

**„Kardiomyogene Differenzierung von
germline-derived pluripotent stem cells
auf dem Biomaterial Resomer[®] LR704“**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Mareike Hoß

aus Siegen

Berichter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martin Zenke

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Lothar Elling

Tag der mündlichen Prüfung: 3. April 2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

1 Einleitung	3
1.1 Stammzellen	3
1.2 <i>Germline-derived pluripotent stem cells</i> (gPS-Zellen)	7
1.2 Kardiomyogene Differenzierung	8
1.3 <i>Tissue Engineering</i> und Polymere	9
1.4 Ziele der Arbeit	13
2 Material	15
2.1 Zellen	15
2.2 Zellkulturmedien	15
2.3 Oligonukleotide	16
2.4 Antikörper	16
2.5 <i>Kits</i>	17
2.6 Molekularbiologische Chemikalien	17
2.7 Gebrauchslösungen	18
2.8 Chemikalien	18
2.9 Lösungsmittel	19
2.10 Geräte	19
2.11 Software	21
2.12 Glaswaren	21
2.13 Verbrauchsmaterial	22
3 Methoden	23
3.1 Chemische Verfahren	23
3.1.1 Herstellung von Polytetrafluorethylen (PTFE) und Polyvinylidenfluorid (PVDF)	23
3.1.2 Herstellung von Resomer [®] LR704	23
3.2 Zellkulturtechnik	24
3.2.1 Isolation von MEF	24
3.2.2 Expansion von gPS-Zellen	24
3.2.3 Zellzahlbestimmung	25
3.2.4 Differenzierung von gPS-Zellen mittels <i>Embryoid body</i> -Formation	25
3.3 Proteinchemische Methoden	26
3.3.1 Alkalische Phosphatase-Nachweis	26

2.3.2 Immunofluoreszenz-Färbung	26
2.3.3 Immunhistochemie.....	27
2.3.4 Vitalitäts-Test.....	27
2.3.5 Zytotoxizitäts-Test.....	28
2.3.6 Bestimmung apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie	28
3.4 Molekularbiologische Methoden.....	29
3.4.1 RNA-Isolation aus Zellen	29
3.4.2 Reverse Transkription.....	30
3.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30
3.4.4 <i>Taqman</i> PCR mit SYBR <i>green</i>	31
3.4.5 Gelelektrophorese.....	32
3.4.6 Affymetrix GeneChip® Array-Analyse	33
3.4.7 Vorbereitung der Proben zur Rasterelektronenmikroskopie.....	33
3.4.8 Vorbereitung der Proben zur Transmissionselektronenmikroskopie.....	34
3.5 Elektronenphysiologische Messungen.....	34
3.5.1 <i>Sharp electrode</i> -Technik.....	34
4 Ergebnisse	36
4.1 Pluripotenz von gPS-Zellen	36
4.1.1 Morphologie und Pluripotenznachweis.....	36
4.2 Kompatible gPS-Zell/Polymer-Kombinationen	37
4.2.1 Vitalität und Proliferation von gPS-Zellen auf Polymeren	37
4.2.2 Zytotoxischer Effekt der Polymere auf gPS-Zellen	39
4.2.3 gPS-Zell-Apoptose auf Polymeren	40
4.3 Expansion von gPS-Zellen auf Polymeren.....	42
4.3.1 Morphologie und Pluripotenz passagierter gPS-Zellen.....	42
4.4 Differenzierung von gPS-Zellen auf Polymeren	44
4.4.1. Genexpression des Pluripotenzmarkers Oct4	44
4.4.2 Genexpression von Keimblattmarkern	45
4.4.3 Proteinexpression von Keimblattmarkern.....	46
4.5 Kardiomyogene Differenzierung von gPS-Zellen	47
4.5.1 Dokumentation schlagender Areale	47
4.5.2 Elektronenphysiologische Messungen	48

4.5.3 Proteinexpression kardiomyogener Marker	50
4.5.4 Transmissionselektronenmikroskopie	51
4.6 <i>Microarray Assay</i> von gPS-Zellen	52
5 Diskussion	55
5.1 Pluripotenz von gPS-Zellen	55
5.2 Identifikation kompatibler Polymer/gPS-Zell-Kombinationen	56
5.3 Expansion von gPS-Zellen auf Polymeren	57
5.4 Differenzierung von gPS-Zellen auf Polymeren	59
5.5 Kardiomyogene Differenzierung auf LR704	60
5.5 Bedeutungen für das <i>Tissue Engineering</i>	63
5.5 Zusammenfassung und Ausblick	65
Quellenangaben	68
Abkürzungsverzeichnis	76

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Stammzellen definieren sich durch zwei charakteristische Eigenschaften. Sie verfügen über das sogenannte Selbsterneuerungspotenzial, das die Fähigkeit zur Autoproduktion beschreibt, und sie besitzen ein Differenzierungspotenzial, das je nach Stadium der Stammzelle unterschiedlich ausgeprägt sein kann und das Potenzial in spezialisierte Zelltypen auszdifferenzieren beschreibt. Bei der Selbsterneuerung entstehen durch symmetrische Teilung zwei identische Tochterzellen, beide entsprechen der ursprünglichen Stammzelle. Stammzellen können sich beliebig oft teilen. Bei einer asymmetrischen Teilung gehen eine Tochterzelle mit denselben Eigenschaften und eine etwas differenziertere Zelle hervor. Man spricht dabei von einem Differenzierungszyklus.

Ob eine Zelle im Selbsterneuerungszyklus verbleibt oder in den Differenzierungszyklus wechselt, hängt von Signalen der Mikroumgebung der Stammzellnische ab. Darüber hinaus dient die Stammzellnische dem Schutz der Zelle und der Aufrechterhaltung des Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzials, sofern keine Signale zum Übergang in den Differenzierungszyklus gegeben werden. Neben den Faktoren der Nische ist ebenfalls der aktuelle Entwicklungsstand, in dem sich die Stammzelle befindet, ausschlaggebend für die Richtung, in welche die Differenzierung startet [1]. Die Zygote beispielsweise kann sich zu einem gesamten Organismus und somit in jeden möglichen Zelltyp entwickeln. Sie ist totipotent, jedoch keine Stammzelle im eigentlichen Sinne, da sie kein Selbsterneuerungspotenzial aufweist. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen), die aus der Blastula gewonnen werden, gelten als pluripotent [2]. Sie verfügen über ein uneingeschränktes Differenzierungspotenzial, da sie sich zwar zu allen Zellen der drei Keimblätter entwickeln können, nicht jedoch in extraembryonales Gewebe wie der Plazenta [3]. Aus dem Endoderm gehen zum Beispiel Zellen des Magen-Darm-Traktes hervor, aus dem Mesoderm entstehen Muskel- und Knochenzellen, sowie das Gefäßsystem und aus dem Ektoderm entwickelt sich Hautgewebe und das zentrale Nervensystem [3]. Adulte Stammzellen, wie hämatopoetische, neurale, mesenchymale und epitheliale Stammzellen, weisen

eine im Vergleich zu ES-Zellen geringere Plastizität und somit ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial auf und gelten daher nur als multipotent [4]. Sie sind durch die Einengung ihrer Entwicklungspotenz bereits determiniert. So kann sich eine hämatopoetische Stammzelle in alle Blutzellen entwickeln, jedoch nicht keimblattüberschreitend in beispielsweise Epithelzellen transdifferenzieren.

Diese konzeptionelle Unterscheidung der Stammzelltypen in toti-, pluri- und multipotent dient nicht nur als Nomenklatur für deren Differenzierungspotenzial, sondern ist ebenfalls von rechtlicher Relevanz. Humane embryonale Stammzellen wachsen zwar schneller als adulte Stammzellen und weisen ein höheres Differenzierungspotenzial auf, ihr Einsatz ist aber ethisch bedenklich und umstritten. Zum einen aufgrund ihrer Isolation aus der Blastula, wobei der Embryo zerstört wird, zum anderen tragen totipotente Stammzellen das Potenzial zur Entwicklung eines Menschen in sich und fallen somit unter das Embryonenschutzgesetz. Dadurch sind die Herstellung von menschlichen Embryonen durch *in vitro*-Fertilisation zu Forschungszwecken und die Verwendung daraus isolierter ES-Zellen in Deutschland verboten. Nur unter strengen Auflagen ist der Import solcher Zellen nach Deutschland möglich. Demnach dürfen nach dem deutschen Stammzellgesetz (StZG) nur ES-Zellen nach Deutschland importiert und verwendet werden, die vor dem 1. Mai 2007 gewonnen wurden und hochrangigen wissenschaftlichen Zwecken dienen, für welche tierische Stammzellen nicht als Forschungsobjekte ausreichen (§ 1-6 StZG).

Im Jahr 1981 wurden zum ersten Mal ES-Zellen der Maus isoliert [5, 6]. Humane ES-Zellen konnten erst 17 Jahre später *in vitro* kultiviert werden [7, 8]. Mittlerweile konnten ES-Zellen auch aus Kaninchen, Ratten, Schweinen und anderen Spezies gewonnen werden [9-11]. Die Kultivierung undifferenzierter ES-Zellen erfolgt meist unter Zusatz des sogenannten *leukemia inhibitory factors* (LIF) auf einer *Feeder*-Zellschicht aus inaktivierten embryonalen Mausfibroblasten (MEF), die zusammen die Aufrechterhaltung des Differenzierungs- und Selbsterneuerungspotenzials *in vitro* gewährleisten [12]. LIF ist ein Zytokin, das an den LIF-Rezeptor in der Zellmembran bindet und daraufhin die Heterodimerisierung mit dem transmembranen Glycoprotein-130 (gp130) bewirkt. Es wird *in vivo* von den Trophoblastenzellen sekretiert und es folgt bei den responsiven ES-Zellen Aktivierung von der Janus

Tyrosin Kinase (JAK), die das Signal zum Nukleus transportiert, wo der *Signaltransducer- und Transkriptionsaktivator-3* (STAT3) die Selbsterneuerung der murinen ES-Zellen aufrecht erhält [13, 14].

Pluripotente Stammzellen besitzen einige Eigenschaften durch die sie von multipotenten Stammzellen unterschieden werden können. Neben dem Potenzial in somatische Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren, exprimieren ES-Zellen sogenannte Pluripotenzmarker wie *stage-specific embryonic antigen-1* (Maus) bzw. -3/4 (human) (SSEA1 bzw. SSEA3/4), *octamer-binding transcription factor-4* (Oct4, auch Pou5f1), Nanog oder *SRY-related high-mobility group (HMG)-box protein-2* (Sox2). Dabei handelt es sich meist um Transkriptionsfaktoren, die bei der Embryonalentwicklung involviert sind, das Selbsterneuerungspotenzial steuern oder bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz involviert sind [15-19]. Außerdem weisen ES-Zellen eine charakteristische Morphologie auf. Sie bilden Kolonien von dreidimensionaler Erscheinung und glattem, durchgehendem und hellem Rand. Pluripotente Stammzellen bilden in Suspensionskultur, bei der den Zellen kein adhäsionsfähiges Material geboten wird, spontan ES-Zellaggregate, sogenannte *Embryoid bodies* (EBs, Embryokörperchen) [3, 12, 20]. Durch interzellulären Signalstoffaustausch innerhalb des EBs wird die Differenzierung initiiert und es entwickeln sich Zellen aller drei Keimblätter [3, 20]. Ein weiteres Merkmal pluripotenter Stammzellen ist die Teratombildung *in vivo*. Bei der Injektion von genetisch identischen ES-Zellen in eine entsprechende Maus bilden sich an dieser Stelle Teratome. Das sind Tumore, die aus verschiedenen Zell- und Gewebearten endo-, ekto- und mesodermalen Ursprungs bestehen [12].

Neben den natürlich vorkommenden ES-Zellen, gibt es noch weitere pluripotente Stammzellarten *in vitro*. Das Klonen von Embryonen ist eine Methode zur Gewinnung von ES-Zellen. Bei dem sogenannten Kerntransfer wird die Verschmelzung einer kernlosen Eizelle mit dem Kern einer somatischen Zelle initiiert. Dieses Verfahren ist spätestens seit 1996 durch das Klonschaf Dolly bekannt [21]. Die Verschmelzung somatischer Zellen mit ES-Zellen ist ein ähnliches Protokoll zur Gewinnung pluripotenter Hybride. Hier kann die Fusion von beispielsweise hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark mit ES-Zellen eingeleitet werden [Schneider RK, Ensenat-Waser R, Chauvistre H, Ding X, Do JT, Han DW, Schöler HR, Zenke M,

Manuskript in Arbeit]. Ein weiteres Verfahren des reproduktiven Klonens ist die sogenannte tetraploide Komplementierung, in der aus pluripotenten Stammzellen direkt (transgene) Mäuse gezüchtet werden können. Zellen eines Spenderembryos werden fusioniert, sodass aus diploiden Zellen ($n=2$), tetraploide Zellen ($n=4$), also mit doppeltem Chromosomensatz, entstehen. Komplementiert man diesen tetraploiden Zellverband mit pluripotenten Stammzellen, entwickelt sich daraus eine Blastozyste mit einer inneren Zellmasse, die exklusiv aus den dazugegebenen embryonalen Stammzellen besteht. Läuft daraufhin eine geordnete Morphogenese ab, können also durch diese tetraploide Embryonen-Komplementierung aus ES-Zellen vollständige, lebens- und fortpflanzungsfähige Individuen erzeugt werden [22, 23]. Dieses Verfahren funktioniert ebenso mit den induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) der Maus [24] und gilt außerdem als Nachweismethode für Pluripotenz.

Sogenannte induzierte pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) sind pluripotente Stammzellen, die von einem ursprünglich nicht-pluripotenten somatischen Zelltyp stammen. 2006 ist es erstmals gelungen somatische Zellen mittels viraler Transfektion in einen pluripotenten Zustand zurückzusetzen. Die Gruppe um Yamanaka stellte einen Cocktail mit vier Transkriptionsfaktoren zusammen, durch den die Reprogrammierung von Mausfibroblasten hervorgerufen werden konnte [25]. Hierbei handelt es sich um die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, c-Myc und Klf4, die besonders stark in embryonalen Stammzellen exprimiert werden, wobei Oct4 und Sox2 die ausschlaggebenden Faktoren sind. Die Generierung von iPS-Zellen aus humanen Fibroblasten gelang derselben Forschergruppe ein Jahr später, 2007 [26]. Seit der ersten erfolgreichen Generierung pluripotenter Stammzellen wurden viele somatische Zellen unterschiedlichen Typs, wie neurale Stammzellen oder Leberzellen, reprogrammiert [27, 28]. Nicht immer durch virale Transfektion, auch durch Plasmid- oder Protein-Transduktion oder das sogenannte *piggyBac* Transposonsystem kann Pluripotenz induziert werden [29-31]. Man versucht mit diesen alternativen Methoden die Reprogrammierungseffizienz zu erhöhen und/oder Mutagenese in der Rezipienten-Zelle zu vermeiden.

1.2 Germline-derived pluripotent stem cells (gPS-Zellen)

Durch ihr uneingeschränktes Differenzierungspotenzial besteht großes Interesse an pluripotenten Stammzellen zum Beispiel für Anwendungen im *Tissue Engineering*. Im Fokus stehen pluripotente Zellen, die ethische Konflikte vermeiden oder nicht durch virale Reprogrammierung hergestellt werden. Daher sind Wissenschaftler motiviert alle Möglichkeiten zur Etablierung pluripotenter Zellen auszuschöpfen. In den vergangenen Jahren ist ein weiterer Typ pluripotenter Stammzellen beschrieben worden, sogenannte *germline-derived pluripotent stem cells* (gPS-Zellen). Neben Ko *et al.*, generierten auch Forschergruppen um Guan, Kossack und Conrad pluripotente Stammzellen aus Keimbahnzellen [32-35], wobei die Studie von Conrad *et al.* umstritten ist [36].

gPS-Zellen stammen von unipotenten Keimbahnstammzellen ab. Sie werden aus Spermatogonien mit erhöhtem Selbsterneuerungspotenzial aus Hoden eines adulten Donors generiert. Ko *et al.* isolierten und kultivierten Keimbahnstammzellen, konvertierten durch eine streng definierte Kultivierungsprozedur Subpopulationen in pluripotente Stammzellen und wiesen deren Pluripotenz anhand der Expression typischer Pluripotenzgene nach. Diese Keimbahnstammzellen wurden aus Mäusen isoliert, deren Oct4-Gen mit dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) gekoppelt ist. Das bedeutet, dass der Differenzierungsstatus der Zellen in Kultur anhand ihrer grünen Fluoreszenz verfolgt werden kann. Diese gPS-Zellen befinden sich im pluripotenten Stadium, solange sie grün fluoreszieren. Wenn sie in den Differenzierungszyklus übergehen, verlieren sie die Fluoreszenz. gPS-Zellen wachsen auf einer *Feeder*-Schicht, bilden ES-Zell-typische Kolonien und sind somit morphologisch nicht von ES-Zellen unterscheidbar. Sie bilden ebenfalls EBs in Suspensionskultur, formen Teratome *in vivo* und bilden lebensfähige Chimäre, wodurch der Pluripotenznachweis erbracht wurde. Auf molekularer Ebene exprimieren sie dieselben Pluripotenzmarker wie ES-Zellen. Genexpressionsprofile demonstrieren, dass gPS-Zellen näher mit ES-Zellen verwandt sind als andere pluripotente Stammzellen. Da die Oct4-Expression durch Methylierung reguliert wird, sind gPS-Zellen den ES-Zellen auch auf dieser epigenetischen Ebene sehr ähnlich. Die Promotorregion von Oct4 ist bei gPS-Zellen ebenso wie bei ES-Zellen nicht methyliert, bei iPS-Zellen hingegen ist dieser Bereich stark methyliert [34, 37].

Stammzellen sind für *Tissue Engineering*-Anwendungen besonders gut geeignet, da sie sich aufgrund ihres Selbsterneuerungspotenzials *in vitro* gut expandieren lassen und in der Lage sind in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren. Das macht sie zu einem idealen Ausgangspunkt für Zelltherapie und regenerative Medizin [38]. Die Pluripotenz der gPS-Zellen erhöht deren Anwendungsmöglichkeiten im Vergleich zu adulten Stammzellen. Die Vorteile der gPS-Zellen im Vergleich zu anderen pluripotenten Zellen wurden bereits beschrieben: (i) die Generierung ist ohne die Verwendung viraler Transkriptionsfaktoren, wie es bei iPS-Zellen der Fall ist, möglich; (ii) gPS-Zellen können ohne ethische Bedenken, mit denen humane ES-Zellen belastet sind, isoliert werden, denn die Isolation erfolgt aus dem adulten Organismus; (iii) gPS-Zellen können autolog eingesetzt werden (allerdings nur beim männlichen Teil der Bevölkerung). Durch autologe Applikation können Immunreaktionen des Patienten ausgeschlossen werden. Das macht gerade gPS-Zellen zu einem optimalen Werkzeug für biomedizinische Anwendungen. In dieser Arbeit werden gPS-Zellen aus Spermatogonien verwendet. Das Pendant der gPS-Zellen sind parthenogene ES-Zellen aus weiblichen Organismen. Es bedarf darüber hinaus allerdings noch Ansätzen zur Isolation pluripotenter Stammzellen aus dem Ovar, sodass im Bereich der regenerativen Medizin und Stammzelltherapie, autologe Anwendungen für Männer und Frauen gleichermaßen möglich sind.

1.2 Kardiomyogene Differenzierung

Das uneingeschränkte Differenzierungspotenzial der gPS-Zellen erlaubt ihnen die Ausreifung in somatische Zellen aller drei Keimblätter. Die Entwicklung in Pankreas-Zellen, neuronale Zellen, Keratinozyten, Epithelzellen, Hepatozyten und Kardiomyozyten wurde mehrfach nachgewiesen [34, 35, 39, 40]. Speziell die Etablierung von Kardiomyozyten ist von großem Interesse, da bisher nicht für alle Gewebetypen adulte Stammzellen isoliert werden konnten, insbesondere keine adulten Herzmuskelstammzellen.

Kardiomyozyten, die aus ES-Zellen bzw. gPS-Zellen entwickelt werden, sollten über einige Merkmale auf molekularer Ebene, ein gewisses funktionelles Leistungsvermögen und bestimmte strukturelle Eigenschaften verfügen: (i) Expression kardialer Gene, (ii) Kontraktion und Expression membrangebundener

Ionen-Kanäle und (iii) charakteristische sarkomere Strukturen [41]. Dazu gehören dementsprechend die verstärkte Expression der in der Kardiomyogenese relevanten Transkriptionsfaktoren, wie Nkx2.5 und GATA4, die Ausbildung von *Gap Junctions* und die Bildung von myokardialen Strukturproteinen wie beispielsweise sarkomerisches α -Aktinin und *myosin heavy chains* (MHC).

Die Entwicklung dieser Funktionen und Eigenschaften lassen sich in ES- und gPS-Zellen durch entsprechende Kultivierung unter Berücksichtigung verschiedener Parameter beeinflussen und induzieren. Von der Zugabe von 5-Aza-2-deoxyzytidin zum Differenzierungsmedium weiß man, dass es durch Cytosin-Methylierung die Expression kardiomyogener Transkriptionsfaktoren hervorruft [42]. Ebenso kann durch die Verwendung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise *bone morphogenetic proteins* (BMP) die kardiomyogene Differenzierung eingeleitet werden [43]. Auch von der Kokultivierung mit adulten Kardiomyozyten wurde berichtet, die durch parakrine Signale oder direkte Zellkontakte ES-Zellen zur Kardiomyogenese veranlassen [44]. Weitere Überlegungen zur gezielten Differenzierung in die kardiomyogene Richtung sind die Stimulation durch mechanische und elektrische Reize und nicht zuletzt die Kultivierung der Stammzellen auf bzw. in speziell aufbereiteten Matrices.

Die Kombination von Biomaterialien bietet hier die Möglichkeit nicht nur die kardiomyogene Differenzierung von ES- bzw. gPS-Zellen durch chemische Zusammensetzung und strukturelle Beschaffenheit zu induzieren, sondern kann als 3-dimensionales (3D) Gerüst als Formgeber fungieren. Die Kombination von gPS-Zellen mit Biomaterialien und deren Differenzierungsverhalten auf Polymeren wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

1.3 Tissue Engineering und Polymere

Trotz moderner Methoden im Bereich der Organtransplantation, stößt die heutige Medizin immer wieder an ihre Grenzen. Um innovative Ansätze zur Lösung klinischer Probleme zu entwickeln, schließen sich Wissenschaftler aus verschiedensten Wissenschaften wie Medizin, Biologie, Chemie, Materialwissenschaften und Ingenieurwesen zusammen. Dieses interdisziplinäre Umfeld bietet die Möglichkeit

fachspezifische Techniken fachübergreifend zu kombinieren. Aus den Herausforderungen, die die Medizin beispielsweise bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder speziell im Bereich der Organtransplantation stellt, hat sich somit das sogenannte *Tissue Engineering* entwickelt.

Unter *Tissue Engineering* versteht man die gerichtete Kultivierung von Zellen und die künstliche Herstellung biologischer Gewebe, die als Ersatzgewebe im menschlichen Körper zum Einsatz kommen. Durch diese Form der regenerativen Medizin lassen sich Gewebedefekte beheben oder durch Einsatz von einzelnen Zellen beispielsweise Autoimmunerkrankungen behandeln. Es gibt drei therapeutische Strategien, um erkranktes oder verletztes Gewebe in Patienten zu ersetzen oder Organfunktionen zu verbessern: (i) die Implantation von frisch isolierten oder *ex vivo* expandierten Zellen, (ii) die Verwendung von Biomaterialien und (iii) den Einsatz von Biomaterial-Zell-Kombinationen [45]. Ein Biomaterial, das im Bereich des *Tissue Engineering* eingesetzt werden soll, muss verschiedene Bedingungen erfüllen. Das wichtigste Kriterium, das ein Biomaterial zu erfüllen hat, ist die Fähigkeit zur Existenz in Kontakt mit Geweben im menschlichen Körper ohne dabei unannehmbare Schäden anzurichten. Ein Biomaterial definiert sich somit über den Begriff der Biokompatibilität [46]. Biomaterialien aus der Gruppe der Keramiken, der Metalle und der Polymere erfüllen diese Kriterien und sind bereits als Zahnersatz, Herzklappen, Hüftgelenke oder vaskuläre Gefäßprothesen im klinischen Einsatz [47]. Ein Material, das für die eine Anwendung als biokompatibel gilt, kann für eine andere Anwendung ungeeignet sein. Dabei spielen die zu erfüllende Funktion und die Lokalisation im Körper eine Rolle. Ein degradierbares Kollagenimplantat beispielsweise kann subkutan oder als Wundverband zur Stimulation der Angiogenese eingesetzt werden, um somit die Geweberegeneration zu fördern. Das gleiche Implantat würde als Hornhautersatz nach einer Augenoperation durch die Angiogenese zum Verlust des Sehvermögens führen und ist somit an dieser Stelle nicht biokompatibel [48].

