zellen mit neuronalem Phänotyp in EBs mit dem Marker TUJ1 detektiert, der ausschließlich in ektodermalen Neuronen exprimiert wird (Abb. 3.11 D rechts, Pfeil). Somit konnten nach der mESZ Langzeitkultivierung auf MN-Substrat alle drei Keimblätter in den EBs nachgewiesen werden. Demnach waren die mESZ auch nach einer längeren Kultivierungszeit auf MN-Substraten noch funktionell pluripotent.

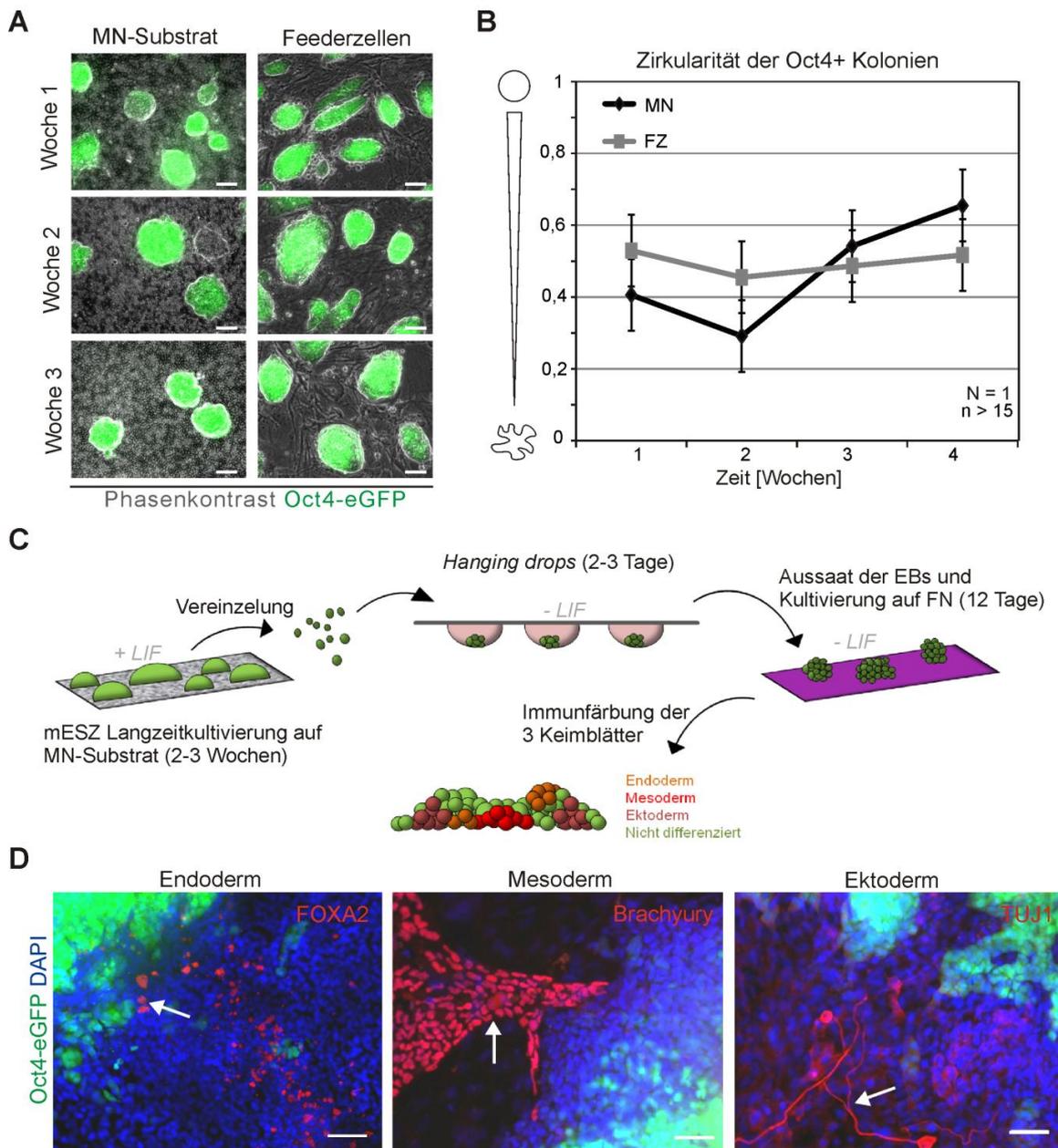


Abb. 3.11: Die Langzeitkultivierung von mESZ auf MN-Substrat erhält die Pluripotenz der Zellen. **A** Oct4-eGFP exprimierende mESZ wurden in Anwesenheit von LIF für 1-3 Wochen auf MN-Substrat oder Feederzellen mit regelmäßigem Passagieren kultiviert. Die Zellkolonien wurden durch Phasenkontrastmikroskopie (grau) und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (Oct4-eGFP, grün). Die runde Morphologie der Kolonien sowie deren Oct4-Signal blieben auf MN-Substrat vergleichbar zu Zellen auf Feederzell-Substrat erhalten. Maßstab: 50 μ m. **B** Messung der Zirkularität von Oct4-positiven mESZ-Kolonien auf MN-Substrat (schwarz) und Feederzellen (FZ, grau) nach 1,2,3 und 4 Wochen Kultivierung inklusive LIF und regelmäßigem Passagieren. Die Zirkularität der mESZ-Kolonien auf dem MN-Substrat nahm mit der Zeit zu. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. **C** Schema zum Nachweis der funktionellen Pluripotenz von mESZ mittels *Embryoid bodies* (EBs). Die auf MN-Substraten kultivierten Zellen wurden vereinzelt, in Medium (-LIF) tropfenweise an die Decke einer Petrischale appliziert und *upside-down* kultiviert. Nach zwei Tagen wurden sie auf FN ausgesät und weitere 12 Tage kultiviert. Danach wurden die EBs mittels Immunzytochemie auf Marker für alle drei Keimblätter untersucht. **D** Beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen von EBs abstammend von mESZ, die für 2,5 Wochen auf MN-Substraten kultiviert wurden (siehe C). Die Proben wurden fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Dargestellt ist Oct4-eGFP (grün), die Zellkerne (DAPI, blau) sowie spezifische Keimblattmarker (rot). Als Marker für Endoderm, Mesoderm und Ektoderm wurden die Proteine FOXA2, Brachyury bzw. TUJ1 verwendet. Es waren alle drei Keimblätter innerhalb der EBs nachweisbar (Pfeile). Maßstab: 50 μ m.

3.2.4 Die Adhäsion der mESZ an MN-Substrate wird mit Hilfe von Zellausläufern realisiert

Nachdem verdeutlicht werden konnte, dass eine Kultivierung der mESZ auf MN-Substraten deren Pluripotenz aufrechterhält, sollte nun untersucht werden, welche Mechanismen hier zugrunde liegen. In Kapitel 3.2.1 wurde gezeigt, dass die mESZ auf MN-Substraten besser adhäreren als auf N- oder G-Substraten. Da die Adhäsion für die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften eine wichtige Rolle spielt (Rezza et al. 2014, Viswanathan et al. 2014), könnte dies ein Grund für die Pluripotenz der mESZ auf MN-Substraten sein. Deshalb wurde im Folgenden der Adhäsionsmechanismus genauer untersucht. Zuerst wurde die Morphologie der mESZ auf den HEMA-EDMA-Substraten unterschiedlicher Topografie durch elektronenmikroskopische Aufnahmen untersucht. Dies erfolgte nach einer Kultivierungsdauer von vier Stunden. Dabei zeigte sich, dass die einzelnen Zellen auf MN-Substraten dünne Zellausläufer aufwiesen, die in das Substrat reichten (Abb. 3.12 A). Auf N-Substraten wurden die Ausläufer seltener beobachtet und waren breiter und auf dem G-Substrat waren sie fast nicht vorhanden (Abb. 3.12 A). Eine genauere Betrachtung der Kontaktstelle zwischen mESZ und dem MN-Substrat mit dem REM machte deutlich, dass diese Ausläufer bisweilen die Zelle wie Zeltschnüre an das Substrat verankerten (Abb. 3.12 B). Andere Ausläufer „griffen“ wie eine Hand oder Finger um die dreidimensionalen Polymerpartikel herum (Abb. 3.12 B, Pfeile). Demnach scheint die Oberflächentopografie der MN-Substrate förderlich für die Adhäsion der mESZ via Zellausläufer zu sein, welche auf N- und G-Substraten selten bis gar nicht ausgebildet werden können.

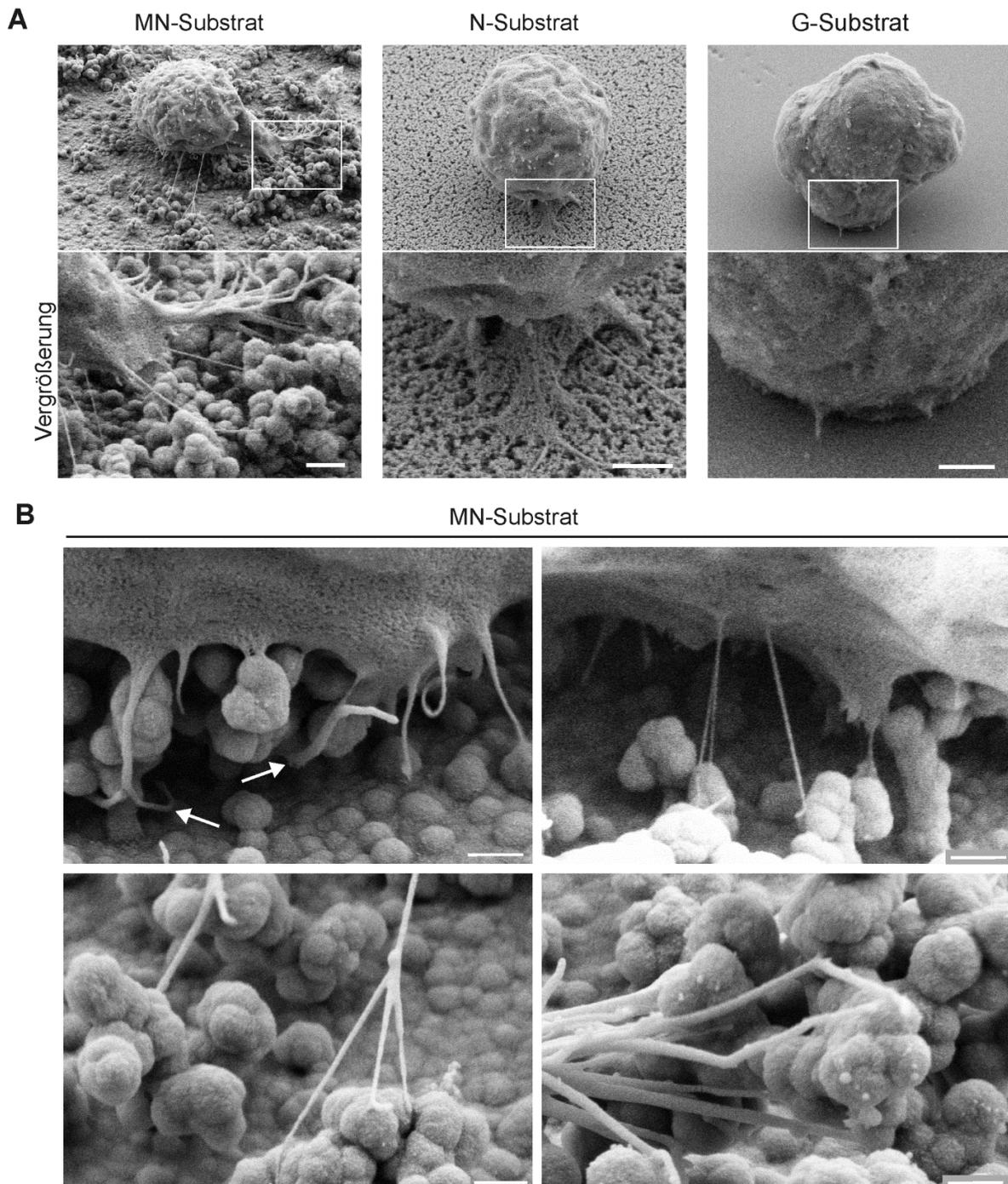


Abb. 3.12: mESZ adhären an MN-Substrate über Zellausläufer. **A** Analyse der Einzelzellmorphologie nach 4h Kultivierung auf HEMA-EDMA-Substraten mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM). Oben: Übersichtsbilder, unten: Detailaufnahme. Der weiße Rahmen markiert den unten vergrößerten Bereich. mESZ auf MN-Substrat wiesen dünne Zellausläufer auf, welche in das Substrat reichten. Auf N-Substraten war dies weniger und auf dem G-Substrat fast nicht zu beobachten. Maßstab: 1 μm . **B** Beispielhafte REM-Detailaufnahmen der Kontaktzone zwischen mESZ und dem MN-Substrat nach 4 h Kultivierung. Die Zellausläufer der mESZ dienen zur Verankerung der Zelle auf der rauen Substratoberfläche und reichten teilweise bis unter die dreidimensionalen Polymerstrukturen (oben links, Pfeile). Maßstab: 500 nm.

3.2.5 Die Adhäsion der mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten ist Integrin-unabhängig

Die Adhäsion vieler verschiedener Zelltypen an Bestandteile der EZM wird über Integrin-abhängige Fokalkontakte bewerkstelligt (Harburger and Calderwood 2009). Für mESZ auf MN-Substrat wurde an Hand von REM-Aufnahmen ein alternativer Mechanismus über verankernde Zellausläufer beobachtet (Kapitel 3.2.4). Deshalb sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob Integrin-vermittelte Kontakte zusätzlich auf MN-Substraten vorhanden sind und inwiefern dies für die anderen beiden HEMA-EDMA-Substraten der Fall ist. Hierzu wurden LSM-Aufnahmen an mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten und Feederzellen nach vierstündiger Kultivierungsdauer angefertigt. Die Proben wurden fixiert und mit einer Antikörperlösung gegen Paxillin, ein Marker für Integrin-abhängige Zell-Matrix-Kontakte (Deakin and Turner 2008), gefärbt. Zusätzlich wurde das Aktin-Zytoskelett markiert, um die Zellmorphologie darzustellen. Ähnlich zu den REM-Aufnahmen konnten auch hier über die Aktinfärbung in Zellen auf MN-Substraten dünne Zellausläufer beobachtet werden, welche auf N- und G-Substraten nicht vorhanden waren (Abb. 3.13, Pfeile).

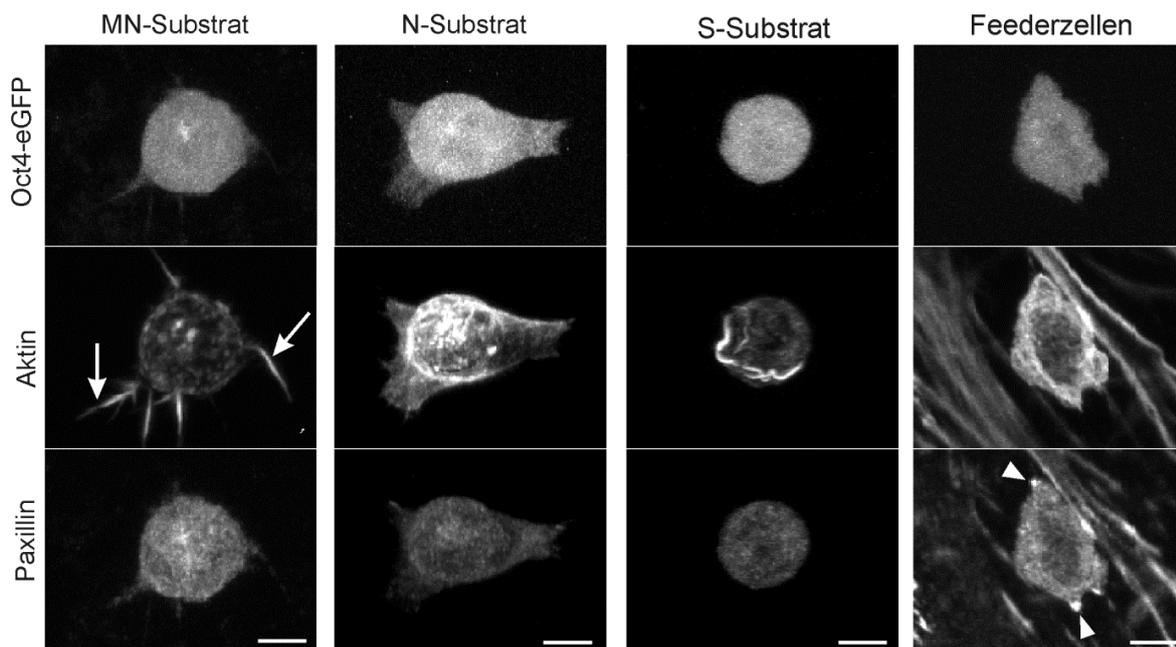


Abb. 3.13: Die Adhäsion der mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten ist Integrin-unabhängig. Maximalprojektionen konfokaler Aufnahmen der mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten und Feederzellen. Die Oct4-eGFP exprimierenden Zellen wurden nach 4 h auf den Substraten fixiert und das Aktin-Zytoskelett sowie Paxillin (als Marker für Integrin-vermittelte Fokalkontakte) immunzytochemisch gefärbt. Auf dem MN-Substrat waren dünne, Aktin-positive Zellausläufer (Pfeile) zu erkennen. Im Gegensatz zu mESZ auf Feederzellen, wurden auf allen drei HEMA-EDMA-Substraten keine Paxillin-Cluster (Pfeilspitze) in den mESZ detektiert. Maßstab: 5 μ m.

Bei keinem der HEMA-EDMA-Substrate wurden Paxillin-Cluster innerhalb der mESZ identifiziert, was auf eine Abwesenheit von Fokalkontakten hinweist. Prinzipiell sind die mESZ jedoch dazu in

der Lage, Fokalkontakte zu bilden, was durch die Paxillin-Cluster in mESZ auf Feederzellen (Abb. 3.13, Pfeilspitze) verdeutlicht wird. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Fokalkontakt-Protein Vinculin (Harburger and Calderwood 2009) und phosphoryliertem Paxillin (pPAX) als Marker für aktive Integrin-Signaltransduktion (Bellis et al. 1997) erhalten (Appendix, Abb. A4). Insgesamt adhären die mESZ also an MN-Substrate über Aktin-positive Zellausläufer, wohingegen sie auf keinem der HEMA-EDMA-Substrate Fokalkontakte ausbilden.

3.2.6 Die Aktivierung der Integrin-Signaltransduktion auf MN-Substraten durch FN führt zu Oct4-Verlust

In Kapitel 3.2.5 wurde demonstriert, dass HEMA-EDMA-Substrate die Bildung von Fokalkontakten in mESZ verhindern. Interessanterweise existieren mehrere Studien, die zeigen, dass die Abwesenheit einer aktiven Integrin-Signaltransduktion innerhalb embryonaler Stammzellen zu einer Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters beitragen (Hayashi et al. 2007, Hunt, Singh and Schwarzbauer 2012, Brafman et al. 2013). Somit könnte, neben der alternativen Adhäsion durch Zellausläufer, die Abwesenheit von Fokalkontakten auf MN-Substrat einen zusätzlichen positiven Effekt auf die mESZ-Selbsterneuerung ausüben. Demnach müsste eine Aktivierung der Integrin-Signaltransduktion auf MN-Substrat zum Pluripotenzverlust der mESZ führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden MN-Substrate hergestellt, die mit FN beschichtete waren (MN-FN-Substrate). FN führt zu einer Aktivierung der Integrin-Signalwege in gewöhnlichen Zellen sowie in mESZ (Bellis et al. 1997, Hunt et al. 2012). Die mikro-nano-raue Topografie war bei MN-FN-Substraten vergleichbar zu reinen MN-Substraten (Abb. 3.14 A). Um zu demonstrieren, dass die Integrin-Signaltransduktion durch die FN-Beschichtung in den mESZ aktiv war, wurde die phosphorylierte Form der *Focal Adhesion Kinase* (pFAK) als Marker in einer Immunfärbung verwendet. In der Tat konnten nach vierstündiger Kultivierung pFAK-Cluster in den mESZ auf MN-FN-Substraten detektiert werden, die auf MN-Substraten nicht auftraten (Abb. 3.14 B). Nach einer dreitägigen Kultivierung und anschließenden Immunfärbung der mESZ auf MN-FN und MN-Substrat zeigten sich morphologische Unterschiede zwischen den mESZ-Kolonien auf beiden Oberflächen. Im Vergleich zu Kolonien auf MN-Substraten waren die Kolonien auf MN-FN-Substraten wenig kompakt und wenig zirkulär (Abb. 3.14 C). Zudem war hier das Oct4-eGFP Signal deutlich reduziert. Eine Auszählung Oct4-positiver, Oct4-negativer und gemischter Kolonien (vergl. Abb. 3.10 B) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen MN- und MN-FN-Substraten (Abb. 3.14 D). Der Prozentsatz differenzierter Kolonien (Oct4⁻) war auf MN-FN-Substraten mehr als doppelt so hoch als auf MN-Substraten (Abb. 3.14 D). Dafür war eine Reduktion des Anteils an Oct4-positiven Kolonien von 46% auf 31% auf MN-FN-Substraten im Vergleich zum MN-Substrat zu verzeichnen.

