

Untersuchung des
Differenzierungspotenzials der USSC
in vitro und *in vivo* im Hühnerembryomodell

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jin Mann
aus Seoul

Juli 2007

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. P. Wernet

Koreferent: Prof. Dr. P. Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition und Abgrenzung der Stammzelle	2
1.1.1	Embryonale Stammzelle	3
1.1.2	Adulte Stammzelle	4
1.1.2.1	Hämatopoetische Stammzellen	4
1.1.2.2	Mesenchymale Stammzellen	5
1.1.2.3	Neurale Stammzellen	5
1.1.3	Stammzellen aus dem Nabelschnurblut	5
1.2	Das Huhn-Modell in der Entwicklungsbiologie	7
1.3	Überblick über die Huhnentwicklung	10
1.3.1	Furchung	10
1.3.2	Gastrulation	10
1.3.3	Somitogenese	12
1.3.4	Entwicklung des Herzens	13
1.3.4.1	Bereiche, die an der Herzentwicklung beteiligt sind	14
1.3.4.2	Marker für die Herzentwicklung	15
1.4	Differenzierung von Stammzellen zu Herzmuskelzellen	19
1.5	Ziel dieser Arbeit	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Kultivierung der USSC	22
2.1.1	Zelllinien	22
2.1.2	Kultivierung der USSC	22
2.2	Markierung der USSC	23
2.2.1	Markierung der USSC mit PKH26	24
2.2.2	Markierung der USSC durch Transfektion	24
2.2.2.1	Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese	25
2.2.2.2	Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen	26
2.2.2.3	Ligation	27
2.2.2.4	Transformation	27
2.2.2.5	Minipräparation von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979), modifiziert	28

2.2.2.6	Maxipräparation von Plasmid-DNA	29
2.2.2.7	Bestimmung der DNA-Konzentration	29
2.2.2.8	Nachweis der β -Galaktosidase	29
2.2.2.9	Transfektion	30
2.2.2.10	Generierung viraler Überstände zur Transfektion der USSC	31
2.2.3	pJM1	31
2.2.4	pCL1nlsLacZ	34
2.3	Differenzierung der USSC in vivo	36
2.3.1	Versuchstiere	36
2.3.2	Manipulationen	37
2.3.2.1	Applikation von USSC während der Gastrulationsphase	38
2.3.2.2	Applikation von USSC während der Somitogenese	38
2.3.2.3	Implantation von USSC in das zuvor geschädigte Neuralrohr	38
2.3.2.4	Applikation in das externe Gefäßsystem	38
2.3.2.5	Applikation in das Gehirn	38
2.3.2.6	Applikation in die Extremitätenanlage	38
2.3.3	Fixierung	39
2.3.4	Nachweis der β -Galaktosidase exprimierenden Zellen im Hühnerembryo	39
2.3.5	Gefrierkonservierung	39
2.4	Immunhistochemie (IHC)	40
2.4.1	IHC mit Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörpern	42
2.4.2	IHC mit Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpern	43
2.5	Differenzierung der USSC in vitro	44
2.5.1	Induzierung der Differenzierung durch Zugabe von Faktoren zum Medium	44
2.5.2	Induzierung der Differenzierung durch Kokultivierung	45
2.5.3	Induzierung der Differenzierung durch konditioniertes Medium	46
2.6	Färbung für die Durchflusszytometrie	46
2.7	Molekularbiologische Analyse der Differenzierung	48
2.7.1	RNA-Isolierung	48

2.7.1.1	Bestimmung der RNA-Konzentration	48
2.7.2	RT-PCR	48
2.7.3	Southern Blot	52
2.7.3.1	Detektion der DNA mit Biotin-konjugierten Oligonukleotiden	52
2.7.4	Quantitative real-time PCR	53
2.7.5	Protein-Isolierung	56
2.7.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	56
2.7.7	Western Blot	57
2.7.7.1	Immundetektion der Proteine mit Peroxidase-konjugierten Antikörpern	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Differenzierung der USSC in vivo	59
3.1.1	Markierung der USSC	59
3.1.2	Applikation ins Blastoderm	62
3.1.3	Applikation während der Gastrulationsphase	63
3.1.4	Manipulation von Somiten	64
3.1.5	Applikation an die Somiten	65
3.1.6	Applikation an das zuvor geschädigte Neuralrohr	69
3.1.7	Applikation ins Herz	70
3.1.8	Applikation ins Gehirn	71
3.1.9	Applikation in das externe Gefäßsystem	72
3.1.10	Applikation in die Extremität	73
3.1.11	Übersicht der manipulierten Embryonen	75
3.2	Differenzierung der USSC in vitro	76
3.2.1	Differenzierung durch Zugabe von Faktoren	77
3.2.2	Differenzierung durch Kokultivierung	77
3.2.2.1	RT-PCR	78
3.2.2.2	Quantitative RT-PCR	80
3.2.2.3	Western Blot	83
3.2.2.4	Immunhistochemie	84
3.2.2.5	Durchflusszytometrie	89
3.2.3	Differenzierung durch Kultivierung mit konditioniertem Medium	92

3.2.3.1	RT-PCR	92
3.2.3.2	Quantitative RT-PCR	93
3.2.3.3	Western Blot	96
3.2.3.4	Immunhistochemie	97
3.2.3.5	Durchflusszytometrie	100
3.2.4	Vergleich der Ergebnisse der Kokultivierung mit der Kultivierung mit konditioniertem Medium	103
3.2.4.1	Nachweis auf RNA-Ebene	103
3.2.4.2	Nachweis auf Protein-Ebene	106
4	Diskussion	109
4.1	Nachweis der USSC im Hühnerembryo	110
4.2	Differenzierung der USSC in vivo	111
4.3	Differenzierung der USSC durch Zugabe von Faktoren zum Medium	116
4.4	Differenzierung der USSC durch Kokultivierung und durch Kultivierung mit konditioniertem Medium und deren Analyse	117
4.4.1	Nachweis der Genexpression	119
4.4.2	Nachweis des Proteins	122
4.4.3	Funktioneller Nachweis	125
4.4.4	Einschätzung des Differenzierungsstatus	125
4.5	Transdifferenzierung und Fusion	126
4.6	Homogenität und Heterogenität	127
4.7	Ausblick	129
5	Zusammenfassung	131
6	Summary	132
7	Literaturverzeichnis	133
8	Anhang	142
8.1	Übersicht der in vitro Differenzierungsansätze	142
8.2	Geräte und Material	148
8.3	Herstellerliste	151

Danksagung

Eidstattliche Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP2A1	SERCA
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> , basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
bp	Basenpaar/e
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i> , morphogenetische Knochenproteine
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
dHAND	<i>dHAND basic helix-loop-helix transcription factor</i>
eHAND	<i>eHAND basic helix-loop-helix transcription factor</i>
dKK	direkte Kokultur
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EB	<i>embryoid body</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Eyal-Giladi und Kochav
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylen-glycol-bis(2-aminoethylether)-NNNN-tetraacetat
END-2	viszeral-endoderm ähnliche Zelle
ESC	<i>embryonic stem cell</i> , embryonale Stammzelle
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GATA2	<i>GATA binding protein 2</i>
GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>
GATA5	<i>GATA binding protein 5</i>
GATA6	<i>GATA binding protein 6</i>