Bei Polymeren unterscheidet man zwischen natürlichen und synthetischen Polymeren. Während die meisten Biopolymere mit der Zeit zerfallen und resorbiert werden, gibt es unter den synthetischen Polymeren auch nicht-degradierbare, biostabile Materialien. Ein Beispiel für ein degradierbares Material ist Resomer® LR704. Dieses Ko-Polymer besteht aus Poly-L-Laktid (PLLA) und Poly-D,L-Laktid

(PDLLA) und wird daher per IUPAC-Nomenklatur (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) auch Poly(L-laktid-co-D,L-laktid) genannt. Es setzt sich aus den chemischen Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff zusammen. Die Degradationszeit von LR704 richtet sich nach dem Zerfall von PLLA und PDLLA und beträgt somit zwischen 10-16 Monate. Bisher gibt es keine Berichte speziell über Resomer[®] LR704 als Biomaterial in klinischen Applikationen. In Zusammenhang mit der spinalen Fusion zur Korrektur des Wirbelgleitens wurde allerdings von Poly(L-laktid-co-D,L-laktid) an sich berichtet [49]. Auch die Bestandteile PLLA und PDLLA werden im *Tissue Engineering* als bioresorbierbare Vaskulargerüste eingesetzt [50]. Damit könnte auch LR704 potenziell biokompatibel sein.

Polyvinylidenfluorid (PVDF), bestehend aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Fluor, und Polytetrafluorethylen (PTFE), aus Kohlenstoff und Fluor, sind nicht-degradierbare Polymere. Obwohl PVDF als sehr hydrophobes Material bekannt ist, kann es als Oberfläche zur Kultivierung von beispielsweise bovinen Hornhautzellen oder zur Kryokonservierung humaner Hepatozyten dienen [51, 52]. Im Bereich des *Tissue Engineering* macht man sich diese Hydrophobizität zunutze. Somit konnte PVDF erfolgreich als Gefäßprothese in Kombination mit Fibrin eingesetzt werden [53]. Auch PTFE, besser bekannt als Teflon, wird als Ersatz für Blutgefäße genutzt [54]. Abbildung 1 zeigt neben LR704, PVDF und PTFE eine Auswahl an weiteren Polymeren, die in Kooperation mit dem deutschen Wollforschungsinstitut Aachen (DWI) als Biomaterialbank etabliert wurden und am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen in Forschungsprojekten eingesetzt werden. Einige dieser Polymere sind bereits aus Publikationen mit verschiedenen Stammzelltypen, aber auch in Kombination mit dendritischen Zellen und vor allem ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten bekannt [55-59].

Beim *Tissue Engineering* spielen aber nicht nur die Biomaterialien eine Rolle, auch die Zellen haben einen entscheidenden Einfluss bei der Gewebekonstruktion und -transplantation. Hier unterscheidet man zwischen autologer, allogener und xenogener Transplantation. Xenogen bedeutet speziesübergreifend, während bei der allogenen Transplantation Gewebe derselben Spezies, aber eines fremden Spenders, verwendet werden. Autologe Zellen und Gewebe stammen aus demselben Spender und sind somit aufgrund der ausbleibenden Immunabwehr perfekt für biomedizinische Therapieformen und Transplantationen geeignet.

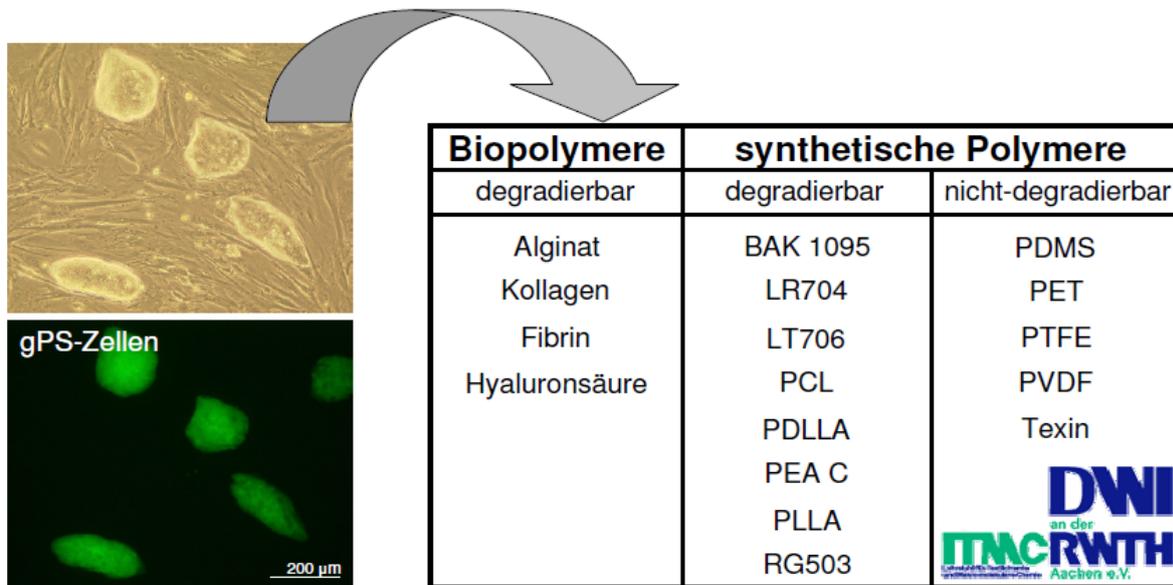


Abbildung 1) Projekteinleitung. gPS-Zellen werden auf Polymeren der Biomaterialbank kultiviert. Rechts ist die Übersicht der Polymere, die am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen eingesetzt werden, gezeigt. Hyaluronsäure (HA), Poly(L-laktid-co-D,L-laktid) (LR704); Poly-L-laktid-trimethylencarbonat (LT706); Poly- ϵ -caprolakton (PCL); Poly-(D,L-laktid) (PDLLA); Polyesteramid Typ C (PEA C); Poly(L-laktid) (PLLA); Poly(D,L-laktid-co-glykolsäure) (RG503); Polydimethylsiloxan (PDMS); Polyethylenterephthalat (PET); Polytetrafluorethylen (PTFE); Polyvinylidenfluorid (PVDF).

Stammzellen bieten aufgrund ihres Differenzierungspotenzials das breiteste Einsatzspektrum im *Tissue Engineering* und sind wegen ihres hohen *ex vivo* Expansionspotenzials optimal zur gezielten Züchtung geeignet [60].

Am besten erforscht ist derzeit die Herstellung von Hautersatz, der vor allem bei Patienten mit großflächigen Verbrennungen oder zur Behandlung komplizierter Hauterkrankungen benötigt wird [61, 62]. Solche dermalen Gewebekonstruktionen finden bereits in der Klinik Anwendung. Darüber hinaus können Knochen- oder Knorpelgewebe gezüchtet werden, die in der Orthopädie bzw. der Kiefer- und Knochenchirurgie zur Anwendung kommen. Das stammzellbasierte *Tissue Engineering* zur Behebung Infarkt-bedingter Schäden des Herzmuskels steckt jedoch noch in den Anfängen. Aufgrund der mangelnden Proliferationsfähigkeit von Herzmuskelzellen sind solche Herzverletzungen oft irreversibel und können nicht aus eigener Kraft des Körpers geheilt werden. Solche Herzerkrankungen sind daher die Ursache einer weltweit hohen Morbidität und können aufgrund der irreversiblen Schädigungen dann häufig tödlich für den Patienten enden [63]. Myokardiales *Tissue*

Engineering ist ein Ansatz Herzinfarktschädigungen zu therapieren und angeborene Herzfehler zu korrigieren. Aufgrund der geringen Proliferation adulter Kardiomyozyten ist deren extrakorporale Expansion limitiert. Daher verwendet man Stammzellen, die durch ihr Selbsterneuerungspotenzial *in vitro* zu einer ausreichenden Menge kultiviert und dann differenziert werden können.

Die gerichtete Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen und ES-Zellen zu Kardiomyozyten ist bereits etabliert. Diese *in vitro*-abgeleiteten ES-Zellen verfügen über dieselben strukturellen, molekularen und funktionellen Eigenschaften von Kardiomyozyten [64-69]. Damit können die grundlegenden Anforderungen an gezielt hergestellte Kardiomyozyten erfüllt werden. Dennoch sind für den Einsatz im *Tissue Engineering* noch viele Techniken verbesserungswürdig und das optimale Protokoll gilt es noch zu entwerfen.

1.4 Ziele der Arbeit

Stammzellen, wie ES-Zellen, iPS-Zellen und die kürzlich beschriebenen gPS-Zellen, stellen durch ihr uneingeschränktes Differenzierungspotenzial eine Ressource mit breitem Einsatzspektrum und somit ein attraktives Werkzeug für das *Tissue Engineering* dar. gPS-Zellen lassen sich im Gegensatz zu humanen ES-Zellen ohne ethische Bedenken generieren. gPS-Zellen exprimieren die typischen Pluripotenz-Gene und ähneln über die molekulare Ebene hinaus, auch auf epigenetischer und funktioneller Ebene sehr stark den ES-Zellen. Ihre Pluripotenz kann durch stringente Kultivierungsbedingungen *in vitro* erhalten bleiben und erfordert keine Transfektion exogener viraler Transkriptionsfaktoren. Darüberhinaus ermöglichen sie die autologe patientenspezifische Applikationen.

Biomaterialien können die Proliferation und die Differenzierung von Stammzellen entweder inhibieren oder induzieren und unterstützen. Sowohl das Wachstums- als auch das Differenzierungsverhalten von gPS-Zellen auf Biomaterialien wurden bisher noch nicht untersucht. Die vorliegende Arbeit soll eine Einschätzung über verschiedene gPS-Zell/Polymer-Kombinationen geben und somit eine Validierung kompatibler Polymere zur Kultivierung dieses Stammzelltyps unter Expansions- und Differenzierungsbedingungen ermöglichen.

Zunächst soll die Pluripotenz der verwendeten gPS-Zellen durch Nachweis der typischen Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 durch Fluoreszenzmikroskopie (Oct4-eGFP⁺) und Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigt werden.

Die Identifizierung eines geeigneten Materials, das die *Feeder*-freie Expansion von gPS-Zellen ermöglicht und dabei deren Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial aufrecht erhält, wäre wünschenswert, um künftige Einsätze für biomedizinische Anwendungen nach internationalen Richtlinien ohne jegliche Berührungspunkte mit tierischem Material zu ermöglichen. Um vereinbare gPS-Zell/Biomaterial-Kombinationen identifizieren zu können, müssen einige Parameter wie Morphologie, Vitalität, Proliferation und Apoptose der gPS-Zellen sowie die Zytotoxizität des jeweiligen Materials analysiert werden. Durchflusszytometrie soll die quantitative Einschätzung des Verhältnisses lebender, apoptotischer und nekrotischer gPS-Zellen auf einem Material ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit werden Polymere einer Biomaterialbank, die in Kooperation mit dem DWI etabliert wurde, verwendet.

Desweiteren soll die Differenzierung von gPS-Zellen auf Polymeren untersucht werden. Hierbei wird der Fokus auf die Kombination von gPS-Zellen mit einzelnen Polymeren gelegt, die zuvor für die Kultivierung geeignet und als vielversprechend für weitere Untersuchungen eingeschätzt wurden. Durch Genexpressionsprofile mit typischen Genen aller drei Keimblätter der gPS-Zellen auf den jeweiligen Polymeren soll analysiert werden, ob das Polymer die Differenzierung in mesodermale, ektodermale oder endodermale Richtung beeinflusst. Die Ergebnisse aus den Differenzierungsversuchen liefern Aussagen über geeignete Kombinationen mit speziellen Polymeren, die für gPS-Zell-basiertes *Tissue Engineering* in Frage kommen könnten.

2 Material

2.1 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten gPS-Zellen stammen aus OG2 bzw. OG2 ROSA 26-Mäusen, deren Oct4-Gen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) gekoppelt wurde. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Ko und Prof. H.R. Schöler (Max Planck Institut für Molekulare Biomedizin, Zell- und Entwicklungsbiologie, Münster) zur Verfügung gestellt.

2.2 Zellkulturmedien

MEF-Medium:

DMEM <i>high Glucose</i> (4,5 g/l)	PAA, Cölbe
10 % FKS	Lonza, Köln
Penicillin (10000 u/ml)	PAA, Cölbe
Streptomycin (100 g/ml)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
β-Mercaptoethanol (100 µM)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM, 1:100)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
Hepes (1 M)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
Nicht-essenzielle Aminosäuren (0,1 mM)	Gibco® invitrogen, Darmstadt

Expansions-Medium:

DMEM <i>low Glucose</i> (1 g/l)	PAA, Cölbe
15 % FKS	Lonza, Köln
Penicillin (10000 u/ml)	PAA, Cölbe
Streptomycin (100 g/ml)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
β-Mercaptoethanol (100 µM)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM, 1:100)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
Hepes (1 M)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
Nicht-essenzielle Aminosäuren (0,1 mM)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
<i>Leukemia</i> -Inhibitor-Faktor (0,15:100 v/v)	

Differenzierungs-Medium:

DMEM <i>high Glucose</i> (4,5 g/l)	PAA, Cölbe
10 % FKS	Lonza, Köln
Penicillin (10000 u/ml)	PAA, Cölbe
Streptomycin (100 g/ml)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
β-Mercaptoethanol (100 μM)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM, 1:100)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
Hepes (1 M)	Gibco® invitrogen, Darmstadt
Nicht-essenzielle Aminosäuren (0,1 mM)	Gibco® invitrogen, Darmstadt

2.3 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert.

Name	Sequenz (5'→3')	Länge (bp)	Annealingtemperatur (°C)	Spezies
β-Actin	TTTGCAGCTCCTTCGTTGC CATCCATGGCGAACTGGTG	52	60	murin
α-Fetoprotein	TCAGCGAGGAGAAATGGTCC ATGAAAATGTCGGCCATTCC	52	60	murin
α-MHC	CATGGCTACACTCTTCTCTACCTATGC TACCACTGTCACCGGTATCAGC	53	60	murin
β-MHC	GAGAGGGTGGCAAAGTCACTG CAGTCACCGTCTTGCCATTCT	51	60	murin
Nestin	TGGAGGGTTGCGTCGG GCGTCGATTGAGCTCCCA	62	60	murin
Oct 4	AACCAACTCCCGAGGAGTCC CTAGCTCCTTCTGCAGGGCTT	58	60	murin

Tabelle 1) Primerliste.

2.4 Antikörper

Primärantikörper:

<i>Rabbit</i> Polyklonal Connexin 43/ GJA1 (ab47368)	abcam, Cambridge, UK
Monoklonal Anti-α-Actinin (<i>Sarcomeric</i>) Clone EA-53 (A7732)	sigma-aldrich, Hamburg
Nanog <i>Rabbit</i> anti-Human Polyklonal <i>Antibody</i> (LS-B1193)	Lifespan Biosciences, Seattle, USA

Anti-Sox2 Polyklonal <i>Antibody</i> (PA1-16968)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Monoklonal Anti-Zytokeratin <i>Clone</i> AE1/AE3 (M3515)	Dako, Hamburg
α -1-Fetoprotein Polyklonal <i>Rabbit</i> (A0008)	Dako, Hamburg
Monoklonal Anti-Desmin (10519)	Progen Biotechnik, Heidelberg
Monoklonal Anti-Actin, α - <i>Smooth Muscle antibody</i> (A2547)	sigma-aldrich, Hamburg
Sekundärantikörper:	
Cy3-konjugierter <i>Goat Anti-Rabbit IgG</i>	Jackson Immuno- Research Laboratories, Baltimore, USA
Biotin-markierter Sekundärantikörper (Anti-Maus/Kanninchen)	Dako, Hamburg

2.5 Kits

<i>BioArray High Yield RNA Transcription Labeling Kit</i>	Enzo Diagnostics, Enzo Life Science Inc., USA
<i>CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay</i>	Promega, Mannheim
<i>CytoTox-One[™] Homogenous Membrane Integrity Assay</i>	Promega, Mannheim
<i>Dako REAL[™] Detectionssystem Peroxidase/DAB⁺ Rabbit/Mouse K5001</i>	Dako, Hamburg
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems, USA
<i>LightCycler DNA Master SYBR Green I</i>	Roche, Mannheim
<i>RNeasy[®] Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden

2.6 Molekularbiologische Chemikalien

7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg
APC Annexin V	BD Biosciences, Heidelberg
DNase I (10 U/ μ l)	Roche, Mannheim

dNTPs (10 mM)	Applied Biosystems, USA
Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, USA
RNase Inhibitor (20 U/μl)	Applied Biosystems, USA
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Applied Biosystems, USA
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat, 50 mg/ml)	Boehringer Mannheim, DE
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, 100 mg/ml)	Boehringer Mannheim, DE

2.7 Gebrauchslösungen

AB-Diluent	5 % BSA in PBS
FDA, Stammlösung 5 mg/ml Aceton	0,1 μg FDA in 20 ml Aceton
Hämalaun	1 g Hämatoxylin in 1 l Aqua dest., 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kalialaun, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure
PBS	1 PBS-Tablette auf 0,5 l Aqua bidest.
PI (Stammlösung 0,5 mg/ml Ringerlösung)	0,01 μg in 20 ml Ringerlösung
Alkalische Phosphatase-Nachweisreagenz	150 μl BCIP (1:200), 112 μl NBT (1:268), 0,1 M Trispuffer (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl ₂ , auf 30 ml H ₂ O auffüllen.

2.8 Chemikalien

BCIP	Boehringer Mannheim, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
BSA, 98 %	Sigma, Steinheim
DAPI-I, DAPI-II-Kernfärbung	Abbott Molecular Inc, USA
DEPC	Sigma, Steinheim
DMSO	Merck, Darmstadt
<i>Epoxy Embedding Medium</i>	Sigma, Steinheim
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	Dako, Hamburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt

Glutaraldehyd	Sigma, Steinheim
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Dako, Hamburg
HCl	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	VWR prolabo, Darmstadt
Natronlauge 1 N	Merck, Darmstadt
NBT	Boehringer Mannheim, Mannheim
Resomer [®] LT706	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
PBS	Gibco BRL, Schottland
Peroxidase Block (Kit)	Dako, Hamburg
Probylenoxid	Serva, Heidelberg
Streptavidin-Peroxidase HRP (Kit)	Dako, Hamburg
Trypsin/EDTA (0,1 %)	Lonza, Schweiz
Trypsin/EDTA (0,25 %)	Gibco BRL, Schottland
Triton-X-100	Sigma, Steinheim

2.9 Lösungsmittel

Chloroform	VWR Prolabo, Darmstadt
Ethanol	VWR Prolabo, Darmstadt
Flüssiger Stickstoff	Merck, Darmstadt
Hexan	Fluka, Schweiz
Isopropanol	KMF optiChem, Lohmar

2.10 Geräte

2100 Bioanalyser	Agilent, USA
Autoklav	2540 EL Tuttnauer Systec, Wettenberg

Brutschrank (37°C, 5 % CO ₂ , 20 % O ₂)	CB210	Binder, Tuttlingen
GeneChip® Fluidics Station 450		Affymetrix, USA
GeneChip® Scanner	3000 7G	Affymetrix, USA
Cytomation Pen		Dako, Hamburg
Dampfsterilisator		Varioklav®/Thermo, Karlsruhe
FACSCanto Durchflusszytometer		BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzlampe		Leica, Wetzlar
Gelkammer		Serva, Heidelberg
Gel-Dokumentationseinheit		MWG Biotech AG, Ebersberg
Membran-Vakuumpumpe		Vacuubrand, Italien
Mikroskope	Axiovert 25	Zeiss, Jena
	DMRX	Leica, Wetzlar
NanoDrop®	ND-1000 Spectro- Photometer	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetten	Reference pipetus®	Eppendorf, Köln Hirschmann, Eberstadt
7300 <i>Real Time</i> PCR System		Applied Biosystems, USA
Rührer/Heizplatte	MR 2002	Heidolph, Kehlheim
Schmelzpresse		LOT-Oriel, Darmstadt
Stanzer	15er, 25er	Turnus, Remscheid
Sterilbank	HERA safe	Heraeus, Düsseldorf
Spannungsgerät	SX250 Power- Supply	Hoefer, USA
Temperaturregler		Specac, USA
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Köln
	Thermomixer 5436	Eppendorf, Köln
Trockenofen	UT6060	Heraeus, Düsseldorf
Ultraschallgerät	RK100H	Bandelin Sonorex, Mörfelden- Walldorf
Vakuumglocke		Kartell, Italien
Verstärker	SEC10-LX	npi electronic, Tamm

Vortex	Minishaker MS2	IKA-Werke, Staufen
Waagen	Feinwaage A120S	Sartorius, Göttingen
	BP1200	Sartorius, Göttingen
	Iso9001	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank (37°C)		Heraeus, Düsseldorf
Wasserbad	SWB 20	Haake, Karlsruhe
Zellzähler	Casy1®	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifugen	Biofuge 15R	Heraeus, Düsseldorf
	Biofuge pico	Heraeus, Düsseldorf
	Megafuge 1.0	Heraeus, Düsseldorf
	2K15	Sigma, Steinheim

2.11 Software

<i>AGCC software</i>	Affymetrix, USA
analySIS®	Soft Imaging System, Münster
Discus	Carl H. Hilgers, Königswinter
<i>Flowjo Flow Cytometry Analysis Software</i>	Tree Star, Inc., USA
<i>GraphPad Prism 4</i>	GraphPad Software, USA
<i>MiniAnalysis software</i>	Synaptosoft, USA
NanoDrop® Software	NanoDrop Technologies, München
PULSE software	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht
7300 <i>Real Time</i> PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt

2.12 Glaswaren

Bechergläser	Schott, Mainz
<i>Chamber Slides™</i> Lab-Tek 8 Well	Nagle Nunc, Langenselbold
Deckgläser	Engelbrecht, Edermünde
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Kapillaren für <i>LightCycler</i>	Roche, Mannheim

Laborflaschen
Messzylinder
Objektträger
Pasteurpipetten
Pipetten
Reagenzröhrchen

Duran, Mainz
Brand, Wertheim
Langenbrinck, Emmendingen
Brand, Wertheim
Costar Stripette, Hamburg
Sarstedt, Nümbrecht

2.13 Verbrauchsmaterial

Casy1[®]-Probengefäße
Eppendorf-Reaktionsgefäße
GeneChip[®] MouseGen 1.0 ST Array
Gewebekulturflaschen (T₇₅, T₁₇₅)
Kanüle
Kavitäten-Platten (6er-, 24er-Format)
Kryoröhrchen
Nitril-Handschuhe
Parafilm
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)
PTFE

PVDF

QiaShredder
Reaktionsgefäße (1,5 ml)
Resomer[®] LR704

RNA NanoChips
Skalpell zum Einmalgebrauch
Sterilfilter mit Glocke
Urinbecher
Zellschaber
Zentrifugenröhrchen

Schärfe System, Reutlingen
Sarstedt, Nümbrecht
Affymetrix, USA
Greiner bio-one, Solingen
Becton Dickinson, Heidelberg
Becton Dickinson, Heidelberg
Nagle Nunc, Langenselbold
Transaflex, Wehrheim
Band, Wertheim
Greiner bio-one, Solingen
GoodFellow Cambridge Ltd,
Huntingdon, England
GoodFellow Cambridge Ltd,
Huntingdon, England
Qiagen, Hilden
Sarstedt, Nümbrecht
Boehringer Ingelheim,
Ingelheim
Agilent, USA
PFM, Köln
Sartorius, Göttingen
Sarstedt, Nümbrecht
Greiner bio-one, Solingen
Greiner bio-one, Solingen

3 Methoden

3.1 Chemische Verfahren

3.1.1 Herstellung von Polytetrafluorethylen (PTFE) und Polyvinylidenfluorid (PVDF)

PTFE- und PVDF-Folien werden zu 6-, 24- und 96-Kavitäten-Formaten zugeschnitten. Die konfektionierten Folien werden in einer mit EtOH und Hexan (21:79 v/v) gefüllten Soxhlet-Apparatur für 2 h extrahiert. Danach werden die Folien bei 80°C für 1 h getrocknet und anschließend für 48 h in Vakuum gehalten.

3.1.2 Herstellung von Resomer[®] LR704

Resomer[®] LR704 (Poly (L-Laktid-co-D,L-Laktid) 70:30)-Folien werden mit einer Schmelzpresse hergestellt. Die Metall-Platten der Presse werden mit Teflon-Folien bedeckt und 1,2 g Resomer[®] LR704 Polymer Granulat werden in die Mitte dieser Folien platziert. Bei einer Temperatur von 200°C wird das Granulat in der Presse für 3 min geschmolzen und mit einer abschließenden Druckerhöhung auf 1 t für 1 min zu einer Folie gepresst. Nachdem die Folien zu entsprechenden Größen konfektioniert wurden, werden sie in Isopropanol gesäubert, mit einem Nitrogenstrahl angetrocknet und 2 h via Vakuum abschließend getrocknet.

Hier wurde nur die Herstellung der Materialien, die in der folgenden Arbeit fokussierter untersucht werden, detailliert aufgeführt. Die Protokolle zur Herstellung aller anderen verwendeten Materialien, wie der degradierbaren Biopolymere Alginat, Kollagen, Fibrin und Hyaluronsäure, der nicht-degradierbaren synthetischen Polymere Texin, Polyethylenterephthalat (PET) und Polydimethylsiloxan (PDMS), sowie der degradierbaren synthetischen Polymere Polyesteramid Typ BAK 1095 (BAK), Poly-L-Laktid-co-Trimethylencarbonat (LT706), Poly-ε-caprolakton (PCL), Poly-D,L-Laktid (PDLLA), Polyesteramid Typ C (PEA C), Poly-L-Laktid (PLLA) und Poly-D,L-Laktid-co-Glycolsäure (RG503) sind der Publikation von

Neuss *et al.* (2008), *Assessment of stem cell/biomaterial interactions for stem cell-based tissue engineering. Biomaterials* 29:302-313 zu entnehmen [55].