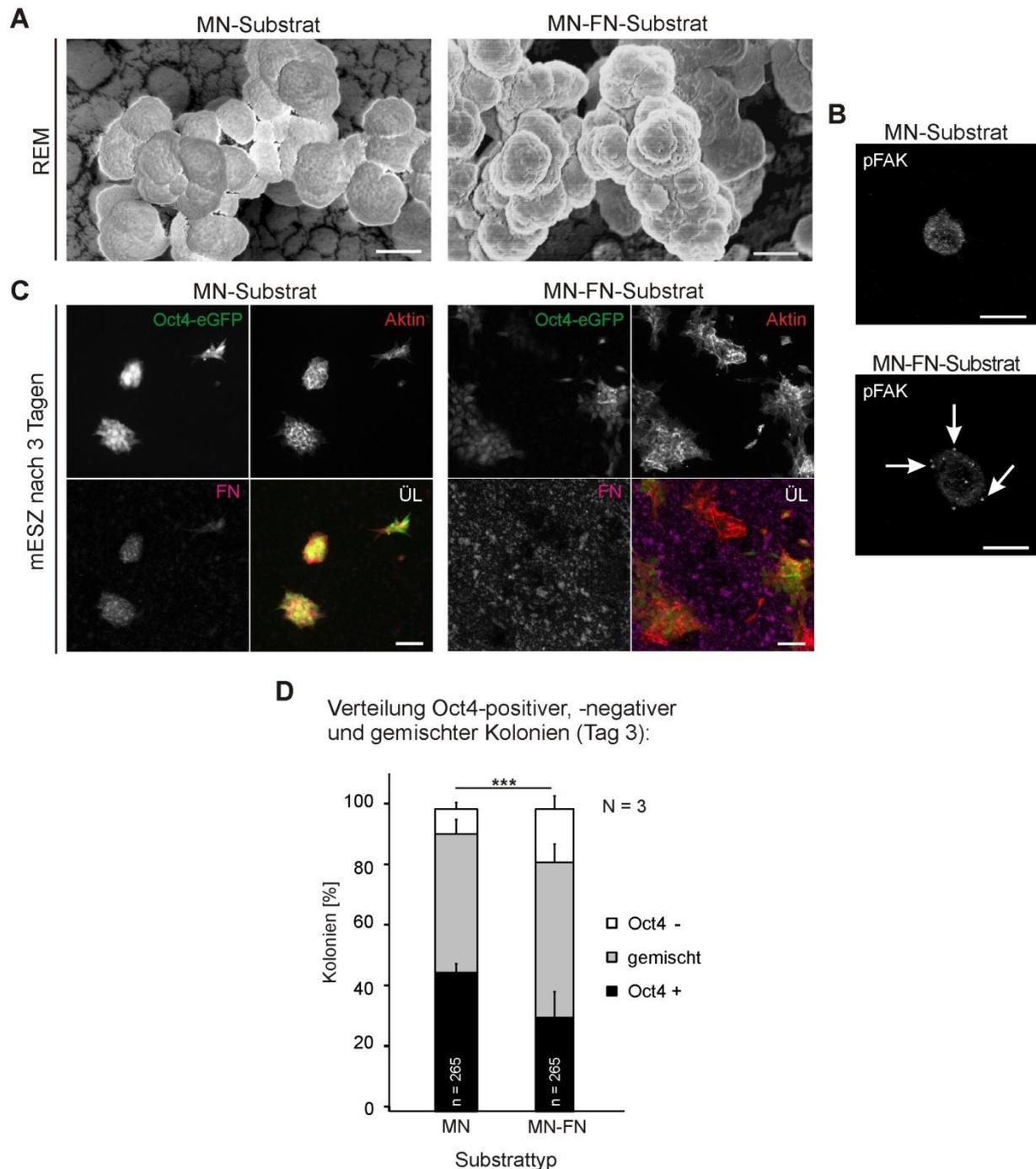


Abb. 3.14: Die Aktivierung der Integrin-Signaltransduktion auf MN-Substraten führt zum Oct4-Verlust. **A** Das MN-Substrat wurde mit 10 µg/µl FN beschichtet (MN-FN-Substrat), um die Integrin-Signaltransduktion in den mESZ zu aktivieren. Die REM-Aufnahmen zeigen eine vergleichbare Oberflächentopografie für MN- und MN-FN-Substrate. Maßstab: 500 nm. (Abbildungen von V. Nedashkivska, ITG) **B** Einzelne mESZ, nach vierstündiger Kultivierung auf MN- und MN-FN-Substraten. Die Zellen wurden fixiert und immunzytochemisch markiert. Als Marker für die aktive Integrin-Signaltransduktion wurde der Antikörper gegen phosphorylierte *Fokal-Adhesion Kinase* (pFAK) verwendet. pFAK Cluster (Pfeile) wurden vermehrt in Zellen auf MN-FN-Substrat detektiert. Maßstab: 10 µm. **C** Oct4-eGFP-exprimierende mESZ wurden 3 Tage lang auf MN- und MN-FN-Substraten kultiviert, fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Dargestellt ist Oct4-eGFP (grün), Aktin (rot) sowie FN (magenta). ÜL = Überlagerung. Auf MN-FN-Substrat waren die Kolonien weniger kompakt und zeigten ein verringertes Oct4-eGFP Signal. **D** Prozentsatz an Oct4-eGFP-positiven (schwarz), -negativen (weiß) und gemischten (grau) mESZ Kolonien nach dreitägiger Kultivierung auf MN- und MN-FN Substrat. Auf dem MN-FN Substrat war der Prozentsatz an Oct4-positiven Kolonien im Vergleich zum MN-Substrat signifikant verringert (Chi² Test: *** = p ≤ 0,001; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung).

Dadurch wird deutlich, dass eine Aktivierung der Integrin-Signaltransduktion in mESZ auf MN-Substraten trotz der MN-Topografie zu einer verstärkten Differenzierung führt.

3.2.7 Die Topografie der HEMA-EDMA-Substrate beeinflusst die Aktivierung von YAP

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.6 verdeutlichen, dass die Hemmung der Integrin-Signaltransduktion auf MN-Substraten einen positiven Einfluss auf die Pluripotenz der Zellen hat. Dieser Mechanismus kann jedoch nicht alleinig ausschlaggebend für die Aufrechterhaltung des Stammzellschicksals auf MN-Substraten sein, da auf N- und G-Substraten ebenfalls keine Fokalkontakte detektiert werden konnten, hier die Zellen jedoch vermehrt differenzierten (Kapitel 3.2.2). Demnach muss die Topografie eine sehr starke Rolle beim Pluripotenzerhalt spielen. Der augenscheinlichste Unterschied der mESZ auf MN-Substraten zu den anderen beiden HEMA-EDMA-Substraten war die Morphologie der Zellen. Die auf den MN-Substraten kultivierten mESZ bildeten lange Zellausläufer zur Verankerung an die raue Oberfläche aus. Solch eine Verankerung könnte zu einer erhöhten intrazellulären Kontraktilität führen, welche wiederum eine Aktivierung des Mechanotransduktions-Proteins YAP zu Folge hat (Halder et al. 2012). Da YAP einen positiven Effekt auf die Aufrechterhaltung der Pluripotenz hat (Lian et al. 2010, Beyer et al. 2013), könnte dies erklären, warum die mESZ auf MN-Substraten weniger stark spontan differenzieren. Analog zu dem Experiment aus Kapitel 3.1.8 wurde deshalb auch für mESZ auf MN- und G-Substraten die relative YAP Lokalisation und damit der Grad der YAP-Aktivierung bestimmt. Dabei wurde erneut anhand immungefärbter mESZ das Verhältnis zwischen der YAP-Signalintensität im Zellkern zur Intensität im Zytoplasma ermittelt (Abb. 3.15 A). Die Fluoreszenzaufnahmen zeigten, dass im Zellkern von Zellen auf dem rauen MN-Substrat mehr YAP lokalisiert war als im Zytoplasma. Dies konnte bei mESZ auf G-Substraten seltener beobachtet werden (Abb. 3.15 B). Die Quantifizierung bestätigte diesen Eindruck (Abb. 3.15 B'). Die relative YAP-Lokalisation war auf MN-Substraten im Vergleich zu G-Substraten um einen Wert von 0,3 signifikant erhöht. Somit führt die Kultivierung von mESZ auf MN-Substraten zu einer verstärkten YAP-Aktivität im Vergleich zur Kultivierung auf G-Substraten.

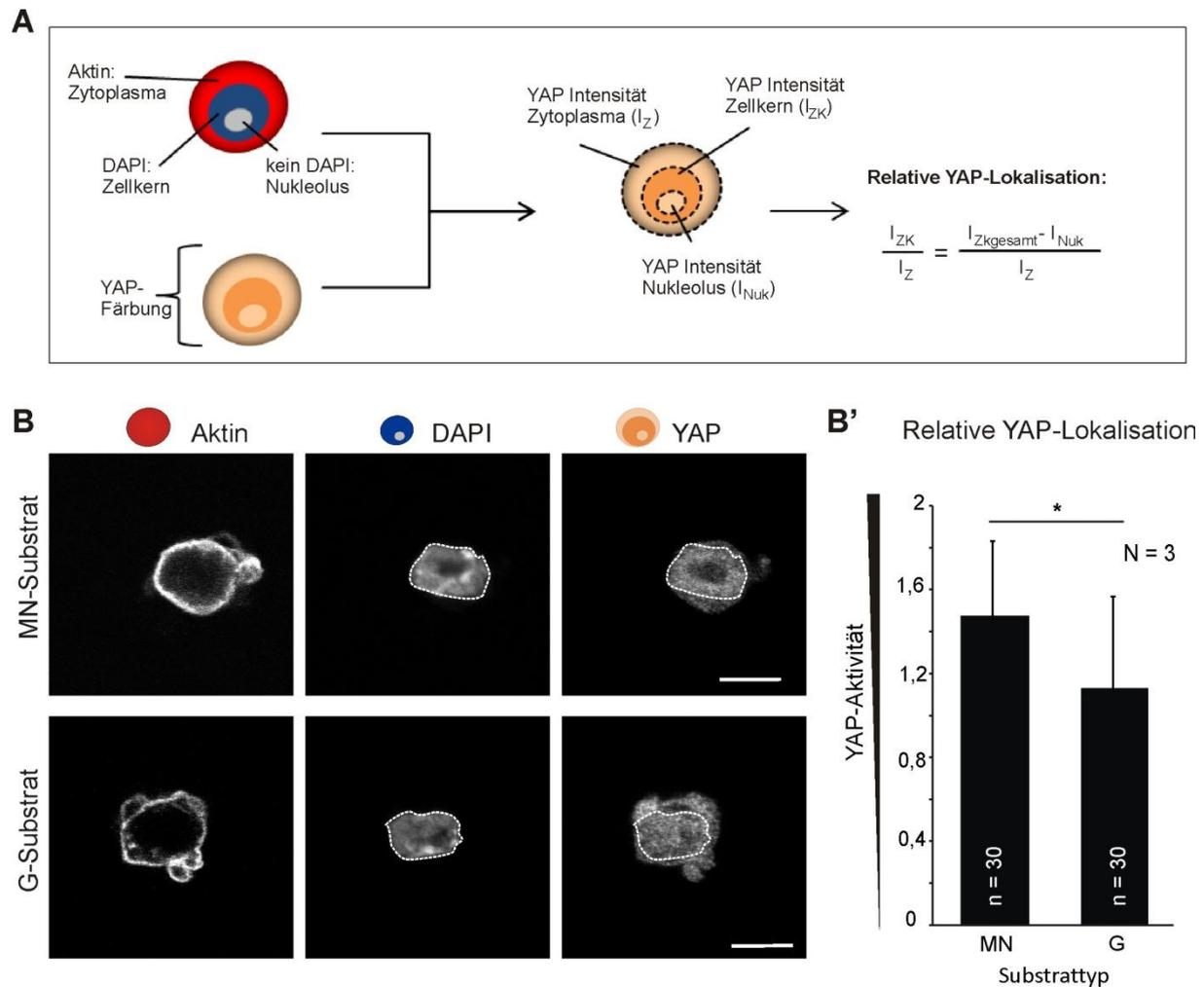


Abb. 3.15: mESZ auf MN-Substrat weisen eine erhöhte YAP-Aktivierung im Vergleich zu Zellen auf G-Substrat auf. **A** Schema zur Auswertung der relativen YAP-Lokalisation in immunzytochemisch gefärbten mESZ. Aktives YAP befindet sich im Zellkern. Um die Grenze der relevanten Zellstrukturen bestimmen zu können, wurde das Aktin-Zytoskelett (rot) und der Zellkern (blau) mit Phalloidin bzw. DAPI gefärbt. Die Intensitätsmessung der YAP-Immundefärbung erfolgte im Bereich des Zytoplasmas (Aktinfärbung ohne Zellkernbereich) und im Bereich des Zellkerns (DAPI-Färbung ohne Nukleolus) an nicht bearbeiteten konfokalen Aufnahmen. Die Messung wurde mit Hilfe der Software *ImageJ* (*Measure tool*) durchgeführt. Die relative YAP Lokalisation setzt sich aus dem Verhältnis der Intensität im Zellkern (I_{ZK}) und im Zytoplasma (I_Z) zusammen. Der Bereich des Nukleolus wurde für I_{ZK} nicht mit ausgewertet. Es wurden stets mittlere Signalintensitäten (Signal/Fläche) für die Rechnung verwendet (für Details siehe Material und Methoden, Kapitel 2.6.4). **B** Exemplarische Aufnahmen von mESZ auf MN- und G-Substrat für die YAP-Quantifizierung. Die mESZ wurden 4 h nach Aussaat fixiert und immunologisch gefärbt. YAP wurde mit einem monoklonalen Antikörper markiert, zusätzlich wurde das Aktin-Zytoskelett und der Zellkern (Grenze dargestellt durch gestrichelte Linie) markiert. Maßstab: 10 μ m **B'** Quantifizierung der Daten aus (B). mESZ auf MN-Substrat weisen eine signifikant höhere relative YAP-Lokalisation (=Aktivierung) auf als Zellen auf G-Substrat (zweiseitiger t-Test: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung).

Der zweite Teil dieser Arbeit (Kapitel 3.2) demonstriert, dass die Topografie einen entscheidenden Einfluss auf die Selbsterneuerung von mESZ hat. Die Kultivierung von mESZ auf MN-HEMA-EDMA-Substraten erhält deren Stammzellcharakter, wohingegen die Kultivierung auf chemisch identischen N- und G-Substraten zu einer erhöhten spontanen Differenzierung der

Zellen führt. Der Erhalt des Stammzellcharakters auf MN-Substraten war auch nach einer Kultivierungsdauer von mehr als drei Wochen noch zu beobachten, wobei die funktionelle Pluripotenz noch nachgewiesen werden konnte. Die Morphologie der Einzelzellen nach Aussaat ist ein entscheidender Faktor, der sich zwischen MN-Substraten und den anderen beiden Substraten stark unterscheidet. Auf MN-Substraten bilden die Zellen lange Zellausläufer zur Verankerung an das Substrat aus, was für N- und G-Substrate nicht beobachtet wurde. Weiterhin ist auf MN-Substraten ist die Aktivierung des Mechanotransduktions-Proteins YAP erhöht, das durch die Ausbreitung von Zellen aktiviert wird und das zusätzlich einen positiven Einfluss auf die Stammzell-Selbsterneuerung hat. Auf allen HEMA-EDMA-Substraten herrscht eine Inhibierung der Integrin-Signaltransduktion vor – ein Effekt, der sich ebenfalls positiv auf die Pluripotenz von mESZ auswirkt.

4 Diskussion

4.1 Die 2D- und 3D-Substratgeometrie beeinflusst die mESZ Proliferation

Der erste Teil dieser Dissertation befasst sich mit der Fragestellung, ob durch geometrische Veränderungen der 2D- und 3D-Umgebung das Verhalten von mESZ beeinflusst werden kann. Die meisten 2D- und 3D-Zellkultursysteme, wie Zellkulturflaschen oder 3D-Hydrogele, bieten wenig geometrischen Spielraum und lassen keine gezielt räumliche Verteilung von extrazellulären Liganden zu. Deshalb wurden hier zwei Methoden verwendet – μ CP und DLS – die es erlauben, strukturierte und geometrisch definierte 2D- und 3D-Substrate herzustellen (Lehnert et al. 2004, Klein et al. 2011). Der geometrische Parameter, der hier untersucht wurde, war die Größe der adhäsiven Fläche (2D-Mikroinseln) beziehungsweise die Größe des zur Verfügung stehenden Raumes (3D-Mikrokammern). Studien an mesenchymalen Stammzellen demonstrieren, dass für diese adulten Zellen die Größe der adhäsiven Fläche entscheidend für das *Spreading* und dementsprechend für das Differenzierungsverhalten ist (McBeath et al. 2004). Da es für embryonale Stammzellen diesbezüglich keine Informationen gab, sollte in dieser Arbeit die Reaktion von mESZ auf die dargebotene adhäsive-Fläche untersucht werden. Dies wurde durch unterschiedlich große, mit FN funktionalisierte 2D-Mikroinseln mit quadratischer Grundfläche realisiert. Die Fläche der Mikroinseln variierte zwischen $(15 \times 15) \mu\text{m}^2$ und $(35 \times 35) \mu\text{m}^2$. Die kleinsten Strukturen entsprachen in den Ausmaßen also ungefähr der Größe einzelner mESZ, die einem Durchmesser von 10-18 μm aufweisen (Wakayama et al. 1999). Dieses stark vereinfachte 2D-System wurde in zusätzlichen Versuchen durch die Verwendung von 3D-Substraten (3D-Mikrokammern) erweitert, um eine Zellumgebung zu schaffen, die der *in vivo*-Situation von ESZ näher kommt. Trotz dessen wurde auch im Fall der 3D-Mikrokammern bewusst ein wenig komplexer Aufbau mit quadratischer Grundfläche der Kammern mit nur einem adhäsiven Protein gewählt, damit nur wenige Parameter vorherrschen, wodurch die Interpretation der Ergebnisse erleichtert wird. Die Variation lag – analog zu den 2D-Experimenten – in der Größe der Grundfläche der Mikrokammern. Als adhäsives Protein wurde in beiden Fällen FN gewählt, das bereits im Blastozysten-Stadium des Embryos gebildet wird und dort einen Teil der EZM bildet (Wartiovaara et al. 1979). Im Gegensatz zu anderen Proteinen, wie Vitronectin oder E-Cadherin, hat FN in den verwendeten Konzentrationen jedoch keinen positiven Einfluss auf die mESZ Selbsterneuerung (Nagaoka et al. 2006, Braam et al. 2008, Hunt et al. 2012). Dadurch können positive Effekte aufgrund biochemischer Signaltransduktion ausgeschlossen und direkt auf die geometrischen Veränderungen des Substrates zurückgeführt werden. Desweiteren wurden die Zellen auf Einzelzellebene

untersucht, um Einflüsse von benachbarten Zellen auszuschließen. Die verschieden großen Mikroinseln beziehungsweise Mikrokammern waren dabei alle auf ein und demselben Deckglas lokalisiert, um eine exakt gleiche Behandlung (insbesondere Aussaatdichte und Medienwechsel) der mESZ innerhalb der unterschiedlichen Strukturen zu gewährleisten. Durch die Anordnung der verschieden großen Strukturen auf einem einzelnen Deckglas konnten die Zellen, die in unterschiedlichen Strukturen kultiviert wurden, bei dieser Arbeit nicht voneinander separiert werden, sodass die Analyse der Zellreaktionen auf mikroskopischer Ebene durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich, dass die Proliferationsfähigkeit der mESZ abhängig von der Mikroinsel-Größe ist. Für mESZ in 3D-Mikrokammern konnte zusätzlich zur Proliferationsfähigkeit eine Abhängigkeit der Zellmorphologie und YAP-Aktivität von der Mikrokammer-Größe nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden nun in den folgenden Kapiteln interpretiert und kritisch diskutiert.

4.1.1 Die mESZ Proliferationsrate ist abhängig von der 2D-Mikroinsel-Größe

Bei der Untersuchung des Proliferationsverhaltens der mESZ auf verschieden großen FN-beschichteten Mikroinseln wurde festgestellt, dass die Proliferation abhängig von der Mikroinsel-Größe ist. Nur die Hälfte der Zellen auf sehr kleinen Mikroinseln ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$) hatte sich nach einer Kultivierungsdauer von 24 Stunden geteilt (Abb. 3.3). Die Kultivierung auf größeren Mikroinseln führte zu einer Zunahme der Proliferationsrate, wobei ab einer Mikroinsel-Größe von $(25 \times 25) \mu\text{m}^2$ eine Schwelle zu erkennen war. Ab hier führte eine weitere Vergrößerung der Mikroinseln zu keinen signifikanten Unterschieden in der Proliferationsrate mehr. Knapp 87% der mESZ auf den größten Inseln ($(35 \times 35) \mu\text{m}^2$) hatten sich nach 24 Stunden bereits mindestens einmal geteilt. Bei einer sehr kurzen Zellzyklusdauer der mESZ von 8-10 Stunden im Vergleich zu differenzierten Zellen (24-32 Stunden) (Kapinas et al. 2013), ist dieser Wert ein Indiz, dass die Zellen auf großen Inseln ihren Stammzellcharakter und die damit verbundene Selbsterneuerung (Hindley and Philpott 2013) aufrechterhalten. Im Gegensatz dazu scheint die Kultivierung der mESZ auf sehr kleinen Mikroinseln ((15×15) und $(20 \times 20) \mu\text{m}^2$) zu einer Verlangsamung des Zellzyklus zu führen oder alternativ zu einer Inhibition der mESZ Proliferation. Eine transiente Inhibition des Zellzyklus, genannt Quieszenz, ist bei vielen adulten Stammzellen ein gängiger Mechanismus, um ein Gleichgewicht der Zellzahl innerhalb der Stammzellnische zu gewährleisten (Li and Bhatia 2011). Die Zellen befinden sich hier in der G₀-Phase des Zellzyklus, das heißt im Zellzyklus-Arrest. Bei der Quieszenz werden die Stammzeleigenschaften jedoch nicht beeinflusst und bei Bedarf an neuen Zellen wird der Zellzyklus-Arrest durch externe Signale wieder aufgehoben (Cheung and Rando 2013). Interessanterweise wurde ein ähnlicher Mechanismus – eine Ruhephase, die keinen Einfluss auf die Stammzeleigenschaften hat – kürzlich erstmals auch für mESZ beschrieben (Scognamiglio et

al. 2016). Allerdings kann dies keine Erklärung für die reduzierte Proliferation der mESZ auf kleinen Mikroinseln sein, da eine Färbung des Ki-67-Proteins auch auf kleinen Inseln noch gegeben war (Appendix Abb. A1). Da dieses Protein ein Marker für Zellen mit aktivem Zellzyklus ist (Gerdes et al. 1984), kann der klassische Zellzyklusarrest (G₀-Phase) hier also ausgeschlossen werden. Auch die Viabilität der mESZ, die unter anderem die Proliferation von Zellen beeinflusst, war nicht abhängig von der Mikroinsel-Größe und vergleichbar zur unstrukturierten FN-Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Somit ist also eine Inhibition des mESZ Zellzyklus durch die Kultivierung auf kleinen FN-Mikroinseln eher auszuschließen, was zu der Schlussfolgerung führt, dass die Zellen auf diesen Strukturen vermutlich ihren Zellzyklus verlangsamen. Ein plausibler Grund hierfür wäre eine spontane Differenzierung, die erwiesenermaßen die Struktur des Zellzyklus verändert und durch die Einführung einer ausgedehnten G₁-Phase zu einer Reduktion der Proliferationsrate führt (Stead et al. 2002, White and Dalton 2005). Die sehr enge Verknüpfung der Zellzyklusstruktur mit der Pluripotenz-Maschinerie (Hindley and Philpott 2013) legt also den Schluss nahe, dass die mESZ auf kleinen Mikroinseln differenzieren und auf großen Inseln pluripotent bleiben. Die Messung des Oct4-Levels aus Kapitel 3.1.2 konnte jedoch keine verlässlichen Aufschlüsse über den Pluripotenzstatus der Zellen auf den unterschiedlichen Mikroinseln geben, worauf in Kapitel 4.1.5 näher eingegangen wird. Deshalb bleibt offen, ob Zellen auf kleinen Mikroinseln tatsächlich vermehrt differenzieren. Dies müsste anhand molekularbiologischer Methoden gezeigt werden, die bei der Konzeption der hier verwendeten Substrate derzeit schwer ausführbar sind.