GFP	<i>green fluorescent protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK	<i>human embryonic kidney</i> , menschliche embryonale Nierenzelle
HH	Hamburger und Hamilton
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> , Meerrettich Peroxidase
HSC	Hämatopoietische Stammzelle
huEPC	humane endotheliale Progenitorzellen
HZ	Huhn Herzzellen
IHC	Immunohistochemie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
K ₃ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanoferrat (III)
K ₄ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanoferrat (II)
KM	konditioniertes Medium
LacZ-Gen	β-Galactosidase kodierendes Gen
LB	Luria Bertani Broth Medium
M	molar (Mol/l)
MEF2A	<i>Myocyte enhancer Factor 2A</i>
MEF2C	<i>Myocyte enhancer Factor 2C</i>
MEF2D	<i>Myocyte enhancer Factor 2D</i>
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	schwere Kette des Myosins
MLC	leichte Kette des Myosins
MLC2a	Vorhof spezifische regulatorische leichte Myosinkette, Polypeptid 7 (MYL7)
MLC2v	Kammer spezifische regulatorische leichte Myosinkette, Polypeptid 2 (MYL2)
MNC	mononukleäre Zellen
mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MYH6	Herzmuskel alpha-Myosin schwere Kette, Polypeptide 6
MYL7	MLC2a
MYL2	MLC2v
MyoD	<i>myogenic differentiation</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Nkx2.5	<i>NK2 transcription factor related locus 5</i>
NPPA	Vorläufer des natriuretischen Peptids A (ANP)
NRCM	neonatale Kardiomyozyten der Ratte
OXTR	Oxytocin Rezeptor

PBS	Phosphat gepufferte Saline
PBST	Tween in PBS
PD	<i>population doubling time</i> , Zeit in der sich eine Population verdoppelt
PFA	Para-Formaldehyd
PCR	Polymerasekettenreaktion
RA	Retinolsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	<i>sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase</i> , Kalzium ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SHRP	<i>streptavidin-horseradish-peroxidase</i> , Streptavidin-Meerrettich Peroxidase
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TNNI3	Troponin I Typ 3 (kardial)
TNNT2	Troponin T Typ2 (kardial)
U	Einheit
USSC	Unrestringierte somatische Stammzelle
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

1 Einleitung

Die Selbstheilung ist ein Phänomen der Natur, welches die Wissenschaft fortwährend beschäftigt. Im menschlichen Körper werden fortlaufend Zellen repariert, tote Zellen entsorgt oder auch neue Zellen gebildet, um dadurch Verletzungen zu beheben. Bereits bei kleineren Schäden wie dem Verschleiß von Knorpel sind die Grenzen unserer Selbstheilung erreicht. Andere Organismen besitzen Regenerationsmechanismen, durch die sie einzelne Organe oder auch ganze Körperteile ersetzen können. Die Hydra regeneriert sich innerhalb von 5 Tagen durch Stammzellteilung vollständig selbst, die einzelnen Teile der Strudelwürmer können sich nach dem Zerteilen wieder zu kompletten Würmern entwickeln. Axolotl bauen ganze Körperteile wieder auf und Haie ersetzen ihre ausgefallenden Zähne. Deswegen werden Wege gesucht, dem menschlichen Gewebe durch Zell- oder Gewebeersatz bei der Regeneration direkt oder indirekt zu helfen. Ziel ist es, nicht nur funktionelle Zellen einzusetzen, sondern auch Regenerationsmechanismen durch das Einbringen von Zellen zu aktivieren oder zu verstärken.

Der elften Bevölkerungsvorausberechnung des Statistischen Bundesamtes anno 2006 zufolge wird bis 2050 die Einwohnerzahl Deutschlands von derzeit 82,3 Millionen auf 69-74 Millionen sinken, jedoch wird es auf Grund der steigenden Lebenserwartung eine Verschiebung in der Alterspyramide geben. Im Gegensatz zu 1910 ist die durchschnittliche Lebenserwartung für Männer um 29 Jahre und für Frauen um 31 Jahre gestiegen. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass die Zahl der über 80jährigen von heute 4 Millionen auf 10 Millionen ansteigen wird. Hier zeigt sich die Notwendigkeit, Therapien für Krankheiten zu finden, die im Alter häufiger auftreten. Zu diesen Krankheiten gehören Krankheiten des Nervensystems, des Herz-Kreislaufsystems, Tumorerkrankungen, Diabetes und Augenerkrankungen. Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sind dabei die häufigste Todesursache bei über 65 Jahre alten Menschen.

Die Forschung an Stamm-, Vorläufer- und enddifferenzierten Zellen scheint unumgänglich, um verschiedene Therapiemöglichkeiten auszutesten. Die Erwartungen bezüglich der potenziellen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten können jedoch nur dann erfüllt werden, wenn Stammzellen gefunden werden, die das nötige Potenzial aufweisen und so den gewünschten Heilungseffekt ermöglichen.

1.1 Definition und Abgrenzung der Stammzelle

Stammzellen sind Zellen, die noch nicht differenziert sind und somit ein Teilungs- und Entwicklungspotenzial besitzen. Es wird davon ausgegangen, dass das Differenzierungspotenzial mit fortschreitender Spezialisierung abnimmt. Stammzellen vermögen sich selbst zu vermehren oder in verschiedene Zelltypen eines Organs, eines Keimblattes oder verschiedener Keimblätter zu differenzieren. Je nach Potenzial der Differenzierung spricht man von oligopotenten, multipotenten, pluripotenten oder totipotenten Zellen. Totipotent sind Zellen, aus denen ein komplettes Lebewesen bzw. alle Zelltypen gebildet werden können, wie die Zygote oder auch die einzelnen Zellen des 4- bis 8-Zellstadiums. Pluripotent sind Zellen, die nahezu alle Zelltypen aller drei Keimblätter bilden können, wie die embryonale Stammzelle. Multipotente Zellen können verschiedene Zelltypen eines Gewebes bilden. Oligopotent sind Zellen, die nur noch in wenige Zelltypen eines Gewebes differenzieren können.

Die differenzierten Zellen werden nach ihrer entwicklungsbiologischen Herkunft gegliedert. Aus dem inneren (Endoderm), mittleren (Mesoderm) und äußeren (Ektoderm) Keimblatt entwickeln sich unterschiedliche Zelltypen (Abb. 1-1).