3.2 Zellkulturtechnik

3.2.1 Isolation von MEF

Embryonale Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts* = MEF) werden aus Embryonen von BL6(IL4)-Mäusen isoliert und mittels γ -Bestrahlung (30 Gy) mitotisch inaktiviert. Die Kultivierung erfolgt mit MEF-Medium ($1-2 \times 10^4$ Zellen/cm²), bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.

Die Embryonen (Tag 13-14) werden im Dottersack aus dem Uterus der schwangeren Maus entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen mit PBS überführt. Unter sterilen Bedingungen werden Dottersack, Plazenta, Kopf, Leber und Innereien des Embryos entfernt und das restliche Gewebe zwei Mal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA gespült. Nach der Zerkleinerung des Gewebes mit einem Skalpell werden die Gewebestücke in 5 ml Trypsin/EDTA aufgenommen und in einem Erlenmeyerkolben für 45 min bei RT unter konstantem Schütteln inkubiert. Die erhaltene Suspension wird durch ein 70 μ m-Zellsieb filtriert und mit 10 ml MEF-Medium gespült. Die Fibroblasten werden für 6 min bei 850 rpm (100 g) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Kultivierung erfolgt in MEF-Medium (2-3 Embryonen pro 150 mm-Platte), bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Nach 48 h wird das Medium gewechselt. Nach 3-4 Tagen können die Zellen weiter passagiert ($1-2 \times 10^4$ Zellen/cm²), inaktiviert und/oder eingefroren werden.

3.2.2 Expansion von gPS-Zellen

gPS-Zellen wurden von Ko *et al.* (2009) aus männlichen Mäusen des Stammes OG2 und OG2 ROSA26 isoliert und zur Verfügung gestellt.

In der vorliegenden Arbeit werden gPS-Zellen ($6,3 \times 10^3$ Zellen/cm²) auf inaktivierten MEF (2×10^4 Zellen/cm²) in Expansions-Medium in Anwesenheit von löslichem *leukemia inhibitory factor* (LIF, 20 ng/ml) expandiert. Die *Feeder*-Zellen wurden zuvor auf Gelatine-beschichteten (0,1%) Kulturplatten ausgesät und gewährleistet

- zusammen mit LIF-Nährstoffaustausch - die Aufrechterhaltung der Pluripotenz der gPS-Zellen. Die Kultivierung der Zellen erfolgt bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.

gPS-Zellen werden etwa alle zwei Tage passagiert, noch bevor die Kolonien ihre ES-Zell-typische Morphologie verlieren. Dazu werden die Zellen zunächst mit PBS gespült. Zum Lösen der gPS-Zellen werden bei 10er-Gewebekulturplatten 1 ml 0,5%iges Trypsin hinzu gegeben und 2 min bei RT inkubiert. Mit 5 ml Medium, also einem Gesamtvolumen von 6 ml, wird die Enzymreaktion gestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 4-minütiger Zentrifugation bei 850 rpm (100xg) wird das trypsinhaltige Medium abgenommen und das Zellpellet wird in so viel frischem Expansions-Medium resuspendiert, dass pro *Feeder*-Zell-besiedelte 10er-Gewebekulturplatte 5×10^5 Zellen in 10 ml Medium unter Zugabe von 20 µl LIF (20 ng/ml) ausgesät werden können. Dies entspricht einer Aussaatdichte von ca. 6300 Zellen/cm². gPS Zellen können 40 Mal und mehr passagiert werden.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mittels Neubauer-Kammer. Dazu werden 10 µl einer Zellsuspension/Trypanblau-Mischung (1:1) auf die Zählkammer gegeben. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während Trypanblau durch die veränderte Membrandurchlässigkeit in die abgestorbenen Zellen eindringen kann. Dadurch wirken tote Zellen unter dem Mikroskop blau, während vitale Zellen weiß erscheinen. Die vitalen Zellen der vier großen Eckquadrate der Neubauerkammer werden gezählt. Die ermittelte Zellzahl wird mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension multipliziert. Dies ergibt die Zellzahl pro ml.

3.2.4 Differenzierung von gPS-Zellen mittels *Embryoid body*-Formation

Trypsinierte gPS-Zellen (s.o., 3.2.1) werden zunächst auf einer Gelatine-beschichteten Zellkulturplatte für 20 min vorplattiert, um eine möglichst MEF-freie Suspensions-Kultur zu erhalten. MEF adhären in dieser Zeit an die Zellkulturplastik, während gPS-Zellen noch in Suspension verbleiben.

Zur Formation einer *Embryoid body* (EB)-Kultur werden die gPS-Zellen zu $1,2-2 \times 10^6$ Zellen auf einer unbeschichteten 10er-Bakterienkulturplatte in

Differenzierungs-Medium (ohne LIF) ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Nach 4 Tagen haben die EBs einen Durchmesser von ca. 350-450 µm erreicht und werden auf die Materialien überführt (ein EB pro 24er Kavität). Der Mediumwechsel erfolgt anfangs alle 2 Tage, später täglich, je nach Verfärbung des Mediums, welche indikativ für den Zellmetabolismus ist.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Alkalische Phosphatase-Nachweis

Der Nachweis der Alkalischen Phosphatase (AP) beruht auf der Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) durch die Alkalische Phosphatase zu 5-Brom-4-chlor-indolyl und der anschließenden Oxidation zu einem Indigofarbstoff. Dabei erfolgt die Fixierung der Zellen nach dem Waschen mit PBS mit -20 °C kaltem Methanol und 10-minütiger Inkubation bei -20 °C. Danach werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und trocknen gelassen. Zum Färben wird pro 24er Kavität 1 ml Nachweisreagenz für Alkalische Phosphatase auf die fixierten Zellen gegeben und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit H₂O werden die Zellen trocknen gelassen. Zellen, die Alkalische Phosphatase enthalten, erscheinen im Lichtmikroskop schwarz.

2.3.2 Immunofluoreszenz-Färbung

Die undifferenzierten gPS-Zellen werden in 4%igem PFA in PBS fixiert. Anschließend werden die Zellen 3 x 5 min mit PBS gespült. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wird ein sogenannter Serumblock durchgeführt. Diese Blockierlösung besteht aus 3% (v/v) Pferde-Serum und 0,5% (v/v) Triton X-100 in 1% BSA in PBS. Es folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper Nanog- bzw. Sox2 (1:50 in 1% BSA in PBS) über Nacht bei RT. Nach dreimaligem Spülen (s.o.), wird der Cy-3-markierte Sekundärantikörper (1:400, in 1% BSA in PBS) für 3 h bei RT und in Dunkelheit auf die Zellen gegeben. Abschließend werden die Zellen erneut 3 x gewaschen und in DAPI-*Mounting*-Medium eingedeckelt. Mit entsprechendem Filter mit einer

Wellenlänge von 550 nm kann die Fluoreszenz der Zellen sichtbar gemacht werden und das Ergebnis fotografisch dokumentiert werden.

2.3.3 Immunhistochemie

Der Nachweis der keimblattspezifischen Proteine α -Fetoprotein (1:1000), Zytokeratin (1:200), Desmin (1:20) und SMA (1:3000), sowie sarkomeres α -Actinin (1:100) und Connexin 43 (1:100) wird mit dem Dako *REALTM Detectionssystem Peroxidase/DAB⁺ Rabbit/Mouse* K5001 durchgeführt. Die differenzierten gPS-Zellen werden in 4%igem PFA in PBS fixiert und anschließend 3 x 5 min mit PBS gespült. Auf den 5-minütigen Peroxidase-Block folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für 25 min. Danach werden die Zellen 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Biotin-markierten Sekundärantikörper erfolgt für 15 min. Daraufhin werden die Zellen 15 min mit Streptavidin-Peroxidase HRP behandelt. Nachdem die Zellen 2 x 5 min mit HRP Substrat-Puffer inkubiert wurden, erfolgt abschließend die Haematoxylin-Färbung.

2.3.4 Vitalitäts-Test

Die Vitalität und Proliferation der Zellen werden mit dem *CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay* der Firma Promega untersucht. gPS-Zellen werden auf Polymere im 96-Well-Format (1300 Zellen/cm²) ausgesät. Als Positivkontrolle dienen gPS-Zellen, die mit derselben Zelldichte auf MEF ausgesät werden. Als Negativkontrolle dient Zellkulturmedium, welches ohne Zellen inkubiert wird. Nach 24 (bzw. 48 und 72)-stündiger Inkubation werden 20 μ l *CellTiter-Blue[®]*-Reagenz pro Kavität zum Medium (1:6) gegeben, für 1 h bei 37°C inkubiert und der Überstand in eine schwarze 96-Well-Platte überführt, um das Resorufin-Fluoreszenzsignal (560 nm_{Ex}/590 nm_{Em}) zu messen. Das umgesetzte Resorufin steht proportional im Verhältnis zur Menge metabolisch aktiver Zellen, da nur solche das im Reagenz enthaltene Resazurin zu dem pink fluoreszierenden Resorufin umwandeln können. Anschließende statistische Analysen wurden mit *GraphPad Prism* durchgeführt.

2.3.5 Zytotoxizitäts-Test

Um den zytotoxischen Einfluss der Biomaterialien auf die gPS-Zellen zu untersuchen, wird der *CytoTox-OneTM Homogenous Membrane Integrity Assay* der Firma Promega durchgeführt. Die Zellen werden auf Polymere im 96-Kavität-Format (1300 Zellen/cm²) ausgesät. Nach 24 h wird das Medium in eine schwarze 96-Well-Platte überführt und mit 100 µl Zytotoxizitätsreagenz (1:1 v/v) gemischt. Nach 10 min wird mittels fluorometrischer Messung das umgesetzte Resorufin bestimmt (560 nm_{Ex}/590 nm_{Em}). Zellen, die negativ auf chemische Substanzen wie zum Beispiel Polymere reagieren, weisen eine geschädigte Zellmembran auf. Zytoplasmatische Laktatdehydrogenase (LDH) wird freigesetzt und wandelt Laktat zu Pyruvat um. Bei dieser Oxidation werden Reduktionsäquivalente übertragen, wodurch in einer weiteren Reaktion das im Zytotoxizitätsreagenz enthaltene Enzym Diaphorase Resazurin zu Resorufin reduziert. Somit steht der gemessene Resorufin-Wert im proportionalen Verhältnis zu der Menge an freigesetzter LDH, die letztendlich eine Quantifizierung nekrotischer Zellen zulässt. Als Positivkontrolle für den Zytotoxizitäts-Assay werden 2 µl eines Lysepuffers eingesetzt, der in einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C die Zellmembran der Kontrollzellen permeabilisiert, wodurch LDH freigesetzt wird. Jeder Assay wurde im achtfach Ansatz durchgeführt. Anschließende statistische Analysen erfolgten durch *GraphPad Prism*.

2.3.6 Bestimmung apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie

Um das Verhältnis lebender und toter gPS-Zellen auf den Polymeren quantifizieren zu können, werden tote Zellen mit Annexin V und 7-AAD markiert und durchflusszytometrisch analysiert. 7-AAD ist ein Nukleinsäure-Farbstoff, der bei nekrotischen Zellen durch die porösen Zell- und Zellkernwände gelangt und in DNA interkaliert. Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin, das im frühen apoptotischen Stadium der Zelle vom Inneren der Plasmamembran zur Außenmembran transloziert wird. Somit kann durch kombinierten Einsatz von 7-AAD und Annexin V zwischen toten und früh apoptotischen Zellen unterschieden werden, die sich als markierte Zellen in der Durchflusszytometrie von den nicht markierten lebenden Zellen abgrenzen.

Die gPS-Zellen werden 24 h auf Polymeren im 6-Kavitäten-Format ($1,4 \times 10^4$ Zellen/cm²) kultiviert. Dann werden die gPS-Zellen zunächst 2 min von dem Material oder den MEF trypsiniert (s.o., 3.2.2). Nach der Zentrifugation werden die Zellen 2 x in kaltem PBS gewaschen. Danach werden die Zellen in 100 µl *Binding* Puffer, 5 µl APC Annexin V und 1 µl 7-AAD resuspendiert, gevortext und 15 min bei Dunkelheit und RT inkubiert. Weitere 400 µl *Binding* Puffer werden hinzugegeben und die Messung erfolgt innerhalb 1 h mit dem FACSCalibur Durchflusszytometer. Die abschließende Auswertung wird mit der *Flowjo Flow Cytometry Analysis Software* durchgeführt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolation aus Zellen

Die RNA-Isolation wird mittels RNeasy-Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Absaugen des Mediums werden 600 µl RLT-Puffer, der zuvor mit β -Mercaptoethanol (1:100) versetzt wurde, auf die Zellen gegeben. Die Zellsuspension wird auf die *Qia-Shredder*-Säule geladen und 2 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Hierbei gelangt die RNA in das Auffanggefäß, während lysierte Zelltrümmer in der Säule aufgefangen werden. Der Durchlauf wird mit gleichem Volumen (600 µl) 70%-igem Ethanol vorsichtig gemischt und auf die RNeasy-Säule gegeben. Im folgenden Zentrifugationsschritt, 15 s bei 10 000 rpm (9520 g), wird die RNA in der Membran gehalten. Weitere Zellbestandteile werden somit von der RNA getrennt und verworfen. Die Säule wird mit 700 µl RW1-Puffer und nachfolgend mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, indem man jeweils 15 s bei 10000 rpm (9520 g), zentrifugiert. Ein dritter Waschschrift wird ebenfalls mit 500 µl RPE-Puffer durchgeführt. Diesmal wird 2 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Schließlich wird die RNA mit 52 µl RNase-freiem Wasser von der Membran eluiert (1 min bei 9520 g).

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgt im NanoDrop bei einer Absorption von 260 nm.

Zum Verdau von DNA-Rückständen wird pro 30 µg RNA 1 µl DNase I (22,9 U/µl) eingesetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die RNA wird anschließend bei -80°C gelagert.

3.4.2 Reverse Transkription

Um spezifische Transkripte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachweisen zu können, muss die RNA zunächst in cDNA (*copy DNA*) umgeschrieben werden. Dazu wird das Enzym Reverse Transkriptase gemäß folgendem Pipettierschema nach Herstellerangaben (Applied Biosystems) eingesetzt:

10 x RT Puffer	2 μ l
25 x dNTP-Mix (100 mM)	0,8 μ l
10 x RT Random Primer	2 μ l
Reverse Transkriptase	1 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
DEPC-H ₂ O	3,2 μ l
<hr/>	
Gesamtvolumen	10 μ l

Die RNA wird in einer Konzentration von 1 μ g/ μ l eingesetzt, so dass insgesamt ein Reaktionsvolumen von 20 μ l entsteht. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt die cDNA-Synthese für 120 min bei 37°C. Die Enzymreaktion wird 10 s bei 85°C abgestoppt und die cDNA im direkten Anschluß auf Eis gekühlt und dann bei -20°C gelagert.

3.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Amplifikation eines DNA-Fragments. Durch Einsatz spezieller Primer wird nur das entsprechende Fragment, welches als *Template* dient und an das die Primer komplementär binden, amplifiziert.

Bei dem ersten Schritt der PCR, dem Denaturierungsschritt, werden die Doppelstränge der *Template*-DNA bei einer Temperatur von 95°C getrennt. Im nächsten Schritt, dem sogenannten *Annealing*-Schritt, hybridisieren die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte. Die *Annealing*temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer. Als nächstes erfolgt die Neusynthese der *Target*-Sequenz durch die hitzestabile Taq-Polymerase. Hierbei wird die Temperatur auf 72°C erhöht.

Diese drei Teilschritte werden in 35 Zyklen wiederholt. Darauf folgt die finale Extension für 10 min bei 72°C und das Programm endet mit der Abkühlung auf 4°C. Die benötigten Komponenten für einen PCR-Ansatz sind im Folgenden aufgeführt:

10 x Puffer	5	µl
dNTPs (100 mM)	1	µl
Taq-Polymerase (2,5 units)	0,5	µl
3'-Primer (20 pmol/µl)	0,5	µl
5'-Primer (20 pmol/µl)	0,5	µl
DEPC-H ₂ O	41,5	µl
<hr/>		
Gesamtvolumen	49	µl
<i>Template</i> -DNA	+ 1	µl

Cycler-Programm für GAPDH-PCR:

1 min	95°C	Denaturation	} x 35
1 min	57°C	<i>Annealing</i>	
1 min	72°C	Extension	
10 min	72°C	Finale Extension	
∞	4°C		

3.4.4 Taqman PCR mit SYBR green

Die *Taqman* PCR dient ebenfalls der Vervielfältigung von Nukleinsäure-Abschnitten, bietet allerdings zusätzlich die Möglichkeit zur relativen Quantifizierung der eingesetzten *Template*konzentration. Um eine quantitative Messung zu ermöglichen werden in die DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe (SYBR green) eingesetzt, deren Signal proportional mit der Menge an PCR-Produkt zunimmt.

Die Substanzen für eine *Taqman* PCR mit SYBR green sind im folgenden Pippettierschema aufgeführt:

SYBR <i>green</i>	10 µl
3'-Primer (20 pmol/µl)	1 µl
5'-Primer (20 pmol/µl)	1 µl
DEPC-H ₂ O	6,8 µl

Gesamtvolumen	18,8 µl
<i>Template</i> -DNA	+ 1,2 µl

Light Cycler-Programm für β-Aktin:

10 min	95°C		
15 s	95°C	Denaturation	} x 40
60 s	60°C	<i>Annealing</i>	
16 s	72°C	Extension	

Das Expressionslevel von jedem *Target*-Gen wird an die Expression des *Housekeeping*-Gens β-Aktin angepasst.

Anschließende statistische Analysen wurden mit *GraphPad Prism* durchgeführt.

3.4.5 Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten können diese elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels werden 10 g Agarose in 500 ml 1 x TBE aufgekocht und mit 75 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) versetzt.

Um durch farbliche Markierung den Verlauf der Proben verfolgen zu können, werden 15 µl DNA mit 5 µl Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Außerdem muss parallel eine geeignete Referenz-DNA aufgetragen werden, der sogenannte Marker oder die DNA-Leiter. Es wird so lange eine Spannung (100 V) angelegt, bis sich die unterschiedlich großen Fragmente im Gel voneinander getrennt haben. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind, wandert die DNA Richtung Anode. Lange Fragmente wandern im Gel aufgrund ihrer Größe nicht so weit wie kleinere Fragmente.

Um die DNA-Banden detektieren zu können, wird das Gel zuvor mit Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA. Durch Bestrahlung mit UV-Licht fluoreszieren die DNA-Banden und können somit sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis wird fotografisch dokumentiert.

3.4.6 Affymetrix GeneChip® Array-Analyse

Die *Microarray* Analysen wurden unter der Leitung von Dr. rer. nat. Bernd Denecke von der Chip-Facility des IZKF Aachen der RWTH Aachen mittels *Affymetrix GeneChip® Array* durchgeführt.

Für die Analysen werden 300 ng/µl aufgereinigter RNA (siehe 3.4.1) zwölf Tage alter EBs, die auf Gelatine und LR704 kultiviert wurden, eingesetzt. Die RNA-Qualität wird mit Hilfe eines *RNA NanoChips* und des *Agilent 2100 Bioanalyzer* geprüft. Die RNA wird mit Random-Hexamer-Oligonukleotiden mit markierter T7 Promotorsequenz in cDNA transkribiert. Die doppelsträngige cDNA wird als Matrize für die Amplifikation einer *antisense* cRNA verwendet, die durch eine T7 RNA-Polymerase synthetisiert wird. Für die reverse Transkription der cRNA in einzelsträngige cDNA werden Random-Hexamere eingesetzt. Diese werden durch Uracil DNA Glycosylase (UDG) und *apurinic/aprimidic* Endonuklease fragmentiert und deren Größe, die zwischen 50-200 bp liegen sollte, anhand des *Bioanalyzers* geprüft. Es folgt die Biotin-Markierung durch terminale Deoxynukleotidyl-Transferase. Anschließend werden die Proben an den *GeneChip® Mouse 1.0 ST Array* bei 45°C für 16 h hybridisiert, gewaschen und gefärbt. Zum Schluß werden die Proben gescannt und mit Hilfe der Affymetrix-Software analysiert.

Abschließende Vergleiche von undifferenzierten gPS-Zellen mit differenzierten gPS-Zellen auf Gelatine und LR704 wurden durchgeführt und mit Hilfe der *Principal component Analyse (PCA)* und in hierarchischen *Cluster Analysen (heat maps)* in Zusammenarbeit mit Qiong Lin, M.Sc. Institut für Biomedizinische Technologie, Zellbiologie, RWTH Aachen, ausgewertet.

3.4.7 Vorbereitung der Proben zur Rasterelektronenmikroskopie

Undifferenzierte gPS-Zellen, die unter Expansionsbedingungen auf den verschiedenen Polymeren kultiviert wurden und für rasterelektronenmikroskopische

Aufnahmen genutzt werden sollen, werden für mindestens 24 h in 3%igem Glutaraldehyd fixiert. Es erfolgt ein Waschschrift mit 0,1 M Soerensen's-Phosphatpuffer für 10 min und eine jeweils 10-minütige Inkubation in 30%, 50%, 70%, 90% und 100%igem EtOH zum Entwässern der Proben. Der letzte Schritt wird 3 x wiederholt. Die Trocknung der Proben erfolgt mit flüssigem CO₂ und anschließend werden die Proben im *Sputter-Coater* mit einer 30 nm-dicken Goldschicht beschichtet, bevor sie im Rasterelektronenmikroskop untersucht werden können.

3.4.8 Vorbereitung der Proben zur Transmissionselektronenmikroskopie

Für die transmissionselektronischen Untersuchungen werden die gPS-Zell-EBs mit einem Zellscharber von der Oberfläche abgetrennt und für mindestens 24 h in 3%igem Glutaraldehyd fixiert. Die Proben werden 15 min in 0,1 M Soerensen's-Phosphatpuffer gewaschen. Es folgt die 1-stündige Kontrastierung in 1%igem Osmiumtetroxid (OsO₄), bevor die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden. Gestartet wird mit der 10-minütigen Inkubation in Aqua dest./Sucrosepuffer (1:1), dann jeweils 10 min in Aqua dest., 30%, 50%, 70%, 90%igem EtOH und 3 x 10 min in 100%igem EtOH. Als nächstes werden die Proben in reines Propylenoxid überführt. Die Inkubation erfolgt in verschlossenen Gläsern für 30 min in einem Rotator. Anschließend werden die Proben für 60 min in ein Epon-Propylenoxid-Gemisch (1:1) überführt und abschließend in reinem Epon bei 37°C für 60 min inkubiert bzw. eingebettet. Zum Schluss erfolgt die Polymerisation für 8 h bei 37°C und für 56 h bei 60°C. Aus den Epon-Blöcke können nun 90 nm-ultradünne Schnitte für die Untersuchungen im Transmissionselektronenmikroskop angefertigt werden.

3.5 Elektronenphysiologische Messungen

3.5.1 *Sharp electrode*-Technik

Um schlagende Areale der EBs zu analysieren, wurden *Sharp electrode*-Messungen unter konstanter Superfusion mit DMEM bei 37°C durchgeführt. Diese Analysen

wurden unter der Leitung von Dr. Dr. T. Šarić (Institut für Neurophysiologie, Zentrum für Molekulare Medizin, Köln) durchgeführt. Dabei werden KCl-gefüllte Pipetten (3 M) mit einem Widerstand von 30-50 M Ω angelegt. pH-Wert und Sauerstoff-Druck der Extrazellulärlösung werden durch Carbogen (95%O₂, 5%CO₂) aufrecht erhalten. Signale werden durch den SEC10-LX-Verstärker verstärkt und durch den EPC-9-*Amplifier* umgewandelt. Die Messdaten werden in der *PULSE software* gespeichert und mittels *MiniAnalysis software* analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) dargestellt und wurden durch einen *student's test* statistisch evaluiert.

4 Ergebnisse

4.1 Pluripotenz von gPS-Zellen

4.1.1 Morphologie und Pluripotenznachweis

Die in dieser Arbeit verwendeten gPS-Zellen stammen aus OG2 bzw. OG2 ROSA 26-Mäusen, deren Oct4-Gen stabil mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) gekoppelt wurde.

Abbildung 2 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme undifferenzierter gPS-Zellen auf MEF. Die Morphologie der gPS-Zellen gibt Aufschluss über deren Differenzierungspotenzial.