Unabhängig davon, ob die Zellen auf kleinen FN-Mikroinseln ihren Stammzellstatus aufrechterhalten oder nicht, stellt sich jedenfalls die Frage, warum die Proliferation gerade in Zellen auf kleinen Mikroinseln abnimmt. Im Gegensatz zu mESZ in 3D-Mikrokammern waren auf den verschiedenen Mikroinseln keine großen Unterschiede in der prä-mitotischen Zellmorphologie zu verzeichnen (Abb. 3.7). Ebenso wenig konnten Unterschiede in der relativen YAP-Lokalisation zwischen Zellen auf kleinen und großen Inseln festgestellt werden (Abb. 3.8), weshalb hier ein vom *Spreading* unabhängiger Mechanismus die Proliferation zu beeinflussen scheint. Anhand von Zeitrafferaufnahmen wurde beobachtet, dass die Zellen auf den 2D-Mikroinseln nicht stark migrieren und sich wenig ausbreiten, jedoch ihre nahe Umgebung durch Zellausläufer und *Blebs* „abtasten“ (Abb. 3.4). Obwohl *Blebs* früher mit apoptotischen Zellen assoziiert wurden, zeigte sich im letzten Jahrzehnt, dass diese Membranausstülpungen in vielen verschiedenen Zelltypen bei der Zell-Mobilität eine Rolle spielen (Paluch and Raz 2013). Die *Blebs*-bildenden Zellen auf den FN-Mikroinseln waren zudem auch zum Ende der Zeitrafferaufnahmen (17-20 Stunden) noch vital (Abb. 3.4 und nicht gezeigte Aufnahmen), was einen Apoptose-unabhängigen Auslöser für die Entstehung der *Blebs* nahelegt. Interessanterweise spielt auch in der frühen Fischentwicklung die Zellbewegung über *Blebs* und

Lamellipodien eine entscheidende Rolle (Trinkaus 1973, Diz-Muñoz et al. 2010), sodass davon auszugehen ist, dass die beobachteten *Blebs* aus den Zeitrafferaufnahmen keine durch Phototoxizität induzierten Artefakte sind. Möglicherweise erkundet die Stammzelle auf FN-Inseln mit den Zellausläufern und *Blebs* ihre nahe Umgebung und überprüft, ob eine Tochterzelle genügend Platz zur Adhäsion hätte. Auf kleineren Mikroinseln treffen sie mit höherer Wahrscheinlichkeit auf die passivierten Bereiche, auf denen keine Zelladhäsion möglich ist, was eventuell zu einer spontanen Differenzierung oder zu einem noch nicht beschriebenen Proliferationsaufschub in mESZ führen könnte (Abb. 4.1). Die Größe der FN-Fläche scheint also von Bedeutung für die mESZ-Proliferation zu sein, wobei eine Bedeckung von ungefähr $(25 \times 25) \mu\text{m}^2$ ($= 625 \mu\text{m}^2$) die kritische Flächengröße zu sein scheint. Ob dabei jedoch die Anzahl der für die Zelle zugänglichen Fibronectinmoleküle ausschlaggebend ist, oder lediglich die Größe der adhäsiven Fläche, müsste durch eine FN-Verdünnungsreihe genauer analysiert werden. Denkbar wäre auch, dass die passivierten Bereiche um die Mikroinsel herum, bestehend aus dem passivierenden Thiol (HS-C11-(EG)6-OH, kurz: (EG)6-OH), einen negativen Einfluss auf die mESZ-Proliferation haben. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle auf die passivierten Bereiche trifft, nimmt mit zunehmender Mikroinsel-Größe ab, weshalb hier möglicherweise mehr Zellen proliferieren. Laut Aussage des Herstellers Prochimia ist das hier verwendete passivierende (EG)6-OH jedoch wenig zytotoxisch und optimal geeignet für strukturierte Zellkultivierung. Jedoch sind pluripotente Stammzellen sehr sensibel und verhalten sich in vielerlei Hinsicht anders als gewöhnliche somatische Zellen. Beispiele hierfür sind der veränderte Zellzyklus (Kapinas et al. 2013) und eine niedrigere Apoptose-Schwelle (Dumitru et al. 2012). Deshalb müsste der Effekt des passivierenden, Ethylenglycol-basierten Thiols (EG)6-OH für embryonale Stammzellen möglicherweise speziell untersucht werden. Beispielsweise wurde eine zytostatische Wirkung von Polyethylenglycol auf humane Krebszellen festgestellt (Parnaud, Corpet and Gamet-Payraastre 2001), die in vielerlei Hinsicht ESZ ähneln. Anhand der hier gezeigten Daten bleibt also ungeklärt, ob die mESZ Proliferationshemmung auf kleinen Mikroinseln durch die zu kleine adhäsive Fläche, durch den erhöhten Kontakt mit den passivierenden Bereichen oder durch eine Kombination aus beiden ausgelöst wird.

Bezüglich der Auswertungsmethode durch Zellzählung nach 24 Stunden könnte man argumentieren, dass eine Tochterzelle auf kleinen Mikroinseln nicht genügend Haftungspunkte nach der Teilung hatte und sich ablöste, sodass solche Zellen nicht in die Auswertung mit einbezogen wurden. Jedoch konnte auch dies mit Hilfe von Zeitrafferaufnahmen ausgeschlossen werden. In den Fällen, in denen auch auf kleinen Mikroinseln eine Zellteilung stattfand, war die Tochterzelle nach der Teilung zwar nicht mit dem Substrat, jedoch mit der Mutterzelle in engem Kontakt (nicht gezeigte Zeitrafferaufnahmen). Die Adhäsion zwischen den beiden Zellen war stark genug, dass die Tochterzelle auch nach einem Tag noch adhärent war, sodass die

Auswertung durch Zellzählung (Abb. 3.3) realistische Werte darstellt. Zudem wurde mit Hilfe der Markierung der mESZ mit dem Proliferationsmarker EdU alternativ demonstriert, dass es bei der Kultivierung auf kleineren Mikroinseln ((15x15) und (20x20) μm^2) zu einer Reduktion der mESZ-Proliferation kommt (Abb.3.3).

4.1.2 Kleine adhäsive 3D-Mikrokammern fördern die mESZ Proliferation

Analog zu den 2D-Experimenten mit FN-beschichteten Mikroinseln wurde im nächsten Schritt dieser Arbeit getestet, inwieweit unterschiedlich große 3D-Mikrokammern das Proliferationsverhalten von mESZ verändern. Auch diese Kammern waren mit FN beschichtet, um die Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Interessanterweise wurde hier eine gegenteilige Tendenz als bei den 2D-Experimenten festgestellt: je größer die Mikrokammern, desto weniger Zellen hatten sich nach 24 Stunden geteilt. Die kleinsten Mikrokammern ((15x15) μm^2) führten zu einer Proliferationsrate von nahezu 90%, wohingegen nur etwas mehr als ein Drittel der Zellen in den größten Mikrokammern ((35x35) μm^2) sich nach 24 Stunden geteilt hatte (Abb. 3.5). Dieses Ergebnis scheint auf den ersten Blick kontra-intuitiv zu sein, da in größeren Kammern mehr Platz für eine Tochterzelle geboten wird - ähnlich zur Situation auf größeren 2D-Mikroinseln. Allerdings verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Änderung der Dimensionalität für Zellen nicht trivial ist und dass sich dadurch mehr Faktoren ändern, als auf den ersten Blick möglicherweise ersichtlich ist. Was sind also die Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Systemen? Natürlich ist zu betonen, dass möglicherweise die effektive FN-Dichte auf den Substraten durch die unterschiedlichen Herstellungsmethoden – μCP und DLS – nicht exakt gleich ist. Bei der Herstellung der 2D-Mikroinseln durch μCP wurde auf Gold-bedampfte Deckgläser das Thiol ODM gestempelt, wodurch es zur Ausbildung einer stabilen, quasi semi-kovalenten Verbindung kommt (Fenter, Eberhardt and Eisenberger 1994). Das FN adsorbiert im nächsten Schritt selektiv an das hydrophob terminierte ODM (Lehnert et al. 2004). Bei den 3D-Mikrokammern adsorbiert das FN direkt an den Fotolack OrmoComp®, ein Keramik-Polymer-Hybrid (micro resist technology), was möglicherweise zu einer anderen FN-Dichte in den 3D-Mikrokammern führt als durch die Gold-Thiol Chemie. Dass eine unterschiedliche Dichte an FN-Molekülen auf der Oberfläche zu Unterschieden im Differenzierungsverhalten der mESZ führt, wurde in einer Studie aus dem Jahr 2012 gezeigt (Hunt et al. 2012). Substratbeschichtungen mit höheren FN-Konzentrationen fördern dabei die Differenzierung der Zellen durch verstärkte Integrin-Signaltransduktion. Einen weiteren Unterschied zwischen den 2D- und 3D-Substraten stellt das passivierende Thiol (EG)6-OH dar, welches die 2D-Mikroinseln voneinander trennt, auf den 3D-Substraten jedoch nicht vorhanden ist. Diese Unterschiede sind der Grund, weshalb ein quantitativer Vergleich zwischen den Werten aus den 2D- und 3D-Experimenten nicht sinnvoll ist. Nichtsdestotrotz können die beobachteten qualitativen Ergebnisse aus den 2D- und 3D-

Experimenten miteinander verglichen werden. Diese tendenzielle Proliferationsänderung in Bezug auf die Strukturgröße kam innerhalb eines Systems durch die Veränderung eines einzigen Parameters (2D-Mikroinsel-Größe beziehungsweise Grundfläche der 3D-Mikrokammer) zustande. Es bleibt also erstaunlich, dass die mESZ auf größeren 2D-Mikroinseln mehr proliferieren als auf kleineren und dass der umgekehrte Fall bei der Kultivierung in 3D-Mikrokammern gegeben ist.

Die absolute Bedeckung an FN, welche auf 2D-Mikroinseln wohl ausschlaggebend für die Abnehmende Proliferation auf kleinen Inseln ist, sollte selbst bei den kleinsten 3D-Mikrokammern ausreichend sein. Bei einer Höhe von 20 μm und einer Grundfläche von $(15 \times 15) \mu\text{m}^2$ ergibt sich hier eine mit FN bedeckte Fläche von 1425 μm^2 pro Mikrokammer, was weit über der geschätzten kritischen Mindestbedeckung von 625 μm^2 (siehe Kapitel 4.1.1) liegt. Hier werden die Zellen also vermutlich durch einen von der FN-Fläche unabhängigen Mechanismus in ihrer Proliferation beeinflusst. Da der wesentlichste Unterschied zwischen den 2D- und 3D-Substraten die Wände der 3D-Mikrokammern sind, spielen diese vermutlich eine entscheidende Rolle bei den beobachteten Effekten. Welche Unterschiede wirken durch die Einführung von Wänden auf dem Substrat auf eine darauf kultivierte Stammzelle? Die Wände selbst stellen für die Zellen eine physikalische Barriere dar, die die Zellen wahrnehmen und die eine Zellausbreitung in x-y Richtung verhindert. Desweiteren könnte diese Barriere auch der Grund für eine reduzierte Diffusion des Mediums oder der darin gelösten Bestandteile sein. Zusätzlich ergibt sich durch die dreidimensionale Verteilung des FN für die einzelne Stammzelle die Möglichkeit zur Adhäsion in der z-Achse, was zu einer Reduktion der apikal-basalen Polarität in Zellen führt (Baker and Chen 2012). Mit Hilfe modifizierter 3D-Mikrokammern wurden diese Möglichkeiten genauer untersucht (Kapitel 3.1.6). Der Glasboden dieser Kammern war mit FN beschichtet, wohingegen die Wände aus dem Fotolack TPE-TA hergestellt wurden, an den Proteine nicht adsorbieren (Claus et al. 2016). Die physikalische Barriere war also gegeben, wohingegen die dreidimensionale Verteilung des FN in diesem Fall nicht vorhanden war. Interessanterweise war das Proliferationsverhalten der mESZ in diesen 3D-Mikrokammern vergleichbar zu den 2D-Experimenten aus dieser Arbeit. Die Kultivierung in kleinen modifizierten Mikrokammern ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$) führte zu einer reduzierten Proliferationsrate (nur ca. 1/3 der Zellen innerhalb von 24 Stunden, Abb. 3.6). In großen modifizierten Mikrokammern war dieser Wert mehr als verdoppelt (Abb. 3.6). Dieses Ergebnis zeigt, dass die rein physikalische Barriere nicht ausreicht, um zu einer hohen Teilungsrate in kleinen Mikrokammern zu führen. Vielmehr scheint die dreidimensionale Präsentation des adhäsiven Liganden FN der ausschlaggebende Faktor zu sein. Die Zellen adhärieren hier nicht nur an einer planen Oberfläche sondern auch in der z-Achse, und verlieren somit die auf 2D-Substraten erzwungene apikal-basal Polarität. Diese ist für viele Zelltypen nicht physiologisch (Baker and

Chen 2012) und hat beispielsweise Auswirkungen auf die Apoptose-Resistenz epithelialer Zellen (Weaver et al. 2002). Im nächsten Kapitel soll nun diskutiert werden, welche Konsequenzen die 3D-Präsentation des FN in Mikrokammern auf die mESZ hatte und wieso dies einen Einfluss auf die Zellproliferation haben könnte.

4.1.3 Die Morphologie der mESZ wird durch die Größe der adhäsiven 3D-Mikrokammern beeinflusst

Anhand der modifizierten 3D-Mikrokammern mit anti-adhäsiven Wänden (Kapitel 3.1.6) konnte festgestellt werden, dass die Proliferation der mESZ nur dann in kleinen Mikrokammern gefördert wird, wenn deren Wände mit FN beschichtet sind. Dadurch wird verdeutlicht, dass die Interaktion zwischen den Zellen und dem FN an den Wänden für die Proliferation von Bedeutung ist. Um tiefere Einblicke in diese Interaktionen zu bekommen, wurde die Stammzellmorphologie auf den Mikroinseln und in den beiden Typen von Mikrokammern anhand konfokaler Aufnahmen untersucht (Kapitel 3.1.7). Der Zeitpunkt der Analyse wurde auf vier Stunden nach Zellaussaat festgelegt, da hier noch Einzelzellen vorlagen, die Zellen aber genügend Zeit zur Adhäsion an die Substrate hatten. Es stellte sich heraus, dass die Zellmorphologie auf den verschiedenen 2D-Mikroinseln und in den modifizierten 3D-Mikrokammern unterschiedlicher Größe nicht stark variierte. Die Zellen waren in allen Fällen eher kugelförmig statt flach, ohne ein klassisches *Spreading* auf dem FN-Boden zu zeigen (Abb. 3.7). In 3D-Mikrokammern mit FN-beschichteten Wänden zeigte sich jedoch ein anderes Bild. In Mikrokammern der kleinsten ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$) und teilweise auch der zweitkleinsten Größe ($(20 \times 20) \mu\text{m}^2$) hatten die Zellen Kontakt zu allen vier Wänden der Kammer und spannten sich zwischen diesen auf – häufig ohne Kontakt zum Boden (Abb. 3.7 und Appendix Abb. A2). Dabei bildete sich meist eine kreuzförmige Zellmorphologie innerhalb der x-y-Ebene aus. Dies konnte nicht für Zellen beobachtet werden, die in Strukturen größer als $(20 \times 20) \mu\text{m}^2$ kultiviert wurden. Die Zellen waren hier jedoch selten mittig auf dem Boden der Kammern lokalisiert, sondern hatten häufig Kontakt zu einer oder zwei der Wände (Abb. 3.7). Teilweise geschah dies, ohne dass die Zellen den Boden berührten. Interessanterweise waren die Mikrokammer-Größen, in denen kein 3D-*Spreading* der Zellen möglich war, auch jene, in denen die Proliferationsrate erniedrigt war (unter 70%, Abb. 3.5). In sehr vielen Zelltypen hat die Zellmorphologie einen Einfluss auf das Zellverhalten wie die Proliferation, das Überleben, oder die Differenzierung (Théry 2010). Bereits 1997 konnte eine positive Korrelation zwischen dem *Spreading* von Zellen und der Zellproliferation in Endothelzellen nachgewiesen werden (Chen et al. 1997). Mittlerweile ist diese Korrelation auch für epitheliale Zelltypen bestätigt (Halder et al. 2012). Im nächsten Kapitel soll nun der Mechanismus, durch den das Zellverhalten über die Zellmorphologie gesteuert wird, im Detail diskutiert werden.

4.1.4 Die Kultivierung in kleinen adhäsiven 3D-Mikrokammern führt zu einer erhöhten YAP-Aktivität in mESZ

Die Mechanotransduktion ist ein Mechanismus, bei dem Informationen aus der EZM ins Zellinnere übertragen und somit das Verhalten von Zellen verändert werden kann. Über Integrine und Rho-GTPasen wird die Aktin-Dynamik beeinflusst, welche wiederum über einen unbekanntem Mechanismus die Aktivierung von YAP und TAZ, zwei wichtige Mediatoren der Mechanotransduktion, reguliert (Halder et al. 2012). Dabei führt ein verstärktes *Zell-Spreading* zu einem erhöhten Level an kontraktilem F-Aktin und folglich zu einer Aktivierung von YAP/TAZ, was wiederum zur Translokation dieser beiden transkriptionellen co-Aktivatoren in den Zellkern führt (Halder et al. 2012). Dort werden Gene aktiviert, die das Zellverhalten wie die Proliferation, Apoptose oder Differenzierung von Zellen regulieren (Halder et al. 2012, Piccolo et al. 2014). Während aktives YAP/TAZ in epithelialen und endothelialen Zelltypen einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation hat, wird in mesenchymalen Stammzellen durch YAP/TAZ die osteogene Differenzierung eingeleitet (Piccolo et al. 2014). In ESZ hingegen ist die YAP/TAZ-Aktivität wichtig für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Zellcharakters (Lian et al. 2010, Beyer et al. 2013). Da in dieser Arbeit Unterschiede im Proliferationsverhalten und in der Morphologie der mESZ in Bezug auf die Mikrokammer-Größe beobachtet wurden (Kapitel 3.1.5 und 3.1.7), wurde die relative Lokalisation von YAP (als Maß für dessen Aktivität) anhand einer Immunfärbung an mESZ in den kleinsten und größten 3D-Mikrokammern untersucht (Kapitel 3.1.8). Dabei zeigte sich, dass bei mESZ in den kleinsten Mikrokammern ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$) die relative YAP Lokalisation im Zellkern signifikant erhöht war im Vergleich zu Zellen in großen Mikrokammern ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$) (Abb. 3.8). In mESZ innerhalb kleiner Mikrokammern war also mehr YAP im Zellkern und damit mehr aktives YAP vorhanden. Somit konnte in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen einer erhöhten Proliferation der mESZ, einem verstärkten *Zell-Spreading*, sowie der erhöhten YAP-Aktivität nachgewiesen werden. In allen Fällen traf dies auf mESZ zu, die in kleineren, adhäsiven 3D-Mikrokammern kultiviert wurden ($(15 \times 15) \mu\text{m}^2$ und $(20 \times 20) \mu\text{m}^2$). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Experimente mit 2D-Mikroinseln scheint hier also das *Spreading* der mESZ innerhalb enger Mikrokammern die Proliferation zu begünstigen. Obwohl anhand der Bestimmung des relativen Oct4-Levels keine Aussagen zur Pluripotenz und dem Differenzierungszustand der mESZ innerhalb verschieden großer Mikrokammern getroffen werden konnten (Kapitel 3.1.2), sind die Ergebnisse zur Untersuchung der relativen YAP-Lokalisation nun ein starkes Indiz für die Pluripotenz der mESZ in kleinen Mikrokammern. Aktives YAP/TAZ ist mit der Aufrechterhaltung des pluripotenten Stammzellcharakters assoziiert (Lian et al. 2010, Beyer et al. 2013), weshalb die Schlussfolgerung nahe liegt, dass die mESZ in kleinen Mikrokammern nicht differenziert sind. Diese Aussage ist konsistent mit der Beobachtung, dass hier auch die Proliferationsrate im Vergleich zu mESZ innerhalb größerer Mikrokammern gesteigert war (Kapitel 3.1.5).

Pluripotente Stammzellen sind für ihren verkürzten Zellzyklus bekannt und verlangsamen diesen erst im Laufe der Differenzierung (Stead et al. 2002).

Wie lassen sich die Ergebnisse und Beobachtungen aus dieser Arbeit mit nun den Gegebenheiten *in vivo* vergleichen? Interessanterweise erfolgt die erste Entscheidung über das Zellschicksal der Zellen im frühen Embryo auf Basis der Mechanotransduktion (Varelas 2014). Die homogene Zellmasse des Morula-Stadiums teilt sich bei der Bildung der Blastozyste in das äußere Trophektoderm und die innere Zellmasse auf (Cockburn and Rossant 2010). Dabei hängt die Positionierung der Zellen in der Blastozyste von ihrer Kontraktilität ab, wobei kontraktile Zellen nach innen wandern (Maître et al. 2016). Das Trophektoderm bildet sich infolgedessen aufgrund der Aktivität von YAP aus, wobei in Kontrast zur gängigen Meinung aus *in vitro* Studien in diesem Fall nukleäres YAP in den äußeren, weniger kontraktilen Zellen auftrat (Maître et al. 2016). Möglicherweise spielt in diesem Stadium der Hippo-Signalweg eine weitere, von der Mechanotransduktion losgelöste Rolle bei der Aktivierung von YAP in außen liegenden Zellen. Konsistent zu den kleinen adhäsiven 3D-Mikrokammern herrscht in der Blastozyste eine dreidimensionale Präsentation von Adhäsionspunkten wie EZM-Moleküle oder Nachbarzellen vor, die einer einzelnen Stammzelle wenig Raum lassen. Allerdings ist die Mikroumgebung *in vivo* weitaus komplexer als die hier verwendeten Substrate. Die ESZ-Nische soll den Stammzellcharakter zum einen transient aufrechterhalten, muss jedoch die Differenzierung im Zuge der Embryonalentwicklung zum korrekten Zeitpunkt gewährleisten. Zudem wurde gezeigt, dass innerhalb der IZM der Blastozyste YAP vermehrt im Zytoplasma lokalisiert ist (Nishioka et al. 2009), und nicht im Zellkern, wie bei ESZ (Varelas 2014). Dies verdeutlicht, dass in dieser komplexen Umgebung andere Parameter, beispielsweise Zell-Zell-Kontakte, dominieren, als in dem hier verwendeten Kultivierungssystem, und das eine YAP-vermittelte Pluripotenz im Embryo möglicherweise nicht nötig ist.