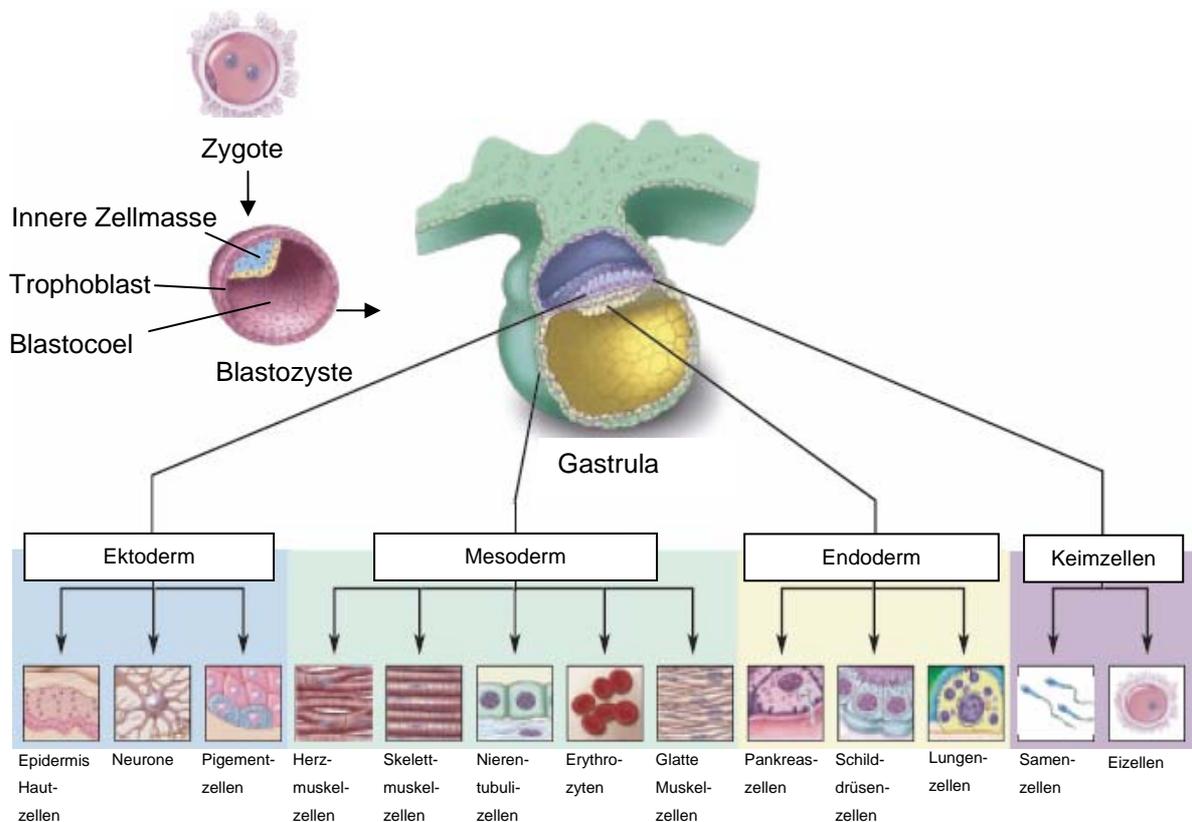


Abb. 1-1 Differenzierung der Keimblätter zu verschiedenen Zelltypen (aus: NIH Stem cell report, modifiziert)

Stammzellen können aus verschiedenen Geweben von Lebewesen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gewonnen werden. Man unterscheidet bisher zwei Stammzelltypen, die embryonalen und die adulten Stammzellen.

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESC) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen (Abb. 1-1). Die ersten embryonalen Stammzellen wurden aus der Maus-Blastozyste isoliert (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981), 17 Jahre später gelang es Forschern, die ersten humanen embryonalen Stammzellen zu gewinnen (Thomson et al., 1998). ESC zeichnen sich durch die Expression von bestimmten Markern aus wie zum Beispiel die Alkalische Phosphatase, Nanog, *octamer-binding transcription factor (Oct)-4*, *SRY related HMG BOX gene (Sox)-2*, *stage-specific embryonic antigen (SSEA)-3*, *SSEA-4*, *tumor rejection antigen (TRA)-1-60* oder *TRA-1-81*, wobei sich die Stammzellen der Maus und des Menschen in einigen Markern unterscheiden. Werden ESC in einer *hanging drop*-Kultur herangezogen, bilden sich kleine Zellaggregate aus, die so genannten *embryoid bodies* (EB), in denen die Zellen zu Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren (Wobus et al., 1984; Itskovitz-Eldor et al., 2000).

Die Pluripotenz und scheinbar uneingeschränkte Vermehrbarkeit machte die Zellen als ideale Rohstofflieferanten für Transplantationen und Gewebeentwicklung interessant. Daher beschäftigten sich in den letzten Jahren zahlreiche Forscher mit der Erstellung von Protokollen für die Differenzierung *in vitro* der embryonalen Stammzellen in therapeutisch relevante Zellpopulationen wie Insulin-produzierende Zellen (Soria et al., 2001), hämatopoetische Zellen (Wiles und Keller, 1991), Endothelzellen (Lumelsky et al., 2001), neurale Zellen (Brüstle et al., 1999), Leberzellen (Fair et al., 2003) oder Skelett- und Herzmuskelzellen (Klug et al., 1996). Jedoch zeigte sich, dass das große Differenzierungspotenzial ein hohes Risiko für Entartungen birgt. Unabhängig davon, ob undifferenzierte (Thomson et al., 1998) oder vordifferenzierte embryonale Stammzellen transplantiert wurden (Fujikawa et al., 2005), konnte Teratombildung beobachtet werden. Dies ist ein biologischer Aspekt, der bei einem therapeutischen Einsatz ausgeschlossen werden muss.

1.1.2 Adulte Stammzellen

Die adulten Stammzellen können sich, ebenso wie die embryonalen Stammzellen, selbst erneuern und zu anderen Zelltypen differenzieren. Eine Schwierigkeit bei der Klassifizierung der Stammzellen ist, die Gewebe-Stammzellen von Vorläuferzellen zu unterscheiden. Daher wird stetig nach Markern gesucht, die stammzellspezifisch exprimiert werden. Adulte Stammzellen werden zur Zeit pragmatisch in verschiedene Kategorien unterteilt. Ontogenetisch unterscheidet man fötale, neonatale und adulte Stammzellen. Gleichzeitig werden die Stammzellen nach ihrem Differenzierungspotenzial unterschieden. So stehen entwicklungsbiologisch die primordialen Keimzellen am Anfang. Sie werden aus fünf bis neun Wochen alten abgetriebenen Föten isoliert und sind, wie die ESC, pluripotent (Shamblott et al., 1998). Da diese Stammzellen keine ESC sind und doch nicht als adult gelten können, nehmen sie eine Zwischenstellung ein. An diesem Beispiel wird deutlich, wie schwierig es ist, Stammzellen gegeneinander abzugrenzen.

Historisch wurden die blutbildenden Stammzellen, die hämatopoetischen Stammzellen (HSC), am frühesten entdeckt. Bereits 1906 postulierte Maximow die Existenz einer adulten multipotenten hämatopoetischen Stammzelle (Maximow, 1906), und 1964 wurde die Vermutung bestätigt (Lewis und Trobaugh, 1964). Die hämatopoetischen Stammzellen werden gegen so genannte mesenchymale Stammzellen (MSC) abgegrenzt. Aus dem Mesenchym, dem embryonalen Bindegewebe, entstehen unter anderem die verschiedenen Blutzellen; demnach sind hämatopoetische Stammzellen ontogenetisch Abkömmlinge frühester mesenchymaler Stammzellen. Auch dieses Beispiel verdeutlicht die Schwierigkeit der Abgrenzung.

Inzwischen wurden adulte Stammzellen in zahlreichen Geweben, wie dem Darm (Bach et al., 2000), dem Gehirn (McKay, 1997), dem Herz (Messina et al., 2004), der Leber (Herrera et al., 2006) und der Retina (Coles et al., 2004) gefunden.

1.1.2.1 Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Vorläufer- und Stammzellen (HSC) werden aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut oder dem Nabelschnurblut gewonnen. Die Zellen exprimieren die Oberflächenantigene CD34 (CD, *cluster of differentiation*) und Thy1 (*thymidylate synthase complementing protein 1*). CD38 hingegen wird nicht oder kaum exprimiert (Baum et al., 1992). HSC können bei Mäusen das gesamte

blutbildende System regenerieren (Becker et al., 1963) und ebenso *in vitro* in die verschiedenen Zelltypen des Blutes differenzieren (Spangrude et al., 1991). Außerdem wurde gezeigt, dass sie *in vivo* zu neuronalen Zellen (Mezey et al., 2000), Epithelzellen (Krause et al., 2001) und Hepatozyten (Lagasse et al., 2000) differenzieren können. Beim Menschen konnte bei Empfängern einer Knochenmarktransplantation durch eine Leberbiopsie eine Differenzierung zu Hepatozyten nachgewiesen werden (Theise et al., 2000). HSC werden vor allem eingesetzt, um Leukämien, Lymphome oder Anämien zu therapieren.

1.1.2.2 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC) werden klassischerweise ebenfalls aus dem Knochenmark gewonnen. Sie exprimieren im Gegensatz zu HSC weder das Oberflächenantigen CD45 noch CD34. Durch verschiedene Faktoren kann *in vitro* wie *in vivo* die Knochen- und Knorpelbildung induziert werden (Pittenger et al., 1999). Es konnte ebenso eine Differenzierung zu Neuronen und Astrozyten *in vivo* (Eglitis und Mezey, 1997) und *in vitro* (Sanchez-Ramos et al., 2000) beobachtet werden. *In vivo* konnte außerdem im Verletzungsmodell eine Differenzierung zu Skelettmuskel (Ferrari et al., 1998) und Hepatozyten (Petersen et al., 1999) nachgewiesen werden.