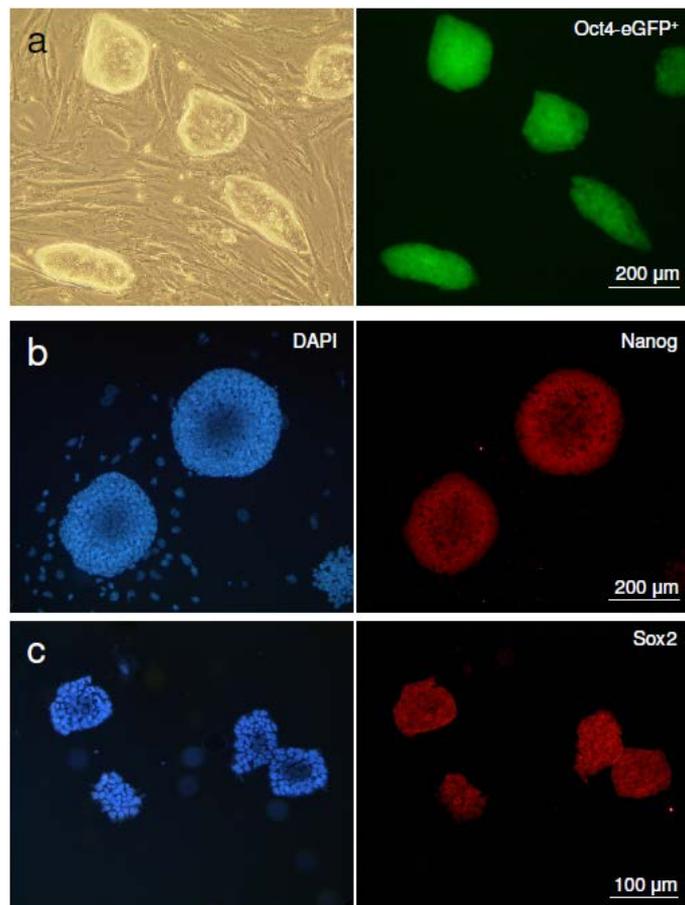


Abbildung 2) Undifferenzierte gPS-Zellen auf MEF: a) Lichtmikroskopische Aufnahme (links) und Fluoreszenzbild (rechts; grüne Fluoreszenz entspricht Oct4-Expression und ist somit Pluripotenznachweis). b) DAPI-Färbungen (links) und Fluoreszenzfärbung des Pluripotenzmarkers Nanog (rechts). c) DAPI-Färbungen (links) und Fluoreszenzfärbung des Pluripotenzmarkers Sox2 (rechts).

Man erkennt in Abbildung 2a fünf Kolonien mit ES-Zell-typischem, glattem, durchgehendem und hellem Rand. Die Form dieser Kolonien erscheint dreidimensional. Die grüne Fluoreszenz dieser Kolonien geht auf die Expression des mit GFP gekoppelten Oct4-Gens zurück und ist indikativ für deren Pluripotenz-Status. Die DAPI-Färbung in Abbildung 2b+c zeigt sowohl die Zellkerne der gPS-Zellen als auch die Zellkerne der MEF. Die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbungen der Pluripotenz-Marker Nanog und Sox2 sind ebenfalls in Abbildung 2b+c dargestellt. Eine deutliche Färbung der undifferenzierten gPS-Zell-Kolonien ist erkennbar. MEF zeigten keine Reaktion mit diesen Pluripotenzmarkern.

Da Oct4, Nanog und Sox2 als Pluripotenzmarker gelten, kann man davon ausgehen, dass die in dieser Arbeit verwendeten gPS-Zellen pluripotent sind.

4.2 Kompatible gPS-Zell/Polymer-Kombinationen

4.2.1 Vitalität und Proliferation von gPS-Zellen auf Polymeren

In Abbildung 3 sind die Vitalitätsmessungen der gPS-Zellen auf den Polymeren an Tag 1, 2 und 3 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass nach drei Tagen eine erhöhte Vitalität fast aller gPS-Zellen, die in Expansions-Medium mit LIF kultiviert wurden, gemessen wurde (Abb. 3). Zellen, die unter Expansionsbedingungen kultiviert wurden, proliferierten stärker als gPS-Zellen, die in Differenzierungs-Medium ohne LIF kultiviert wurden (Abb. 3). Es konnte allerdings kein Material identifiziert werden, auf dem die undifferenzierten gPS-Zellen besser proliferierten als auf MEF. Lediglich Zellen auf TCPS, Gelatine, LR704 und PLLA zeigten stärkere Proliferation als auf anderen Polymeren, was sich auch in der statistischen Analyse zeigt. Diese Materialien unterscheiden sich an Tag 3 nicht mit einer Signifikanz von $** p \leq 0,01$ von der Kontrolle auf MEF. Alle anderen Materialien hingegen schon. Bei BAK und Fibrin wurden die geringsten Vitalitätswerte gemessen. Auch unter Differenzierungsbedingungen (Abb. 3b) zeigten Zellen auf diesen zwei Polymeren nach drei Tagen ein stärker verringertes Fluoreszenzsignal als auf anderen Biomaterialien. Insgesamt schienen die gPS-Zellen bei der Kultivierung in Differenzierungs-Medium ohne LIF ihre Zellteilung einzustellen. Neben TCPS und

Gelatine, erreichten Kollagen, PTFE, LR704, PLLA und RG503 vergleichbare Werte wie die Kontroll-Zellen auf MEF.

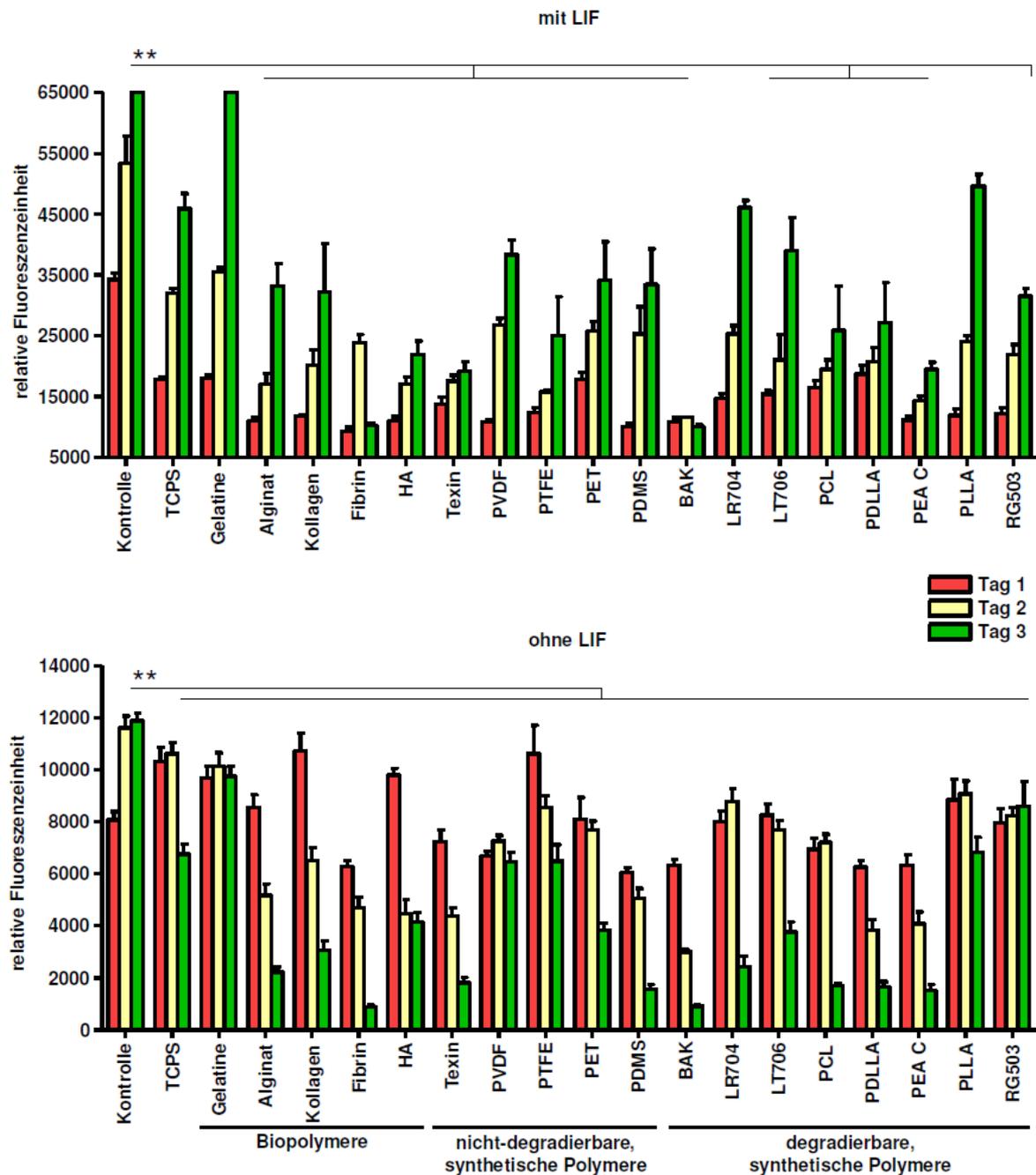


Abbildung 3) Vitalität/Proliferation von gPS-Zellen auf Biomaterialien. Die relative Fluoreszenzeinheit bezieht sich auf das umgesetzte Resorufin, welches proportional im Verhältnis zur Menge metabolisch aktiver Zellen steht. Oben: Wachstumsbedingungen (mit LIF), unten: Differenzierungsbedingungen (ohne LIF). Die angegebene Signifikanz bezieht sich auf Tag 3 des jeweiligen Materials im Vergleich zur Kontrolle. ** $p \leq 0,01$.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass gPS-Zellen in der Lage sind auf Polymeren zu überleben und zu proliferieren. Setzt man sie allerdings

Differenzierungsbedingungen aus, sinkt die Proliferationsrate -wie üblicherweise unter Differenzierungsbedingungen- rapide ab. Keines der getesteten Polymere bewirkte bei gPS-Zellen hinsichtlich Proliferation ein vergleichbares Verhalten wie gPS-Zellen auf MEF.

4.2.2 Zytotoxischer Effekt der Polymere auf gPS-Zellen

Die Diagramme in Abbildung 4 zeigen die relative Fluoreszenzeinheit der Resorufin-Messung, welche sich auf die Menge an freigesetztem LDH und somit auf die Menge nekrotischer Zellen bezieht.

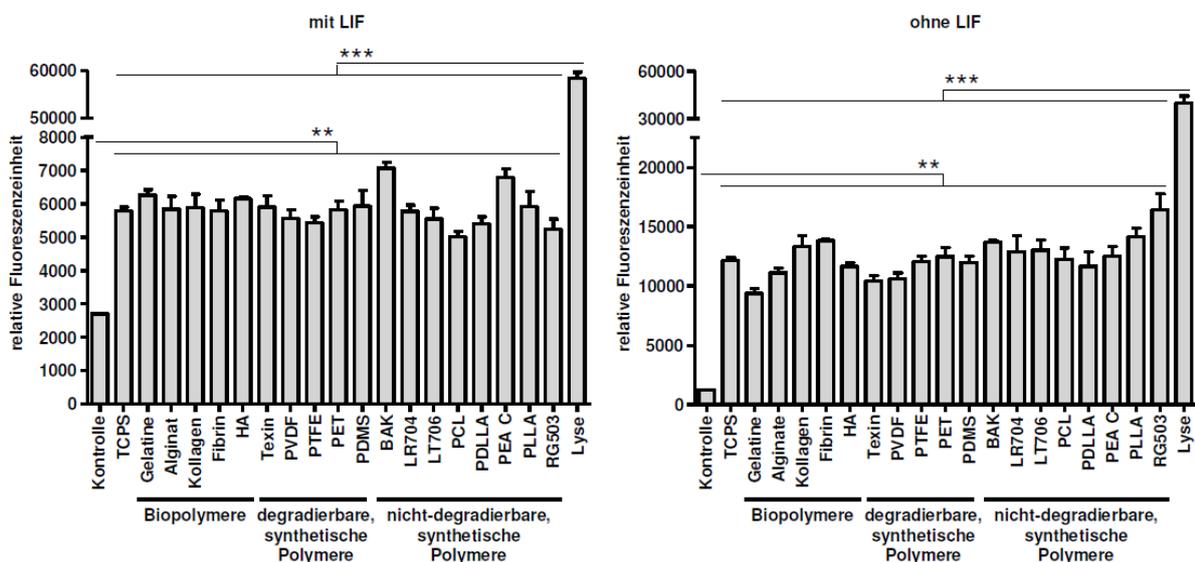


Abbildung 4) Zytotoxizitäts-Test. Die relative Fluoreszenzeinheit bezieht sich auf die Menge freigesetzter LDH zur Quantifizierung nekrotischer gPS-Zellen auf Polymeren im Vergleich zu gPS-Zellen auf MEF als Kontrolle. Links: Wachstumsbedingungen (mit LIF), rechts: Differenzierungsbedingungen (ohne LIF). ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Die Menge an freigesetzter LDH liegt bei allen getesteten Materialien deutlich über der MEF-Kontrolle, jedoch unter der Lyse-Kontrolle. Der Zytotoxizitäts-Test hat ergeben, dass der zytotoxische Effekt der Polymere sich untereinander unabhängig von den Kultivierungsbedingungen nicht signifikant unterscheidet. Unter Expansionsbedingungen wirkte PCL am wenigsten zytotoxisch. Auf BAK und PEA C reagierten die gPS-Zellen unter Expansionsbedingungen mit LIF am stärksten nekrotisch. Auch unter Differenzierungsbedingungen hatte BAK neben RG503, PLLA

und Fibrin einen stark nekrotischen Effekt. Hier zeigten Gelatine, Texin und PVDF die geringsten freigesetzten LDH-Mengen.

Keines der Materialien hatte einen vergleichbar geringen oder annähernd geringen zytotoxischen Einfluss auf gPS-Zellen wie die MEF-Kontrolle.

4.2.3 gPS-Zell-Apoptose auf Polymeren

Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, bei der Annexin V als Marker für frühapoptotische Zellen eingesetzt wurde und 7AAD tote (nekrotische) Zellen markiert. Somit befinden sich im unteren linken Quadranten alle nicht-fluoreszierenden vitalen Zellen. Auf der Y-Achse nach oben reichend sind die Zellen im apoptotischen Zustand zu finden und im oberen rechten Quadranten sind alle bereits toten Zellen markiert (Abb. 5a).

Hier sind die Ergebnisse der Quadranten-Analyse der Kontroll-gPS-Zellen auf MEF dargestellt und exemplarisch ein Material -PDMS- mit hohem Anteil Annexin V- und 7AAD-markierter Zellen und ein Material -LR704- mit vielen lebenden Zellen. Die meisten lebenden gPS-Zellen wurden mit mehr als 93% auf MEF unter Expansionsbedingungen (mit LIF) gemessen.

Mehr als drei Viertel der gPS-Zellen überlebten auf LR704. PDMS zeigte, wie viele andere Materialien auch, einen erhöhten Anteil toter Zellen unter Expansionsbedingungen. Auf Gelatine, TCPS, Alginat, Texin, PET, LT706, PLLA und RG503 wurde dasselbe Phänomen beobachtet (Abb. 5b). Bei Fibrin und PDMS wurden die meisten toten Zellen detektiert. In der *Heat map* fallen LR704 und PVDF mit dem höchsten Anteil lebender Zellen, neben den Kontroll-gPS-Zellen auf MEF, auf.

Insgesamt lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen eine vorläufige Einschätzung über kompatible Polymere für die Kultivierung von gPS-Zellen ableiten. Demnach scheinen Gelatine, PVDF, PTFE und LR704 vielversprechende Oberflächen darzustellen, auf denen viele vitale und wenige tote gPS-Zellen nachzuweisen sind.

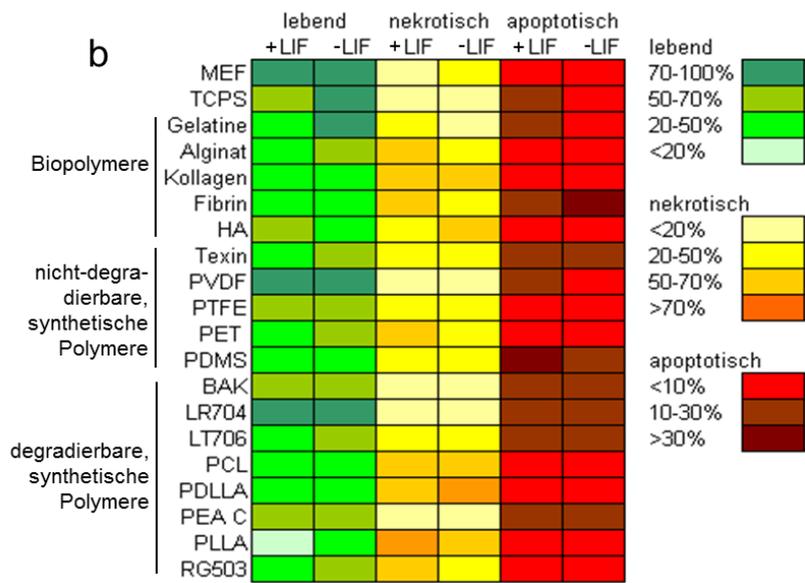
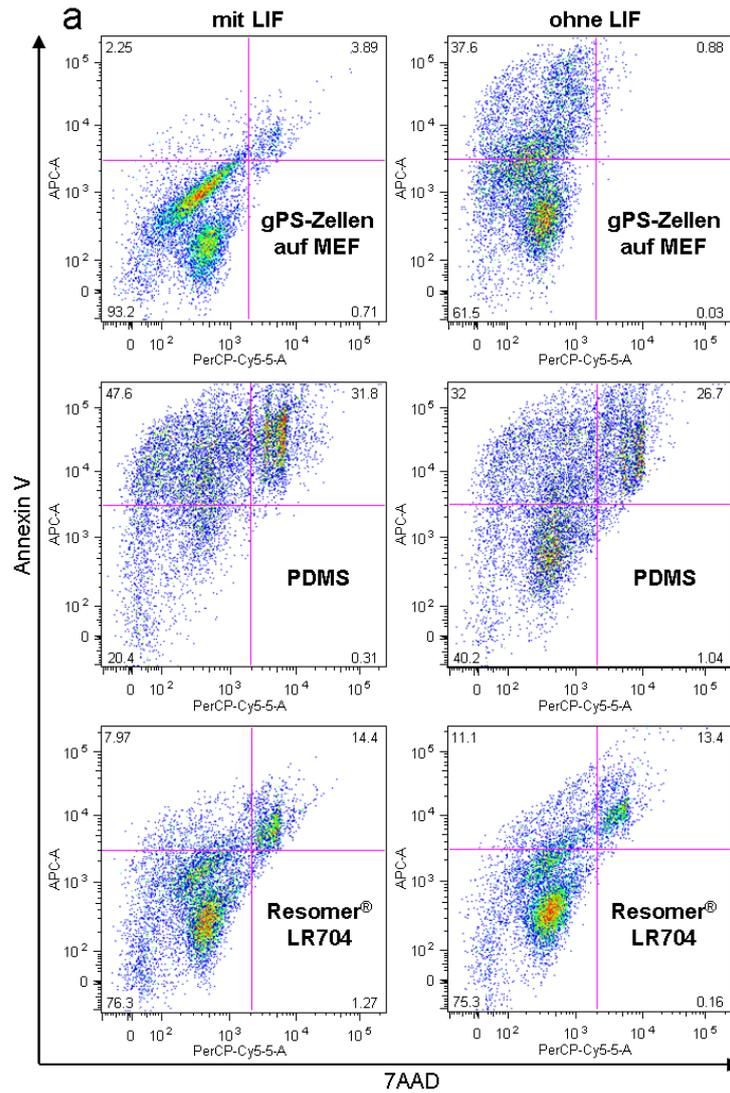


Abbildung 5) Ergebnisse der Durchflusszytometrie. a) Quadranten-Analyse. b) Heat map der Durchflusszytometrie-Ergebnisse; Wachstumsbedingungen (+LIF), Differenzierungsbedingungen (-LIF).

4.3 Expansion von gPS-Zellen auf Polymeren

4.3.1 Morphologie und Pluripotenz passagierter gPS-Zellen

Um festzustellen, ob eines der als kompatibel bewerteten Polymere (LR704, PTFE und PVDF) für die effiziente Expansion von gPS-Zellen geeignet ist und somit eine Alternative zu MEF darstellt, wurden die Zellen auf den Polymeren unter Expansionsbedingungen (mit LIF) kultiviert und passagiert. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen, sowie die fotografische Dokumentation geben einen Eindruck der gPS-Zell-Morphologie (Abb. 6a).

gPS-Zellen auf Gelatine und TCPS bildeten ES-Zell-typische Kolonien, die in Größe und Morphologie den Zellen auf MEF ähneln. Die gPS-Zell-Kolonien auf LR704, PTFE und PVDF waren wesentlich kleiner als die Kontroll-Kolonien auf MEF (Abb. 7a). Die gPS-Zellen stimmen im Größenvergleich und in der Morphologie auf den Bildern des Rasterelektronenmikroskops und den Fotos der Passagedokumentation überein.

Grün fluoreszierende Zellen exprimieren Oct4 und können daher als pluripotent betrachtet werden. Die Zellen in Passage 1 formten auf allen Polymeren ES-Zell-typische Kolonien und fluoreszierten grün (Abb. 6b). Nach mehreren Passagen zeigte auf Gelatine und TCPS nur noch ein Teil der Zellen ES-Zell-typische Morphologie mit Koloniebildung, hellem Rand und dreidimensionaler Erscheinung. Die meisten gPS-Zellen bildeten keine Aggregate, zeigten eine reduzierte grüne Fluoreszenz und fingen an zu differenzieren. Auf PTFE adhärten keine Zellen nach dem Passagieren. Auch auf PVDF war es nicht möglich gPS-Zellen zu expandieren. Mit jeder Passage verringerte sich die Zellzahl. Zellen auf PVDF waren nur leicht adhärent und deren Kolonien nur sehr klein. gPS-Zellen, die bis Passage 9 auf PVDF kultiviert werden konnten, verloren ihre Pluripotenz. gPS-Zellen, die auf Gelatine, TCPS und LR704 kultiviert wurden, proliferierten und zeigten über 9 Passagen positive Oct4-eGFP-Signale. Sie bildeten auf Gelatine und TCPS im Laufe der Kultivierung weniger Kolonien und Einzelzellen waren erkennbar. gPS-Zellen adhärten auf LR704, bildeten Kolonien und behielten ihre grüne Fluoreszenz bei, wodurch die Expression des Pluripotenzmarkers Oct4 und somit deren Pluripotenz visualisiert wurde.

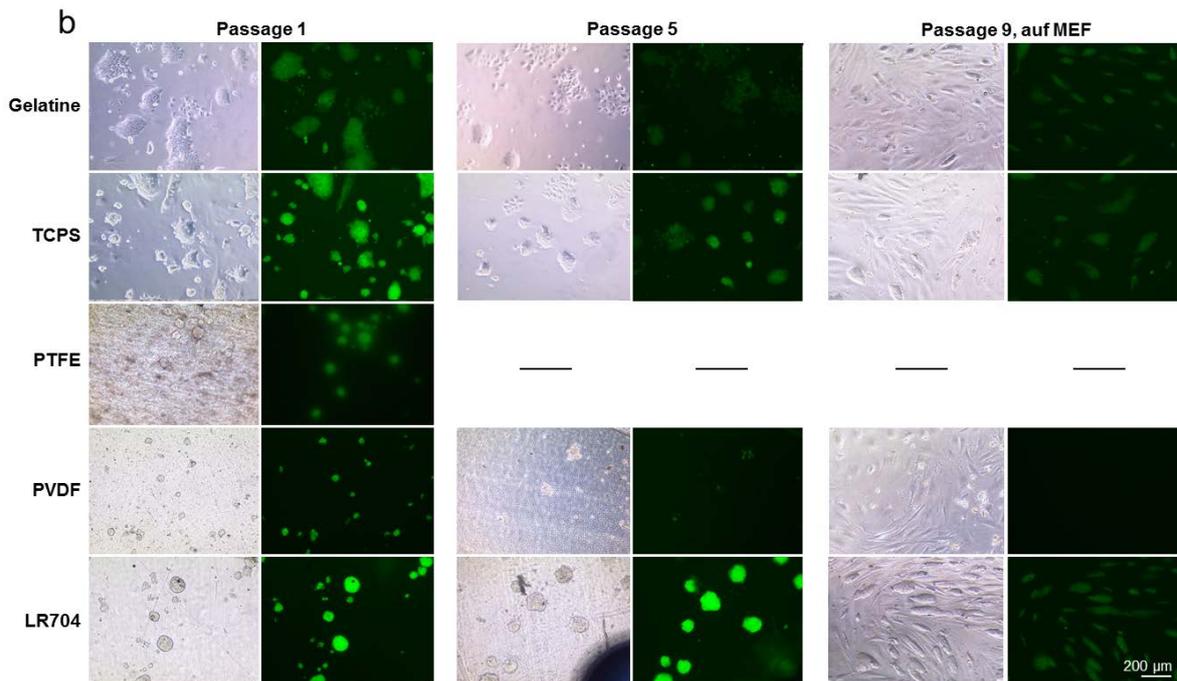
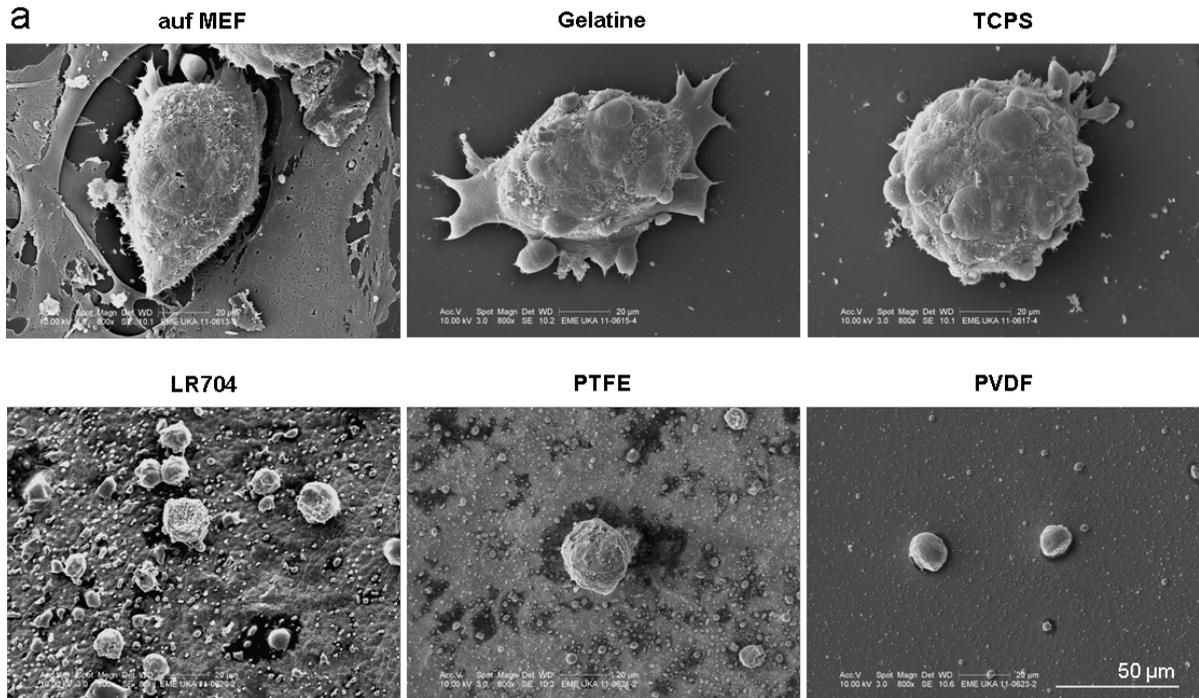


Abbildung 6) Morphologie der gPS-Zellen auf MEF, Gelatine, TCPS, PTFE, PVDF und LR704. a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen in Passage 0 nach 72 h. b) Morphologie und Oct4-Expression der gPS-Zellen nach bis zu 9 Passagen. Nach Passage 8 wurden die Zellen vom Material auf MEF übertragen.