Einige wenige *in vitro* Studien stützen die Ergebnisse aus dieser Arbeit. Nava *et al.* zeigten beispielsweise in einem zu hier analogen Ansatz, dass mESZ Kolonien innerhalb von 3D-Gittern adhären, und ihre Pluripotenz im Vergleich zur 2D-Kultivierung über längere Zeit aufrechterhalten (Nava et al. 2016). Diese Gitter wurden, wie in dieser Arbeit, mit der Technik des DLS hergestellt. Die Untersuchungen fanden jedoch nicht auf Einzelzellebene statt und der beteiligte Mechanismus wurde nicht aufgeklärt. Untersuchungen zur Morphologie und Pluripotenz vereinzelter ESZ in geometrisch definierten 2D- und 3D-Strukturen existieren bislang nicht. Dies ist lediglich für adulte, insbesondere mesenchymale Stammzellen der Fall. Hier ging mit der Vergrößerung der adhäsiven 2D- oder 3D-Strukturen (zum Beispiel Mikroinseln oder Wells) stets ein verstärktes *Spreading* der Zellen einher, was zu einer bevorzugten osteogenen oder neuronalen Differenzierung führte und die adipogene Differenzierung inhibierte (McBeath et al. 2004, Lee et al. 2013, Harris, Piroli and Jabbarzadeh

2014). Auch diese Zellform-abhängigen Effekte konnten auf die Wirkung von YAP/TAZ durch die erhöhte intrazelluläre Aktin-Kontraktilität zurückgeführt werden (Varelas 2014). Vereinzelt mESZ *spreaden* auf flachen, Pluripotenz-fördernden Substraten für gewöhnlich nicht und bilden rasch kuppelförmige 3D-Kolonien, in denen die Zellen dicht aneinandergelagert vorliegen (Hunt et al. 2012). Auf den hier verwendeten 2D-Mikroinseln war die Morphologie der einzelnen mESZ eher kugelförmig und die Zellen zeigten nach kurzer Kultivierungsdauer kein verstärktes *Spreading* in Bezug auf die Vergrößerung der Inseln (Kapitel 3.1.7). Auch in größeren 3D-Mikrokammern war die Zellmorphologie wenig *gespreaded*. Die Tatsache, dass die Zellen hier häufig am Rand der Mikrokammer in Kontakt zur Wand adhäriert waren, lässt jedoch vermuten, dass eine 3D-Umgebung von den Zellen bevorzugt wird. Lediglich in kleinen, engen Mikrokammern ((15x15) μm^2 und (20x20) μm^2) war der Abstand der Wände nahe genug, dass die Zellen sich dazwischen aufspannen konnten, wobei auch hier der Boden der Kammer zur Adhäsion häufig gemieden wurde (Abb. 3.7). Aufgrund der geringen Neigung der mESZ, über große Distanzen zu *spreaden*, ist hier also im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen die Ausbreitung beziehungsweise das Aufspannen der Zellen negativ mit der Mikrokammer-Größe korreliert und deshalb ist auch die YAP-Aktivierung höher in kleineren Mikrokammern. Konsistent damit war hier auch die Proliferationsrate erhöht, was auf eine Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters in kleinen Mikrokammern hinweist. Eine Studie aus dem Jahr 2006 an hESZ demonstriert, dass die spontane Differenzierung durch die Dehnung der Zellschicht auf einer elastischen Membran verhindert werden kann (Saha et al. 2006). Allerdings handelt es sich hier nicht um aktives *Spreading* der Zellen, sondern um eine von außen dirigierte Veränderung der Zellmorphologie, die in der Studie nicht genauer untersucht wurde. Nichtsdestotrotz führt solch eine Dehnung zur Umordnung des Zytoskeletts (Gadhari et al. 2013), wie es auch beim aktiven *Spreading* der Fall ist. Bei Saha *et al.* könnte der beobachtete Effekt also einem ähnlichen Mechanismus zugrunde liegen, wie er in dieser Arbeit beschrieben wird. Eine weitere Studie mit unterschiedlich harten Substraten aus PDMS Mikrosäulen zeigt ebenfalls, dass ESZ mechanosensitiv sind. Die Kultivierung von hESZ auf harten Mikrosäulen hatte eine Erhöhung der Zytoskelett-Kontraktilität zu Folge und führte zur Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters im Vergleich zur Kultivierung auf weicheren Mikrosäulen (Sun et al. 2012b). Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Schlussfolgerungen aus der vorliegenden Arbeit, dass eine erhöhte Zytoskelett-Kontraktilität die Pluripotenz von Stammzellen fördert. Im Gegensatz dazu steht jedoch eine Studie von Murray *et al.*, die anhand von 2D-Substraten zeigen, dass die Restriktion des *Spreadings* von mESZ - und damit der Zytoskelett-Kontraktilität - die Pluripotenz von mESZ fördert (Murray et al. 2013). Allerdings existieren entscheidende Unterschiede zwischen der vorliegenden Studie und der von Murray *et al.*, die die Erklärung für diese Diskrepanzen liefern könnten. Zur Induktion des Zell-*Spreadings* wurden die Zellen bei Murray *et al.* auf ein stark adhäsives Substrat ausgesät, das mit 0,1% Gelatine und 10% FCS

beschichtet war. Dies wurde mit Stammzellkulturen auf synthetischen Polymer-Substraten oder reduzierter Gelatine- und FCS-Konzentration verglichen. Dadurch sind Änderungen in der Signaltransduktion der Zellen möglich, die allein durch die chemischen Unterschiede des Substrats und weniger auf das *Spreading* selbst zurückgeführt werden können. FCS ist chemisch nicht definiert und beinhaltet Wachstumsfaktoren, die einen entscheidenden Einfluss auf die Selbsterneuerung pluripotenter Stammzellen haben könnten (Mannello and Tonti 2007). Im Gegensatz dazu waren in dieser Arbeit alle Mikrokammern stets mit der gleichen Konzentration an FN beschichtet, sodass Unterschiede in der Signaltransduktion aufgrund der FN-Konzentration weniger wahrscheinlich sind. Desweiteren wurden die Experimente von Murray *et al.* in Abwesenheit von LIF und nicht an Einzelzellen durchgeführt, was einen weiteren Kontrast zum Versuchsaufbau aus dieser Arbeit darstellt und einen direkten Vergleich fragwürdig macht.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die beobachtete Veränderung der Zellmorphologie, der Proliferationsfähigkeit und der YAP-Aktivität in mESZ in den unterschiedlichen 3D-Mikrokammern direkt miteinander in Verbindung steht. Insbesondere stellt sich die Frage, ob die mESZ in kleinen Mikrokammern pluripotent bleiben. Die YAP-TAZ-basierte Mechanotransduktion in ESZ ist bisher nicht im Detail verstanden (Piccolo et al. 2014). Es existiert jedoch eine Studie an hESZ – allerdings nicht auf Einzelzellebene – die eine Verbindung zwischen der Aktin-Dynamik und der Selbsterneuerung von hESZ aufzeigt. Hier wurde demonstriert, dass die Aktivierung von Rho-GTPasen und die daraus resultierende Erhöhung der Zytoskelett-Dynamik in hESZ zu einer Aktivierung von YAP/TAZ führt. Dies hat wiederum einen positiven Einfluss auf das Langzeit-Überleben und -Wachstum der Stammzellen *in vitro* (Ohgushi et al. 2015). Allerdings wurde die Aktin-Dynamik hier nicht durch morphologische Veränderungen, sondern durch das GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*) AKAP-Lbc aktiviert. Aufgrund dieser Ergebnisse ist jedoch anzunehmen, dass mESZ innerhalb kleiner Mikrokammern aufgrund einer zellmorphologisch basierten YAP-Aktivierung pluripotent bleiben. Diese Schlussfolgerung steht jedoch in Kontrast zu den Ergebnissen aus der Messung des relativen Oct4-eGFP-Levels (Kapitel 3.1.2). Im nächsten Kapitel soll nun diskutiert werden, woraus sich diese Diskrepanzen ergeben könnten.

4.1.5 Messung des relativen Oct4-Levels in mESZ auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikrokammern anhand konfokaler Aufnahmen

Kapitel 3.1.2 beschreibt die Analyse des spontanen Differenzierungsverhaltens der mESZ auf Mikroinseln und in Mikrokammern unterschiedlicher Größe. Generell eignet sich hierfür am besten die Bestimmung des Expressionslevels von Pluripotenzmarkern, wie Oct4, Sox2 oder Nanog über quantitative PCR oder auf Proteinbasis, beispielsweise durch einen *Westernblot* oder

durch FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) (De Los Angeles et al. 2015), was bei der Konzeption der Substrate hier jedoch nicht möglich war. Deshalb wurde in den kultivierten mESZ das relative Oct4-Level anhand des Oct4-eGFP Reportergens mit konfokalem Fluoreszenzaufnahmen bestimmt. Da die Expression des genomischen Oct4-Fragments im transgenen Konstrukt der mESZ der endogenen Oct4-Expression entspricht (Yeom et al. 1996), konnte hier das Reportergen zur Quantifizierung der Oct4-Expression verwendet werden. Bei der Messung des Oct4-Levels in Abhängigkeit von der 2D- oder 3D-Strukturgröße wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abb. 3.2). Dies suggeriert, dass die mESZ in ihrem Differenzierungsverhalten nicht durch die Substratgröße beeinflusst wurden. Die Ergebnisse aus den Kapiteln 3.1.3 und 3.1.5 stehen jedoch in Kontrast zu dieser Aussage. Hier wurden starke Unterschiede im Proliferationsverhalten der mESZ in Abhängigkeit von der Mikroinsel-/Mikrokammer-Größe festgestellt (Abb. 3.3 und Abb. 3.5). Die Dauer des Zellzyklus von pluripotenten Zellen ist sehr stark mit dem Erhalt der Pluripotenz verknüpft, und eine Differenzierung führt für gewöhnlich zur Verlangsamung des Zellzyklus (Stead et al. 2002, White and Dalton 2005). Aus diesem Grund ist die Bestimmung des Oct4-eGFP Levels anhand mikroskopischer Aufnahmen möglicherweise nicht für quantitative Aussagen geeignet. Es wurde zwar jüngst demonstriert, dass eine Entkopplung von Zellzyklus und Pluripotenz in mESZ möglich ist, jedoch wurde dies ausgelöst durch die Manipulation des Hormonhaushalts in schwangeren Mäusen beziehungsweise der c-Myc-Expression *in vitro* (Scognamiglio et al. 2016). Dass die *in vitro* Kultivierung der mESZ in unterschiedlich großen Mikroinseln oder Mikrokammern diese hormonalen oder genetischen Veränderungen hervorruft, scheint unwahrscheinlich. Vielmehr sollte der hier verwendete Versuchsaufbau zur Messung des Oct4-Levels kritisch betrachtet werden. Bereits bei der Durchführung ergaben sich ungünstige Einschränkungen, die zu einer ungenauen Bestimmung des Oct4-Levels führen könnten. Erstens konnte die Oct4-Messung aufgrund des schnellen Zellzyklus der mESZ zu keinem späteren Zeitpunkt als nach zwei Tagen durchgeführt werden, da es sonst zu einer Verschmelzung der einzelnen Kolonien über die Strukturgrenzen hinaus kam. Während der murinen Embryonalentwicklung wird Oct4 erst während der Gastrulation, also drei Tage nach dem Blastozysten-Stadium, in fast allen Zellen vollständig herunter reguliert (Zeineddine et al. 2014), sodass möglicherweise der Zeitpunkt der Messung ungünstig war. Allerdings stellt sich dann die Frage, wieso der Zellzyklus in den Versuchen zur Proliferation nach 24 h bereits verändert war (Abb. 3.3 und Abb. 3.5). Desweiteren sollte an dieser Stelle angemerkt werden, dass Oct4 alleine nicht zur Bestimmung der Pluripotenz ausreicht, da es ebenfalls ein Lineage-Specifier für das mesendodermale Zellschicksal ist (Niwa et al. 2000, Zeineddine et al. 2006, Stefanovic and Pucéat 2007). Das bedeutet, dass eine Abwesenheit von Oct4 zwar ein eindeutiger Beweis für den differenzierten Zellzustand ist, dass ein Vorhandensein von Oct4 aber auch in frühen mesendodermalen Stadien noch gegeben ist. Somit könnten die Diskrepanzen zwischen der

Oct4-Messung und der Proliferationsbestimmung von mESZ in den unterschiedlich großen 2D- und 3D-Strukturen auch hiermit erklärt werden. Bezüglich der sicheren Bestimmung der Pluripotenz oder Differenzierungsrichtung der mESZ in den unterschiedlich großen 2D- und 3D-Strukturen sind weitere, möglicherweise molekularbiologische Analysen notwendig, auf die im Ausblick (Kapitel 4.4) genauer eingegangen wird.

4.1.6 Fazit und offene Fragen zum Einfluss der 2D- und 3D-Substratgeometrie auf das mESZ Verhalten

Der erste Teil dieser Dissertation verdeutlicht, dass die Substratgeometrie einen entscheidenden Einfluss auf das Einzelzellverhalten von mESZ hat (zusammengefasst in Abb. 4.1). Genauer konnte demonstriert werden, dass die mESZ Proliferation mit zunehmender 2D-Mikroinsel-Größe zunimmt, jedoch mit zunehmender 3D-Mikrokammer-Größe abnimmt. Die Daten aus den 2D-Experimenten legen nahe, dass für die korrekte mESZ Proliferation eine bestimmte Größe der adhäsiven Zellkulturfläche nicht unterschritten werden darf. Alternativ könnte der erhöhte Kontakt zur passivierten Fläche die mESZ Proliferation auf kleinen Mikroinseln hemmen. Weder das *Spreading* noch die YAP-Aktivität war von der 2D-Mikroinsel-Größe abhängig. Im Fall der 3D-Mikrokammern hingegen konnte eine Korrelation zwischen der erhöhten Proliferationsrate, dem Aufspannen der Zellen und der erhöhten YAP-Aktivität in mESZ innerhalb kleiner Mikrokammern beobachtet werden. Die vorliegende Arbeit ist meines Erachtens die erste Studie, die auf Einzelzell-Niveau zeigt, dass eine morphologische Veränderung embryonaler Stammzellen *in vitro* – genauer ein verstärktes Aufspannen der Zellen in der Umgebung – die YAP-Aktivität und die Proliferation der Zellen positiv beeinflussen kann. Die Pluripotenz der Zellen in kleinen Mikrokammern wurde zwar nicht direkt bewiesen, ist aber aufgrund der erhöhten YAP-Aktivität und Proliferationsrate sehr wahrscheinlich. Ob solch ein Mechanismus auch *in vivo*, also in der Blastozyste, von Bedeutung ist, bleibt fraglich.

Zusammengenommen führen die Daten aus dem ersten Teil der Arbeit zu der Hypothese, dass mESZ zum einen eine ausreichend große adhäsive Fläche zur Proliferation benötigen. Zum anderen führt ein Aufspannen der Zellen zu einer erhöhten Zytoskelett-Kontraktilität und YAP-Aktivität, wodurch die Selbsterneuerung der mESZ positiv beeinflusst wird (näheres in Kapitel 4.3, Abb. 4.3). Diese Erkenntnisse liefern Aufschlüsse darüber, wie die *in vitro*-Kultivierung für die Forschung oder für klinische Zwecke von mESZ effizienter gestaltet werden kann. Geeignet sind beispielsweise adhäsive 3D-Substrate, die strukturiert sind und eine Poren-/Maschengröße im Bereich der Stammzellgröße aufweisen. Dies lässt sich beispielsweise durch poröse Polymersubstrate realisieren, die teilweise bereits in der Stammzellforschung eingesetzt werden (Kang et al. 2007, Wei et al. 2014, Koroleva et al. 2015) und durch verschiedenste Methoden wie *Electrospinning* oder DLS hergestellt werden können (Greiner, Richter and Bastmeyer 2012).

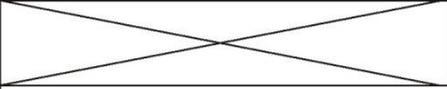
	2D-Mikroinseln	3D-Mikrokammern
Größe der Mikroinsel/ Mikrokammer (Grundfläche)	 (15x15) μm^2 (35x35) μm^2	 (15x15) μm^2 (35x35) μm^2
FN-Fläche		
Kontakt zu Passivierung		
Spreading/ Aufspannung		
YAP (Zellkern) YAP (Zytoplasma)		
Proliferation		

Abb. 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Teil 1 (Geometrie). **Links:** Die für die mESZ (grün) zugängliche FN-Fläche nimmt mit steigender Größe der 2D-Mikroinseln (magenta) zu, wobei es dadurch zu einer reduzierten Wahrscheinlichkeit kommt, dass die Zelle auf die passivierten Bereiche ((EG)6-OH) trifft. Weder das *Spreading* der mESZ noch die YAP-Aktivität ist abhängig von der Mikroinsel-Größe. Die Proliferationsrate der mESZ nimmt mit steigender Größe der 2D-FN-Mikroinseln zu. **Rechts:** Die FN-Fläche nimmt mit zunehmender Grundfläche der 3D-Mikrokammern (magenta) zu – eine Passivierung ist nicht vorhanden. Ein Aufspannen der mESZ zwischen den Wänden der Kammer ist nur in kleinen 3D-Mikrokammern möglich. Desweiteren ist die YAP-Aktivität in kleineren Mikrokammern erhöht. Die Proliferationsrate von mESZ (grün) nimmt in Folge dessen mit steigender Größe der Mikrokammern ab.

4.2 Die Substrat-Topografie beeinflusst die Selbsterneuerung von mESZ

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Verhalten von mESZ in Bezug auf die Substrat-Topografie. Im Gegensatz zur biochemischen Komponente der zellulären Mikroumgebung ist die Topografie *in vitro* ein wenig fluktuierender und stabiler Faktor, und eignet sich deshalb zum Beispiel zur Verbesserung von Zellkultursystemen oder zur Modifikation medizinischer Implantate (Bressan et al. 2013, Harvey, Hill and Bayat 2013). Die Mechanotransduktion in ESZ ist jedoch noch nicht verstanden und darauf basierende Zellkultursysteme existieren derzeit nicht.

In dieser Arbeit sollte deshalb der Effekt der Zellsubstrat-Topografie auf das Verhalten muriner embryonaler Stammzellen untersucht werden, indem nicht beschichtete, chemisch identische Substrate mit variabler Oberflächentopografie verwendet wurden. Als Substrat wurden Oberflächen gewählt, die mit dem Polymer HEMA-EDMA beschichtet waren. Dieses Polymer ist biokompatibel (Efremov et al. 2013) und lässt sich durch die Variation der Porogen-

Zusammensetzung während der UV-Polymerisation unterschiedlich strukturiert auf einen Glasträger oder andere Trägermaterialien aufbringen (Levkin, Svec and Frechet 2009, Jaggy et al. 2015). Da sich die Porogene im Laufe der Herstellung verflüchtigen, bleibt die Oberflächenchemie in allen Fällen dieselbe. Die Substrate wurden in Kooperation mit Arbeitsgruppe Levkin (ITG, KIT) für diese Arbeit hergestellt. Es wurden drei verschiedene Substrate verwendet: hierarchisch strukturierte mikro-nano-raue Substrate (MN-Substrate), nano-raue Substrate (N-Substrat) sowie nicht strukturierte glatte Substrate (G-Substrate). Dabei konnte demonstriert werden, dass die Kultivierung auf MN-Substrat die Adhäsion der mESZ über Zellausläufer fördert und – analog zu mESZ in kleinen 3D-Mikrokammern - zu einer erhöhten YAP-Lokalisation im Zellkern führt. Nachdem für Zellen in kleineren 3D-Mikrokammern die Pluripotenz nur indirekt über die Proliferationsrate und YAP-Aktivität nachgewiesen werden konnte, waren in diesem Fall die Zellen auf MN-Substraten auch nach längerer Kultivierung noch eindeutig funktionell pluripotent, wohingegen Zellen auf N- und G-Substraten vermehrt spontan differenzierten. Im Folgenden sollen die einzelnen Teilergebnisse zum Einfluss der Topografie auf mESZ kritisch diskutiert werden.