1.1.2.3 Neurale Stammzellen

Neurale Stammzellen werden aus dem Gehirn isoliert und sind durch das Oberflächenantigen CD133 gekennzeichnet. Sie differenzieren *in vitro* zu Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten (Doetsch et al., 1999) und *in vivo* zu hämatopoetischen Zellen (Bjornson et al., 1999) und zu anderen Zelltypen aller drei Keimblätter (Clarke et al., 2000).

1.1.3 Neonatale Stammzellen: Stammzellen aus dem Nabelschnurblut

Stammzellen aus dem Nabelschnurblut sind neonatale Stammzellen und werden weltweit therapeutisch als Alternative zu Knochenmarkstammzellen eingesetzt; dies geschah zum ersten Mal 1988 in Frankreich. Bis Ende 2004 kamen ca. 5000-6000 Mal Nabelschnurblut-Stammzellen bei Transplantationen zum Einsatz (Kögler et al., 2004; Steinbrook, 2005).

Die Herstellung von Nabelschnurpräparaten bedarf einer Herstellungserlaubnis nach §13 des Arzneimittelgesetzes (AMG). Im Falle einer allogenen Nabelschnurblutbank muss vom Paul-Ehrlich-Institut eine Arzneimittelzulassung erteilt werden. Der

Verwendung des Nabelschnurrestblutes muss die Mutter zustimmen. Zu Forschungszwecken wird nur Nabelschnurrestblut verwendet, das nicht der Richtlinie zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut der Bundesärztekammer entspricht.

Bisher wurden bei Transplantationen die hämatopoetischen Stammzellen des Nabelschnurblutes verwendet. Jedoch scheinen im Nabelschnurblut noch weitere Stammzellen für einen möglichen therapeutischen Einsatz zu existieren.

Endotheliale Vorläuferzellen, die weder den Oberflächenmarker CD34 noch CD14 tragen, sind ebenfalls im Nabelschnurblut vorhanden (Murga et al., 2004). Außerdem gibt es eine multipotente mesenchymale Stammzelle, die nicht nur in Knochen-, Knorpel- und Fettzellen, sondern auch in neuroglia- und hepatozytenartige Zellen differenzieren kann (Lee et al., 2004).

Des Weiteren wurde eine adhärente, undifferenzierte Zellpopulation im Nabelschnurblut nachgewiesen, die Zellen dieser Population wurden als unrestringierte somatische Stammzellen (*unrestricted somatic stem cells*, USSC) bezeichnet (Kögler et al., 2004). Diese USSC lassen sich in mesodermale, ektodermale und endodermale Zellen differenzieren. Unter geeigneten Kulturbedingungen können diese pluripotenten neonatalen Stammzellen über mehr als 20 Passagen ohne Verlust ihrer Pluripotenz vermehrt werden. Die Regenerationsfähigkeit der USSC in Knochen wurde mit kritischen Knochendefekten im Femur athymischer Harlan-Nacktratten nachgewiesen, die nach zwölf Wochen analysiert wurden. Die neuronale Differenzierung wurde drei Monate nach der Transplantation von USSC in Wistarratten untersucht. Für die Differenzierung der USSC zu Kardiomyozyten, Purkinjezellen und Hepatozyten wurde das fötale Schafmodell genutzt. Die präimmunen Schafföten waren zum Zeitpunkt der Transplantation 56-60 Tage alt, analysiert wurden sie acht bzw. vierzehn Monate später (Kögler et al., 2004). Um die Untersuchung des therapeutischen Potenzials zu beschleunigen wäre es von Vorteil, ein Modell zu finden, das diese Differenzierungsfragen in einem kürzeren Zeitraum beantwortet.

1.2 Das Huhn-Modell in der Entwicklungsbiologie

Die Entwicklungsbiologie beschäftigt sich mit der Entstehung von Organismen und den darin involvierten Prozessen. Im Bereich der Embryologie werden die Prozesse untersucht, die zwischen der Befruchtung und der Geburt stattfinden. Anatomische, experimentelle und genetische Untersuchungen dienen dem Verständnis, wie Zellen differenzieren und wie sie kommunizieren, um funktionelle Gewebe und Organe zu bilden.

Es gibt verschiedene Tiermodelle, die zur Untersuchung von Genen dienen oder zur Klärung von molekularen und biochemischen Grundlagen bestimmter Krankheiten herangezogen werden können. So sind klassische Modelle der Entwicklungsbiologie die Taufliege (*Drosophila melanogaster*), der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), das Huhn (*Gallus gallus*) und die Säugetiere Maus (*Mus musculus*) und Ratte (*Rattus norvegicus*). Als Tiermodelle für Erkrankungen werden speziellere Tiermodelle wie die NOD (*non obese diabetic*)-Maus und die SH (*spontaneous hypertension*)-Ratte verwendet.

Die ersten detaillierten Beschreibungen über die Entwicklung des Hühnerembryos wurden im 16. Jahrhundert veröffentlicht. Die beschreibenden Analysen von damals kombiniert mit der experimentellen Embryologie der Neuzeit geben ein detailliertes Bild des Hühnersystems und der Organentwicklung.

Das Hühnermodell bietet einen klaren Vorteil gegenüber anderen Modellen. Der Embryo ist durch seine leichte Zugänglichkeit während seiner gesamten Entwicklungszeit hervorragend zu beobachten und bietet sich für mikrochirurgische Eingriffe an. Hinzu kommt, dass die entwicklungsbiologischen Stadien vor (Eyal-Giladi und Kochav, 1976) und nach der Gastrulation (Hamburger und Hamilton, 1951) gut charakterisiert sind. Hamburger und Hamilton (HH) teilten die Entwicklung von der Eiablage bis zum Schlüpfen nach morphologischen Kriterien in 46 Stadien ein. Zunächst dient die Somitenentwicklung und anschließend dient die Entwicklung der Extremitäten der Orientierung. Eyal-Giladi und Kochav (EK) teilten später die Entwicklung von der Furchung bis zur Gastrulation, die bei HH nur vier Stadien ausmacht, in 14 Stadien ein und nummerierten diese mit römischen Ziffern. Dabei orientierten sie sich zunächst am Aussehen des Blastoderms und anschließend an der Bildung des Primitivstreifens.

Das Huhn-Modell wird zur Untersuchung des Zellschicksals, des Differenzierungspotenzials von Zellen und zur Untersuchung von Tumoren eingesetzt.

- 1) Untersuchung des Zellschicksals: Zellen aus Wachtelembryonen der EK-Stadien XI-XIII wurden mittig oder auch posterior in Hühnerembryonen im EK-Stadium XI-2 injiziert, und nach sechs Tagen wurde die Lokalisation der Zellen analysiert. Bei einer mittigen Injektion in den EK-Stadien XI-XIII konnten die Zellen in anterioren ektodermalen und endodermalen Geweben wieder gefunden werden, bei mittigen und posterioren Injektionen in die Stadien EK XIV-HH 2 verteilten sich die Zellen in posteriore ekto-, endo- und mesodermale Gewebe (Watanabe et al., 1992). Es wurden Somiten von Hühnerembryonen im HH-Stadium 14-15 durch Somiten von Wachtelembryonen des gleichen Stadiums ersetzt, um den Aufbau der Somiten zu untersuchen (Ordahl und Le Douarin, 1992). Zum gleichen Zweck wurden auch Somiten aus den neun Tage alten Mausembryonen in zwei Tage alte Hühnerembryonen transplantiert (Fontaine-Perus et al., 1995).
- 2) Untersuchung des allgemeinen Differenzierungspotenzials verschiedener Zellen: Die Injektion adulter muriner neurale Stammzellen in die Amnionhöhle von Embryonen im HH-Stadium 4 zeigte, dass diese im Hühnerembryo in mesodermale, ektodermale und endodermale Zellen differenzieren können (Clarke et al., 2000). Adulte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark von Ratten wurden in 1,5-2 Tage alte Hühnerembryonen eingebracht, indem die letzten 2-3 gebildeten Somiten zerstört oder auch entfernt wurden und stattdessen die Stammzellen eingepflanzt wurden. Die Zellen fügten sich in unterschiedliche Gewebe wie Gehirn, Herz, Leber und Rückenmark ein und exprimierten zum Teil die schwere Myosinkette α und Cardiotin (Pochampally et al., 2004). Adulte Stammzellen aus der Dermis (*skin derived precursor cells*, SKP) von Ratte oder Maus, die sowohl in neonatalen als auch in adulten Tieren zu finden sind und von den Eigenschaften den embryonalen Neuralleisten-Stammzellen ähneln, können nach Injektion zwischen zwei Somiten zu neuronalen und mesodermalen Zellen differenzieren (Fernandes et al., 2004). Auch humane embryonale Stammzellen können im Hühnerembryo überleben und in das Wirtsgewebe integrieren (Goldstein et al., 2002).