Nach acht Passagen wurden die gPS-Zellen von Polymeren auf MEF übertragen, um festzustellen, ob die morphologischen Eigenschaften, die auf den Materialien abweichen können, auf der gewohnten *Feeder*-Schicht unverändert bleiben. gPS-

Zellen, die zuvor auf Gelatine, TCPS und LR704 kultiviert wurden, nahmen auf MEF ihre typische Formation ein und konnten aufgrund der grünen Fluoreszenz als pluripotent bewertet werden.

4.4 Differenzierung von gPS-Zellen auf Polymeren

4.4.1. Genexpression des Pluripotenzmarkers Oct4

Zur relativen Quantifizierung der Oct4-Expression differenzierter gPS-Zellen, wurde cDNA aus EBs, die auf Gelatine, LR704, PTFE und PVDF kultiviert wurden, in einer *Real Time* PCR eingesetzt ($n \geq 5$). Die Säulendiagramme in Abbildung 7 zeigen das relative Expressionslevel von Oct4 in logarithmischer Skalierung (normiert auf das *Housekeeping*-Gen β -Actin), welches auf die Oct4-Expression undifferenzierter pluripotenter gPS-Zellen als Kontrolle bezogen wurde ($n=3$). Zur statistischen Analyse wurde eine *One-way Analysis of Variance* mit anschließendem *Dunnnett's Multiple Comparison Test* durchgeführt.

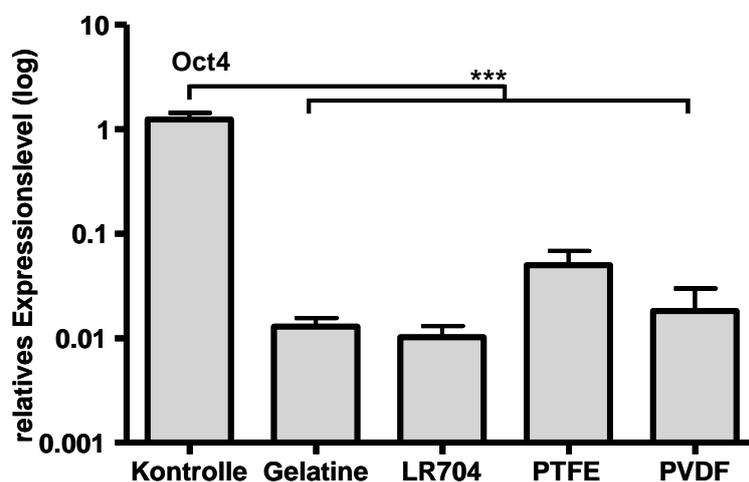


Abbildung 7) Relatives Expressionslevel des Pluripotenzmarkers Oct4 (normiert auf das *Housekeeping*-Gen β -Actin) in differenzierten EBs auf Gelatine, LR704, PTFE und PVDF im Vergleich zu undifferenzierten gPS-Zellen als Kontrolle. *** $p \leq 0,0001$.

Hier ist die signifikante Herabregulierung des Pluripotenzgens Oct4 in gPS-Zellen, die unter Differenzierungsbedingungen (ohne LIF) kultiviert wurden, auf allen getesteten Materialien zu erkennen.

4.4.2 Genexpression von Keimblattmarkern

Abbildung 8 zeigt die relative Genexpression in differenzierten gPS-Zellen von α - und β MHC als mesodermale Marker, von α -Fetoprotein als Marker des endodermalen Keimblatts und Nestin als Ektodermmarker in logarithmischer Auftragung ($n \geq 6$). Die jeweiligen Expressionslevel wurden auf undifferenzierte pluripotente gPS-Zellen als Kontrolle ($n=3$) bezogen, normiert wurde auf das *Housekeeping*-Gen β -Actin. Es wurde eine *One-way Analysis of Variance* mit anschließendem *Dunnett's Multiple Comparison Test* durchgeführt. Aufgrund der teilweise hohen Standardabweichungen vom Mittelwert konnten keine Signifikanzen ermittelt werden.

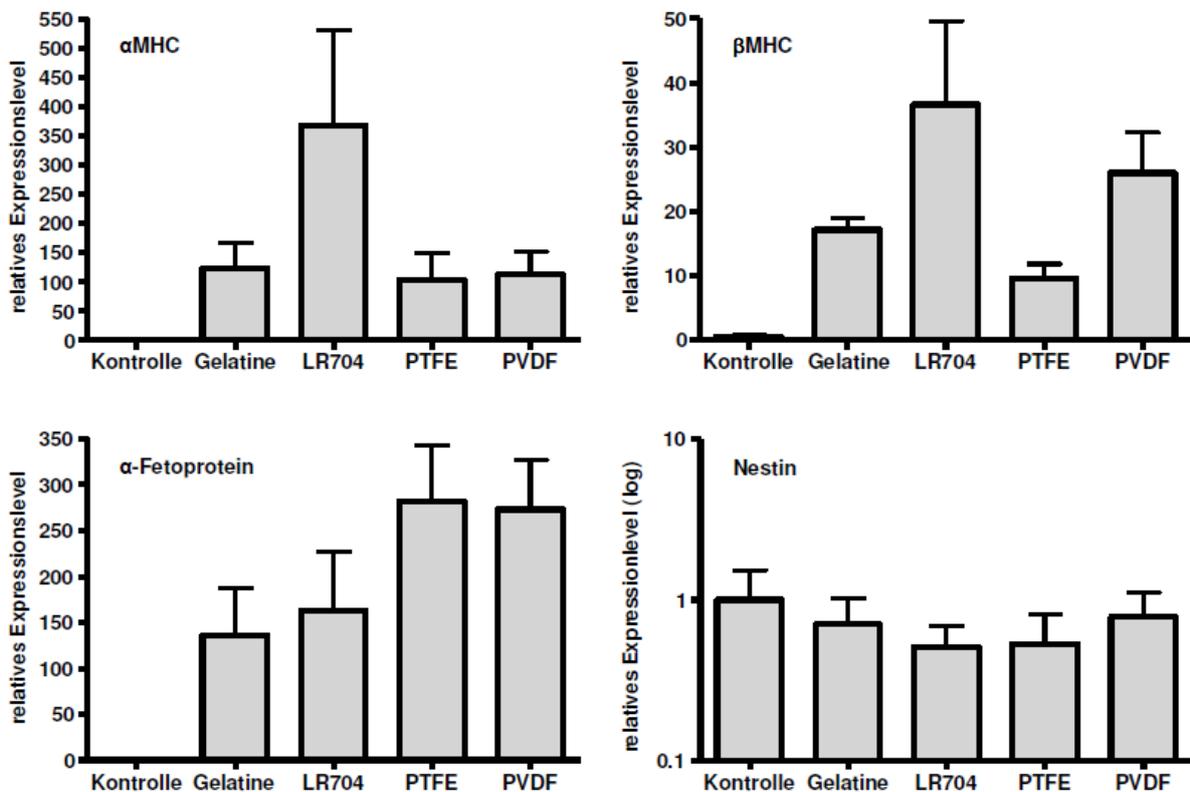


Abbildung 8) Relatives Expressionslevel typischer Keimblattmarker (normiert auf das *Housekeeping*-Gen β -Actin) in differenzierten EBs auf Gelatine, LR704, PTFE und PVDF im Vergleich zu undifferenzierten gPS-Zellen als Kontrolle.

α MHC, β MHC und α -Fetoprotein wurden von differenzierenden gPS-Zellen auf allen Materialien heraufreguliert. EBs auf PVDF und PTFE exprimierten α -Fetoprotein am stärksten. Hingegen regulierten die 14-Tage-alten Zellen auf den Materialien die Nestin-Expression herunter bzw. es ist davon auszugehen, dass kein Nestin

exprimiert wurde, da auf undifferenzierte pluripotente gPS-Zellen normiert wurde und diese ebenfalls kein Nestin exprimieren.

In den Diagrammen zu α MHC und β MHC fällt auf, dass die gPS-Zellen auf LR704 die Expression dieser kardialen Gene besonders stark heraufregulieren. Im Vergleich zu den Zellen auf Gelatine und PVDF wurden diese mesodermalen Marker sogar mehr als doppelt so stark exprimiert. Die Expression endo- und ektodermaler Gene scheint auf LR704 hingegen nicht besonders ausgeprägt zu sein.

4.4.3 Proteinexpression von Keimblattmarkern

Die immunhistochemische Färbung keimblatttypischer Proteine ist in Abbildung 9 dargestellt. EBs, die auf LR704 unter Differenzierungsbedingungen (ohne LIF) kultiviert wurden, wiesen sehr starke Färbungen von Desmin und SMA auf. Auch EBs auf Gelatine exprimierten diese mesodermalen Marker. EBs, die auf PTFE wuchsen, waren in der immunhistochemischen Färbung negativ für Desmin und SMA. Allerdings konnte in EBs auf PTFE auf Proteinebene kein α -Fetoprotein nachgewiesen werden, dessen Genexpression zuvor in der *Real Time* PCR auf PTFE am stärksten im Vergleich zu den anderen Materialien war.

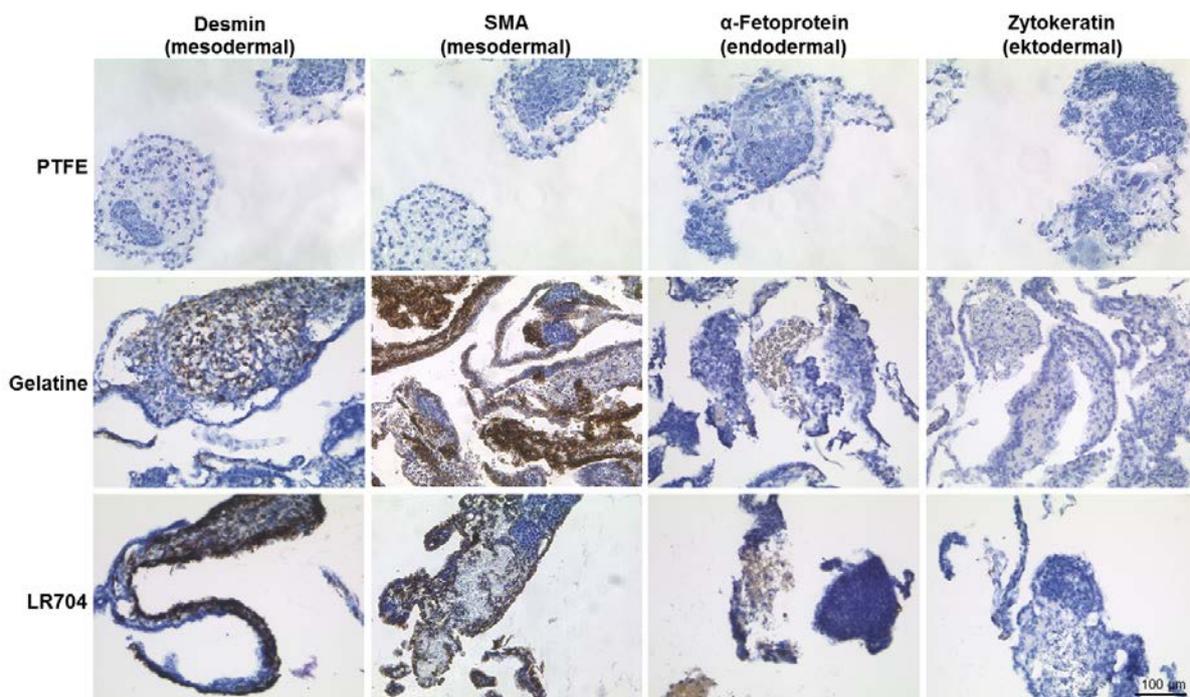


Abbildung 9) Immunhistochemie der Keimblattmarker Desmin, SMA, α -Fetoprotein und Zytokeratin auf PTFE, Gelatine und LR704.

Die Immunhistochemie lieferte für EBs auf LR704 und Gelatine ein positives Ergebnis gegen das endodermal-typische α -Fetoprotein. Eine Differenzierung der EBs in die ektodermale Richtung konnte durch Zytokeratin-Färbung nicht nachgewiesen werden. Somit war das Differenzierungsprofil der EBs auf LR704 und Gelatine anhand immunhistochemischer Färbungen von Keimblattmarkern gleich.

4.5 Kardiomyogene Differenzierung von gPS-Zellen

4.5.1 Dokumentation schlagender Areale

gPS-Zellen, die unter Differenzierungsbedingungen (ohne LIF) auf Gelatine, LR704, PTFE und PVDF kultiviert wurden, wurden täglich auf schlagende Areale untersucht. Die roten Kreise in Abbildung 10a kennzeichnen die schlagenden Areale und geben einen Eindruck über deren Quantität (Menge an Kreisen) und Intensität (Größe der Kreise) an Tag 11. In der Abbildung von PTFE sind keine roten Kreise markiert. EBs, die auf PTFE ausgesät wurden, schlugen nicht, verblieben in ihrem Aggregatverband und adhärten nicht. Abbildung 10a zeigt sehr deutlich die starre EB-Form ohne ausspreitende Zellen im Vergleich zu den EBs, die auf den anderen Materialien ausgesät wurden und sich durch Adhäsion auf der Oberfläche ausbreiteten.

LR704 war das einzige Material, auf dem erstmals nach 8 Tagen Kontraktionen beobachtet werden konnten. Die gPS-Zell-abgeleiteten EBs auf Gelatine fingen 1-2 Tage später als auf LR704 an zu kontrahieren. Vereinzelt schlagende Areale konnten auch auf PVDF nach 11 Tagen entdeckt werden.

Die Graphen in Abbildung 10b zeigen den Anteil schlagender Areale in gPS-Zell-abgeleiteten EBs an dem jeweiligen Tag nach Beginn der Differenzierung. Da diese Quantifizierung nur einmal dokumentiert wurde, konnte hier keine Statistik ermittelt werden. Daher liefert diese exemplarische Darstellung nur einen Eindruck über den prozentualen Anteil schlagender Areale in gPS-Zellen auf Gelatine und LR704. Diese Werte sind reproduzierbar, wurden jedoch nicht mehrmals dokumentiert. So schlugen bereits an Tag 8 über ein Drittel der ausplattierten EBs auf LR704. Auf Gelatine hingegen konnten erst an Tag 9 erste schlagende Areale identifiziert werden. Von allen ausplattierten EBs konnten auf Gelatine an Tag 9 in 16% der EBs Kontraktionen beobachtet werden.

Die Graphen zeigen sehr deutlich, dass gPS-Zellen auf LR704 im Vergleich zu gPS-Zellen auf Gelatine früher und mit einem höheren Anteil kontrahieren.

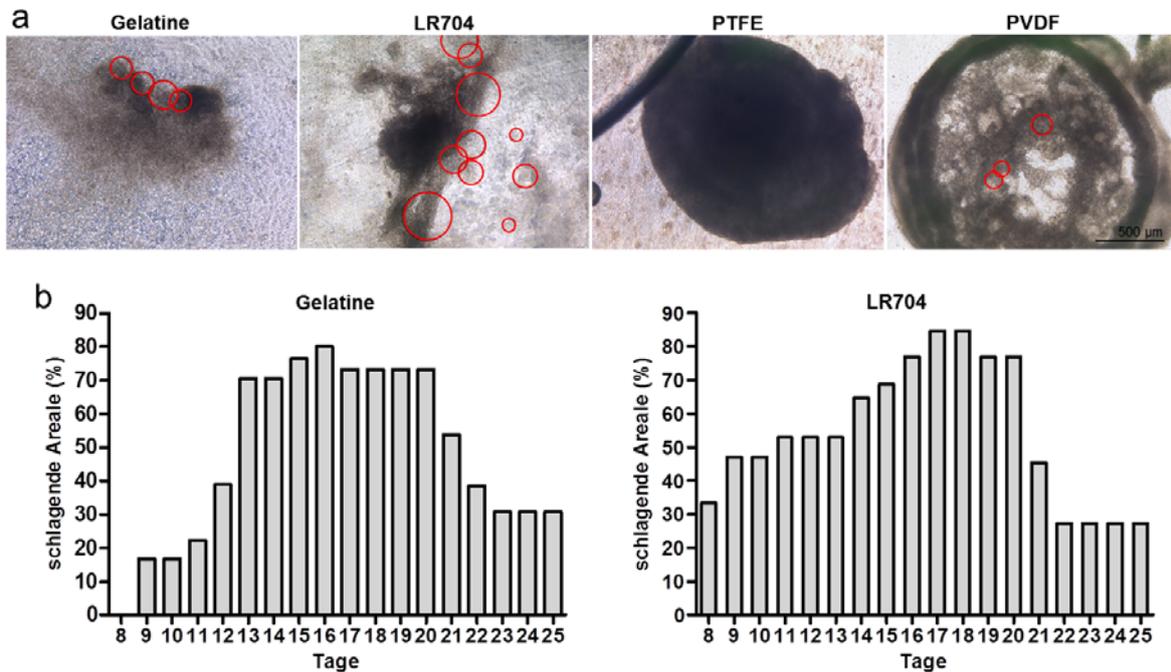


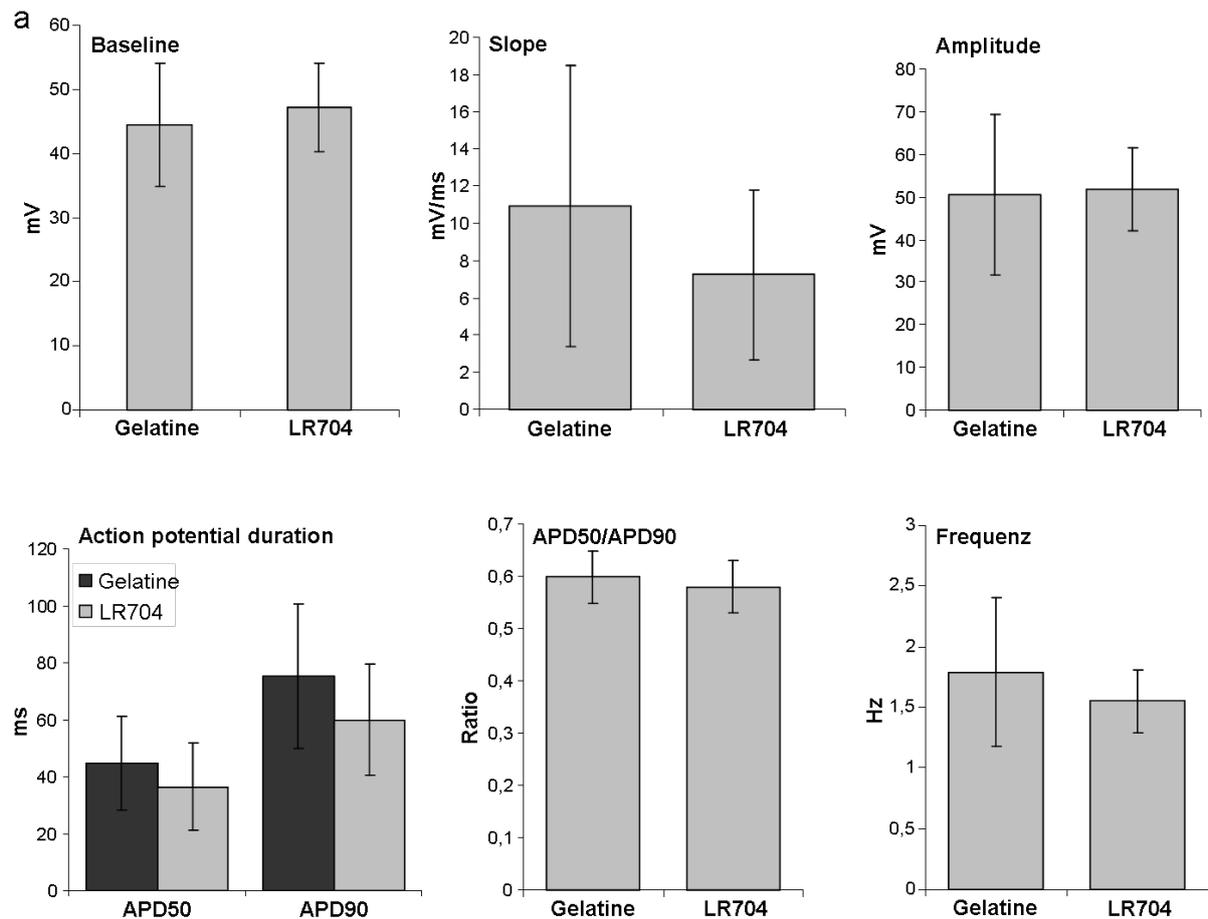
Abbildung 10) Dokumentation schlagender Areale. a) Die roten Kreise zeigen die schlagenden Areale an Tag 11 der Differenzierung. b) Die Graphen zeigen exemplarisch den Anteil schlagender Areale von Tag 8 bis Tag 25.

4.5.2 Elektronenphysiologische Messungen

gPS-Zell-abgeleitete EBs weisen eine spontane Kontraktion sowohl auf LR704 als auch auf Gelatine auf. Um eine Einschätzung über die Qualität und die Quantität der schlagenden Areale der EBs auf LR704 zu erhalten, wurden elektronenphysiologische Messungen durchgeführt. Da die erfolgreiche Differenzierung von ES-Zellen auf Gelatine bekannt ist, werden auch hier gPS-Zellen auf Gelatine als Positivkontrolle gemessen und dienen somit als Vergleichsmaßstab. Hierzu wurde die sogenannte *sharp electrode*-Methode angewandt, die Aussagen über beispielsweise die Schlag-Frequenz, die Amplitude und die Dauer eines Aktionspotenzials innerhalb eines Areals liefert (Abb. 11).