4.2.1 Die Ausprägung der mESZ-Adhäsion variiert auf HEMA-EDMA-Substraten unterschiedlicher Topografie

Da die HEMA-EDMA-Substrate für die Untersuchungen des Einflusses der Topografie auf mESZ nicht beschichtet werden sollten, wurde zuerst getestet, ob die Zellen auf den reinen Substraten adhären können. Es zeigte sich dabei, dass prinzipiell eine Adhäsion der mESZ an alle drei HEMA-EDMA-Substrate möglich ist, jedoch adhärten auf N- und G-Substraten deutlich weniger Zellen als auf dem Kontrollsubstrat (Gelatine) oder dem MN-Substrat (Abb. 3.9). Es wurde ausgeschlossen, dass die Unterschiede in der Zellzahl durch ein verändertes Proliferationsverhalten zustande kamen (Abb. 3.9), beziehungsweise durch Unterschiede in der Zellviabilität (Daten nicht gezeigt). Da die drei verschiedenen Substrate chemisch identisch sind, müssen demnach die Unterschiede in der Zellzahl durch die Topografie der Substrate ausgelöst worden sein. Auf N- und G-Substraten war die Haftung der Zellen an die Substratoberfläche für viele Zellen nicht möglich oder zu schwach, um eine langfristige Verankerung zu gewährleisten. Deshalb wurde im nächsten Schritt der Adhäsionsmechanismus der mESZ an die drei HEMA-EDMA-Substrattypen durch REM- und LSM-Aufnahmen genauer untersucht (Kapitel 3.2.4 und 3.2.5). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten erstaunliche Unterschiede in der Morphologie der mESZ in Bezug auf die Topografie des Substrats (Abb. 3.12). Auf MN-Substraten hatten die einzelnen mESZ bereits nach vier Stunden Kultivierung seilartige Zellausläufer gebildet, die die Zelle an der rauen Polymer-Oberfläche verankerten. Die 3D-Oberfläche des MN-Substrats ermöglichte dabei sogar teilweise, dass die Zellausläufer unter die rundkörnigen

Polymerstrukturen reichten. Auf N-Substraten und G-Substraten bildeten sich diese seilartigen Zellausläufer nicht aus, da hier aufgrund der nicht vorhandenen Rauheit die Möglichkeit zur Verankerung fehlte. Auf N-Substraten bildeten sich jedoch teilweise breitere, flache Ausläufer (Abb. 3.12), die auf der Oberfläche auflagen und offensichtlich ebenfalls der Adhäsion dienen. Auch in mesenchymalen Stammzellen, kultiviert auf nanostrukturierten Substraten, wurden solche Ausläufer, wie sie auf MN-Substraten auftreten, beobachtet, wobei die Autoren hier ebenfalls eine Funktion zur Haftung an das Substrat vorschlagen (McNamara et al. 2014). Nach bestem Wissen ist dies jedoch die erste Studie, die für einzelne mESZ eine Funktion in der Verankerung über solche Zellausläufer demonstriert. Allerdings wurden ähnliche Zellstrukturen, in einer Studie über die Morphologie von mESZ-Kolonien auf Feederzellen beschrieben, ohne dass auf deren Funktion eingegangen wurde (Baharvand and Matthaei 2003). Die Effektivität der Verankerung von mESZ an das MN-Substrat wurde beim Versuch, die Zellen für die Passagierung enzymatisch zu lösen, deutlich. Nur durch starkes Schütteln und hohe Trypsin-Konzentrationen war eine Ablösung der Zellkolonien von der Oberfläche überhaupt möglich. Dabei wurden verstärkt die Zell-Zell-Kontakte innerhalb der Kolonien zueinander gelöst, während die unterste Zellschicht, die Kontakt zum MN-Polymer hatte, oft auf dem Substrat verblieb. Die Funktion der Protease Trypsin bei der Vereinzelung von Zellen basiert auf dem Verdauen von Membranproteinen, wie Integrinen oder Cadherinen. Die verminderte Effektivität des Trypsin beim Ablösen der mESZ vom MN-Substrat deutet darauf hin, dass der hier vorliegende Adhäsionsmechanismus von einer Rezeptor-Liganden Interaktion zwischen Zelle und Oberfläche unabhängig ist.

Anhand konfokaler Aufnahmen gefärbter mESZ auf MN-Substraten zeigte sich, dass die in REM-Aufnahmen beobachteten Zellausläufer Aktin-positiv waren (Abb. 3.13). Da die Adhäsion von Zellen an die EZM für gewöhnlich über Fokalkontakte vermittelt wird, die mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind (Blanchoin et al. 2014), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Zellen auf den verschiedenen Oberflächen Fokalkontakte aufwiesen. Jedoch zeigte keiner der untersuchten Marker für Integrin-vermittelte Adhäsionen (Paxillin (Abb. 3.13), Vinculin (Appendix, Abb. A4) beziehungsweise für aktive Integrin-Signaltransduktion (phospho-Paxillin (Appendix, Abb. A4)) ein *Clustering*, wie es typisch für Fokalkontakte ist. Dies war für mESZ auf allen drei HEMA-EDMA-Substraten der Fall, unabhängig von der Oberflächentopografie. Dass mESZ prinzipiell in der Lage sind, solche Adhäsionen zu bilden zeigte die Kontrolle mit mESZ auf Feederzellen. Zudem wird in der Literatur die Expression verschiedenster Integrin-Heterodimere von mESZ beschrieben, wie $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha V\beta 1$ -, $\alpha 6\beta 1$ - oder $\alpha V\beta 3$ -Integrine (Hayashi et al. 2007, Villa-Diaz et al. 2016). Diese sind unter anderem Liganden für Fibronectin oder Laminin, die einen Teil der EZM in der Blastozyste darstellen (Wartiovaara et al. 1979, Kang et al. 1990). Demnach bewirkt die Oberflächenchemie der HEMA-EDMA-Substrate unabhängig von

der Topografie eine Reduktion oder Inhibition der Integrin-vermittelten Fokalkontakte in mESZ. Tatsächlich wird poly-HEMA zur Verhinderung der Adhäsion eukaryotischer Zellen oder Bakterien an Oberflächen eingesetzt (Minett et al. 1984, Bilbruck, Hanlon and Martin 1993). Dies lässt sich auf den hydrophilen Charakter dieses Polymers zurückführen, was in den meisten Fällen zu einer verminderten Zelladhäsion führt (Lyndon 1986). Auch der hier verwendete *Crosslinker* EDMA ist für Zellen wenig adhäsiv, da er eine Ethylen-Glycol-Gruppe beinhaltet, die für ihre passivierenden Eigenschaften aufgrund der Hydrophilizität bekannt ist, vor allem in der polymerisierten Form (Desai and Hubbell 1991). Konsistent zu den hier erhaltenen Beobachtungen konnten Minett *et al.* nur dann eine Adhäsion von Nieren-Zellen auf poly-HEMA feststellen, wenn die Oberfläche strukturiert war (Minett et al. 1984). Demnach spielt die HEMA-EDMA Oberflächentopografie in Bezug auf die Zelladhäsion eine übergeordnete Rolle über die an sich zellabweisende Oberflächenchemie. Über physikalische Interaktion der Zelle mit dem Substrat, beispielsweise über Zellausläufer, kann eine Verankerung erfolgen, die unabhängig von Rezeptor-Liganden Interaktionen ist. Dementsprechend gibt es weitere Studien, die zeigen, dass eine raue Oberfläche die Adhäsion und das Wachstum verschiedener eukaryotischer Zelltypen fördert (Gentile et al. 2010, Patntirapong et al. 2015). Trotzdem lässt sich diese Aussage nicht verallgemeinern, sondern ist kontextabhängig in Bezug auf Faktoren wie Substratsteifheit, Ausmaß der Rauheit, Zelltyp oder Oberflächenchemie (Gentile et al. 2010, Gentile et al. 2013, Chen et al. 2013, Lyu et al. 2014, Giljean, Bigerelle and Anselme 2014).

4.2.2 Die Kultivierung der mESZ auf MN-Substraten fördert den Erhalt der Pluripotenz

Die Ergebnisse aus den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 zeigen, dass eine Kultivierung der mESZ auf den drei verschiedenen HEMA-EDMA-Substraten die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters unterschiedlich stark beeinflusst. Während die Zellen auf N- und G-Substraten bereits nach drei Tagen Kultivierung eine Reduktion des Oct4-eGFP Signals in vielen Zellen und Kolonien aufwiesen, war dies auf MN-Substrat deutlich weniger zu beobachten (Abb. 3.10). Die Quantifizierung zeigte sogar für mESZ auf MN-Substraten einen signifikant höheren Anteil komplett Oct4-positiver Kolonien als auf Feederzellen (47% auf MN-Substrat, 21% auf Feederzellen; Abb. 10 B'). Allerdings ist anzumerken, dass diese Quantifizierung nach drei Tagen Kultivierung auf den Oberflächen erfolgte, wohingegen bei der Routinekultivierung auf Feederzellen normalerweise alle zwei Tage eine Passagierung erfolgt, da die mESZ-Kolonien sonst zu groß werden und spontan differenzieren. Nach zwei Tagen Kultivierung der mESZ auf Feederzellen war ungefähr die Hälfte der Zellkolonien Oct4-positiv (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Kultivierung der mESZ auf MN-Substrat einen positiven Einfluss auf die Selbsterneuerung der Zellen hat, vergleichbar zur routinemäßigen Feederzell-Kultivierung. Dass dieser Effekt auch nach längerer Kultivierungsdauer (über 20 Tage) noch

gegeben ist, wird in Kapitel 3.2.3 demonstriert. Sowohl das Oct4-eGFP Signal, als auch die zirkuläre Morphologie der Kolonien waren nach der Langzeitkultivierung noch vorhanden, beziehungsweise sogar stärker ausgeprägt als zu Beginn der Kultivierung (Abb. 3.11). Die Differenzierung der mESZ in alle drei Keimblätter über EBs zeigte zusätzlich, dass die Langzeitkultivierung auf MN-Substraten die funktionelle Pluripotenz der mESZ erhält (Abb. 3.10). Dies ist meines Erachtens die erste Studie, die eine Aufrechterhaltung des Stammzellschicksals über solch einen langen Zeitraum auf unbeschichteten rauen Oberflächen demonstriert. Allerdings war die Inhibierung der spontanen Differenzierung der mESZ auf MN-Substraten nur dann gegeben, wenn das Stammzellmedium mit dem Zytokin LIF supplementiert war (Appendix, Abb. A3). Demnach ist der Einfluss der MN-Oberfläche nicht hinreichend für die mESZ Pluripotenz, sondern unterstützt lediglich den positiven Einfluss der chemischen Pluripotenzfaktoren. Trotz dieser Abhängigkeit von LIF ist es erstaunlich, dass die Oberflächentopografie solch einen starken Einfluss auf die Langzeit-Selbsterneuerung der mESZ hat. Dass dieser Effekt auch für andere mESZ-Linien gilt, wird in Jaggy *et al.* anhand der mESZ Zelllinie D3 demonstriert (Jaggy *et al.* 2015).

Welche Gründe können nun für die Aufrechterhaltung der mESZ-Pluripotenz auf MN-Substraten genannt werden? Die Tatsache, dass HEMA-EDMA-Substrate generell die Ausbildung von Integrin-vermittelten Fokalkontakten in mESZ verhindern (Kapitel 3.2.5 und 3.2.6), könnte unter anderem ein entscheidender Faktor für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz auf MN-Substrat sein. Mehrere Studien belegen, dass eine Inhibition der Integrin-Signaltransduktion, genauer die Inaktivität der *focal adhesion kinase* (FAK), einen positiven Einfluss auf die mESZ Selbsterneuerung hat (Hayashi *et al.* 2007, Hunt *et al.* 2012, Villa-Diaz *et al.* 2016). Dies wird in adhärennten pluripotenten Zellen dadurch bewerkstelligt, dass ihr Haupt-Integrinrezeptor $\alpha 6 \beta 1$, im Gegensatz zur normalen Integrin-Signaltransduktion, die FAK-Aktivität inhibiert (Villa-Diaz *et al.* 2016). Dadurch wird die für ESZ nötige Verankerung an das Substrat gewährleistet, jedoch für die Pluripotenz negative Einflüsse der Integrin-Signaltransduktion werden gleichzeitig inhibiert (Villa-Diaz *et al.* 2016). Solch ein negativer Faktor ist beispielsweise der ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) Signalweg, der eine Rolle bei der Differenzierung von embryonalen Stammzellen spielt und unter anderem durch Integrine über die FAK aktiviert wird (Legate, Wickström and Fässler 2009). Demnach könnte die Abwesenheit von Fokalkontakten auf HEMA-EDMA-Substraten positiv auf die mESZ Selbsterneuerung wirken. Konsistent damit sind die Ergebnisse der Versuche mit FN-beschichteten MN-Oberflächen aus Kapitel 3.2.6. Die Beschichtung der rauen Oberfläche mit FN führte hier zur Ausbildung von Fokalkontakten in darauf kultivierten mESZ und zu einer Reduktion des Anteils Oct4-positiver Kolonien trotz unveränderter Oberflächentopografie (Abb. 3.14). Dies verdeutlicht, dass nicht die Topografie alleine für die Pluripotenz der mESZ auf dem MN-Substrat verantwortlich ist.

Vielmehr scheint zusätzlich die reduzierte FAK-Aktivität durch die Oberflächenchemie der HEMA-EDMA-Substrate eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters zu spielen. Allerdings kann die FAK-Inhibition nicht der Hauptfaktor dafür sein, da sonst keine spontane Differenzierung der mESZ auf N- und G-Substraten auftreten würde. Deshalb muss die Topografie des MN-Substrates einen zusätzlichen, nicht unerheblichen Einfluss auf den Erhalt der Pluripotenz der mESZ haben. Dies könnte über die Wirkung der durch die Rauheit induzierten mESZ Zellausläufer auf MN-Substrat vermittelt werden (Kapitel 3.2.4). Welchen Einfluss diese Zellausläufer auf die mESZ Selbsterneuerung haben, und welcher Mechanismus hier eine Rolle spielt, wird im nächsten Abschnitt genauer diskutiert.

4.2.3 Die YAP-Aktivität ist abhängig von der Substrat-Topografie

Ein deutlicher Unterschied zwischen mESZ, die auf MN-Substrat kultiviert wurden im Vergleich zu Zellen auf N- und G-Substraten, war die Zellmorphologie (Kap 3.2.4). Da die Zellausläufer zur Adhäsion der mESZ besonders auf MN-Substraten vorhanden waren, welche wiederum verstärkt die Selbsterneuerung der mESZ förderten, herrscht möglicherweise eine Verbindung zwischen diesen beiden Beobachtungen. Nachdem im ersten Projekt dieser Arbeit bereits eine Korrelation zwischen der mESZ-Zellmorphologie und der YAP-Aktivität festgestellt werden konnte (siehe Kapitel 4.1.6), sollte die YAP-Aktivität auch hier in Abhängigkeit von der Topografie untersucht werden. Tatsächlich zeigte die Quantifizierung der relativen YAP-Lokalisation eine erhöhte YAP-Lokalisation im Zellkern von mESZ auf MN-Substraten im Vergleich zu Zellen auf G-Substraten (Abb. 3.15). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass die Ausbildung der Aktin-positiven-Zellausläufer auf MN-Substraten zu einer erhöhten Zellspannung beziehungsweise Zytoskelett-Kontraktilität führt, was wiederum einen positiven Einfluss auf die YAP-Aktivität hat (Halder et al. 2012). Da YAP seinerseits förderlich für die mESZ Selbsterneuerung ist (Lian et al. 2010, Beyer et al. 2013, Ohgushi et al. 2015), könnte dies ein Grund für den Pluripotenzerhalt auf MN-Substraten darstellen. Da auf den N- und G-Substraten solche Zellausläufer nur wenig beziehungsweise überhaupt nicht gebildet werden konnten, führte dies folglich zu einer verstärkten spontanen Differenzierung der darauf kultivierten mESZ. Einige Studien demonstrieren bereits, dass das Verhalten embryonaler Stammzellen durch die Oberflächentopografie beeinflusst wird (Chen et al. 2012, Jeon et al. 2012, Kong et al. 2013, Bae et al. 2014, Lü et al. 2014, Lyu et al. 2014). Neben geometrisch definierter Strukturierungen wurde auch der Effekt der Rauheit untersucht (Chen et al. 2012, Jeon et al. 2012, Lyu et al. 2014), allerdings mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen und ohne exakte Mechanismen aufzudecken. Chen *et al.* zeigen, dass raue Glassubstrate die spontane Differenzierung von embryonalen Stammzellen auslösen, wohingegen bei Lyu *et al.* sowie Jeon *et al.* ein positiver Effekt der Nano-Rauheit auf die ESZ-Pluripotenz festgestellt wurde. Solche

Widersprüche kommen möglicherweise durch Unterschiede im verwendeten Zelltyp, der Substratchemie, der Oberflächenbeschichtung und der verwendeten Kontrollsubstrate zustande. Bei Chen *et al.* wurden zum Beispiel hESZ auf Vitronectin-beschichteten Glassubstraten verwendet, wohingegen Jeon *et al.* mESZ auf Poly-D-Lysin-beschichteten PDMS-Substraten untersucht hatten. Nur Lyu *et al.* verwendeten unbeschichtete Substrate aus Gold für die Untersuchung von mESZ. Eine Proteinbeschichtung sollte bei der Untersuchung des Effekts der Substrat-Topografie auf Zellen jedoch vermieden werden, da sich bei rauen Substraten die Oberfläche vergrößert, wodurch mehr Protein in einem bestimmten Bereich adsorbiert. Dadurch hat eine Zelle bei gleicher Zellfläche auf rauer Oberfläche möglicherweise mehr Kontakt zu dem Protein als auf einer glatten, beschichteten Oberfläche. Auch Lyu *et al.* demonstrieren einen positiven Einfluss der Substrat-Rauheit auf die mESZ Selbsterneuerung für mindestens eine Woche in LIF-supplementiertem Medium (Lyu et al. 2014). Allerdings wurde hier festgestellt, dass nanostrukturierte Goldsubstrate aufgrund verbesserter Adhäsion zu Nachbarzellen und zum Substrat besser geeignet sind, als mikrostrukturierte Substrate. Der Vorteil der hier verwendeten MN-Substrate über die mikrorauen Substrate von Lyu *et al.* ist möglicherweise die hierarchische Strukturierung im Mikro- und Nanometerbereich. Die Verankerung der mESZ über feine Ausläufer an das MN-Substrat wird vermutlich durch die Nanostrukturierung verbessert. Diese Hypothese müsste durch die Verwendung eines nur mikrorauen HEMA-EDMA Zellkultursubstrats getestet werden, das mit der hier verwendeten Polymerisationstechnik derzeit jedoch nicht hergestellt werden kann. Dass YAP bei der Kultivierung von mESZ auf rauen Substraten eine Rolle spielt, wird in dieser Arbeit mit bestem Wissen zum ersten Mal gezeigt. Generell wurde der Einfluss der Substrat-Topografie auf die YAP-Aktivität in Zellen bisher wenig untersucht. Allerdings existiert eine Studie, die zeigt, dass die Kultivierung auf topografischen PDMS-Substraten (strukturiert mit $2 \times 2 \mu\text{m}$ breiten, und $7 \mu\text{m}$ tiefen Löchern) zu einer erhöhten YAP-Aktivität in Knochen-Vorläuferzellen führt und dadurch die osteogene Differenzierung begünstigt (Zhang et al. 2016). Desweiteren wurde in unserem Institut demonstriert, dass eine Rillen-Strukturierung ($2\text{-}10 \mu\text{m}$ breit, 650 nm tief) von PDMS-Substraten die YAP-Aktivität von Endothelzellen und glatten Muskelzellen fördert und die Proliferation der Zellen unterstützt (Chen 2015). In einer weiteren Studie an mesenchymalen Stammzellen, kultiviert auf verschiedenen großen Polyimid-Rillensubstraten, konnte wiederum kein Einfluss der Topographie auf die YAP-Aktivität festgestellt werden (Abagnale et al. 2015). Diese Beispiele verdeutlichen, dass eine topografische Strukturierung des Zellkultursubstrats nur in bestimmtem Kontext die YAP-Aktivität reguliert. Einflussgrößen hierfür können die Substrat-StEIFheit, der kultivierte Zelltyp, die Strukturierungsgröße und die daraus resultierende Zellform sein.

4.2.4 Fazit und offene Fragen zum Einfluss der Substrat-Topografie auf das mESZ Verhalten

Anhand chemisch identischer, jedoch unterschiedlich strukturierter Zellkultursubstrate aus dem Polymer HEMA-EDMA wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Reaktion von mESZ auf die Substrat-Topografie untersucht (zusammengefasst in Abb. 4.2). Die spontane Differenzierung von mESZ auf MN-Substraten war weniger häufig im Gegensatz zur Kultivierung auf weniger rauen N- und G-Substraten, wobei die funktionelle Pluripotenz in mESZ auch nach einer Langzeitkultivierung auf MN-Substraten noch gegeben war. Dies wurde auf die spezielle hierarchisch organisierte Rauheit der MN-Substrate zurückgeführt. Einzelzellen auf dem MN-Substrat wiesen eine verbesserte Zellverankerung über Zellausläufer sowie eine erhöhte YAP-Lokalisation im Zellkern auf. Zusätzlich war auf allen HEMA-EDMA-Substraten eine Inhibition der Integrin-Signaltransduktion zu verzeichnen, was die mESZ Pluripotenz fördert (Hayashi et al. 2007, Hunt et al. 2012, Villa-Diaz et al. 2016). Die beobachtete Korrelation zwischen den Zellausläufern, der erhöhten YAP-Aktivität und der Selbsterneuerung in mESZ auf MN-Substraten legt nahe, die mESZ aufgrund der Morphologie und der daraus resultierenden Aktin-Kontraktilität auf MN-Substraten pluripotent bleiben (Abb. 4.2). Es ist jedoch anzumerken, dass dies ein starkes Indiz, jedoch kein eindeutiger Beweis für den Zusammenhang zwischen der Pluripotenz und den Zellausläufern darstellt. In ESZ ist YAP/TAZ generell im Zellkern lokalisiert (Varelas 2014). Es stellt sich hier also die berühmte Frage „nach der Henne und dem Ei“. Ist YAP in mESZ auf MN-Substrat deshalb im Zellkern lokalisiert, weil die Zellen dort pluripotent sind? Oder sind die Zellen pluripotent, da die Zellausläufer, die Aktin-Kontraktilität und die YAP-Aktivität dies unterstützen? Diese Fragen müssten durch weitere Experimente, die unter Kapitel 4.4 diskutiert werden, abschließend geklärt werden. Da die Zellmorphologie jedoch bekanntermaßen einen starken Einfluss auf die YAP-Aktivität hat und da diese Mechanotransduktion dominant über den Hippo-Signalweg ist (Piccolo et al. 2014), deutet alles auf einen Zusammenhang zwischen den beobachteten Zellausläufern und der erhöhten YAP-Aktivität auf MN-Substraten hin. Dass eine erhöhte YAP-Aktivität die Pluripotenz von Zellen fördert, ist bereits bekannt (Lian et al. 2010). Diese YAP-vermittelte Pluripotenz ist abhängig von LIF (Lian et al. 2010, Piccolo et al. 2014), was erklärt, warum das MN-Substrat nur in Anwesenheit von LIF die Selbsterneuerung der mESZ fördert. Die Erkenntnisse aus diesem Teil der Arbeit könnten die Routine-Zellkultivierung von mESZ vereinfachen. Eine Beschichtung von Petrischalen oder Zellkulturflaschen mit dem MN-HEMA-EDMA Polymer wäre durchaus denkbar und kostengünstiger als Beschichtungen mit Matrigel oder mit anderen komplexen Hydrogelen (Efremov et al. 2013). Die Vorbereitung und aufwändige Inaktivierung von Feederzellen für die Routine-Kultivierung der Stammzellen wäre dadurch nicht mehr nötig. Desweiteren wäre die Gefahr von Kontaminationen durch Feederzellen oder andere biochemische Beschichtungen

reduziert, sodass MN-Substrate eine einfache Alternative zu Feederzellen oder Matrigel darstellen.