- 3) Untersuchung eines speziellen Differenzierungsvermögens: Humane retinale Progenitorzellen wurden in den Glaskörper von 3,5-4 Tage alten Hühnerembryonen injiziert. Sie migrierten in die Ganglion-Zellschicht und die innere Körnerschicht und differenzierten zu Retina-typischen Zellen wie Ganglionzellen und Horizontalzellen (Coles et al., 2004). Bei HSC, die an ein läsioniertes Neuralrohr transplantiert wurden, konnte eine Differenzierung zu neuronalen Zellen nachgewiesen werden (Sigurjonsson et al., 2005).
- 4) Modell zur Untersuchung von Tumoren: Humane Glioma-Zelllinien wurden in die Gehirne fünf Tage alter Hühnerembryonen injiziert, um das Wachstum der Tumore, die Gefäßbildung und die Invasion zu untersuchen (Cretu et al., 2005). Die Chorioallantoismembran bietet einen zusätzlichen Bereich, in dem Tumorpheriferation und Apoptose der Tumorzellen durch Zugabe von Pharmazeutika getestet werden können, ohne den Embryo manipulieren zu müssen (Kunzi-Rapp et al., 2001).

Diese Untersuchungen zeigen, dass das Hühnerembryo-Modell das Potenzial bietet, Stammzellen in kurzer Zeit zu analysieren.

Zahlreiche entwicklungsbiologische Schritte sind Spezies-spezifisch, die zellulären und molekularen Ereignisse, die die frühe Herzentwicklung steuern, sind jedoch unter Wirbeltieren und sogar bei Nicht-Wirbeltieren konserviert (Srivastava und Olson, 2000). Daher können Ergebnisse bezüglich der Herzentwicklung, die in Hühnerembryonen untersucht wurden, auch auf andere Spezies übertragen werden.

1.3 Überblick über die Huhnentwicklung

Die Entwicklung des Hühnerembryos bis zum Schlüpfen des Huhns unterteilt sich in verschiedene Schritte. Im Folgenden wird auf die Furchung, die Gastrulation, die Somitogenese und die Herzentwicklung näher eingegangen.

1.3.1 Furchung

Die Furchung findet bereits statt, während sich die Zygote noch im Eileiter befindet. Die Furchungsteilung ist eine Abschnürung von Zellen. Durch diese wird lediglich die Zellzahl erhöht, jedoch nicht die Größe des Komplexes verändert. Beim Hühnerembryo bilden ca. 60000 Blastomere die Keimscheibe, die sich morphologisch in die *Area pellucida* und die *Area opaca* unterteilen lässt. Sie besteht aus einer Zellschicht, dem Epiblast, der am Rand in Verbindung mit dem Dotter steht und in der Mitte einen dotterfreien Raum überspannt. Zellen des Epiblasten gruppieren sich zu Zellclustern, die als primärer Hypoblast bezeichnet werden. Einige Zellen migrieren von anterior nach posterior an den Rand des Blastoderms (Kollersche Sichel), um den sekundären Hypoblasten auszubilden. Das Blastoderm besteht zu diesem Zeitpunkt aus dem Epiblasten und dem sekundären Hypoblasten. Der Zwischenraum wird als Blastocoel bezeichnet (Abb. 1-2, A).

1.3.2 Gastrulation

Durch die Gastrulation bilden sich die drei Keimblätter aus. Aus dem Epiblasten entstehen alle drei Keimblätter und Teile der extraembryonalen Membran. Aus dem Hypoblasten entstehen nur extraembryonale Membranen, jedoch keine Gewebe des Embryos (Lemaire und Kessel, 1997). Der Primitivstreifen ist das Hauptcharakteristikum der Gastrulation und entsteht ca. drei Stunden nach der Eiablage. Er erscheint erst als eine Verdickung am posterioren Ende des entstehenden Embryos und wird aus Zellen der lateralen Region des posterioren Epiblasten gebildet (Eyal-Giladi et al., 1992). Der Primitivstreifen verlängert sich in anteriorer Richtung und erreicht seine maximale Länge im HH-Stadium 4; es bildet sich der Primitivgraben aus. Am anterioren Ende des Primitivstreifens gibt es eine Verdickung, die Hensenscher Knoten genannt wird. Durch den Hensenschen Knoten und den Primitivgraben wandern Zellen in das Blastocoel ein und bilden das Mesoderm und Endoderm. Die verbleibenden Zellen des Epiblasten bilden das Ektoderm (Abb. 1-2, B).

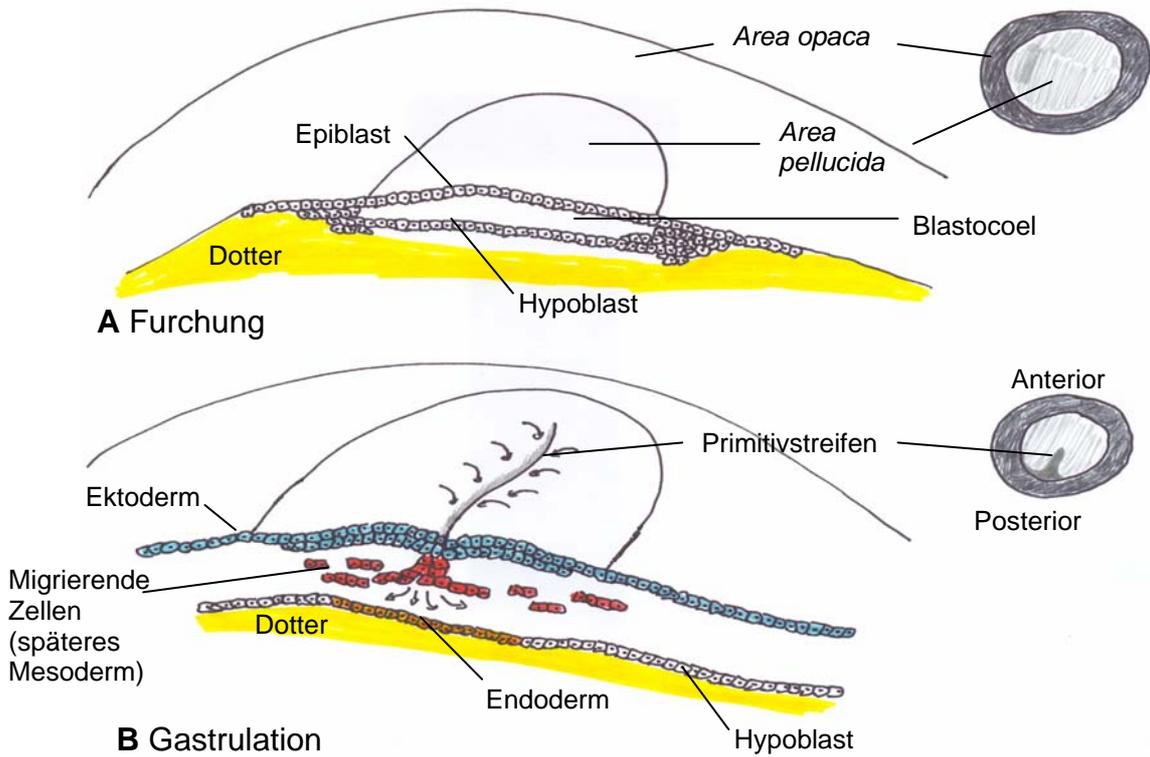


Abb. 1-2 Furchung (A) und Gastrulation (B) beim Hühnerembryo. In der Abbildung A wird das Blastoderm nach der Furchung dargestellt, bestehend aus dem Epiblasten und dem sekundären Hypoblasten. Während der Gastrulation bildet sich durch die Migration von Zellen durch den Primitivgraben das Mesoderm und das Endoderm aus (B).