Die *Baseline*, also das ruhende Membranpotenzial, liegt sowohl bei EBs auf Gelatine als auch bei EBs auf LR704 bei etwa -45 mV. *Slope* bezeichnet den Anstieg der Depolarisation. Bei EBs auf Gelatine wurde ein Depolarisations-Anstieg von 10,93 mV/ms gemessen, während die Aktionspotenziale der EBs auf LR704 nur um

7,24 mV/ms in der Depolarisation ansteigen. Doch aufgrund der hohen Standardabweichung der Messungen auf Gelatine, sind die Werte im Mittel nicht signifikant unterschiedlich. Die gemessenen Amplituden der EBs auf LR704 sind im Mittel nur um etwa 1 mV stärker ausgeprägt als bei den EBs auf Gelatine und unterscheiden sich somit kaum.



t-test Gelatine/LR704

	Baseline	Slope	Amplitude	APD50	APD90	Frequency
p value	0,88	0,12	0,41	0,18	0,08	0,17

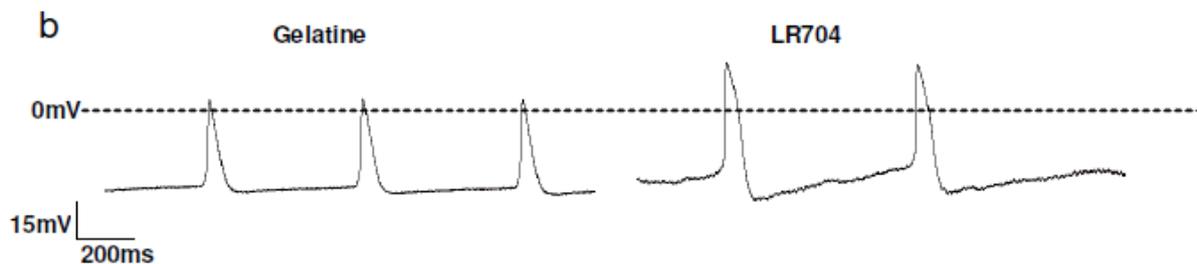


Abbildung 11) Elektronenphysiologische Messungen der schlagenden Areale auf Gelatine (n=12) und LR704 (n=16). a) Quantifizierung und statistische Auswertung der *sharp electrode*-Daten in graphischer Darstellung. b) Graphische Darstellung jeweils eines schlagenden Areals auf Gelatine und LR704.

Die *Action potential duration* bezieht sich auf die Dauer des Aktionspotentials nach 50%iger (APD50) bzw. 90%iger (APD90) Repolarisationsphase. Dieser Wert liegt wie zu erwarten bei 90%iger Repolarisation höher als bei 50%iger Repolarisation und unterscheidet sich nicht signifikant zwischen EBs auf Gelatine und auf LR704.

Zusätzlich ist in Abbildung 11a ein Graph mit dem Verhältnis der APD50 zu APD90 dargestellt. Auch hier ließ sich kein Unterschied im Vergleich feststellen. Die gemessene Schlag-Frequenz der Kontraktionen liegt für EBs auf Gelatine im Mittel bei 1,79 Hz und für EBs auf LR704 bei 1,55 Hz. Damit unterscheiden sich die Schlag-Frequenzen der EBs auf diesen beiden Oberflächen nur sehr gering. Eine Signifikanz wurde nach Student's t-test nicht festgestellt (Abb. 11a).

4.5.3 Proteinexpression kardiomyogener Marker

Mittels Immunohistochemie konnten sarkomer-typische Proteine in den EBs der gPS-Zellen nachgewiesen werden. Da bei der Dokumentation schlagender Areale keine Kontraktionen der EBs auf PTFE beobachtet werden konnten und auch die Ergebnisse der *Real Time* PCR die geringste Expression der mesodermalen Marker α MHC und β MHC auf PTFE anzeigten, kann davon ausgegangen werden, dass bei gPS-Zell-abgeleitete EBs auf PTFE keine Differenzierung in kardiomyogene Richtung vorlag bzw. dass im Vergleich zur Kontrolle auf Gelatine die kardiomyogene Differenzierung signifikant unterdrückt wird. Daher wurden Paraffin-Schnitte der EBs auf PTFE als Kontrolle gewählt, um zu zeigen, dass EBs ohne schlagende Areale negativ für die kardiomyogenen Proteine Connexin 43 und sarkomeres α -Aktinin sind (Abb. 12).

Die Färbungen lassen weiterhin keine maßgeblichen Unterschiede zwischen EBs, die auf Gelatine oder auf LR704 kultiviert wurden, erkennen. Die Bilder zeigen eine vergleichbar gute Differenzierung der gPS-Zellen auf Gelatine und LR704 in die kardiomyogene Richtung mittels Connexin 43- und Sarkomeres α -Aktinin-Nachweis auf Proteinebene (Abb. 12).

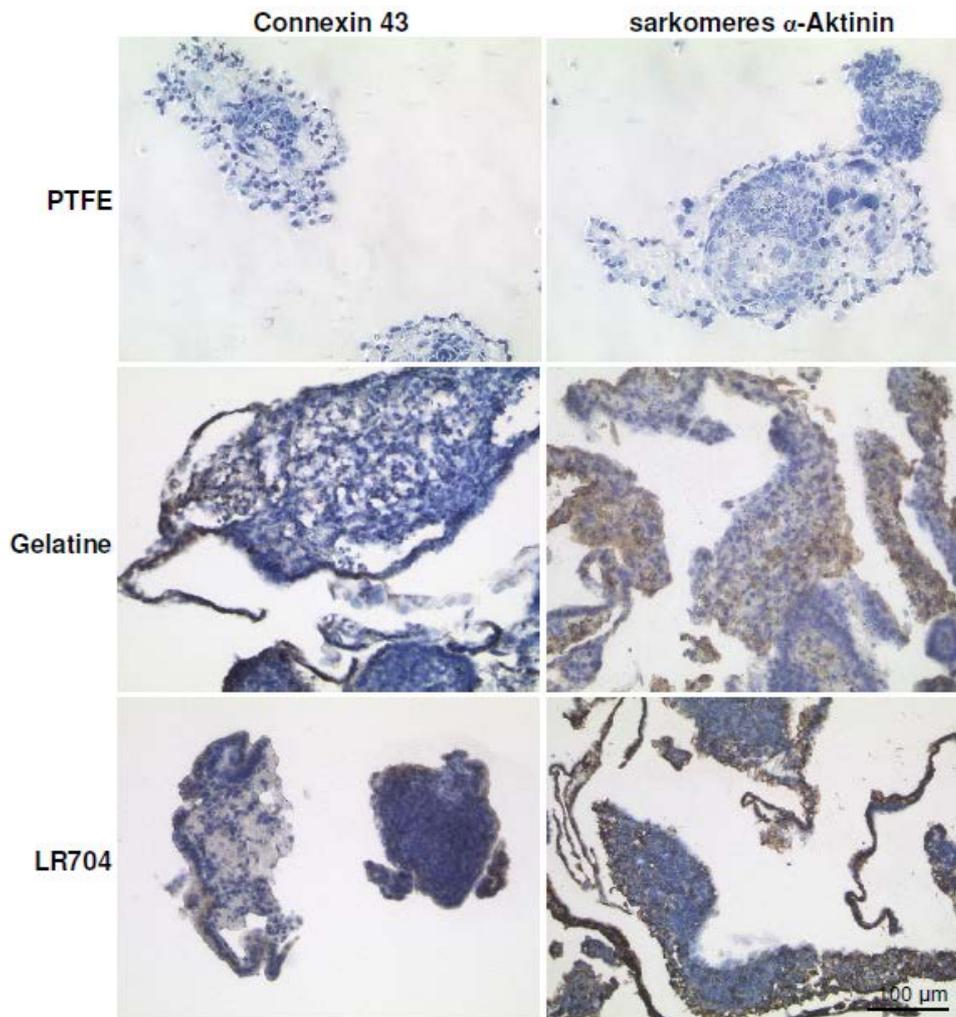


Abbildung 12) Immunohistochemie Connexin 43 und sarkomeres α -Aktinin, exprimiert in gPS-Zellen auf PTFE (als Negativ-Kontrolle), Gelatine (als Positiv-Kontrolle) und LR704.

4.5.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Abbildung 13 zeigt Aufnahmen aus der Transmissionselektronenmikroskopie. Durch TEM lassen sich Strukturen innerhalb der Zelle und an Zell-Zell-Kontakten darstellen. Die untersuchten gPS-Zellen wurden 14 Tage unter Differenzierungsbedingungen kultiviert. In den Präparaten konnten Desmosomen, viele freie Ribosomen und Intermediärfilamente gefunden werden.

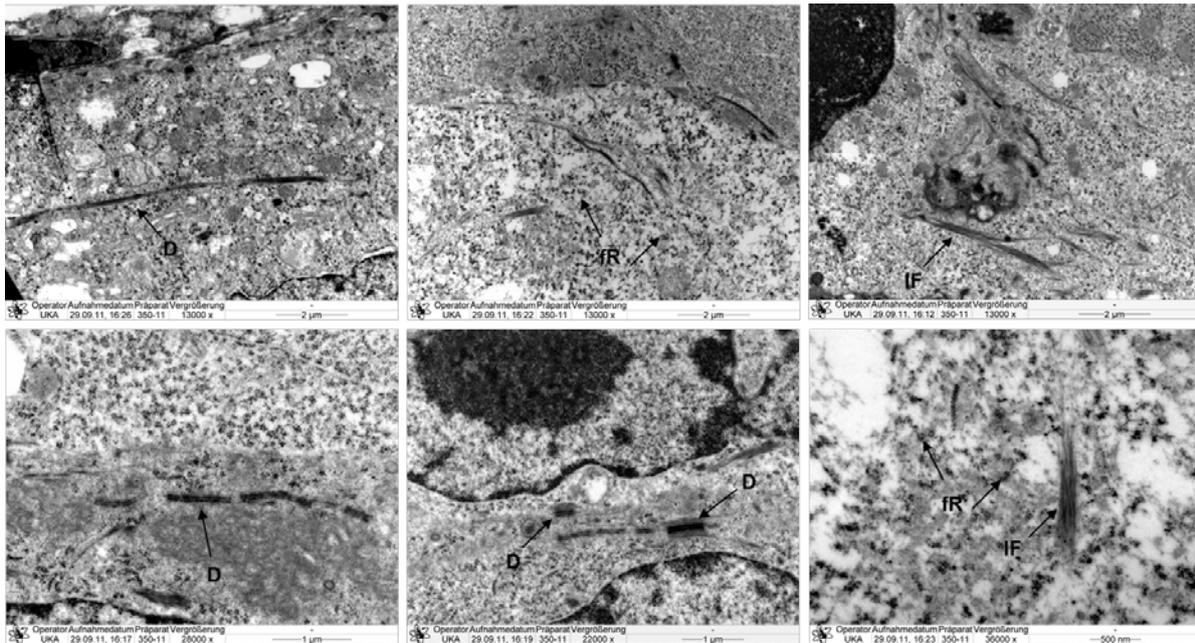


Abbildung 13) Transmissionselektronische Aufnahmen zeigen Strukturen von Desmosomen (D), freien Ribosomen (fR) und Intermediärfilamenten (IF).

4.6 Microarray Assay von gPS-Zellen

In einem *Microarray Assay* werden tausende von Genen untersucht. So können in der vorliegenden Arbeit die Genexpressionsprofile von gPS-Zell-abgeleiteten EBs auf LR704 (n=3) bzw. Gelatine (n=3) mit undifferenzierten gPS-Zellen verglichen werden.

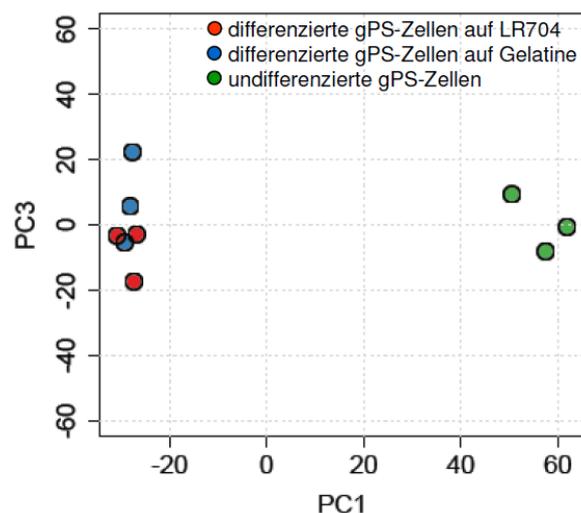


Abbildung 14) *Principal component*-Analyse (PCA) vereint die Ergebnisse des *Microarray*-Assays von undifferenzierten gPS-Zellen (undiff) und gPS-Zellen, die auf LR704 und Gelatine unter Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden.

Abbildung 14 zeigt die PCA der Daten des *Microarray Assays*. Man kann man deutlich erkennen, dass sich basierend auf ihrem Genexpressionsprofil die gPS-Zell-EBs auf LR704 mit den gPS-Zell-EBs auf Gelatine im dreidimensionalen Raum an ähnlicher Stelle lokalisieren und sich deutlich von den undifferenzierten pluripotenten gPS-Zellen unterscheiden. Anhand dieser Abbildung kann man das Genexpressionsprofil der differenzierten gPS-Zellen in einen Kontext setzen, nämlich dass eine erfolgreiche Differenzierung stattgefunden hat.

Abbildung 15 zeigt die *Heat map* eines *Gen-Subsets*, bei dem sowohl Pluripotenzgene als auch Gene, die in Kardiomyozyten exprimiert werden, ausgewählt wurden. Auf den ersten Blick wird besonders im Stammbaum deutlich, dass sich die differenzierten gPS-Zellen auf Gelatine und LR704 von den undifferenzierten pluripotenten gPS-Zellen unterscheiden. Pluripotenzgene, wie Oct4 (hier als Pou5f1 dargestellt), Sox2, UTF1 und Nanog wurden in gPS-Zellen auf Gelatine und LR704 herabreguliert, während die Mehrzahl der typisch kardiomyogenen Gene, wie beispielsweise Troponin I (Tnni3) und kardiales α -Aktinin (Actc1), heraufreguliert wurden.

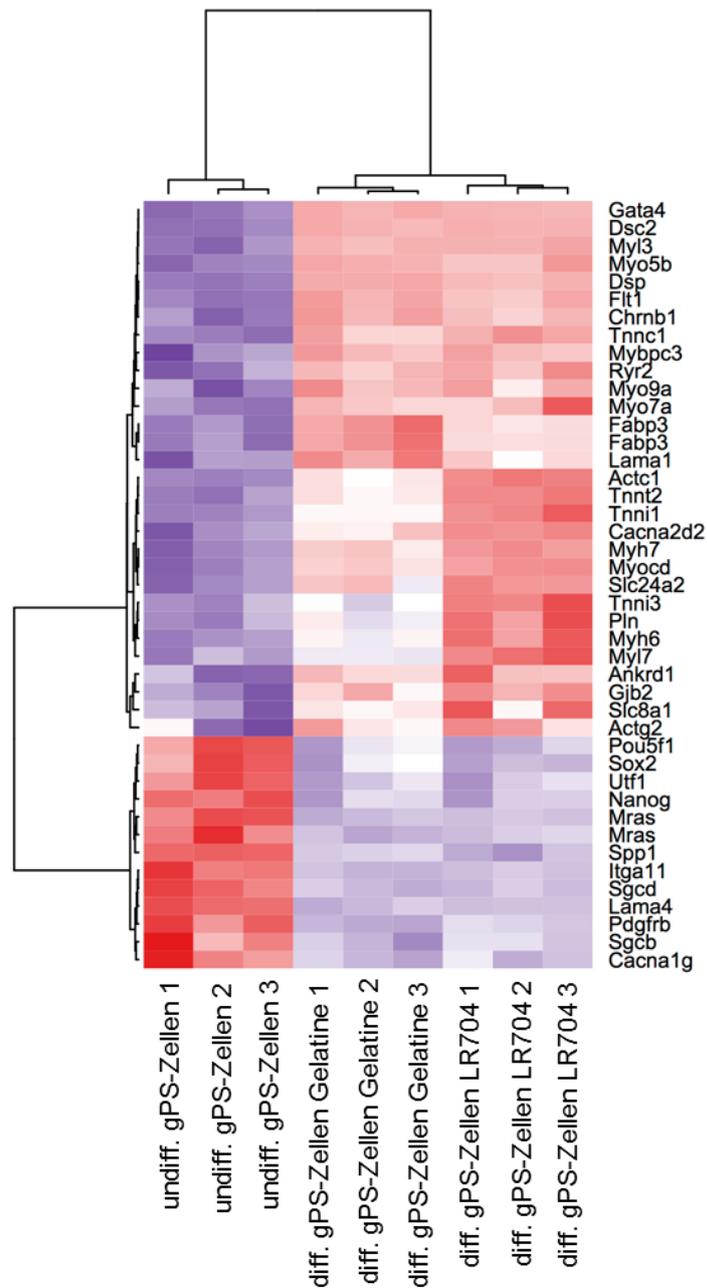


Abbildung 15) *Heat map*. Hier sind entsprechend der Farbkodierung die relativen Expressionslevel der aufgelisteten Gene in undifferenzierten gPS-Zellen (undiff.), differenzierten gPS-Zellen auf Gelatine und differenzierten gPS-Zellen auf LR704 (diff.) gezeigt.

5 Diskussion

5.1 Pluripotenz von gPS-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Differenzierungsstatus der gPS-Zellen verifiziert, um garantiert undifferenzierte pluripotente Zellen für die folgenden Experimente einsetzen zu können. gPS-Zellen sind pluripotent und verfügen über typische ES-Zell-Charakteristika. Dies konnte durch AP-Färbung, SSEA1-Expression, Chimera-Assay, *in vitro*-Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter und Teratomabildung *in vivo* von Ko *et al.* [34] nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen zeigen darüber hinaus positive Signale für Nanog und Sox2 (Abb. 2b+c). Diese Transkriptionsfaktoren sind in der Literatur als typische Pluripotenzgene beschrieben [15-17]. Dieselben Marker wurden ebenfalls zum Pluripotenznachweis bei der Generierung entsprechender Zellen aus humanen Spermatogonien nachgewiesen [33, 35]. Die verwendeten gPS-Zellen exprimierten außerdem Oct4, was durch GFP-Fluoreszenz visualisiert werden konnte (Abb. 2a). Bei der Generierung der gPS-Zellen wurde GFP an das Oct4-Gen gekoppelt [34]. Oct4 wurde als Mastergen für Pluripotenz beschrieben und gilt als wichtiger Transkriptionsfaktor [18, 19]. Die Potenz von Oct4 hinsichtlich der Vermittlung von Pluripotenz zeigt sich auch darin, dass einzig dieser Faktor ausreicht, um somatische Zellen zu reprogrammieren [70]. Dass entsprechende Zellen Oct4 und Nanog exprimieren, wurde ebenfalls in einer Studie von Guan *et al.* nachgewiesen [32]. gPS-Zellen bilden ES-Zell-ähnliche Kolonien während sie auf einer MEF-Feeder-Schicht wachsen (Abb. 2a) und formen sogenannte *embryoid bodies* (EB) *in vitro*. Sie sind somit morphologisch nicht von murinen ES-Zellen unterscheidbar. Genexpressionsprofile demonstrieren darüber hinaus die nahe Verwandtschaft zwischen gPS-Zellen und ES-Zellen [34].

Somit konnte die Pluripotenz der gPS-Zellen anhand ihrer Morphologie, durch Oct4-Visualisierung und durch Nachweis von Nanog und Sox2 auf Proteinebene gezeigt bzw., neben den Nachweisen von Ko *et al.* [34], verifiziert werden.

5.2 Identifikation kompatibler Polymer/gPS-Zell-Kombinationen

Um geeignete Polymere für die Expansion und Differenzierung von gPS-Zellen zu identifizieren, wurden Vitalitäts-Assays, Zytotoxizitäts-Tests und Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Vitalität und Proliferation der gPS-Zellen variierte auf den Polymeren, trotz identischer initialer Zellzahl, sehr stark (Abb. 3). Sogar auf den Oberflächen derselben Materialgruppe wurde stark unterschiedliches Zellverhalten beobachtet. Die gleichen Beobachtungen wurden bereits in Proliferations-Studien mit Stammzellen auf den gleichen Materialien derselben Biomaterialbank von Neuss *et al.* [55] beschrieben. In dieser Studie wurden sieben Stammzelltypen auf 19 Materialien getestet. Auch Ittichaisri *et al.* [71] beobachteten unterschiedliches Wachstumsverhalten von Osteoblasten auf verschiedenen Biomaterialien. In den vergangenen Jahren beschäftigten sich viele Forschergruppen mit dem Wachstum, der Adhärenz, Vitalität und/oder Morphologie von Zellen auf unterschiedlichen Biomaterialien und stellten fest, dass der gleiche Zelltyp auf den Materialien ein unterschiedliches Erscheinungsbild aufweisen kann [71-73]. Einige Materialien fördern Proliferation und Wachstum von Zellen, andere haben eine inhibitorische Wirkung [55]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen dieses Phänomen. So proliferierten gPS-Zellen beispielsweise auf LR704 sehr gut, während BAK eine inhibitorische Wirkung zu haben scheint (Abb. 3+5). Publikationen von Ittichaisri *et al.* [71] und Neuss *et al.* [55], sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen die These, dass derselbe Zelltyp auf unterschiedlichen Materialien nicht vergleichbar agiert. Darüber hinaus zeigen die vorliegenden Ergebnisse erstmals die Unterscheidung zwischen Expansions- und Differenzierungsbedingungen für Stammzellen auf Biomaterialien. Das bedeutet, dass sich nicht nur das Material auf das Verhalten einer Zelle auswirkt, auch die Kultivierungsbedingungen haben in Kombination mit demselben Material einen entscheidenden Einfluss. Beispielsweise liegt der Wert der relativen Fluoreszenzeinheit auf LR704 für die Vitalität der gPS-Zellen unter Wachstumsbedingungen bei etwa 46000 nach drei Tagen, während sie unter Differenzierungsbedingungen nach drei Tagen bei etwa 19450 liegt.

Aufgrund der geringsten Proliferationsrate und dem höchsten zytotoxischen Einfluss, fallen die Polyesteramide BAK und PEA C als ungeeignetste Materialien für die Kultivierung für gPS-Zellen auf (Abb. 3+4). Neuss *et al.* raten ebenfalls aufgrund schlechter Adhäsion und hoher Apoptose- und Nekrosesignalen von der Kombination muriner Stammzellen mit BAK und PEA C ab [55]. Fibrin galt bislang als ein

zytotoxisches Material, auf dem sowohl adulte als auch embryonale Stammzellen problemlos kultiviert werden konnten [55, 74]. In der vorliegenden Arbeit fällt dieses Biopolymer bei den Untersuchungen der Vitalität, Proliferation, Apoptose und Zytotoxizität weder als außergewöhnlich zytotoxisch, noch besonders zytotoxisch im Hinblick auf die Kultivierung von gPS-Zellen auf.

Auf LR704, PTFE und PVDF wurden relativ geringe Zytotoxizitäts- und Apoptoseraten gemessen und die Proliferation der gPS-Zellen war verhältnismäßig hoch. In einer PCA aus Daten dieser Parameter gruppieren sich LR704, PTFE und PVDF zusammen [55]. Zwar kann man annehmen, dass die sehr ähnliche chemische Struktur von PTFE und PVDF eine Erklärung hierfür sein könnte, jedoch sprechen die meisten Erkenntnisse über ähnliche chemische Zusammensetzungen und das Verhalten von Zellen dagegen. Demnach sollten PLLA und PDLLA ähnliche Ergebnisse wie LR704 liefern, denn LR704 ist ein zusammengesetztes Kopolymer aus diesen beiden Laktiden. Abbildung 5b zeigt jedoch deutlich unterschiedliche Profile dieser drei Polymere. Auch die Ergebnisse von Neuss *et al.* [55] belegen unterschiedliches Verhalten desselben Zelltyps auf chemisch verwandten Materialien. Unabhängig von der chemischen Zusammensetzung, Molekularstruktur und anderen Parametern wie z.B. Topografie, liefern die durchgeführten Tests ausreichende Aussagen bezüglich des gPS-Zellverhaltens auf den Materialien.

Nach umfassender Analyse aller Ergebnisse bezüglich der Vitalität, Proliferation und Apoptose der gPS-Zellen auf Materialien und der Zytotoxizität der Materialien, wurden LR704, PTFE und PVDF als geeignete Polymere für weitere Untersuchungen in Kombination mit gPS-Zellen befunden.

5.3 Expansion von gPS-Zellen auf Polymeren

Die Expansion undifferenzierter ES-Zellen erfordert zur Aufrechterhaltung des Selbsterneuerungspotenzials und der Pluripotenz eine MEF-Feeder-Schicht. Das sind mitotisch inaktive murine embryonale Fibroblasten, die durch Sezernierung verschiedener Signalstoffe die Differenzierung der Zellen verhindern [12]. Für den Bereich des *Tissue Engineering* wäre ein klinischer Einsatz humaner ES-Zellen in diesem Fall nicht gestattet, da nach internationalen Richtlinien jeglicher Kontakt mit tierischem Material verhindert werden muss. Durch das Ausmaß an Möglichkeiten, das humane ES-Zellen in therapeutischen Applikationen bieten, erhält daher die

Notwendigkeit von ES-Zellen, die frei von insbesondere murinen *Feeder*-Zellen expandiert werden können, einen hohen Stellenwert. Daher ist die Erschaffung eines *Feeder*- und auch Serum-freien Milieus zur Versorgung von humanen ES-Zellen von größtem Interesse hinsichtlich eines Zelltherapie-Ansatzes. Hinzu kommt die wesentlich vereinfachte Kultivierung, die außerdem für tierische ES-Zellen Zeit- und Aufwandsparnis bedeuten würde.