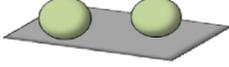
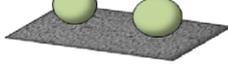
	G-Substrat	N-Substrat	MN-Substrat
Topografie	glatt 	nano-rau 	mikro-nano-rau 
Reduktion der Integrin Signaltransduktion	✓	✓	✓
Adhäsion über Zellausläufer	✗	✗	✓
YAP (Zellkern) YAP (Zytoplasma)	↓	<i>n.a.</i>	↑
Reaktion der mESZ	spontane Differenzierung ✗	spontane Differenzierung ✗	Erhalt der Pluripotenz ✓

Abb. 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Teil 2 (Topografie). Alle getesteten topografischen HEMA-EDMA-Substrate (grau) führen zu einer Reduktion der Integrin-Signaltransduktion in darauf kultivierten mESZ (grün). Jedoch nur MN-Substrate erlauben die verstärkte Ausbildung von Zellausläufern, die die mESZ an das raue Substrat verankern. Die relative YAP-Lokalisation ist niedriger in Zellen auf G-Substrat im Vergleich zu Zellen auf MN-Substrat (*n.a.* = nicht ausgewertet). Auf MN-Substrat kultivierte mESZ bleiben pluripotent, während Zellen auf G- und N-Substrat vermehrt spontan differenzieren.

4.3 Allgemeines Fazit

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass mESZ in ihrem Verhalten durch physikalische Faktoren aus der Mikroumgebung beeinflusst werden. Dies gilt sowohl für die Geometrie der adhäsiven 2D- und 3D-Umgebung als auch für die Topografie. Ebenso wurde deutlich, dass eine 2D-Kultivierung von (Stamm-) Zellen zu unterschiedlichem Zellverhalten führen kann, als es bei der 3D-Kultivierung der Fall ist. Interessanterweise sind die Ergebnisse aus den Experimenten mit 3D-Mikrokammern analog zu den Beobachtungen des zweiten Teilprojekts dieser Arbeit. Sowohl für die 3D-Mikrokammern als auch für die HEMA-EDMA-Substrate war die morphologische Veränderung der Zellen vermutlich der entscheidende Faktor, der die YAP-Aktivität und dadurch die Proliferationsfähigkeit beziehungsweise Selbsterneuerung der Zellen steuerte. Das Aufspannen der mESZ zwischen den Wänden kleiner FN-beschichteter Mikrokammern ist also demnach mit der Ausbildung der Aktin-Zellausläufer in mESZ, die auf MN-Substrat kultiviert werden, gleichzusetzen. Daraus leitet sich nun folgende Hypothese ab (Abb. 4.3): Eine erhöhte Kontraktilität des Aktin-Zytoskeletts und die daraus resultierende YAP-Aktivität fördern die Selbsterneuerung von mESZ. Dabei kann die

Kontraktilität Rezeptor-vermittelt beeinflusst werden, wie im Fall der 3D-Mikrokammern, oder auf direktem Wege durch die Ausbildung Aktin-positiver Zellausläufer, wie es auf MN-Substraten beobachtet wurde. Eine Integrin-unabhängige Adhäsion der mESZ ist dabei sogar förderlich für den Erhalt der Pluripotenz, da der negative Einfluss der FAK hier nicht zu tragen kommt.

Zusammenfassend können diese Erkenntnisse beispielsweise genutzt werden, um die optimalen Anforderungen an eine (künstliche) mESZ-Nische zum Erhalt der Pluripotenz und Selbsterneuerung zu erfüllen. Solch eine Nische sollte:

1. eine ausreichend große adhäsive Fläche für die Zellen zur Verfügung stellen,
2. relativ engmaschig bzw. kleinporig sein (im Größenbereich einer einzelnen Zelle), damit die Zelle die Verankerungspunkte auch erreichen kann,
3. die Adhäsion beziehungsweise das Aufspannen oder *Spreading* der Zellen ermöglichen, um die Aktin-Kontraktilität zu erhöhen, beispielsweise durch die dreidimensionale Präsentation des adhäsiven Liganden oder durch topografische Oberflächen,
4. falls möglich die Integrin-Signaltransduktion und FAK-Aktivität verhindern.

Einige dieser Anforderungen herrschen auch in der natürlichen Stammzellnische *in vivo* vor. Trotzdem ist an dieser Stelle erneut anzumerken, dass das *in vivo* Pendant der kultivierten ESZ, die innere Zellmasse der Blastozyste, nur sehr transient existiert und dass möglicherweise einige Faktoren aus dieser Nische über längere Zeit eine Differenzierung der Zellen in die drei Keimblätter begünstigen. Für die Aufrechterhaltung des embryonalen Stammzellcharakters *in vitro* sind deshalb oft Anforderungen nötig, wie sie in der Blastozyste nie vorkommen, beispielsweise die regelmäßige enzymatische Vereinzelung der Zellen bei der mESZ-Passagierung. Die Verwendung von Substraten wie zum Beispiel MN-HEMA-EDMA-Oberflächen, oder Substrate bestehend aus kleinen 3D-Mikrokammern könnten für die *in vitro* Kultivierung und Amplifikation der Zellen in Zukunft von Bedeutung sein. Eine optimale Kultivierung pluripotenter Zellen ist sowohl für die Grundlagenforschung, als auch im Bereich der Medizin ein erfolgsbringender Faktor.

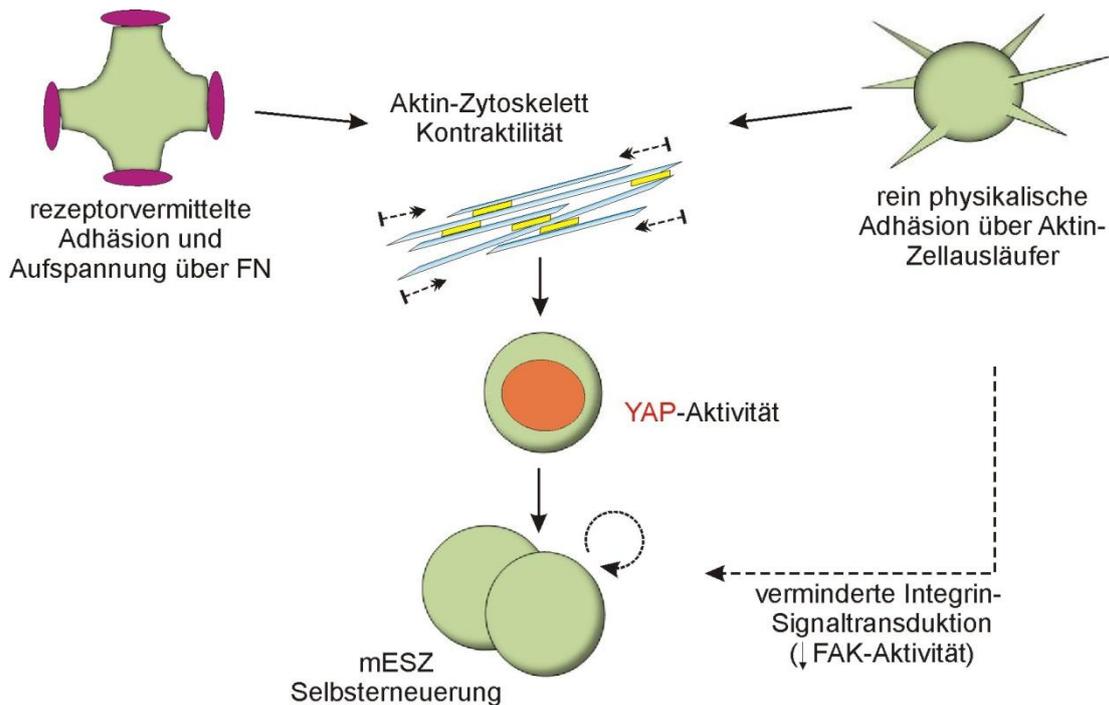


Abb. 4.3: Hypothetisches Modell zur mechanisch induzierten Selbsterneuerung in mESZ. Das Aufspannen von mESZ (grün) zwischen FN-Adhäsionspunkten (magenta, links oben) führt zu einer erhöhten Kontraktibilität des Aktin-Zytoskeletts (blau = Aktin, gelb = Myosin), woraufhin das Mechanotransduktions-Protein YAP (orange) aktiviert wird. Dies hat eine Selbsterneuerung der mESZ zu Folge. Die direkte, Rezeptor-unabhängige Modifikation des Aktin-Zytoskeletts anhand von Zellausläufern (rechts oben) führt gleichermaßen zu einer verstärkten Aktin-Kontraktibilität. Dies beeinflusst wiederum positiv die Aktivierung von YAP und die Selbsterneuerung der mESZ. Eine Reduktion der FAK-Aktivität durch eine Integrin-unabhängige Adhäsion stellt eine weitere positive Einflussgröße auf die mESZ Selbsterneuerung dar.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit veranschaulichen anhand von zwei unterschiedlichen Ansätzen die Abhängigkeit der mESZ von physikalischen Parametern der zellulären Mikroumgebung. Es existieren an dieser Stelle jedoch noch offene Fragen, die durch weiterführende Experimente geklärt werden könnten. Auf diese soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Die Experimente mit 2D-Mikroinseln führten zu der Hypothese, dass eine ausreichend große beschichtete FN-Fläche für die Proliferation der mESZ nötig ist. Eine FN-Verdünnungsreihe könnte Aufschluss darüber geben, ob in diesem Kontext die Anzahl der für die Zelle zugänglichen Fibronectinmoleküle ausschlaggebend ist, oder ob lediglich die Größe der adhäsiven Fläche von Bedeutung ist.

Anhand der mikroskopischen Analyse des Oct4-eGFP-Levels der mESZ auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikrokammern konnte der Pluripotenzstatus der Zellen nicht ermittelt werden. Auch wenn die erhöhte Proliferationsrate auf großen Mikroinseln und in kleinen Mikrokammern sowie die erhöhte YAP-Aktivität in kleinen Kammern ein starkes Indiz für die Pluripotenz der

Zellen sind, müsste dies in weiteren Experimenten eindeutig geklärt werden. Denkbar wäre eine molekularbiologische Analyse, wie eine quantitative PCR, oder *Westernblots*, um den Pluripotenzstatus der Zellen auf den 2D- und 3D-Substraten zu ermitteln. Dies kann prinzipiell mit Hilfe von Pluripotenzmarkern (zum Beispiel Sox2 oder Nanog) und Differenzierungsmarkern (beispielsweise Brachyury oder TUJ1) realisiert werden. Aufgrund der Anordnung der verschiedenen Konditionen (Größen) auf einem Deckglas und der relativ kleinen Substratfelder, war eine molekularbiologische Analyse mit den hier verwendeten Substraten jedoch nicht möglich. Dies wäre nur dann machbar, wenn die gesamte Fläche eines Deckglases mit der gleichen Mikroinsel- oder Mikrokommer-Größe strukturiert wäre, sodass die Zellen auf der Oberfläche enzymatisch abgelöst und molekularbiologisch analysiert werden könnten. Durch geeignete DLS-basierte Master könnten solche Strukturen mit Hilfe des μ CP oder der hier verwendeten 3D-Abformungstechnik in großem Maßstab hergestellt werden. Die Produktion eines Masters dieser Ausmaße nimmt jedoch sehr viel Zeit in Anspruch und sollte wohl überlegt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen der Zellmorphologie der mESZ auf MN-Substraten und der Selbsterneuerung der Zellen auf diesem Substrat festgestellt werden, wobei zusätzlich auf diesem Substrat eine erhöhte YAP-Aktivität in den mESZ beobachtet wurde. Die Hypothese, dass die Zellausläufer eine erhöhte Aktin-Kontraktilität auslösen, wodurch YAP aktiviert wird, welches die Selbsterneuerung der mESZ positiv beeinflusst, müsste in weiteren Experimenten bestätigt werden. Am besten wäre hier ein Ansatz geeignet, in dem die Aktin-Kontraktilität direkt in Zellen auf MN-Substrat inhibiert wird, beispielsweise mit einem Myosin II-Inhibitor wie Blebbistatin (Kovács et al. 2004) oder mit Latrunculin A, das die Aktin-Polymerisation inhibiert (Yarmola et al. 2000). Eine verstärkte Differenzierung für Zellen unter diesen Bedingungen würde zeigen, dass die Kontraktilität der Zellen für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters auf MN-Substrat von Bedeutung ist. Alternativ könnten in einem etwas aufwändigeren Experiment in einzelnen Zellen die Zellausläufer gezielt mittels Laser abgelöst werden, wie es für Retraktionsfasern von HeLa-Zellen bereits durchgeführt wurde (Fink et al. 2011). Die Zellreaktion darauf könnte anhand des Oct4-eGFP Reportergens in Zeitrafferaufnahmen analysiert werden. Ein Rückgang des Signals in einer Zelle nach dem Ablösen der Zellausläufer vom Substrat wäre ein eindeutiger Beweis für den Zusammenhang der Zellausläufer auf MN-Substrat und der beobachteten mESZ Pluripotenz.

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit stammen alle aus Experimenten mit murinen Stammzellen embryonalen Ursprungs. Abschließend stellt sich nun die Frage, inwieweit diese Ergebnisse auf andere pluripotente Zelltypen wie hESZ oder iPSZ projiziert werden können. Für die Medizin sind Stammzellen humanen Ursprungs von weitaus größerer Bedeutung und eine Kontrolle dieser Zellen auf physikalischer Ebene wäre ein enormer Fortschritt in vielen Bereichen, wie

beim *Tissue Engineering* oder dem Einsatz von Implantaten. Der Vergleich zwischen humanen und murinen ESZ zeigt, dass sich die Zellen in ihrem Verhalten sehr ähneln, jedoch gibt es auch Unterschiede zwischen diesen Zelltypen. Gemeinsamkeiten sind neben der Pluripotenz und Selbsterneuerung beispielsweise die wichtige Rolle von Oct4 und Nanog oder die hohe proliferative Aktivität (Grivennikov 2008). Neben der Tatsache, dass diese Zelltypen aus unterschiedlichen Organismen stammen, sind sie nicht vollkommen äquivalent in Bezug auf den Status der Entwicklung. Obwohl beide Zelltypen aus der Inneren Zellmasse von Blastozysten stammen, wird von mESZ angenommen, dass sie den naiven Zustand darstellen, wohingegen hESZ *primed*, also in der Entwicklung weiter fortgeschritten sind (De Los Angeles et al. 2015). Dadurch kommt unter anderem es zu Unterschieden im Repertoire bestimmter Oberflächenmarker oder bei der Sensibilität gegenüber LIF (Grivennikov 2008). Desweiteren überleben mESZ auch als Einzelzellen, was bei hESZ oder iPSZ nicht der Fall ist (Xu et al. 2010). Aufgrund dieser Unterschiede ist nicht eindeutig vorauszusagen, ob die hier erhaltenen Ergebnisse für alle pluripotente Zelltypen gültig sind. Diese Fragen können nur durch weitere Experimente an humanen Stammzellen geklärt werden.

Appendix

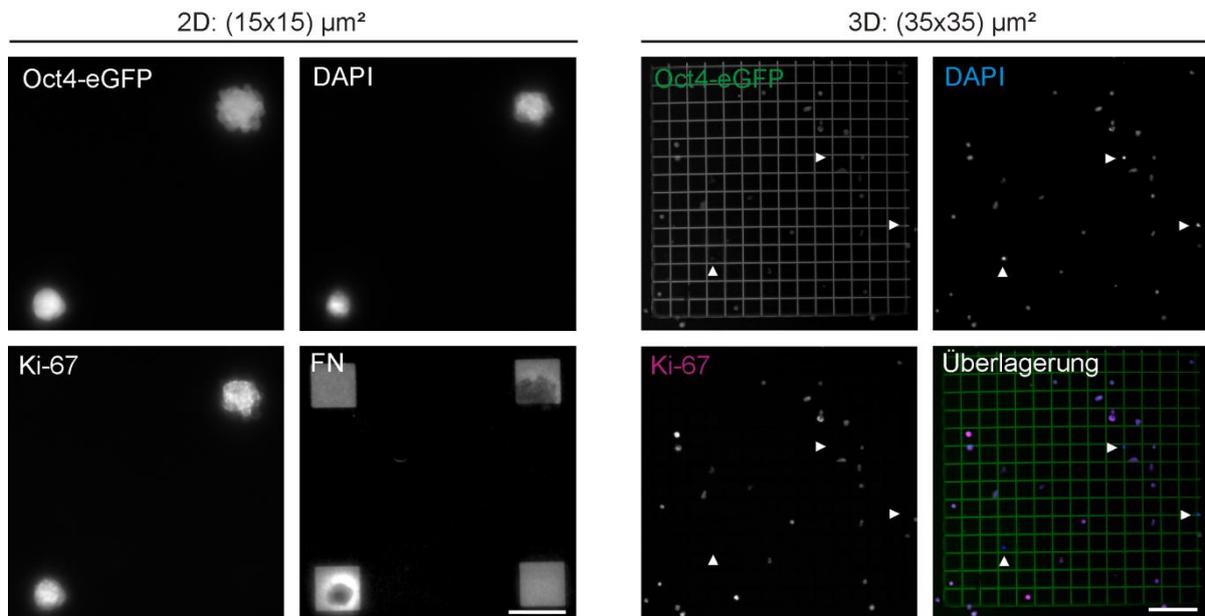


Abb. A1: Die mESZ auf kleinen Mikroinseln und in großen Mikrokkammern sind Ki-67 positiv. Die Oct4-eGFP (grau/grün) exprimierenden mESZ wurden nach 4 h Kultivierung auf den Substraten fixiert und mit einem Antikörper gegen Ki-67 gefärbt. Zusätzlich wurde der Zellkern (DAPI; grau/blau) und die 2D-FN-Mikroinseln (links: grau) markiert. Ki-67 kann nur in Zellen nachgewiesen werden, die einen aktiven Zellzyklus aufweisen. Alle vitalen mESZ auf 2D- und 3D-Substraten waren stets Ki67-positiv, auch auf Substraten, die zu einer Reduktion der Proliferationsrate führen (2D: $(15 \times 15) \mu\text{m}^2$; 3D: $(35 \times 35) \mu\text{m}^2$). Pfeilspitzen zeigen abgestorbene mESZ, erkennbar durch das unnatürlich starke und kreisrunde DAPI-Signal, bei denen kein Ki-67 nachweisbar war. Maßstab: links 20 μm ; rechts 100 μm .

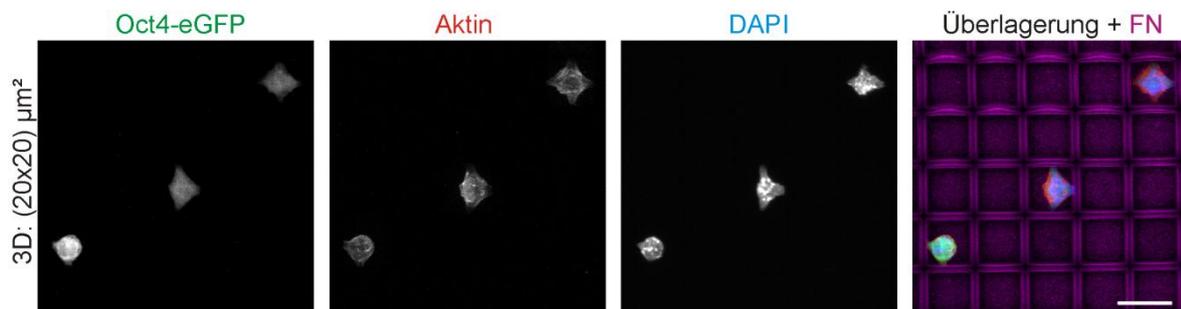


Abb. A2: mESZ adhären kreuzförmig in Mikrokkammern der Größe $(20 \times 20) \mu\text{m}^2$. Die Oct4-eGFP (grau/grün) exprimierenden Zellen wurden nach 4 h Kultivierung in den Mikrokkammern fixiert, fluoreszent markiert (Aktin: grau/rot, DAPI: grau/blau, FN: grau/magenta) und am konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt die Maximalprojektion der einzelnen z-Schnitte. Die mESZ waren teilweise in der Lage, sich zwischen allen vier Wänden der FN-beschichteten Mikrokkammern der Größe $(20 \times 20) \mu\text{m}^2$ aufzuspannen (oben rechts). Maßstab: 20 μm .

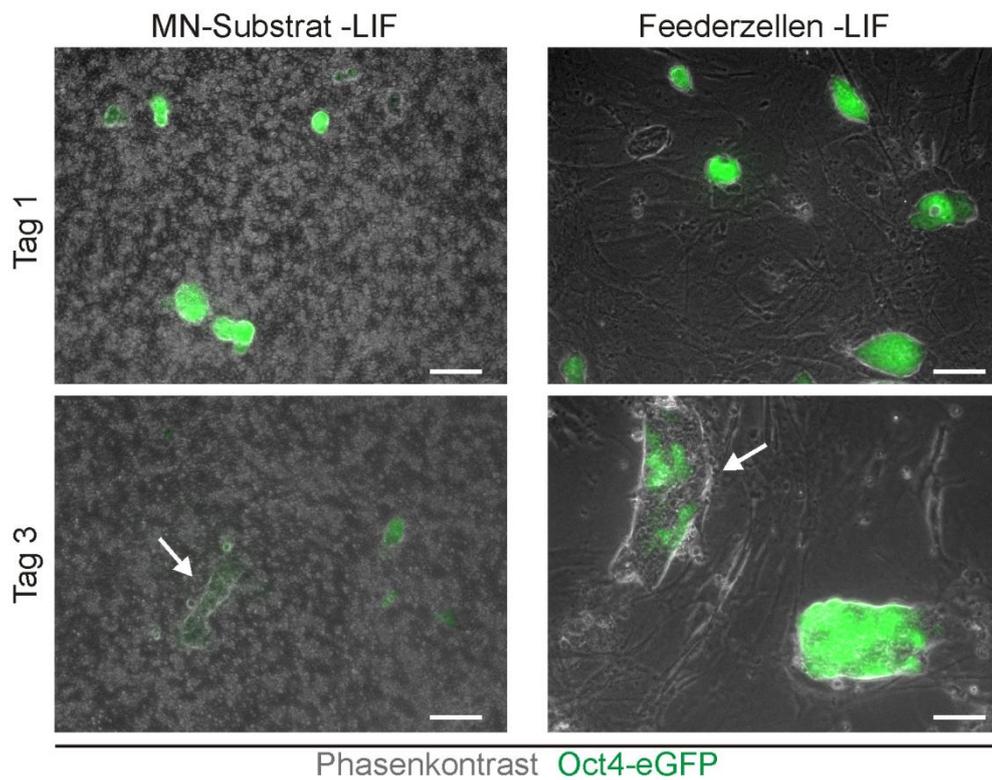


Abb. A3: In Abwesenheit von LIF verlieren mESZ auf MN-Substrat und auf Feederzellen das Oct4-eGFP Signal. Die Oct4-eGFP-exprimierenden mESZ wurden für 1 bzw. 3 Tage in mESZ Medium ohne LIF auf MN- und Feederzellen kultiviert. Dargestellt sind Oct4-eGFP (grün) und der Phasenkontrast (grau). Die mESZ Kolonien verloren sowohl auf MN-Substrat als auch auf Feederzellen vermehrt das Oct4-eGFP Signal (Pfeile). Auf dem MN-Substrat wurde desweiteren nur ein geringes Wachstum der Kolonien beobachtet. Maßstab 50 μm .