Das Mesoderm besteht aus vier Kompartimenten, dem axialen, paraxialen, intermediären und Seitenplattenmesoderm (Abb. 1-3). Die *Chorda dorsalis* entsteht aus dem axialen Mesoderm, aus dem intermediären Mesoderm stammen die Zellen des Urogenitaltrakts, das paraxiale Mesoderm bildet die Somiten. Das Seitenplattenmesoderm differenziert zu verschiedenen Geweben wie der glatten Muskulatur des Verdauungstrakts und Herzmuskelgewebe (Christ und Ordahl, 1995).

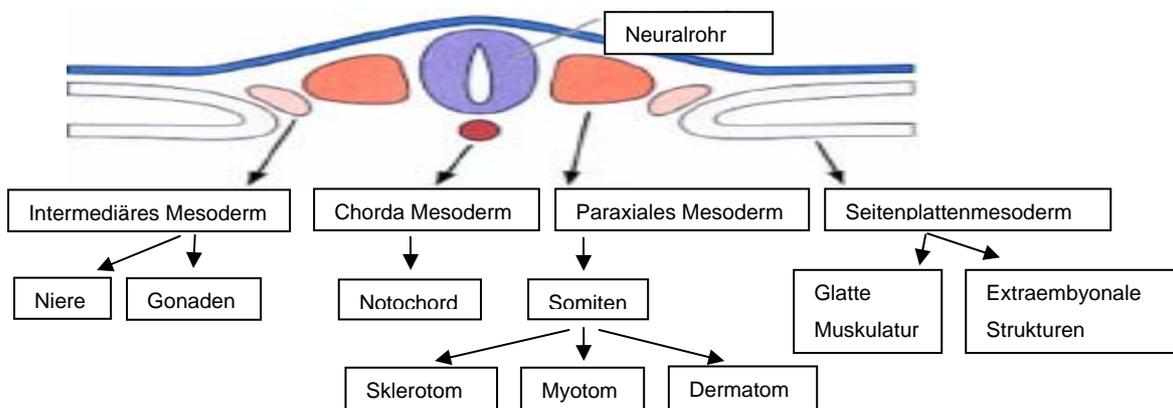


Abb. 1-3 Die Kompartimente des Mesoderms und Gewebe, die aus ihnen entstehen.

1.3.3 Somitogenese

Nachdem der Primitivstreifen sich komplett ausgebildet hat, wandert der Hensensche Knoten in die posteriore Richtung, wobei die Kopffalte und die *Chorda dorsalis* gebildet werden. Zu beiden Seiten der *Chorda dorsalis* ist das paraxiale Mesoderm lokalisiert. Die Somitogenese findet in drei Schritten statt: Der Vorsegmentierungsperiode folgt die eigentliche Somitenbildung und die Somitenreifung.

Während der Vorsegmentierungsperiode wird die Somitengröße festgelegt, und Zellbereiche werden sowohl regional spezifiziert, wobei thorakale und zervikale Bereiche abgegrenzt werden, als auch polarisiert, da der spätere Somit eine anteriore und eine posteriore Hälfte besitzen wird (Stern et al., 1988). Die Somitenbildung schließt sich an. Während dieser Periode unterscheidet man die bereits ausgebildeten Somiten vom unsegmentierten Bereich (Segmentplatte). Nach der Bildung der Somiten folgt die Reifung. Zellen spezifizieren sich und teilen den Somit in verschiedene Bereiche (Gossler und Hrabe de Angelis, 1998; Christ et al., 2004). In der Abbildung 1-4 sind die verschiedenen Bereiche eines reifen Somiten dargestellt.

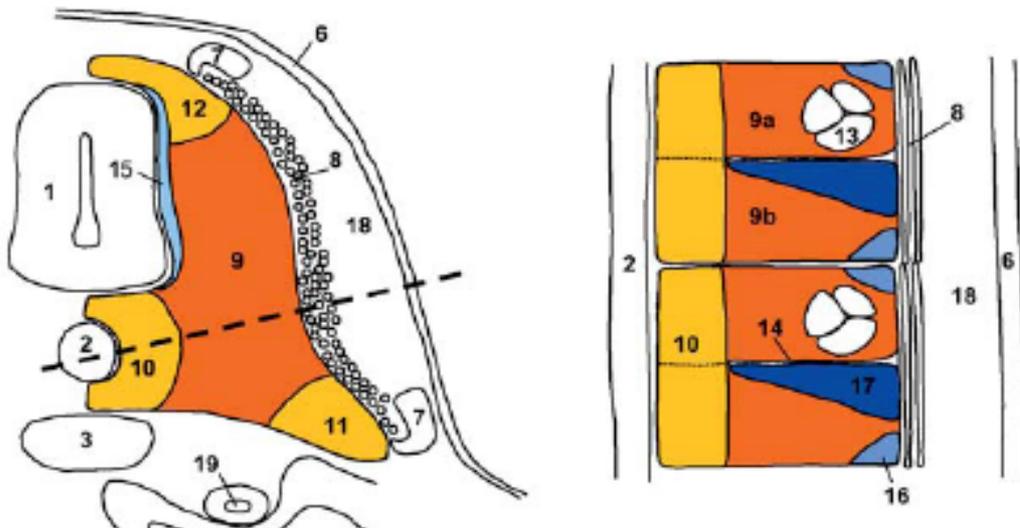


Abb. 1-4 Schematische Darstellung eines transversalen (links) und longitudinalen (rechts) Schnitts durch die reifen Somiten eines Hühnerembryos. 1 Neuralrohr, 2 Neuralleiste, 3 Aorta, 6 Oberflächen-Ektoderm, 7 Dermomyotom, 8 Myotome, 9 zentrales Sklerotom, 9a kraniale Hälfte des zentralen Sklerotoms, 9b kaudale Hälfte des zentralen Sklerotoms, 10 ventrales Sklerotom, 11 laterales Sklerotom, 12 dorsales Sklerotom, 13 Spinalnerv, 14 Ebners Fissur, 15 Meningotom, 16 Syndetom, 17 Somitocoelzellen/Arthrotome, 18 Dermis, 19 Wolffian Duktus. Aus Christ et al., 2004.

1.3.4 Entwicklung des Herzens

Das erste Organ, das sich bei Vertebraten ausbildet, ist das Herz. Während der Gastrulation dringen herzbildende Zellen entlang einer breiten Region des Primitivstreifens posterior zum Hensenschen Knoten ein. Die Zellen wandern zum anterioren Seitenplattenmesoderm, das sich beidseitig des Primitivstreifens befindet, um das kardiale Mesoderm zu bilden. Die beidseitigen kardialen Regionen verdichten sich zu halbmondförmigen Zellgebilden (Abb. 1-5, A), die schließlich an der ventralen Mittellinie zusammen wachsen (Abb. 1-5, B) und einen Herzschlauch im HH-Stadium 10 bilden.