Auf PTFE und PVDF konnte kein Zellwachstum nachgewiesen werden, sodass sich diese Materialien zur Expansion von gPS-Zellen nicht eignen. Außerdem verloren die gPS-Zellen ihre Pluripotenz (Abb. 6). PVDF wurde bereits als vergleichbar schlecht geeignetes Substrat zur Kultivierung von Leberzellen angegeben [51]. Auch bei der Kultivierung von neuronalen Stammzellen aus Ratten schneidet PVDF schlechter ab als beispielsweise Chitosan [75]. Die Kombination von embryonalen Stammzellen mit PVDF ist in der Literatur noch nicht beschrieben, sodass es sich bei den hier vorliegenden Ergebnissen um die erstmalige Beschreibung dieser Art handelt. PTFE, auch als Teflon bekannt, gilt als sehr hydrophobes und reaktionsträges Material, wodurch die Adhäsion und Proliferation der Zellen erschwert bzw. verhindert wird [76]. Dieses Phänomen wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt, die somit von der Kultivierung von gPS-Zellen auf PTFE und auch PVDF abraten.

Bei gPS-Zellen, die auf Gelatine und TCPS kultiviert wurden, wurde eine Abweichung der typischen ES-Zell-Morphologie festgestellt (Abb. 6). Solche Kolonien mit erkennbaren Einzelzellen sind ein Indikator für ein Verlassen des pluripotenten Zustands. Dennoch nahmen die Zellen nach Rekultivierung auf MEF ihre typische Formation ein und fluoreszierten grün. Zellen, die differenzieren, stellen ihre Proliferation ein. Dies wurde bereits im Vitalitäts-Assay (Abb. 3) deutlich. Daher scheint der Anteil differenzierter Zellen in Passage 9 eliminiert. Dennoch sollte die vollständige Pluripotenz längerfristig z.B. mittels der Erstellung eines Genexpressionsprofils überprüft und somit garantiert werden. Obwohl man in der Literatur Protokolle zur Kultivierung von ES-Zellen auf Gelatine findet [77], wurde in allen bisher veröffentlichten Artikeln zu gPS-Zellen die Kultivierung auf MEF bevorzugt, um deren Kapazität zur andauernden undifferenzierten Proliferation aufrecht zu erhalten [32-35, 40].

Aufgrund der Koloniebildung, der Aufrechterhaltung der Oct4-eGFP-Fluoreszenz über mehrere Passagen und der typischen ES-Zell-Morphologie nach dem Re-Transfer der Zellen auf MEF (Abb. 6), scheint LR704 eine Alternative für *Feeder*-freie

Kultivierung von gPS-Zellen darzustellen. Hier muss allerdings bemerkt werden, dass die Proliferationsquantität, wie auch schon Abb. 3 zeigt, nicht an das Maß von proliferierenden gPS-Zellen auf MEF gelangt. Über LR704 wurde in Zusammenhang mit der Zellkultivierung noch nicht in der Literatur berichtet. Dass aber zumindest die Bestandteile dieses Kopolymers, nämlich Poly-L-laktid (PLLA) und Poly-D,L-laktid (PDLLA), zytokompatibel sind, zeigt die Kultivierung von proliferierenden Leberzellen bzw. von mesenchymalen Stammzellen auf diesen Materialien [78, 79].

5.4 Differenzierung von gPS-Zellen auf Polymeren

gPS-Zellen sind per Definition (*germline-derived pluripotent stem cells*) in der Lage in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Die Entwicklung zu neuronalen Zellen und Kardiomyozyten ist anhand zellspezifischer Proteinfärbungen und elektronenphysiologischen Messungen belegt. Auch die Expression abstammungsspezifischer Transkriptionsfaktoren in mehreren Tagen alten EBs ist nachgewiesen [32-35]. In Abbildung 7 ist die signifikante Herabregulierung des Pluripotenzgens Oct4 in gPS-Zell-abgeleiteten EBs auf allen getesteten Materialien zu erkennen. Dementsprechend lässt diese Abbildung auf die fortgeschrittene Differenzierung von gPS-Zellen und somit deren verringertes Differenzierungspotenzial schließen. Die Abnahme von Oct4 während der Differenzierung wurde anhand des Expressionslevels ebenfalls von Kossack *et al.* dokumentiert [35].

Die ausgebliebene Nestin-Expression als Ektodermalmarker in gPS-Zell-abgeleiteten EBs deckt sich mit der geringen Färbung von Zytokeratin, ebenfalls ein Ektodermalmarker (Abb. 8+9). Dennoch sind diese Ergebnisse unerwartet, da Ko *et al.* die Entwicklung zu neuronalen Zellen zeigen konnten und Guan *et al.* speziell Nestin in EBs nachgewiesen haben [32, 34]. Möglicherweise bewirken die Materialien einen Selektionsdruck in Richtung Meso- und Endoderm. Der Anstieg endodermaler Marker während der Differenzierung und auch die Entwicklung in Zellen endodermalen Ursprungs wurde in der Literatur beschrieben [32-35]. Die besonders ausgeprägte α -Fetoprotein-Expression auf PTFE und PVDF im Gegensatz zu Gelatine und LR704 lässt sich soweit nicht erklären. Wobei die Kultivierung von Leberzellen auf PVDF im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt wurde [51]. Auch die Besiedlung von Endothelzellen auf PTFE ist aus der Literatur bekannt [76]. Hier könnte geprüft werden, ob noch weitere Endodermalmarker, wie beispielsweise

hepatocyte nuclear factor 1 β (HNF-1β), der eine zentrale Rolle bei der Nieren- und Leberentwicklung spielt, und Sox17, ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Endodermalentwicklung, heraufreguliert werden und endodermale Besonderheiten in den EBs auf diesen Fluorkunststoffen auftreten. Auf die ausgeprägte Expression der mesodermalen Marker wird im nächsten Kapitel eingegangen.

5.5 Kardiomyogene Differenzierung auf LR704

Die Differenzierung von ES-Zellen in Kardiomyozyten wurde seit dem ersten Bericht über Kardiogenese aus murinen ES-Zellen durch EB-Formation, der 1985 veröffentlicht wurde, ausführlich studiert [80]. Dass ES-Zellen das Potenzial besitzen in Kardiomyozyten zu differenzieren ist vielfach beschrieben [41, 64, 65, 67, 69, 81]. Die jahrelange Forschung offenbart die Schwierigkeiten, die mit der gezielten Generierung von Kardiomyozyten verbunden sind. Auch nach über 15 Jahren gewährleisten die heutigen durchaus innovativen Methoden keine Homogenität und die Zellpopulationen sind gemischt mit Derivaten aller drei Keimblätter. Während die Qualität ES-Zell-abgeleiteter Kardiomyozyten bemerkenswert gut erscheint, sind Reinheit und Quantität limitierende Faktoren bezüglich des therapeutischen Potenzials [41]. Dies zeigt die damit verbundenen Herausforderungen und macht den Bedarf in diesem Forschungsgebiet deutlich.

Die Generierung funktionaler Kardiomyozyten aus gPS-Zellen [34] bzw. multipotenten adulten Keimbahn-Stammzellen (maGSCs) aus Mäusehoden [39] wurde bereits publiziert. Auch hier wurden kardiale Proteine gefärbt und elektronenphysiologische Messungen durchgeführt (vergl. Abb. 9+11).

Das Differenzierungsschicksal von ES-Zellen wird durch die Größe der EBs beeinflusst. Mehrere Publikationen haben die Differenzierung von ES-Zellen in Abhängigkeit von kontrollierten EB-Größen untersucht [82-84]. Um die Beeinflussung der Differenzierung der gPS-Zellen auf Polymeren aufgrund der EB-Größe und aufgrund von EB-Interaktion auszuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit nur ein EB mit jeweils vergleichbarer Größe pro 24er Kavität ausgesät. Mohr *et al.* wiesen die Abhängigkeit der EB-Größe auf die kardiomyogene Differenzierung von humanen ES-Zellen anhand der Quantifizierung kontrahierender EBs und der Expression kardialer Gene nach [84]. Hwang *et al.* berichten von der höchsten Frequenz schlagender Areale und der Expression typisch kardialer Gene in EBs,

deren Durchmesser 450 μm betrug [82]. Laut Hwang *et al.* begünstigen größere EBs die kardiale Differenzierung, während aus kleineren EBs endotheliale Zellen hervorgehen [82]. Demnach wurde in der vorliegenden Arbeit die optimale EB-Größe für kardiomyogene Differenzierung (350-450 μm Durchmesser) gewählt. In der vorliegenden Arbeit wurden die EBs in Suspensionskultur generiert. Um homogenere Größen zu gewährleisten, empfiehlt sich die Verwendung von speziellen *Microwells*, die auch Mohr, Hwang und Karp in ihren Studien verwendet haben [82-84], oder die etwas aufwendigere *hanging drop*-Methode, bei der sich die EB-Größe durch die Zellanzahl pro Tropfen kontrollieren lässt [64, 85]. In der vorliegenden Arbeit wurden pro Versuchsansatz nur einige EBs benötigt. Somit reichte die Anzahl der 350-450 μm -großen EBs in einer (heterogenen) Suspensionskultur aus. Die Vorbereitung einer homogenen Kultur war daher hier nicht zwingend erforderlich.

Es kann davon ausgegangen werden, dass gPS-Zellen auf Polymeren, die unter Differenzierungsbedingungen kultiviert werden, nicht mehr proliferieren (Abb. 3). Dies wurde bereits an ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten während ihrer *in vitro*-Entwicklung gezeigt. Je fortgeschrittener die Kardiomyogenese, desto weniger DNA-Synthese wurde in den entsprechenden Zellen betrieben. Diese Zellen verlassen den Zellzyklus [69].

PTFE scheint nicht nur ein ungeeignetes Material für die *Feeder*-freie Expansion von gPS-Zellen zu sein, es scheint außerdem die kardiomyogene Differenzierung zu inhibieren. Im Gegensatz zu den anderen Materialien konnten auf PTFE keine schlagenden Areale beobachtet werden (Abb. 10). Das Verharren in der EB-Konformation ohne Ausbreiten von Zellen wie auf LR704 oder Gelatine könnte ein Grund dafür sein. EBs in Suspension verbleiben ebenfalls in Aggregaten, adhären nicht und zeigen keine Kontraktion. Des Weiteren zeigte das Genexpressionsprofil der EBs auf PTFE geringe Expression von αMHC und βMHC (Abb. 8). Diese Proteine sind für die Strukturgebung essenziell und somit an der Funktionalität der Kardiomyozyten beteiligt. Dementsprechend scheint LR704 ein probates Polymer hinsichtlich der Induzierung der kardiomyogenen Differenzierung zu sein. Die Expression dieser wichtigen kardialen Gene αMHC und βMHC ist in differenzierten gPS-Zellen auf LR704 besonders auffällig. Auf LR704 wurden bereits nach 11 Tagen die meisten schlagenden Areale im Vergleich zu den anderen Materialien beobachtet (Abb. 10). In der Veröffentlichung von Ko *et al.* [34] wird von schlagenden Arealen nach 12 Tagen berichtet. Besonders die verfrühte Kontraktion der EBs auf LR704 im

Vergleich zu den anderen Materialien spricht für den Kardiomyogenese-Support durch LR704. Die erste spontane Kontraktion konnte auf LR704 schon nach 8 Tagen festgestellt werden. Früheste Kontraktionen sind auf den Gelatine-Kontrollen erst nach 9 Tagen nachweisbar (Abb. 10). Die Nachweise Kardiomyozyten-spezifischer Proteine wie Connexin 43 und sarkomeres α -Aktinin beweisen zusätzlich auf Proteinebene die Entwicklung von Kardiomyozyten in gPS-Zell-EBs auf LR704 und Gelatine (Abb. 12).

In vitro-abgeleitete ES-Zellen verfügen über dieselben strukturellen, molekularen und funktionellen Merkmale von Kardiomyozyten. Dies wurde bereits mehrfach gezeigt [66, 67]. Bestimmte Eigenschaften auf diesen verschiedenen Ebenen wurden als Bedingungen für die Charakterisierung von Kardiomyozyten beschrieben [41]. Die Funktionalität der gPS-Zell-abgeleiteten EBs auf LR704 wurde bereits durch die Dokumentation der rhythmisch schlagenden Areale bewiesen und konnte durch elektrophysiologische Messungen quantifiziert werden (Abb. 11). Neben den Amplituden von gPS-Zellen auf Gelatine, die auch schon für dieselben Zellen in der Ko-Veröffentlichung gemessen und gezeigt wurden [34], untermauern die Werte der Aktionspotenzialdauer, Frequenz, *Baseline* und *Slope* deren Funktionalität. Der zusätzliche Vergleich mit gPS-Zell-EBs auf LR704 macht deutlich, dass auch die auf LR704 differenzierten gPS-Zellen als Kardiomyozyten funktionell sind. Wissenschaftler aus Köln beschrieben bereits ein ähnliches Kontraktionsmuster von iPS-Zellen und ES-Zellen. Sie stellten aber gleichzeitig einen Unterschied zu vergleichbar alten Maus-Myokardzellen fest, der auf das nicht vollständig ausgereifte sarkoplasmatische Retikulum und die β -adrenerge Antwort zurückzuführen ist [86]. Ein Vergleich mit nativen Kardiomyozyten wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Es ist allerdings davon auszugehen, dass aufgrund der auf verschiedenen Ebenen nachgewiesenen Ähnlichkeiten von gPS-Zellen und ES-Zellen [34] auch gPS-Zellen bezüglich der kardiomyogenen Funktionalität neben ES- und iPS-Zellen einzuordnen sind.

Die Aufnahmen des Transmissionselektronenmikroskops zeigen die opulente Distribution freier Ribosomen (Abb. 13). Dies deutet auf Proteinsyntheseaktivität hin [69]. Auch Desmosomen und Intermediärfilamente konnten im TEM nachgewiesen werden (Abb. 13). Desmosomen findet man häufig in Herzmuskelzellen. Sie zeigen sich häufig im Bereich von *Gap Junctions*, die beispielsweise den Austausch von Ionen ermöglichen, der zur Erregung des Aktionspotenzials in Herzmuskelzellen

wichtig ist. Intermediärfilamente geben einer Zelle Struktur und erhöhen die mechanische Stabilität, die bei Herzmuskelzellen gewährleistet sein muss.

Die PCA und die *Heat Map* (Abb. 14 + 15) zeigen eine deutliche Abgrenzung der gPS-Zellen auf Gelatine und LR704 von den undifferenzierten gPS-Zellen und somit die erfolgreiche Differenzierung. Die Heraufregulation typisch kardialer Gene zeigt die Differenzierung in Richtung Kardiomyozyten. Kardiale Ryanodin-Rezeptoren (Ryr2) sind membranständige Kalziumionen-Kanäle. Ryr2 wird von ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten [64], als auch, wie hier gezeigt, von differenzierten gPS-Zellen stark exprimiert. Auch kardiale Troponine, wie Tnnt2, Tnni1 und Tnni3, sind essentielle Vermittler bei der kardialen Muskelkontraktion und spielen bei der Anordnung der Sarkomere eine wichtige Rolle [87]. Diese Gene wurden in gPS-Zellen auf Gelatine und LR704 heraufreguliert, in gPS-Zellen auf LR704 stärker als in gPS-Zellen auf Gelatine. Die verstärkte Expression der kardialen Troponine macht die Differenzierung der gPS-Zellen auf LR704 in Richtung Kardiomyozyten deutlich, da es wichtige Gene für die Strukturgebung von Kardiomyozyten und deren Funktionalität sind. Somit deutet die heraufregulierte Expression von Ryr2, Tnnt2, Tnni1 und Tnni3, als auch anderer typischer kardialer Gene die Differenzierung der gPS-Zellen auf Gelatine und LR704 in kardiomyogene Richtung hin.

Diese Arbeit zeigt, dass gPS-Zellen sowohl auf Gelatine als auch auf LR704 in funktionelle Kardiomyozyten differenziert werden können. Das degradierbare, synthetische Material LR704 leitet jedoch im Vergleich zu Gelatine die Kontraktion der gPS-Zellen früher ein.

5.5 Bedeutungen für das *Tissue Engineering*

Die Generierung von pluripotenten Stammzellen durch rein stringente Kultivierungsbedingungen, also ohne den Einsatz viraler Transkriptionsfaktoren wie bei iPS-Zellen, wurde kürzlich beschrieben [32-35]. Dies ist für das humane System ein ausschlaggebender Fortschritt in der Bereitstellung Patienten-spezifischer pluripotenter Stammzellen für medizinische Bedürfnisse. Die Spermatogonien-isolation aus adultem Hoden bringt im Gegensatz zur Gewinnung humaner ES-Zellen keine ethische Problematik mit sich. Die Konversion in pluripotente ES-Zell-ähnliche Zellen ist *in vitro* unproblematisch und die (für Männer) autologe

Verwendungsmöglichkeit macht gPS-Zellen zu einem interessanten Werkzeug in der regenerativen Medizin und dem *Tissue Engineering*.

Aufgrund der Vorteile von gPS-Zellen und der Lücken, die im kardiologischen Bereich der regenerativen Zelltherapie zu schließen sind, liegt es nahe gPS-Zellen für die Entwicklung myokardialer Äquivalente einzusetzen. Zimmermann stellte aktuell (2011) unter anderem pluripotente Keimbahnstammzellen als alternative Kardiomyozytenquelle zu humanen ES-Zellen vor. Er schlug außerdem die Herstellung einer mesoderm-promotenden Nische vor, in der die *in vitro* Myokardium-Entwicklung vereinfacht simuliert werden kann [2]. Dazu bedarf es der Verwendung von Biomaterialien. Die Erkenntnis dieser Arbeit, dass das synthetische Polymer LR704 die kardiomyogene Differenzierung von gPS-Zellen einleitet, legt hierfür den Grundstein. LR704 eignet sich, neben der Herstellung 2-dimensionaler (2D) Folien, zur 3D-Modellierung.

Nichtsdestotrotz sind vor dem tatsächlichen Einsatz von gPS-Zellen im myokardialen *Tissue Engineering* einige sehr wichtige Punkte zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich LR704 zur Kultivierung von gPS-Zellen eignet und deren Differenzierungsschicksal in die kardiomyogene Richtung begünstigt. Es vermag bisher nicht die Entwicklung anderer Zelltypen endo- oder ektodermalen Ursprungs zu inhibieren, sodass am Ende vorerst eine heterogene Zellkultur vorliegt. Unter diesem Gesichtspunkt sei ebenfalls das Differenzierungspotenzial des verwendeten Zelltyps angesprochen. Ebenso wie andere ES-Zell-ähnliche, pluripotente Stammzellen, bergen auch gPS-Zellen die Gefahr der Teratomabildung *in vivo*, was sie als optimalen Zelltyp für die Transplantation ausschließt. Solange dieses Risiko besteht, sollte man von ihrem Einsatz absehen, bzw. nur hochaufgereinigte, aus gPS-Zellen ausdifferenzierte Zellen für Transplantationszwecke in Erwägung ziehen.

Dennoch erlaubt das vorliegende System aus der gPS-Zell/LR704-Kombination zukünftig eine detaillierte Untersuchung und Beschreibung der kardialen Entwicklung und der Funktion von Herzmuskelzellen. Somit können grundlegende Strategien für die regenerative Zelltherapie ermittelt werden. Basierend auf diesem System bzw. der Erkenntnis, dass LR704 Eigenschaften birgt, die die Kardiomyogenese fördern, können nun weitere Systeme unter der Verwendung dieses Materials und weiterer (humaner) Keimbahnstammzellen entwickelt werden.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden pluripotente gPS-Zellen aus OG2Rosa26- und OG2-Mäusen verwendet. Der Pluripotenzmarker Oct4 dieser gPS-Zellen ist mit dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) gekoppelt, sodass durch Fluoreszenzmikroskopie die Pluripotenz der undifferenzierten gPS-Zellen visualisiert wird und der Pluripotenz-Status kontrolliert werden kann. Zusätzlich wurde die Pluripotenz durch Immunfluoreszenz-Färbungen der typischen Transkriptionsfaktoren Nanog und Sox2 nachgewiesen.

Durch Vitalitätsmessungen konnte die Proliferationsrate der gPS-Zellen unter Expansions- und Differenzierungsbedingungen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen dokumentiert werden. Dabei zeigte sich, dass gPS-Zellen unter Expansionsbedingungen auf BAK nicht proliferierten und dass sie auf TCPS, Gelatine, LR704 und PLLA am besten wuchsen, jedoch nicht dieselbe Aktivität wie auf MEF erreicht werden konnte. Unter Differenzierungsbedingungen stellen gPS-Zellen auf allen Polymeren ihre Proliferation ein. Im Zytotoxizitäts-Test zeigte für keines der verwendeten Materialien einen vergleichbaren geringen zytotoxischen Effekt wie MEF. BAK und PEA C wurden als zytotoxisch für gPS-Zellen identifiziert, während sich alle anderen Materialien untereinander weder unter Wachstumsbedingungen, noch unter Differenzierungsbedingungen nicht signifikant unterschieden. Die Durchflusszytometrie erlaubt die quantitative Einschätzung vitaler, apoptotischer und nekrotischer gPS-Zellen auf den Materialien. Hier wurden neben MEF, auf LR704 und PVDF die meisten lebenden Zellen detektiert. Somit wurden unter Berücksichtigung der Proliferations- und Zytotoxizitätstests und der Durchflusszytometrie und nach umfassender Analyse neben Gelatine, LR704, PTFE und PVDF als vielversprechende Materialien für weiterführende Expansionsuntersuchungen und Differenzierungsversuche ausgewählt.

Im Vergleich zu MEF, Gelatine und TCPS bildeten sich auf LR704, PTFE und PVDF kleinere Kolonien, wie die Rasterelektronenmikroskopie, sowie die Durchlichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie (Oct4-eGFP⁺) einheitlich zeigten. PTFE und PVDF eigneten sich nicht, um gPS-Zellen über mehrere Passagen zu kultivieren. Entweder wurden sie nicht adhärent oder verloren ihre Pluripotenz, was sich durch Verlust der grünen Fluoreszenz darstellte. LR704 hingegen ließ die

Kultivierung über 9 Passagen mit Aufrechterhaltung ihres Differenzierungspotenzials zu.

Genexpressionsanalysen zeigten, dass unter Differenzierungsbedingungen die Oct4-Expression der gPS-Zellen auf allen Polymeren im Vergleich zu undifferenzierten Kontroll-Zellen signifikant herabreguliert wurde. Die Auswertung der Taqman-Analyse ließ außerdem vermuten, dass aufgrund der ausbleibenden Nestin-Expression die gPS-Zellen auf keinem der Polymere in ektodermale Richtung differenzierten. Die Expression von endo- und mesodermalen Keimblattmarkern wie α -Fetoprotein und α - und β MHC konnte hingegen gezeigt werden. Hierbei war die starke Heraufregulierung der mesodermalen Marker α - und β MHC in gPS-Zellen auf LR704 auffällig. Diese Ergebnisse deckten sich mit den Färbungen der Immunhistochemie von *smooth muscle actin*, Desmin, α -Fetoprotein und Zytokeratin.

Auf LR704 wurden bereits nach 8 Tagen schlagenden Areale der aus gPS-Zellen abgeleiteten EBs beobachtet. Auf Gelatine und PVDF setzten erst später Kontraktionen in gPS-Zellen ein und auf PTFE gar nicht. Durch die Ausprägung der schlagenden Areale und den verfrühten Einsatz der Kontraktionen auf LR704, konnte dieses Material als *Supporter* für die kardiomyogene Differenzierung identifiziert werden. Elektronenphysiologische Messungen brachten keine Unterschiede der Frequenz oder der Amplituden zwischen EBs auf LR704 und Gelatine hervor. Die Differenzierung war also auf beiden Materialien ähnlich effizient. Auf beiden Materialien konnten in gPS-Zellen starke Ausprägungen der typischen kardialen Proteine wie Connexin 43 und sarkomeres α -Aktinin durch immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen werden. Es wurden Ribosomen und Desmosomen in gPS-Zellen auf LR704 gefunden und die *Microarray* Analyse zeigte die erfolgreiche Differenzierung der gPS-Zellen auf LR704. Somit konnten gPS-Zellen auf LR704 auf molekularer, funktioneller und Protein-Ebene als Kardiomyozyten identifiziert werden. Abschließend konnte eine umfassende Einschätzung des Verhaltens von gPS-Zellen auf Polymeren gegeben werden, die ihre Proliferationsaktivität, ihre Vitalität und Apoptoserate auf den Materialien einbezieht. LR704 eignet sich zur *Feeder*-freien Kultivierung von gPS-Zellen, die die Aufrechterhaltung ihres Differenzierungspotenzials gewährleistet. Desweiteren kann LR704 unter Differenzierungsbedingungen die kardiomyogene Differenzierung von gPS-Zellen induzieren. Das macht LR704 zu einem vielversprechenden Material für die Kultivierung von gPS-Zellen. Die vorliegenden Daten und Erkenntnisse können für

zukünftige zelltherapeutische Ansätze insbesondere im Bereich der kardialen Regeneration von großem Interesse sein. Um sich die Kombination von gPS-Zellen mit diesem Polymer für das myokardiale *Tissue Engineering* zu Nutze machen zu können, bedarf es der Entwicklung weiterer Methoden zur Eliminierung anderer Zelltypen in den EBs bzw. der Etablierung einer reinen Kardiomyozytenkultur. Dazu wäre es möglich die gPS-Zell-Kultivierung auf LR704 mit anderen etablierten Methoden zur Induzierung der Kardiomyogenese zu kombinieren. So könnten zusätzlich Wachstumsfaktoren eingesetzt werden oder elektrische und/oder mechanische Reize, die Kontraktionen hervorrufen, angelegt werden. Außerdem könnte die gPS-Zell-Kombination mit LR704 in ein drei-dimensionales Modell überführt werden.