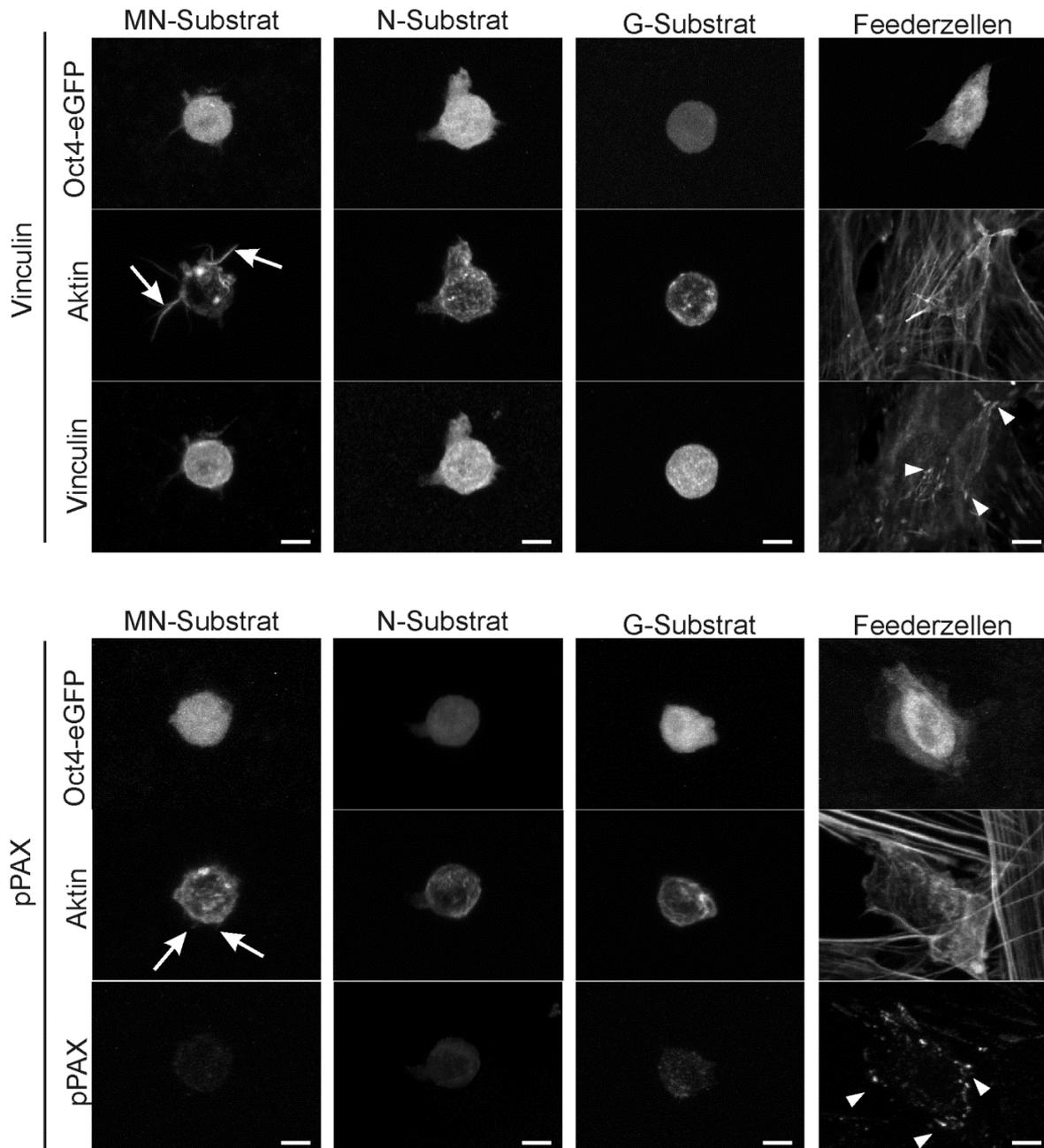


Abb. A4: Die Adhäsion der mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten ist Integrin-unabhängig. Maximalprojektionen konfokaler Aufnahmen der mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten und Feederzellen. Die Oct4-eGFP exprimierenden Zellen wurden nach 4 h auf den Substraten fixiert und das Aktin-Zytoskelett sowie Vinculin (als Marker für Integrin-vermittelte Fokalkontakte) und phosphoryliertes Paxillin (pPAX, als Marker für aktive Integrin-Signalweiterleitung) immunzytochemisch gefärbt. Auf dem MN-Substrat waren dünne, Aktin-positive Zellausläufer (Pfeile) zu erkennen. Im Gegensatz zu mESZ auf Feederzellen, wurden auf allen drei HEMA-EDMA-Substraten keine Cluster von Vinculin oder pPAX (Pfeilspitze) in den mESZ detektiert. Maßstab: 5 μ m.

Literaturverzeichnis

- Abagnale, G., M. Steger, V. H. Nguyen, N. Hersch, A. Sechi, S. Joussem, B. Denecke, R. Merkel, B. Hoffmann, A. Dreser, U. Schnakenberg, A. Gillner & W. Wagner (2015) Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. *Biomaterials*, 61, 316-26.
- Abdelalim, E. M. (2013) Molecular mechanisms controlling the cell cycle in embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*, 9, 764-73.
- Ader, M. & E. M. Tanaka (2014) Modeling human development in 3D culture. *Curr Opin Cell Biol*, 31, 23-8.
- Avior, Y., I. Sagi & N. Benvenisty (2016) Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17, 170-82.
- Bae, D., S. H. Moon, B. G. Park, S. J. Park, T. Jung, J. S. Kim, K. B. Lee & H. M. Chung (2014) Nanotopographical control for maintaining undifferentiated human embryonic stem cell colonies in feeder free conditions. *Biomaterials*, 35, 916-28.
- Baharvand, H. & K. I. Matthaei (2003) The ultrastructure of mouse embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online*, 7, 330-5.
- Baker, B. M. & C. S. Chen (2012) Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci*, 125, 3015-24.
- Becker, K. A., P. N. Ghule, J. A. Therrien, J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. van Wijnen & G. S. Stein (2006) Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol*, 209, 883-93.
- Baur, S. (2014) Murine stem cell behavior in geometrically defined 2D and 3D patterns. Masterthesis, Zoologisches Institut, KIT
- Bellis, S. L., J. A. Perrotta, M. S. Curtis & C. E. Turner (1997) Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin. *Biochem J*, 325 (Pt 2), 375-81.
- Beyer, T. A., A. Weiss, Y. Khomchuk, K. Huang, A. A. Ogunjimi, X. Varelas & J. L. Wrana (2013) Switch enhancers interpret TGF- β and Hippo signaling to control cell fate in human embryonic stem cells. *Cell Rep*, 5, 1611-24.
- Bilbruck, J., G. W. Hanlon & G. P. Martin (1993) The effects of polyHEMA coating on the adhesion of bacteria to polymer monofilaments. *International Journal of Pharmaceutics*, 99, 293-301.
- Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes & J. Plastino (2014) Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*, 94, 235-63.
- Boyer, L. A., T. I. Lee, M. F. Cole, S. E. Johnstone, S. S. Levine, J. P. Zucker, M. G. Guenther, R. M. Kumar, H. L. Murray, R. G. Jenner, D. K. Gifford, D. A. Melton, R. Jaenisch & R. A. Young (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 947-56.
- Braam, S. R., L. Zeinstra, S. Litjens, D. Ward-van Oostwaard, S. van den Brink, L. van Laake, F. Lebrin, P. Kats, R. Hochstenbach, R. Passier, A. Sonnenberg & C. L. Mummery (2008) Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. *Stem Cells*, 26, 2257-65.
- Brafman, D. A., C. Phung, N. Kumar & K. Willert (2013) Regulation of endodermal differentiation of human embryonic stem cells through integrin-ECM interactions. *Cell Death Differ*, 20, 369-81.
- Bressan, E., L. Sbricoli, R. Guazzo, I. Tocco, M. Roman, V. Vindigni, E. Stellini, C. Gardin, L. Ferroni, S. Sivolella & B. Zavan (2013) Nanostructured surfaces of dental implants. *Int J Mol Sci*, 14, 1918-31.

- Bédurier, A., C. Vieu, F. Arnauduc, J. C. Sol, I. Loubinoux & L. Vaysse (2012) Engineering of adult human neural stem cells differentiation through surface micropatterning. *Biomaterials*, 33, 504-14.
- Charras, G. T. (2008) A short history of blebbing. *J Microsc*, 231, 466-78.
- Chen, C. S., M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides & D. E. Ingber (1997) Geometric control of cell life and death. *Science*, 276, 1425-8.
- Chen, H. 2015. The effect of cell age on the response of human vascular cells to different surface topographies. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie.
- Chen, S., M. Lewallen & T. Xie (2013) Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development*, 140, 255-65.
- Chen, W., L. G. Villa-Diaz, Y. Sun, S. Weng, J. K. Kim, R. H. Lam, L. Han, R. Fan, P. H. Krebsbach & J. Fu (2012) Nanotopography influences adhesion, spreading, and self-renewal of human embryonic stem cells. *ACS Nano*, 6, 4094-103.
- Cheung, T. H. & T. A. Rando (2013) Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 329-40.
- Chin, M. H., M. J. Mason, W. Xie, S. Volinia, M. Singer, C. Peterson, G. Ambartsumyan, O. Aimiwu, L. Richter, J. Zhang, I. Khvorostov, V. Ott, M. Grunstein, N. Lavon, N. Benvenisty, C. M. Croce, A. T. Clark, T. Baxter, A. D. Pyle, M. A. Teitell, M. Pelegri, K. Plath & W. E. Lowry (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*, 5, 111-23.
- Chowdhury, F., Y. Li, Y. C. Poh, T. Yokohama-Tamaki, N. Wang & T. S. Tanaka (2010) Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix tractions. *PLoS One*, 5, e15655.
- Claus, T. K., B. Richter, V. Hahn, A. Welle, S. Kayser, M. Wegener, M. Bastmeyer, G. Delaittre & C. Barner-Kowollik (2016) Simultaneous Dual Encoding of Three-Dimensional Structures by Light-Induced Modular Ligation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55, 3817-22.
- Cockburn, K. & J. Rossant (2010) Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest*, 120, 995-1003.
- De Los Angeles, A., F. Ferrari, R. Xi, Y. Fujiwara, N. Benvenisty, H. Deng, K. Hochedlinger, R. Jaenisch, S. Lee, H. G. Leitch, M. W. Lensch, E. Lujan, D. Pei, J. Rossant, M. Wernig, P. J. Park & G. Q. Daley (2015) Hallmarks of pluripotency. *Nature*, 525, 469-78.
- Deakin, N. O. & C. E. Turner (2008) Paxillin comes of age. *J Cell Sci*, 121, 2435-44.
- Desai, N., P. Rambhia & A. Gishto (2015) Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reprod Biol Endocrinol*, 13, 9.
- Desai, N. P. & J. A. Hubbell (1991) Biological responses to polyethylene oxide modified polyethylene terephthalate surfaces. *J Biomed Mater Res*, 25, 829-43.
- Discher, D. E., D. J. Mooney & P. W. Zandstra (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, 324, 1673-7.
- Diz-Muñoz, A., M. Krieg, M. Bergert, I. Ibarlucea-Benitez, D. J. Muller, E. Paluch & C. P. Heisenberg (2010) Control of directed cell migration in vivo by membrane-to-cortex attachment. *PLoS Biol*, 8, e1000544.
- Dumitru, R., V. Gama, B. M. Fagan, J. J. Bower, V. Swahari, L. H. Pevny & M. Deshmukh (2012) Human embryonic stem cells have constitutively active Bax at the Golgi and are primed to undergo rapid apoptosis. *Mol Cell*, 46, 573-83.
- Dupont, S. (2016) Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. *Exp Cell Res*, 343, 42-53.
- Efremov, A. N., E. Stanganello, A. Welle, S. Scholpp & P. A. Levkin (2013) Micropatterned superhydrophobic structures for the simultaneous culture of multiple cell types and the study of cell-cell communication. *Biomaterials*, 34, 1757-63.
- Evans, M. J. & M. H. Kaufman (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-6.
- Faast, R., J. White, P. Cartwright, L. Crocker, B. Sarcevic & S. Dalton (2004) Cdk6-cyclin D3 activity in murine ES cells is resistant to inhibition by p16(INK4a). *Oncogene*, 23, 491-502.

- Fenter, P., A. Eberhardt & P. Eisenberger (1994) Self-Assembly of n-Alkyl Thiols as Disulfides on Au(111). *Science*, 266, 1216-8.
- Fernández, B. G., P. Gaspar, C. Brás-Pereira, B. Jezowska, S. R. Rebelo & F. Janody (2011) Actin-Capping Protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development*, 138, 2337-46.
- Fink, J., N. Carpi, T. Betz, A. Bétard, M. Chebah, A. Azioune, M. Bornens, C. Sykes, L. Fetler, D. Cuvelier & M. Piel (2011) External forces control mitotic spindle positioning. *Nat Cell Biol*, 13, 771-8.
- Frantz, C., K. M. Stewart & V. M. Weaver (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123, 4195-200.
- Gadhari, N., M. Charnley, M. Marelli, J. Brugger & M. Chiquet (2013) Cell shape-dependent early responses of fibroblasts to cyclic strain. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3415-25.
- Gao, L., R. McBeath & C. S. Chen (2010) Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin. *Stem Cells*, 28, 564-72.
- Gearing, D. P., M. R. Comeau, D. J. Friend, S. D. Gimpel, C. J. Thut, J. McGourty, K. K. Brasher, J. A. King, S. Gillis & B. Mosley (1992) The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science*, 255, 1434-7.
- Gentile, F., R. Medda, L. Cheng, E. Battista, P. E. Scopelliti, P. Milani, E. A. Cavalcanti-Adam & P. Decuzzi (2013) Selective modulation of cell response on engineered fractal silicon substrates. *Sci Rep*, 3, 1461.
- Gentile, F., L. Tirinato, E. Battista, F. Causa, C. Liberale, E. M. di Fabrizio & P. Decuzzi (2010) Cells preferentially grow on rough substrates. *Biomaterials*, 31, 7205-12.
- Gerdes, J., H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab & H. Stein (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133, 1710-5.
- Giljean, S., M. Bigerelle & K. Anselme (2014) Roughness statistical influence on cell adhesion using profilometry and multiscale analysis. *Scanning*, 36, 2-10.
- Ginis, I., Y. Luo, T. Miura, S. Thies, R. Brandenberger, S. Gerech-Nir, M. Amit, A. Hoke, M. K. Carpenter, J. Itskovitz-Eldor & M. S. Rao (2004) Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*, 269, 360-80.
- Goldmann, W. H. (2012) Mechanotransduction in cells. *Cell Biol Int*, 36, 567-70.
- Gonzales, K. A., H. Liang, Y. S. Lim, Y. S. Chan, J. C. Yeo, C. P. Tan, B. Gao, B. Le, Z. Y. Tan, K. Y. Low, Y. C. Liou, F. Bard & H. H. Ng (2015) Deterministic Restriction on Pluripotent State Dissolution by Cell-Cycle Pathways. *Cell*, 162, 564-79.
- Greiner, A. M., B. Richter & M. Bastmeyer (2012) Micro-engineered 3D scaffolds for cell culture studies. *Macromol Biosci*, 12, 1301-14.
- Grivennikov, I. A. (2008) Embryonic stem cells and the problem of directed differentiation. *Biochemistry (Mosc)*, 73, 1438-52.
- Halder, G., S. Dupont & S. Piccolo (2012) Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 591-600.
- Harburger, D. S. & D. A. Calderwood (2009) Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci*, 122, 159-63.
- Harris, G. M., M. E. Piroli & E. Jabbarzadeh (2014) Deconstructing the Effects of Matrix Elasticity and Geometry in Mesenchymal Stem Cell Lineage Commitment. *Adv Funct Mater*, 24, 2396-2403.
- Harvey, A. G., E. W. Hill & A. Bayat (2013) Designing implant surface topography for improved biocompatibility. *Expert Rev Med Devices*, 10, 257-67.
- Hayashi, Y., M. K. Furue, T. Okamoto, K. Ohnuma, Y. Myoishi, Y. Fukuhara, T. Abe, J. D. Sato, R. Hata & M. Asashima (2007) Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 25, 3005-15.
- Higuchi, A., Q. D. Ling, Y. Chang, S. T. Hsu & A. Umezawa (2013) Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate. *Chem Rev*, 113, 3297-328.
- Hindley, C. & A. Philpott (2013) The cell cycle and pluripotency. *Biochem J*, 451, 135-43.
- Hunt, G. C., P. Singh & J. E. Schwarzbauer (2012) Endogenous production of fibronectin is required for self-renewal of cultured mouse embryonic stem cells. *Exp Cell Res*, 318, 1820-31.

- Jaggy, M., P. Zhang, A. M. Greiner, T. J. Autenrieth, V. Nedashkivska, A. N. Efremov, C. Blattner, M. Bastmeyer & P. A. Levkin (2015) Hierarchical Micro-Nano Surface Topography Promotes Long-Term Maintenance of Undifferentiated Mouse Embryonic Stem Cells. *Nano Lett*, 15, 7146-54.
- Jeon, K., H. J. Oh, H. Lim, J. H. Kim, D. H. Lee, E. R. Lee, B. H. Park & S. G. Cho (2012) Self-renewal of embryonic stem cells through culture on nanopattern polydimethylsiloxane substrate. *Biomaterials*, 33, 5206-20.
- Joddar, B. & Y. Ito (2013) Artificial niche substrates for embryonic and induced pluripotent stem cell cultures. *J Biotechnol*, 168, 218-28.
- Kang, H. M., K. Kim, H. B. Kwon & W. K. Cho (1990) Regulation of laminin gene expression in the expansion of mouse blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 27, 191-9.
- Kang, X., Y. Xie, H. M. Powell, L. James Lee, M. A. Belury, J. J. Lannutti & D. A. Kniss (2007) Adipogenesis of murine embryonic stem cells in a three-dimensional culture system using electrospun polymer scaffolds. *Biomaterials*, 28, 450-8.
- Kapinas, K., R. Grandy, P. Ghule, R. Medina, K. Becker, A. Pardee, S. K. Zaidi, J. Lian, J. Stein, A. van Wijnen & G. Stein (2013) The abbreviated pluripotent cell cycle. *J Cell Physiol*, 228, 9-20.
- Keller, G. (2005) Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*, 19, 1129-55.
- Keller, G. M. (1995) In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 7, 862-9.
- Kirchhof, N., J. W. Carnwath, E. Lemme, K. Anastassiadis, H. Schöler & H. Niemann (2000) Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod*, 63, 1698-705.
- Klein, F., B. Richter, T. Striebel, C. M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener & M. Bastmeyer (2011) Two-component polymer scaffolds for controlled three-dimensional cell culture. *Adv Mater*, 23, 1341-5.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, L. A. Liotta, P. G. Robey, K. Tryggvason & G. R. Martin (1982) Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*, 21, 6188-93.
- Kolind, K., K. W. Leong, F. Besenbacher & M. Foss (2012) Guidance of stem cell fate on 2D patterned surfaces. *Biomaterials*, 33, 6626-33.
- Kong, Y. P., C. H. Tu, P. J. Donovan & A. F. Yee (2013) Expression of Oct4 in human embryonic stem cells is dependent on nanotopographical configuration. *Acta Biomater*, 9, 6369-80.
- Koroleva, A., A. Deiwick, A. Nguyen, S. Schlie-Wolter, R. Narayan, P. Timashev, V. Popov, V. Bagratashvili & B. Chichkov (2015) Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in 3-D Zr-Si organic-inorganic scaffolds produced by two-photon polymerization technique. *PLoS One*, 10, e0118164.
- Kovács, M., J. Tóth, C. Hetényi, A. Málnási-Csizmadia & J. R. Sellers (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem*, 279, 35557-63.
- Kumar, A. & G. M. Whitesides (1993) Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching. *Applied Physics Letters*, 63, 2002-2004.
- Larue, L., C. Antos, S. Butz, O. Huber, V. Delmas, M. Dominis & R. Kemler (1996) A role for cadherins in tissue formation. *Development*, 122, 3185-94.
- Lawson, K. A., J. J. Meneses & R. A. Pedersen (1991) Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*, 113, 891-911.
- Lee, J., A. A. Abdeen, D. Zhang & K. A. Kilian (2013) Directing stem cell fate on hydrogel substrates by controlling cell geometry, matrix mechanics and adhesion ligand composition. *Biomaterials*, 34, 8140-8.
- Legate, K. R., S. A. Wickström & R. Fässler (2009) Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev*, 23, 397-418.
- Lehnert, D., B. Wehrle-Haller, C. David, U. Weiland, C. Ballestrem, B. A. Imhof & M. Bastmeyer (2004) Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci*, 117, 41-52.