Der Herzschlauch besteht aus dem äußeren Myokard und dem inneren Endokard. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Kontraktion. Myokard und Endokard werden durch eine dicke, extrazelluläre Matrix (Herzgalerte) getrennt. Die endokardialen Vorläufer entstammen ebenfalls dem Seitenplattenmesoderm. Der Herzschlauch ist bereits (Abb. 1-5, C, D) von anterior nach posterior in den Konotrunkus, den zukünftigen rechten und linken Ventrikel und die zukünftigen Vorhöfe gegliedert (Olson und Srivastava, 1996) (Abb. 1-5, C und D).

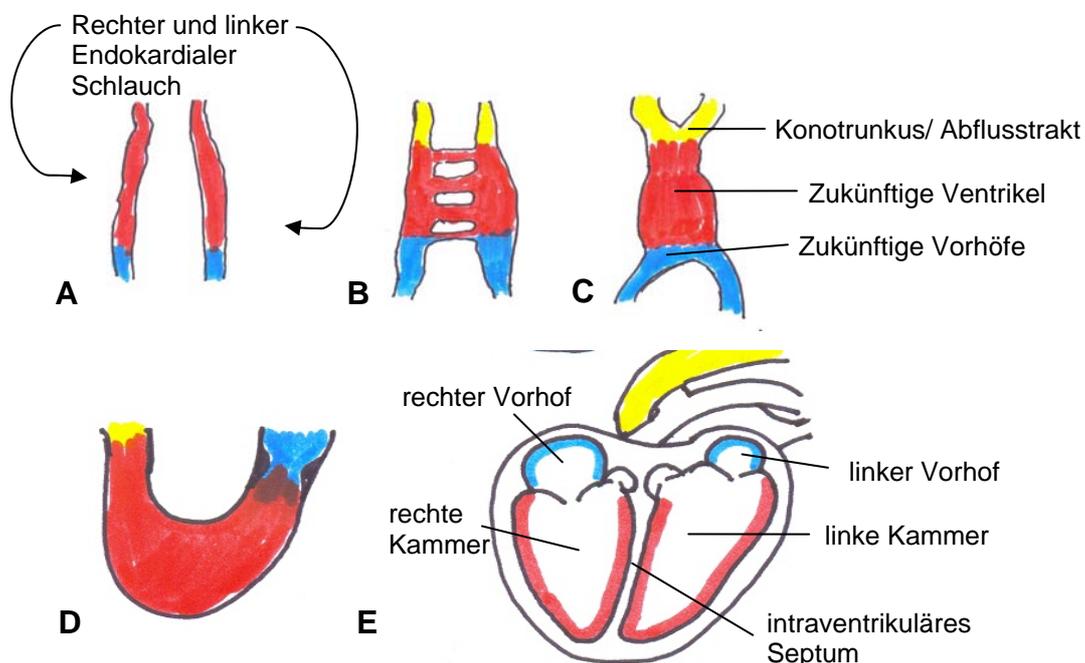


Abb. 1-5 Entwicklung des Herzens. Die beiden Endokardialen Schläuche (A) wachsen zusammen (B) und bilden einen Herzschlauch (C), der bereits in die Bereiche Konotrunkus/Abflusstrakt, zukünftige Ventrikel und Vorhöfe gegliedert ist. Dieser Herzschlauch beginnt im HH-Stadium 10 (D) mit dem Looping, es bildet sich langsam das Herz in seiner endgültigen morphologischen Form aus (E).

Im HH-Stadium 10 beginnt der Herzschlauch mit dem *Looping*. Während dieses Prozesses werden die Positionen der Kammern und der Gefäßverbindungen durch die Rechtsdrehung des Herzschlauchs festgelegt.

Bis zu diesem Stadium werden die metabolischen Prozesse des Myokards über Diffusion geregelt. Mit zunehmender Dicke der Kammerwände wird die Herzgallerte durch ein Trabekelnetzwerk ersetzt, durch das Blut durch das Myokard fließen kann. Zwischenwände bilden sich zwischen den Vorhöfen und den Ventrikeln, das Endokardkissen und die Klappen entwickeln sich, die Zellen des Erregungsleitungssystems spezialisieren sich und die epikardiale Schicht wird gebildet. Das Herz hat nun seine endgültige Form (Abb. 1-5, E).

1.3.4.1 Bereiche, die an der Herzentwicklung beteiligt sind

Das Herz besteht aus fünf Segmenten, die vom HH-Stadium 9-22 ausgebildet werden: der zukünftige rechte und linke Ventrikel, der atrioventrikuläre Kanal, die Vorhöfe und der Ausflusstrakt (Konotrunkus). Es wurden zwei Bereiche identifiziert, die an der Herzentstehung beteiligt sind.

Primäres Herzfeld: kardiogenes Mesoderm

Das primäre Herzfeld ist das bilaterale kardiogene Mesoderm (Abb. 1-6), dessen Zellen sich in den ersten vier Segmenten des geloopten Herzens wieder finden. Die ersten kardialen Progenitoren konnten im posterioren Epiblasten vor der Gastrulation gefunden werden (Hatada und Stern, 1994). Zu Beginn der Gastrulation lokalisieren sie sich zur Mitte hin und erscheinen nach der Gastrulation in der anterioren Hälfte des Primitivstreifens. Lange Zeit war es ungeklärt, wohin die Zellen migrieren, nachdem sie den Primitivstreifen verlassen haben. Eine Untersuchung mit fluoreszierenden Zellen gab Aufschluss darüber (Redkar et al., 2001). Die herzbildenden Zellen migrierten anterio-lateral des Primitivstreifens.

Das primäre Herzfeld befindet sich im HH-Stadium 4 in einer Distanz von ca. 0,3 mm vom Primitivgraben, anterior knapp über dem Hensenschen Knoten, posterior nimmt die Region ca. $\frac{1}{4}$ der Länge des Primitivstreifens ein und lateral grenzt sie fast an die *Area opaca/Area pellucida*.

Die komplette Ablation des primären Herzfeldes bewirkt das Fehlen aller Herzsegmente mit Ausnahme des Ausflusstrakts (Waldo et al., 2001).