Quellenangaben

1. Fuchs, E., T. Tumber, and G. Guasch, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. Cell, 2004. 116(6): p. 769-78.
2. Zimmermann, W.H., *Embryonic and embryonic-like stem cells in heart muscle engineering*. J Mol Cell Cardiol. 50(2): p. 320-6.
3. Wobus, A.M. and K.R. Boheler, *Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy*. Physiol Rev, 2005. 85(2): p. 635-78.
4. Minguell, J.J., A. Erices, and P. Conget, *Mesenchymal stem cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. 226(6): p. 507-20.
5. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. 292(5819): p. 154-6.
6. Martin, G.R., *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, 1981. 78(12): p. 7634-8.
7. Reubinoff, B.E., M.F. Pera, C.Y. Fong, A. Trounson, and A. Bongso, *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Nat Biotechnol, 2000. 18(4): p. 399-404.
8. Thomson, J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones, *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. 282(5391): p. 1145-7.
9. Graves, K.H. and R.W. Moreadith, *Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos*. Mol Reprod Dev, 1993. 36(4): p. 424-33.
10. Iannaccone, P.M., G.U. Taborn, R.L. Garton, M.D. Caplice, and D.R. Brenin, *Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras*. Dev Biol, 1994. 163(1): p. 288-92.
11. Wheeler, M.B., *Development and validation of swine embryonic stem cells: a review*. Reprod Fertil Dev, 1994. 6(5): p. 563-8.
12. Wang, Q., Z.F. Fang, F. Jin, Y. Lu, H. Gai, and H.Z. Sheng, *Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves*. Stem Cells, 2005. 23(9): p. 1221-7.
13. Boeuf, H., C. Hauss, F.D. Graeve, N. Baran, and C. Kedinger, *Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells*. J Cell Biol, 1997. 138(6): p. 1207-17.
14. Boiani, M. and H.R. Scholer, *Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(11): p. 872-84.

15. Avilion, A.A., S.K. Nicolis, L.H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, and R. Lovell-Badge, *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. *Genes Dev*, 2003. 17(1): p. 126-40.
16. Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, and A. Smith, *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. *Cell*, 2003. 113(5): p. 643-55.
17. Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, and S. Yamanaka, *The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells*. *Cell*, 2003. 113(5): p. 631-42.
18. Pan, G. and J.A. Thomson, *Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency*. *Cell Res*, 2007. 17(1): p. 42-9.
19. Scholer, H.R., R. Balling, A.K. Hatzopoulos, N. Suzuki, and P. Gruss, *Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis*. *Embo J*, 1989. 8(9): p. 2551-7.
20. Maltsev, V.A., J. Rohwedel, J. Hescheler, and A.M. Wobus, *Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types*. *Mech Dev*, 1993. 44(1): p. 41-50.
21. Campbell, K.H., J. McWhir, W.A. Ritchie, and I. Wilmut, *Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line*. *Nature*, 1996. 380(6569): p. 64-6.
22. Eggan, K., H. Akutsu, J. Loring, L. Jackson-Grusby, M. Klemm, W.M. Rideout, 3rd, R. Yanagimachi, and R. Jaenisch, *Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(11): p. 6209-14.
23. Nagy, A., J. Rossant, R. Nagy, W. Abramow-Newerly, and J.C. Roder, *Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(18): p. 8424-8.
24. Zhao, X.Y., W. Li, Z. Lv, L. Liu, M. Tong, T. Hai, J. Hao, C.L. Guo, Q.W. Ma, L. Wang, F. Zeng, and Q. Zhou, *iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation*. *Nature*, 2009. 461(7260): p. 86-90.
25. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. 126(4): p. 663-76.
26. Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. *Cell*, 2007. 131(5): p. 861-72.
27. Kim, J.B., H. Zaehres, G. Wu, L. Gentile, K. Ko, V. Sebastiano, M.J. Arauzo-Bravo, D. Ruau, D.W. Han, M. Zenke, and H.R. Scholer, *Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors*. *Nature*, 2008. 454(7204): p. 646-50.

28. Aoi, T., K. Yae, M. Nakagawa, T. Ichisaka, K. Okita, K. Takahashi, T. Chiba, and S. Yamanaka, *Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells*. *Science*, 2008. 321(5889): p. 699-702.
29. Woltjen, K., I.P. Michael, P. Mohseni, R. Desai, M. Mileikovsky, R. Hamalainen, R. Cowling, W. Wang, P. Liu, M. Gertsenstein, K. Kaji, H.K. Sung, and A. Nagy, *piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2009. 458(7239): p. 766-70.
30. Yu, J., K. Hu, K. Smuga-Otto, S. Tian, R. Stewart, Slukvin, II, and J.A. Thomson, *Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences*. *Science*, 2009. 324(5928): p. 797-801.
31. Okita, K., M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors*. *Science*, 2008. 322(5903): p. 949-53.
32. Guan, K., K. Nayernia, L.S. Maier, S. Wagner, R. Dressel, J.H. Lee, J. Nolte, F. Wolf, M. Li, W. Engel, and G. Hasenfuss, *Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis*. *Nature*, 2006. 440(7088): p. 1199-203.
33. Conrad, S., M. Renninger, J. Hennenlotter, T. Wiesner, L. Just, M. Bonin, W. Aicher, H.J. Buhning, U. Mattheus, A. Mack, H.J. Wagner, S. Minger, M. Matzkies, M. Reppel, J. Hescheler, K.D. Sievert, A. Stenzl, and T. Skutella, *Generation of pluripotent stem cells from adult human testis*. *Nature*, 2008. 456(7220): p. 344-9.
34. Ko, K., N. Tapia, G. Wu, J.B. Kim, M.J. Bravo, P. Sasse, T. Glaser, D. Ruau, D.W. Han, B. Greber, K. Hausdorfer, V. Sebastiano, M. Stehling, B.K. Fleischmann, O. Brustle, M. Zenke, and H.R. Scholer, *Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2009. 5(1): p. 87-96.
35. Kossack, N., J. Meneses, S. Shefi, H.N. Nguyen, S. Chavez, C. Nicholas, J. Gromoll, P.J. Turek, and R.A. Reijo-Pera, *Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells*. *Stem Cells*, 2009. 27(1): p. 138-49.
36. Ko, K., M.J. Arauzo-Bravo, N. Tapia, J. Kim, Q. Lin, C. Bernemann, D.W. Han, L. Gentile, P. Reinhardt, B. Greber, R.K. Schneider, S. Kliesch, M. Zenke, and H.R. Scholer, *Human adult germline stem cells in question*. *Nature*. 465(7301): p. E1; discussion E3.
37. Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M.J. Aryee, H. Ji, L.I. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi, K.C. Cunniff, H. Hongguang, S. McKinney-Freeman, O. Naveiras, T.J. Yoon, R.A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S.H. Orkin, I.L. Weissman, A.P. Feinberg, and G.Q. Daley, *Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells*. *Nature*. 467(7313): p. 285-90.
38. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. *J Cell Physiol*, 2007. 213(2): p. 341-7.

39. Guan, K., S. Wagner, B. Unsold, L.S. Maier, D. Kaiser, B. Hemmerlein, K. Nayernia, W. Engel, and G. Hasenfuss, *Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells*. *Circ Res*, 2007. 100(11): p. 1615-25.
40. Guan, K., F. Wolf, A. Becker, W. Engel, K. Nayernia, and G. Hasenfuss, *Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes*. *Nat Protoc*, 2009. 4(2): p. 143-54.
41. Czyz, J., C. Wiese, A. Rolletschek, P. Blyszczuk, M. Cross, and A.M. Wobus, *Potential of embryonic and adult stem cells in vitro*. *Biol Chem*, 2003. 384(10-11): p. 1391-409.
42. Xu, C., S. Police, N. Rao, and M.K. Carpenter, *Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells*. *Circ Res*, 2002. 91(6): p. 501-8.
43. Heng, B.C., H. Haider, E.K. Sim, T. Cao, and S.C. Ng, *Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro*. *Cardiovasc Res*, 2004. 62(1): p. 34-42.
44. Peran, M., J.A. Marchal, E. Lopez, M. Jimenez-Navarro, H. Boulaiz, F. Rodriguez-Serrano, E. Carrillo, G. Sanchez-Espin, E. de Teresa, D. Tosh, and A. Aranega, *Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes*. *Cytotherapy*. 12(3): p. 332-7.
45. Griffith, L.G. and G. Naughton, *Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities*. *Science*, 2002. 295(5557): p. 1009-14.
46. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. *Biomaterials*, 2008. 29(20): p. 2941-53.
47. Williams, D.F., *On the nature of biomaterials*. *Biomaterials*, 2009. 30(30): p. 5897-909.
48. Feldman D.S., C.P.J., Kelpke S.S., Pandit A.S., Wilson D.J., *A biocompatibility hierarchy: Justification for biomaterial enhanced regeneration.*, ed. T.D.J. Wise D., Altobelli D.E., Yaszemski M.J., Gresser J.D., Schwartz E.R. 1995.
49. Vaccaro, A.R., K. Singh, R. Haid, S. Kitchel, P. Wuisman, W. Taylor, C. Branch, and S. Garfin, *The use of bioabsorbable implants in the spine*. *Spine J*, 2003. 3(3): p. 227-37.
50. Shazly, T., V.B. Kolachalama, J. Ferdous, J.P. Oberhauser, S. Hossainy, and E.R. Edelman, *Assessment of Material By-Product Fate from Bioresorbable Vascular Scaffolds*. *Ann Biomed Eng*.
51. Lu, J.N., C.C. Wang, and T.H. Young, *The behaviors of long-term cryopreserved human hepatocytes on different biomaterials*. *Artif Organs*. 35(3): p. E65-72.

52. Wang, T.J., I.J. Wang, Y.H. Chen, J.N. Lu, and T.H. Young, *Polyvinylidene fluoride for proliferation and preservation of bovine corneal endothelial cells by enhancing type IV collagen production and deposition*. J Biomed Mater Res A.
53. Tschoeke, B., T.C. Flanagan, A. Cornelissen, S. Koch, A. Roehl, M. Sriharwoko, J.S. Sachweh, T. Gries, T. Schmitz-Rode, and S. Jockenhoevel, *Development of a composite degradable/nondegradable tissue-engineered vascular graft*. Artif Organs, 2008. 32(10): p. 800-9.
54. Murphy, E.H., J.M. Dimaio, M.E. Jessen, and F.R. Arko, *Technique for branched thoracic stent-graft repair of a chronic type a aortic dissection in a patient with multiple prior sternotomies*. J Endovasc Ther. 18(3): p. 359-64.
55. Neuss, S., C. Apel, P. Buttler, B. Denecke, A. Dhanasingh, X. Ding, D. Grafahrend, A. Groger, K. Hemmrich, A. Herr, W. Jahnen-Dechent, S. Mastitskaya, A. Perez-Bouza, S. Rosewick, J. Salber, M. Woltje, and M. Zenke, *Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering*. Biomaterials, 2008. 29(3): p. 302-13.
56. Neuss, S., B. Denecke, L. Gan, Q. Lin, M. Bovi, C. Apel, M. Woltje, A. Dhanasingh, J. Salber, R. Knuchel, and M. Zenke, *Transcriptome analysis of MSC and MSC-derived osteoblasts on Resomer(R) LT706 and PCL: impact of biomaterial substrate on osteogenic differentiation*. PLoS One. 6(9): p. e23195.
57. Pfannkuche, K., S. Neuss, F. Pillekamp, L.P. Frenzel, W. Attia, T. Hannes, J. Salber, M. Hoss, M. Zenke, B.K. Fleischmann, J. Hescheler, and T. Saric, *Fibroblasts facilitate the engraftment of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes on three-dimensional collagen matrices and aggregation in hanging drops*. Stem Cells Dev. 19(10): p. 1589-99.
58. Schneider, R.K., R. Knuchel, and S. Neuss, *[Mesenchymal stem cells and their interaction with biomaterials: Potential applications in tissue engineering]*. Pathologe. 32 Suppl 2: p. 296-303.
59. Shokouhi, B., C. Coban, V. Hasirci, E. Aydin, A. Dhanasingh, N. Shi, S. Koyama, S. Akira, M. Zenke, and A.S. Sechi, *The role of multiple toll-like receptor signalling cascades on interactions between biomedical polymers and dendritic cells*. Biomaterials. 31(22): p. 5759-71.
60. Guillot, P.V., W. Cui, N.M. Fisk, and D.J. Polak, *Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering*. J Cell Mol Med, 2007. 11(5): p. 935-44.
61. Schneider, R.K., J. Anraths, R. Kramann, J. Bornemann, M. Bovi, R. Knuchel, and S. Neuss, *The role of biomaterials in the direction of mesenchymal stem cell properties and extracellular matrix remodelling in dermal tissue engineering*. Biomaterials. 31(31): p. 7948-59.
62. Schneider, R.K., A. Pullen, R. Kramann, J. Bornemann, R. Knuchel, S. Neuss, and A. Perez-Bouza, *Long-term survival and characterisation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents*. Differentiation. 79(3): p. 182-93.

63. Jing, D., A. Parikh, J.M. Canty, Jr., and E.S. Tzanakakis, *Stem cells for heart cell therapies*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2008. 14(4): p. 393-406.
64. Boheler, K.R., J. Czyz, D. Tweedie, H.T. Yang, S.V. Anisimov, and A.M. Wobus, *Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes*. *Circ Res*, 2002. 91(3): p. 189-201.
65. Igelmund, P., B.K. Fleischmann, I.R. Fischer, J. Soest, O. Gryshchenko, M.M. Bohm-Pinger, H. Sauer, Q. Liu, and J. Hescheler, *Action potential propagation failures in long-term recordings from embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in tissue culture*. *Pflugers Arch*, 1999. 437(5): p. 669-79.
66. Kehat, I., A. Gepstein, A. Spira, J. Itskovitz-Eldor, and L. Gepstein, *High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction*. *Circ Res*, 2002. 91(8): p. 659-61.
67. Kehat, I., D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir, H. Segev, M. Amit, A. Gepstein, E. Livne, O. Binah, J. Itskovitz-Eldor, and L. Gepstein, *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes*. *J Clin Invest*, 2001. 108(3): p. 407-14.
68. Pittenger, M.F. and B.J. Martin, *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics*. *Circ Res*, 2004. 95(1): p. 9-20.
69. Snir, M., I. Kehat, A. Gepstein, R. Coleman, J. Itskovitz-Eldor, E. Livne, and L. Gepstein, *Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(6): p. H2355-63.
70. Kim, J.B., B. Greber, M.J. Arauzo-Bravo, J. Meyer, K.I. Park, H. Zaehres, and H.R. Scholer, *Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4*. *Nature*, 2009. 461(7264): p. 649-3.
71. Itthichaisri, C., M. Wiedmann-Al-Ahmad, U. Huebner, A. Al-Ahmad, R. Schoen, R. Schmelzeisen, and N.C. Gellrich, *Comparative in vitro study of the proliferation and growth of human osteoblast-like cells on various biomaterials*. *J Biomed Mater Res A*, 2007. 82(4): p. 777-87.
72. Calvert, J.W., K.G. Marra, L. Cook, P.N. Kumta, P.A. DiMilla, and L.E. Weiss, *Characterization of osteoblast-like behavior of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces*. *J Biomed Mater Res*, 2000. 52(2): p. 279-84.
73. Chastain, S.R., A.K. Kundu, S. Dhar, J.W. Calvert, and A.J. Putnam, *Adhesion of mesenchymal stem cells to polymer scaffolds occurs via distinct ECM ligands and controls their osteogenic differentiation*. *J Biomed Mater Res A*, 2006. 78(1): p. 73-85.
74. Ferreira, M.V., N. Labude, D. Piroth, W. Jahnen-Dechent, R. Knuchel, T. Hieronymus, M. Zenke, and S. Neuss, *Compatibility of different polymers for cord blood-derived hematopoietic progenitor cells*. *J Mater Sci Mater Med*.

75. Hung, C.H., Y.L. Lin, and T.H. Young, *The effect of chitosan and PVDF substrates on the behavior of embryonic rat cerebral cortical stem cells*. *Biomaterials*, 2006. 27(25): p. 4461-9.
76. Massia, S.P. and J.A. Hubbell, *Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials*. *J Biomed Mater Res*, 1991. 25(2): p. 223-42.
77. Cohen, S., A. Samadikuchaksaraei, J.M. Polak, and A.E. Bishop, *Antibiotics reduce the growth rate and differentiation of embryonic stem cell cultures*. *Tissue Eng*, 2006. 12(7): p. 2025-30.
78. Torok, E., M. Lutgehetmann, J. Bierwolf, S. Melbeck, J. Dullmann, B. Nashan, P.X. Ma, and J.M. Pollok, *Primary human hepatocytes on biodegradable poly(l-lactic acid) matrices: a promising model for improving transplantation efficiency with tissue engineering*. *Liver Transpl*. 17(2): p. 104-14.
79. Xu, Z.X., J.T. Chen, T. Li, D.S. Zha, X.X. Zhang, X.R. Jiang, W.D. Xiao, and Q.A. Zhu, *[Effects of bioactive modification of poly-D,L-lactide acid scaffolds on the biological behaviors of the seed cells]*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 31(2): p. 289-94.
80. Doetschman, T.C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, and R. Kemler, *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. *J Embryol Exp Morphol*, 1985. 87: p. 27-45.
81. Wobus, A.M., G. Wallukat, and J. Hescheler, *Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers*. *Differentiation*, 1991. 48(3): p. 173-82.
82. Hwang, Y.S., B.G. Chung, D. Ortmann, N. Hattori, H.C. Moeller, and A. Khademhosseini, *Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate via differential expression of WNT5a and WNT11*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(40): p. 16978-83.
83. Karp, J.M., J. Yeh, G. Eng, J. Fukuda, J. Blumling, K.Y. Suh, J. Cheng, A. Mahdavi, J. Borenstein, R. Langer, and A. Khademhosseini, *Controlling size, shape and homogeneity of embryoid bodies using poly(ethylene glycol) microwells*. *Lab Chip*, 2007. 7(6): p. 786-94.
84. Mohr, J.C., J. Zhang, S.M. Azarin, A.G. Soerens, J.J. de Pablo, J.A. Thomson, G.E. Lyons, S.P. Palecek, and T.J. Kamp, *The microwell control of embryoid body size in order to regulate cardiac differentiation of human embryonic stem cells*. *Biomaterials*. 31(7): p. 1885-93.
85. Wobus, A.M., K. Guan, H.T. Yang, and K.R. Boheler, *Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation*. *Methods Mol Biol*, 2002. 185: p. 127-56.

86. Xi, J., M. Khalil, N. Shishechian, T. Hannes, K. Pfannkuche, H. Liang, A. Fatima, M. Haustein, F. Suhr, W. Bloch, M. Reppel, T. Saric, M. Wernig, R. Janisch, K. Brockmeier, J. Hescheler, and F. Pillekamp, *Comparison of contractile behavior of native murine ventricular tissue and cardiomyocytes derived from embryonic or induced pluripotent stem cells*. *Faseb J.* 24(8): p. 2739-51.
87. Sehnert, A.J., A. Huq, B.M. Weinstein, C. Walker, M. Fishman, and D.Y. Stainier, *Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility*. *Nat Genet*, 2002. 31(1): p. 106-10.

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin
A	Adenin
α	alpha
Abb.	Abbildung
AP	Alkaline Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APD	<i>action potential duration</i>
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
β	beta
BAK	Polyesteramid Typ BAK 1095
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	cirka
cDNA	<i>copy DNA</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy-3	Cyanin-3
2D	2-dimensional
3D	3-dimensional
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DWI	Deutsches Wollforschungsinstitut

EB	<i>embryoid body</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FDA	Fluoreszeindiacetat
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
Gly	Glycin
gPS-Zellen	<i>germline-derived pluripotent stem cells</i>
Gy	<i>grey</i> , SI-Einheit für absorbierte Strahlung
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
H ₂ O	Wasser
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
Hz	Hertz
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IgG	Immunglobulin
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
k	kilo
Klf4	<i>krueppel-like factor 4</i>
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LFA-1	<i>Leukocyte function-associated antigen-1</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LR704	Poly(L-Laktid-co-D,L-Laktid)
LT706	Poly(L-Laktid-co-Trimethylencarbonat)

M	Molar
m	milli (1×10^{-3})
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MCDB	<i>Chick fibroblast basal medium</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
min	Minute
M. Sc.	<i>Master of Science</i>
n	nano (1×10^{-9}), Anzahl
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NSF	<i>National Science Foundation</i>
μ	mikro (1×10^{-6})
O ₂	Sauerstoff
Oct4	<i>octamer-binding transcription factor-4</i>
p	pico (1×10^{-12})
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCL	Poly- ϵ -caprolakton
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDLLA	<i>Poly-D,L-lactic acid</i>
PDMS	<i>Poly(dimethyl siloxane)</i> , Silikon
PEA C	Polyesteramid Typ C
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PLLA	Poly-L-Laktid
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RG503	Poly(D,L-Laktid-co-Glycolsäure)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i>

Sox2	<i>SRY-related high-mobility group (HMG)-box protein-2</i>
SSEA	<i>stage-specific embryonic antigen</i>
StZG	Stammzellgesetz
u.a.	unter anderem
UDG	Uracil DNA Glycosylase
Taq-Polymerase	Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TCPS	<i>tissue culture polystyrene</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

LEBENS LAUF

MAREIKE HOß

ANGABEN ZUR PERSON

Name	MAREIKE HOß
Adresse	Herstalerstr. 4, 52074 Aachen
Telefon	0241/ 5908960, 0178/7715208
E-Mail	mareike.hoss@rwth-aachen.de
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	31.10.1982
Geburtsort	Siegen

QUALIFIKATIONEN

1999 - 2002	Peter-Paul-Rubens-Gymnasium, Siegen Allgemeine Hochschulreife
10/2002 – 9/2008	RWTH Aachen Diplom der Biologie „Stammzell/Biomaterial-Interaktionen: Welche Moleküle vermitteln die differentielle Adhäsion nah verwandter Stammzelltypen auf synthetischen Polymeren?“ im Universitätsklinikum Aachen Institut für Pathologie, AG Stammzellen und <i>Tissue Engineering</i> RWTH Aachen
1/2009-12/2011	Promotion „Kardiomyogene Differenzierung von <i>germline-derived pluripotent stem cells</i> auf dem Biomaterial LR704“ im Universitätsklinikum Aachen IZKF Aachen

PUBLIKATIONEN

Hoss M., Dhanasingh A., Groll J., Ko K., Salber J., Schöler H.R., Zenke M., Neuss S.. Cardiomyogenic Differentiation of germline-derived pluripotent stem cells on Resomer® LR704. *Biomaterials*. 2012. Manuskript in Arbeit.

Hoss M., Apel C., Dhanasingh A., Hemmrich K., Salber J., Suschek CV., Zenke M., Neuss S. Integrin $\alpha 4$ Impacts on Differential Adhesion of Stem Cells on Synthetic Polymers. *TERM*. 2011 Oct 4. [Epub ahead of print]

Pfannkuche K., Neuss S., Pillekamp F., Frenzel L., Attia W., Hannes T., Salber J., **Hoss M.**, Zenke M., Fleischmann B., Hescheler J., Saric T. Fibroblasts facilitate the engraftment of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes on three-dimensional collagen matrices and aggregation in hanging drops. *Stem Cells Dev*. 2010 Oct;19(10):1589-99.

Datum, Unterschrift

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rahmen des IZKF Aachen Nachwuchswissenschaftler Förderprogramms.

Bei Prof. Zenke möchte ich mich für die Übernahme des Gutachtens und die Möglichkeit zur Durchführung meiner Doktorarbeit am Institut für Biomedizinische Technik, Zellbiologie, bedanken.

Prof. Elling danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Kinarm Ko und Prof. Schöler aus dem Max-Planck-Institut für Molekulare Biomedizin in Münster, Zell- und Entwicklungsbiologie, danke ich für die freundliche Bereitstellung der gPS-Zellen.

Dr. Jochen Salber und Dr. Anandhan Dhanasingh möchte ich für die Einführung in die Folienherstellung im DWI danken und dass sie mir bereitwillig alles Wissenswerte zu den Polymeren vermittelt haben.

Ohne Dr. Bernd Dennecke und Qiong Lin wäre die Abwicklung und die informatische Auswertung des *Microarray Assays* nicht möglich gewesen.

Dr. Dr. Tomo Šarić danke ich für die Kooperation bezüglich der elektronenphysiologischen Messungen.

Ich bedanke mich bei Dr. Jörg Bornemann und Manfred Bovi für deren nette Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Labor- und Bürokollegen für die stets angenehme und hilfsbereite Atmosphäre.

Frau PD Dr. Sabine Neuß-Stein gilt mein ganz besonderer Dank. Sie ist ein hervorragendes Vorbild, hatte stets ein offenes Ohr und hat auch über den

Laboralltag hinaus für eine phantastische Atmosphäre gesorgt. Ihr und ihrem Team (*Stem Cells and Tissue Engineering*) verdanke ich meine Freude an der Arbeit, Spaß an der Forschung und das gute Gefühl Teil eines wirklich motivierten und zusammenhaltenden Teams zu sein.

Außerdem danke ich natürlich meinen lieben Freunden und meiner Familie.