- Leivo, I., A. Vaheri, R. Timpl & J. Wartiovaara (1980) Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. *Dev Biol*, 76, 100-14.
- Levkin, P. A., F. Svec & J. M. Frechet (2009) Porous polymer coatings: a versatile approach to superhydrophobic surfaces. *Adv Funct Mater*, 19, 1993-1998.
- Li, L., S. A. Bennett & L. Wang (2012) Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh Migr*, 6, 59-70.
- Li, L. & R. Bhatia (2011) Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res*, 17, 4936-41.
- Li, Y., C. Lin, L. Wang, Y. Liu, X. Mu, Y. Ma & L. Li (2009) Maintenance of human embryonic stem cells on gelatin. *Chinese Science Bulletin*, 54, 4214-4220.
- Lian, I., J. Kim, H. Okazawa, J. Zhao, B. Zhao, J. Yu, A. Chinnaiyan, M. A. Israel, L. S. Goldstein, R. Abujarour, S. Ding & K. L. Guan (2010) The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*, 24, 1106-18.
- Llames, S., E. García-Pérez, Á. Meana, F. Larcher & M. del Río (2015) Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Eng Part B Rev*, 21, 345-53.
- Lyndon, M. (1986) Synthetic Hydrogels as Substrata for Cell Adhesion Studies. *British Polymer Journal*, 18, 1934-256X.
- Lyu, Z., H. Wang, Y. Wang, K. Ding, H. Liu, L. Yuan, X. Shi, M. Wang & H. Chen (2014) Maintaining the pluripotency of mouse embryonic stem cells on gold nanoparticle layers with nanoscale but not microscale surface roughness. *Nanoscale*, 6, 6959-69.
- Lü, D., C. Luo, C. Zhang, Z. Li & M. Long (2014) Differential regulation of morphology and stemness of mouse embryonic stem cells by substrate stiffness and topography. *Biomaterials*, 35, 3945-55.
- Mannello, F. & G. A. Tonti (2007) Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells*, 25, 1603-9.
- Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 7634-8.
- Maître, J. L., H. Turlier, R. Illukkumbura, B. Eismann, R. Niwayama, F. Nédélec & T. Hiiragi (2016) Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature*, 536, 344-8.
- McBeath, R., D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju & C. S. Chen (2004) Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*, 6, 483-95.
- McNamara, L. E., T. Sjöström, K. Seunarine, R. D. Meek, B. Su & M. J. Dalby (2014) Investigation of the limits of nanoscale filopodial interactions. *J Tissue Eng*, 5, 2041731414536177.
- Meng, X., P. Leslie, Y. Zhang & J. Dong (2014) Stem cells in a three-dimensional scaffold environment. *Springerplus*, 3, 80.
- Mimeault, M., R. Hauke & S. K. Batra (2007) Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther*, 82, 252-64.
- Minett, T. W., B. J. Tighe, M. J. Lydon & D. A. Rees (1984) Requirements for cell spreading on polyHEMA coated culture substrates. *Cell Biol Int Rep*, 8, 151-9.
- Montserrat, N., E. Nivet, I. Sancho-Martinez, T. Hishida, S. Kumar, L. Miquel, C. Cortina, Y. Hishida, Y. Xia, C. R. Esteban & J. C. Izpisua Belmonte (2013) Reprogramming of human fibroblasts to pluripotency with lineage specifiers. *Cell Stem Cell*, 13, 341-50.
- Mrksich, M. & G. M. Whitesides (1996) Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 25, 55-78.
- Murphy, W. L., T. C. McDevitt & A. J. Engler (2014) Materials as stem cell regulators. *Nat Mater*, 13, 547-57.
- Murray, P., M. Prewitz, I. Hopp, N. Wells, H. Zhang, A. Cooper, K. L. Parry, R. Short, D. J. Antoine & D. Edgar (2013) The self-renewal of mouse embryonic stem cells is regulated by cell-substratum adhesion and cell spreading. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 2698-705.

- Nagaoka, M., U. Koshimizu, S. Yuasa, F. Hattori, H. Chen, T. Tanaka, M. Okabe, K. Fukuda & T. Akaike (2006) E-cadherin-coated plates maintain pluripotent ES cells without colony formation. *PLoS One*, 1, e15.
- Narsinh, K. H., J. Plews & J. C. Wu (2011) Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: fraternal or identical twins? *Mol Ther*, 19, 635-8.
- Nava, M. M., A. Piuma, M. Figliuzzi, I. Cattaneo, B. Bonandrini, T. Zandrini, G. Cerullo, R. Osellame, A. Remuzzi & M. T. Raimondi (2016) Two-photon polymerized "nichoid" substrates maintain function of pluripotent stem cells when expanded under feeder-free conditions. *Stem Cell Res Ther*, 7, 132.
- Nava, M. M., M. T. Raimondi & R. Pietrabissa (2012) Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 797410.
- Niakan, K. K., J. Han, R. A. Pedersen, C. Simon & R. A. Pera (2012) Human pre-implantation embryo development. *Development*, 139, 829-41.
- Nichols, J., D. Davidson, T. Taga, K. Yoshida, I. Chambers & A. Smith (1996) Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mech Dev*, 57, 123-31.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler & A. Smith (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95, 379-91.
- Nicola, N. A. & J. J. Babon (2015) Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev*, 26, 533-44.
- Nieto, A., C. M. Cabrera, P. Catalina, F. Cobo, A. Barnie, J. L. Cortés, A. Barroso del Jesus, R. Montes & A. Concha (2007) Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. *Cell Biol Int*, 31, 269-78.
- Nishioka, N., K. Inoue, K. Adachi, H. Kiyonari, M. Ota, A. Ralston, N. Yabuta, S. Hirahara, R. O. Stephenson, N. Ogonuki, R. Makita, H. Kurihara, E. M. Morin-Kensicki, H. Nojima, J. Rossant, K. Nakao, H. Niwa & H. Sasaki (2009) The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell*, 16, 398-410.
- Niwa, H., T. Burdon, I. Chambers & A. Smith (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12, 2048-60.
- Niwa, H., J. Miyazaki & A. G. Smith (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24, 372-6.
- Ohgushi, M., M. Minaguchi & Y. Sasai (2015) Rho-Signaling-Directed YAP/TAZ Activity Underlies the Long-Term Survival and Expansion of Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 17, 448-61.
- Paluch, E. K. & E. Raz (2013) The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 582-90.
- Parnaud, G., D. E. Corpet & L. Gamet-Payraastre (2001) Cytostatic effect of polyethylene glycol on human colonic adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*, 92, 63-9.
- Patntirapong, S., W. Singhatanadgit, P. Meesap, T. Theerathanagorn, M. Toso & W. Janvikul (2015) Stem cell adhesion and proliferation on hydrolyzed poly(butylene succinate)/ β -tricalcium phosphate composites. *J Biomed Mater Res A*, 103, 658-70.
- Pauklin, S. & L. Vallier (2013) The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell*, 155, 135-47.
- Piccolo, S., S. Dupont & M. Cordenonsi (2014) The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev*, 94, 1287-312.
- Plusa, B. & A. K. Hadjantonakis (2016) Mammalian development: Mechanics drives cell differentiation. *Nature*, 536, 281-2.
- Radziskeuskaya, A. & J. C. Silva (2014) Do all roads lead to Oct4? The emerging concepts of induced pluripotency. *Trends Cell Biol*, 24, 275-284.
- Raimondi, M. T., S. M. Eaton, M. Laganà, V. Aprile, M. M. Nava, G. Cerullo & R. Osellame (2013) Three-dimensional structural niches engineered via two-photon laser polymerization promote stem cell homing. *Acta Biomaterialia*, 9, 4579-4584.

- Rao, M. (2004) Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol*, 275, 269-86.
- Rezza, A., R. Sennett & M. Rendl (2014) Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Curr Top Dev Biol*, 107, 333-72.
- Robson, P., P. Stein, B. Zhou, R. M. Schultz & H. S. Baldwin (2001) Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst. *Dev Biol*, 234, 317-29.
- Rosowski, K. A., A. F. Mertz, S. Norcross, E. R. Dufresne & V. Horsley (2015) Edges of human embryonic stem cell colonies display distinct mechanical properties and differentiation potential. *Sci Rep*, 5, 14218.
- Rozario, T. & D. W. DeSimone (2010) The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol*, 341, 126-40.
- Ruoslahti, E. (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 697-715.
- Saha, S., L. Ji, J. J. de Pablo & S. P. Palecek (2006) Inhibition of human embryonic stem cell differentiation by mechanical strain. *J Cell Physiol*, 206, 126-37.
- Sansores-Garcia, L., W. Bossuyt, K. Wada, S. Yonemura, C. Tao, H. Sasaki & G. Halder (2011) Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J*, 30, 2325-35.
- Savatier, P., H. Lapillonne, L. Jirmanova, L. Vitelli & J. Samarut (2002) Analysis of the cell cycle in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*, 185, 27-33.
- Schaap, A. & Y. Bellouard (2013) Molding topologically-complex 3D polymer microstructures from femtosecond laser machined glass. *Optical Materials Express*, 3, 1428-1437.
- Schöler, H. R., A. K. Hatzopoulos, R. Balling, N. Suzuki & P. Gruss (1989) A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J*, 8, 2543-50.
- Scognamiglio, R., N. Cabezas-Wallscheid, M. C. Thier, S. Altamura, A. Reyes, Á. Prendergast, D. Baumgärtner, L. S. Carnevalli, A. Atzberger, S. Haas, L. von Paleske, T. Boroviak, P. Wörsdörfer, M. A. Essers, U. Kloz, R. N. Eisenman, F. Edenhofer, P. Bertone, W. Huber, F. van der Hoeven, A. Smith & A. Trumpp (2016) Myc Depletion Induces a Pluripotent Dormant State Mimicking Diapause. *Cell*, 164, 668-80.
- Shao, Y., J. Sang & J. Fu (2015) On human pluripotent stem cell control: The rise of 3D bioengineering and mechanobiology. *Biomaterials*, 52, 26-43.
- Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl & D. Rogers (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336, 688-90.
- Stead, E., J. White, R. Faast, S. Conn, S. Goldstone, J. Rathjen, U. Dhingra, P. Rathjen, D. Walker & S. Dalton (2002) Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene*, 21, 8320-33.
- Stefanovic, S. & M. Pucéat (2007) Oct-3/4: not just a gatekeeper of pluripotency for embryonic stem cell, a cell fate instructor through a gene dosage effect. *Cell Cycle*, 6, 8-10.
- Stephens, L. E., A. E. Sutherland, I. V. Klimanskaya, A. Andrieux, J. Meneses, R. A. Pedersen & C. H. Damsky (1995) Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev*, 9, 1883-95.
- Sun, Y., C. S. Chen & J. Fu (2012a) Forcing stem cells to behave: a biophysical perspective of the cellular microenvironment. *Annu Rev Biophys*, 41, 519-42.
- Sun, Y., L. G. Villa-Diaz, R. H. Lam, W. Chen, P. H. Krebsbach & J. Fu (2012b) Mechanics regulates fate decisions of human embryonic stem cells. *PLoS One*, 7, e37178.
- Takahashi, K. & S. Yamanaka (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.
- Tamm, C., S. Pijuan Galitó & C. Annerén (2013) A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing. *PLoS One*, 8, e81156.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall & J. M. Jones (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-7.

- Théry, M. (2010) Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci*, 123, 4201-13.
- Trinkaus, J. P. (1973) Surface activity and locomotion of *Fundulus* deep cells during blastula and gastrula stages. *Dev Biol*, 30, 69-103.
- Tschumperlin, D. J. (2011) Mechanotransduction. *Compr Physiol*, 1, 1057-73.
- Varelas, X. (2014) The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*, 141, 1614-26.
- Vestweber, D., A. Gossler, K. Boller & R. Kemler (1987) Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol*, 124, 451-6.
- Villa-Diaz, L. G., J. K. Kim, A. Laperle, S. P. Palecek & P. H. Krebsbach (2016) Inhibition of Focal Adhesion Kinase Signaling by Integrin $\alpha\beta 1$ Supports Human Pluripotent Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells*, 34, 1753-64.
- Villa-Diaz, L. G., A. M. Ross, J. Lahann & P. H. Krebsbach (2013) Concise review: The evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells*, 31, 1-7.
- Viswanathan, P., T. Gaskell, N. Moens, O. J. Culley, D. Hansen, M. K. Gervasio, Y. J. Yeap & D. Danovi (2014) Human pluripotent stem cells on artificial microenvironments: a high content perspective. *Front Pharmacol*, 5, 150.
- Wada, K., K. Itoga, T. Okano, S. Yonemura & H. Sasaki (2011) Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*, 138, 3907-14.
- Wakayama, T., I. Rodriguez, A. C. Perry, R. Yanagimachi & P. Mombaerts (1999) Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 14984-9.
- Wang, Y., W. Zhang, J. Yuan & J. Shen (2016) Differences in cytocompatibility between collagen, gelatin and keratin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 59, 30-4.
- Wartiovaara, J., I. Leivo & A. Vaheri (1979) Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. *Dev Biol*, 69, 247-57.
- Weaver, V. M., S. Lelièvre, J. N. Lakins, M. A. Chrenek, J. C. Jones, F. Giancotti, Z. Werb & M. J. Bissell (2002) beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*, 2, 205-16.
- Wei, J., J. Han, Y. Zhao, Y. Cui, B. Wang, Z. Xiao, B. Chen & J. Dai (2014) The importance of three-dimensional scaffold structure on stemness maintenance of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*, 35, 7724-33.
- White, J. & S. Dalton (2005) Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*, 1, 131-8.
- Williams, R. L., D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Willson, C. L. Stewart, D. P. Gearing, E. F. Wagner, D. Metcalf, N. A. Nicola & N. M. Gough (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336, 684-7.
- Xu, C., M. S. Inokuma, J. Denham, K. Golds, P. Kundu, J. D. Gold & M. K. Carpenter (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 19, 971-4.
- Xu, Y., X. Zhu, H. S. Hahm, W. Wei, E. Hao, A. Hayek & S. Ding (2010) Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8129-34.
- Yarmola, E. G., T. Somasundaram, T. A. Boring, I. Spector & M. R. Bubb (2000) Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J Biol Chem*, 275, 28120-7.
- Yeom, Y. I., G. Fuhrmann, C. E. Ovitt, A. Brehm, K. Ohbo, M. Gross, K. Hübner & H. R. Schöler (1996) Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, 122, 881-94.
- Young, R. A. (2011) Control of the embryonic stem cell state. *Cell*, 144, 940-54.
- Zeineddine, D., A. A. Hammoud, M. Mortada & H. Boeuf (2014) The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells*, 3, 74-82.
- Zeineddine, D., E. Papadimou, K. Chebli, M. Gineste, J. Liu, C. Grey, S. Thurig, A. Behfar, V. A. Wallace, I. S. Skerjanc & M. Pucéat (2006) Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Dev Cell*, 11, 535-46.

Zhang, Y., H. Gong, Y. Sun, Y. Huang & Y. Fan (2016) Enhanced osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells on grid-topographic surface and evidence for involvement of YAP mediator. *J Biomed Mater Res A*, 104, 1143-52.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1.1: Die zwei wesentlichen Eigenschaften embryonaler Stammzellen	8
Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung der embryonalen Stammzellnische	14
Abb. 2.1: Übersicht über das 2D-Stempelmuster	27
Abb. 2.2: Übersicht über das 3D-Muster für DLS und die Abformung der 3D-Substrate.	30
Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Herstellung FN-funktionalisierter 3D-Mikrokammern durch Abformung	32
Abb. 3.1: Adhäsion der mESZ auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikrokammern	49
Abb. 3.2: Nach Kultivierung auf 2D-Mikroinseln und in 3D-Mikrokammern unterschiedlicher Größe sind keine Unterschiede im Oct4-eGFP-Level der mESZ detektierbar	51
Abb. 3.3: Die mESZ Proliferationsfähigkeit nimmt mit steigender 2D-Mikroinsel-Größe zu	53
Abb. 3.4: Die Proliferation der mESZ auf 2D-Mikroinseln ist unabhängig vom Zell- <i>Spreading</i>	55
Abb. 3.5: Die mESZ Proliferationsfähigkeit nimmt mit steigender 3D-Mikrokammer-Größe ab	57
Abb. 3.6: Die mESZ Proliferationsfähigkeit nimmt mit steigender 3D-Mikrokammer-Größe zu, sofern die Wände nicht adhäsiv sind	59
Abb. 3.7: Kleine adhäsive Mikrokammern fördern die Ausbreitung von mESZ	61
Abb. 3.8: Differenzielle YAP-Aktivierung in 3D-Mikrokammern unterschiedlicher Größe	63
Abb. 3.9: Die Anzahl adhärenter mESZ variiert auf HEMA-EDMA-Substraten unterschiedlicher Topografie	66
Abb. 3.10: Das Oct4-eGFP Signal der mESZ bleibt während der Kultivierung auf MN-Substraten erhalten	68
Abb. 3.11: Die Langzeitkultivierung von mESZ auf MN-Substrat erhält die Pluripotenz der Zellen	71
Abb. 3.12: mESZ adhäreren an MN-Substrate über Zellausläufer	73
Abb. 3.13: Die Adhäsion der mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten ist Integrin-unabhängig	74
Abb. 3.14: Die Aktivierung der Integrin-Signaltransduktion auf MN-Substraten führt zum Oct4-Verlust	76
Abb. 3.15: mESZ auf MN-Substrat weisen eine erhöhte YAP-Aktivierung im Vergleich zu	

Zellen auf G-Substrat auf	78
Abb. 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Teil 1 (Geometrie)	93
Abb. 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Teil 2 (Topografie)	101
Abb. 4.3: Hypothetisches Modell zur mechanisch induzierten Selbsterneuerung in mESZ	103
Abb. A1: Die mESZ auf kleinen Mikroinseln und in großen Mikrokammern sind Ki-67 positiv	106
Abb. A2: mESZ adhärieren kreuzförmig in Mikrokammern der Größe (20x20) μm^2	106
Abb. A3: In Abwesenheit von LIF verlieren mESZ auf MN-Substrat und auf Feederzellen das Oct4-eGFP Signal	107
Abb. A4: Die Adhäsion der mESZ auf HEMA-EDMA-Substraten ist Integrin-unabhängig	108

Tabellen

Tabelle 1: Nicht-Standard-Chemikalien, die für vorliegende Arbeit verwendet wurden	24
Tabelle 2: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen	25
Tabelle 3: Übersicht über verwendete Zelllinien	34
Tabelle 4: Übersicht über verwendete mESZ Aussaatdichten und Kultivierungsdauern	37
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper	39
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper und Affinitätssonden	39
Tabelle 7: Verwendete Kits zur fluoreszenten Markierung von Zellen bzw. Proteinen	40
Tabelle 8: Verwendete Mikroskope	41

Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind spezielle Abkürzungen aufgelistet, die in dieser Arbeit häufig verwendet wurden.

(EG)6-OH	Ethylenglycol-6-OH Mercaptan
μCP	<i>Microcontact Printing</i>
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
DLS	direktes Laserschreiben
EB	<i>Embryoid Body</i>
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
EDMA	Ethylen Dimethacrylat
EdU	5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ESZ	embryonale Stammzellen
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FN	Fibronektin
G-Substrat	glattes HEMA-EDMA-Substrat
HEMA	Hydroxyethyl Methacrylat
hESZ	humane embryonale Stammzellen
iPSZ	induziert pluripotente Stammzellen
IZM	innere Zellmasse
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
mESZ	murine embryonale Stammzellen
mkl	monoklonal
MN-Substrat	mikro-nano-raues HEMA-EDMA-Substrat
N-Substrat	nano-raues HEMA-EDMA-Substrat
n.s.	nicht signifikant
Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan
pkl	polyklonal
REM	Rasterelektronenmikroskop
Sox2	<i>Sex determining region Y-box 2</i>
TAZ	<i>Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif</i>
TPE-TA	Trimethylolpropan Ethoxylat Triacrylat
YAP	<i>Yes-associated protein</i>

Veröffentlichungen und Manuskripte

M. Jaggy, P. Zhang, A. M. Greiner, T. J. Autenrieth, V. Nedashkivska, A. N. Efremov, C. Blattner, M. Bastmeyer & P. A. Levkin (2015). Hierarchical Micro-Nano Surface Topography Promotes Long-Term Maintenance of Undifferentiated Mouse Embryonic Stem Cells. *Nano Letters*, 15, 7146-7154.

M. Jaggy*, S. Bertels*, A. M. Greiner, T. J. Autenrieth, B. Richter, A.C. Scheiwe, M. Thiel, M. Bastmeyer. Differential stem cell behavior in 2D vs. 3D micro-patterned substrates.

** contributed equally*

- *In Vorbereitung* -

T. Tronser, A. Popova, **M. Jaggy**, M. Bastmeyer, P. A. Levkin. Superhydrophobic-hydrophilic microarray sustaining undifferentiated state of mESCs through nanoporous surface topography.

- *In Vorbereitung* -

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Bastmeyer dafür danken, dass er sein Vertrauen in mich gesetzt hat und mir die Promotion am Zoologischen Institut des KIT ermöglicht hat. Weiterhin möchte ich ihm für die Hilfe und Unterstützung im Laufe meiner Promotion und bei der Ausarbeitung dieser Arbeit danken.

Ebenfalls danke ich Dr. Dietmar Gradl für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ich danke der Helmholtz Gemeinschaft für die Finanzierung im Rahmen des BIF-TM-Programms. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Doris Wedlich und Prof. Dr. Rolf Kemler für die transgene murine Stammzelllinie danken, die die Basis dieser Arbeit darstellt.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Pavel Levkin, Dr. Victoria Nedashkivska und Tina Tronser für die Produktion der HEMA-EDMA-Substrate und für die erfolgreiche und spannende Kooperation.

Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Benjamin Richter für die Herstellung vieler 3D-Substrate und für seine Hilfe bei der Anfertigung der REM-Aufnahmen. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Andrea Scheiwe und Dr. Michael Thiel für die Hilfe bei der Herstellung und Replikation der 3D-Substrate bedanken.

Dr. Tatjana Autenrieth und Dr. Alexandra Greiner danke ich herzlich für ihre Unterstützung und die guten Ratschläge, vor allem zu Beginn der Promotion.

Außerdem danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Zell- und Neurobiologie für die schöne und aufregende gemeinsame Zeit. Besonders möchte ich mich bei meiner Stammzell-Kollegin Sarah Bertels für ihre „2D-Ergebnisse“ und die Unterstützung bei der Zellkultivierung bedanken. Ebenso gilt mein Dank Dr. Michaela Schober und Dr. Wolfgang Falk für die Hilfe bei der Molekularbiologie, die leider keinen Platz in dieser Arbeit gefunden hat.

Ganz besonders danke ich meiner Familie dafür, dass sie mich immer unterstützen und auch in turbulenten Zeiten stets für mich da sind.

Last but not least danke ich meinem Lebensgefährten, Ex-Kollegen und besten Freund Markus: Danke nicht nur für die geduldige und hilfreiche Korrektur meiner „Ergüsse“, sondern auch dafür, dass du an mich glaubst und immer für mich da bist.