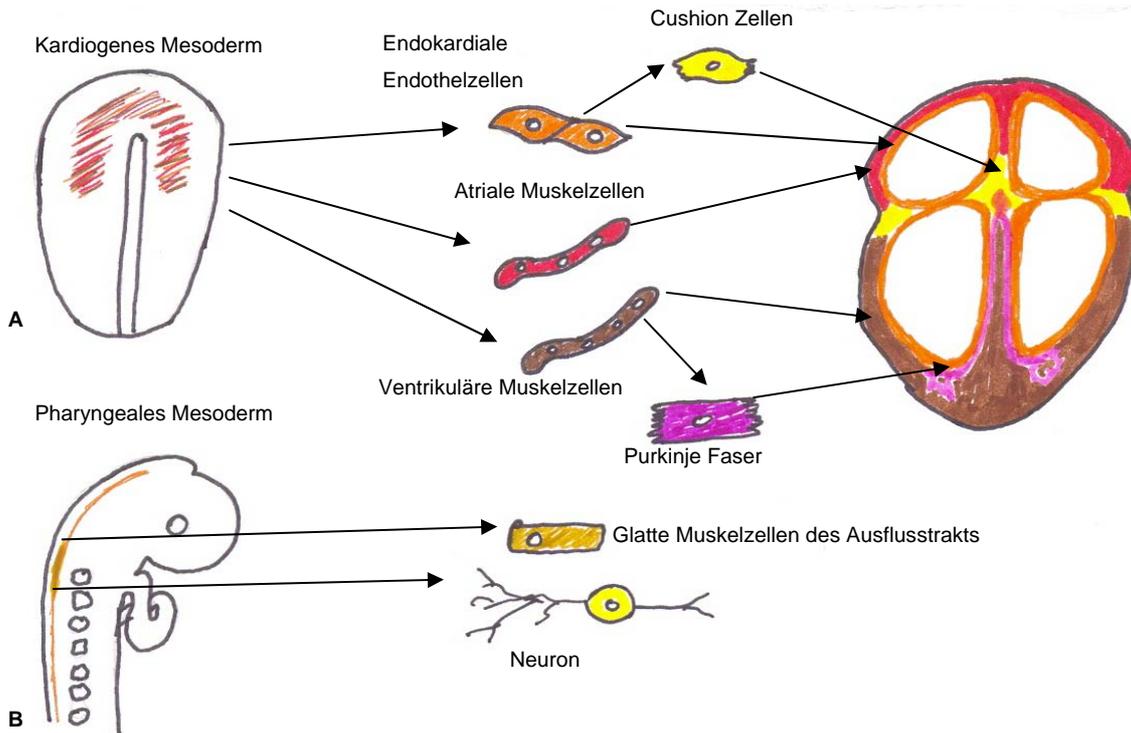


Abb. 1-6 Es gibt zwei Bereiche des Embryos, die zellulär an der Herzentwicklung beteiligt sind. Aus dem Bereich des kardiogenen Mesoderms (A) entwickeln sich die Cushion Zellen, die endokardialen Endothelzellen, die atrialen und ventrikulären Muskelzellen und die Purkinje Fasern. Der Bereich des pharyngealen Mesoderms (B) steuert die glatten Muskelzellen des Ausflusstrakts und Neuronen bei.

Sekundäres Herzfeld: pharyngeales Mesoderm

Der zelluläre Ursprung des Ausflusstrakts war lange unklar. Es wurde ein sekundäres Herzfeld identifiziert, lokalisiert unter dem kaudalen Pharynx (Abb. 1-6, B). Dieser Bereich beherbergt das Myokard des Ausflusstrakts. Die kardialen Neuralleistenzellen entstehen zwischen der Ohrplakode und den dritten Somiten. Sie nehmen an der Bildung des kardialen Ausflusstrakts (Kirby und Waldo, 1990, 1995), der trunkalen Kissen und des membranösen Anteils des intraventrikulären Septums teil (Olson und Srivastava, 1996).

1.3.4.2 Marker für die Herzentwicklung

Es ist nicht vollständig geklärt, welche Signalmoleküle und Gewebeinteraktionen bei multipotenten Vorläuferpopulationen eine kardiale Differenzierung induzieren. Während bekannt ist, dass sich bereits im HH-Stadium 3 kardiale Vorläufer ausbilden (Schultheiss et al., 1995), sind die Quellen dieser initialen Differenzierungssignale unbekannt. Wird das Regulationsgen MyoD in z. B. primären Fibroblasten aktiviert, so können sich die Zellen zu einem Skelettmuskel-Phänotyp entwickeln (McGrew et al., 1999). Für die Herzmuskeldifferenzierung werden mehr Signale und Interaktionen

benötigt. Einige Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle, die Herzentwicklung regulieren sollen, werden im Folgenden beschrieben.

Sowohl der Hypoblast vor der Gastrulation als auch das anterior laterale Plattenendoderm können kardiale Differenzierung induzieren. Die Induktionsmöglichkeiten sind unterschiedlich. Der Hypoblast kann Herzmuskelbildung im Epiblast induzieren. Activin, ein Signalmolekül für TGF- β (transformierender Wachstumsfaktor β), kann den Hypoblast bei der Induktion der Muskelbildung ersetzen (Ladd et al., 1998). Das anteriore Endoderm wird zur Initiation und Aufrechterhaltung der kardialen Genexpression benötigt. Es scheint, als hätten einige Moleküle, die vom Endoderm segregiert werden, die Fähigkeit zur kardialen Induktion (Alsan und Schultheiss, 2002). Die knochen-morphogenetischen Proteine (*bone morphogenetic proteins*, BMP) sind die größte Subfamilie der TGF- β Superfamilie. Durch die Applikation von BMP-2 zur nicht kardiogenen Region im anterioren medialen Mesoderm werden zwei wichtige Gene der Herzentwicklung induziert: Nkx2.5 und GATA bindenden Protein 4 (*GATA binding protein 4*, GATA-4) (Schultheiss et al., 1997). Allerdings ist es BMP-2 alleine nicht möglich, die Herzbildung im nicht-kardiogenen posterioren Bereich des lateralen Mesoderms zu induzieren. In Kombination mit dem Fibroblasten Wachstumsfaktor 4 (*fibroblast growth factor 4*, FGF-4) gelingt es jedoch, das Gewebe zu Herzmuskel zu differenzieren (Lough et al., 1996). BMP-2 ist auch in der Lage, die FGF-8-Expression regulieren. FGF-8 wird im Endoderm exprimiert, das dem kardialen Mesoderm benachbart ist. Er ist einer der Faktoren, der die Eigenschaft des Endoderms, Herzbildung zu induzieren, vermittelt. Nach dem Entfernen des Endoderms kann die Zugabe von FGF-8 die kardiale Genexpression des Embryos wieder herstellen. Zusätzlich kann die ektopische Expression von FGF-8 in Bereichen, in denen außerdem BMP-2 exprimiert wird, die Expression von Nkx2.5 und Mef2c, einem weiteren kardialen Marker, induziert werden (Alsan und Schultheiss, 2002).

Nkx2.5 wird während der Herzentwicklung exprimiert (Schultheiss et al., 1995). Es ist ein Homeodomäne-Transkriptionsfaktor, dessen Expression das erste Mal im HH-Stadium 5 in Bereichen, die mit dem Herz bildenden Feld überlappen, nachgewiesen wurde. In Verbindung mit dem Serum Response Factor, einem Transkriptionsfaktor, der für die Expression einiger kardialer kontraktile Proteine benötigt wird, kann Nkx2.5 den kardialen α -Aktin Promotor aktivieren (Chen und

Schwartz, 1995). Zusätzlich ist Nkx2.5 in der Lage mit GATA-4 zu interagieren und synergistisch den Promotor für das atriale natriuretische Peptid (ANP) zu aktivieren. ANP ist ein gefäßaktives Hormon, das Nk- und GATA-Faktor-bindende-Elemente besitzt (Durocher et al., 1997).

Die GATA-Familie der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren kooperiert mit Nkx2.5 bei der Aktivierung nachgeschalteter kardialer Gene. GATA-4, -5 und -6 werden zum ersten Mal in den prekardialen Zellen exprimiert, die während der Gastrulation aus dem Primitivstreifen hervorgehen, um sich nach der Gastrulation im primitiven Herzschlauch und dem Seitenplattenmesoderm zu lokalisieren (Laverriere et al., 1994). Die Depletion der Faktoren GATA-4-6 resultiert in einem Unvermögen von Herzmuskelvorläuferzellen, sich an der ventralen Mittellinie zu versammeln, um den Herzschlauch zu bilden. Die Herzmuskeldifferenzierung wird jedoch nicht verändert (Jiang et al., 1998). GATA-Faktoren alleine können nicht die kardiale Genexpression aktivieren, sie bilden mit Nkx2.5 und Mef2 Komplexe zur Aktivierung spezifische Zielgene (Durocher et al., 1997). Funktionell wichtige Bindungsstellen für GATA wurden an Promotoren herzspezifischer Gene wie den Genen für die schwere Myosinkette α (*α -myosin heavy chain*, α -MHC) und β (*β -myosin heavy chain*, β -MHC), das kardiale Troponin C, ANP und BNP (*brain natriuretic peptide*) gefunden (Grepin et al., 1994; Molkentin et al., 1994).

Das ANP wurde als potenzieller Marker für differenziertes Kammermyokard identifiziert, wobei zwischen dem embryonalen und dem Kammermyokard unterschieden werden kann. Erstmals wird die Expression von ANP im HH-Stadium 9+ im ventralen anterioren Bereich des Herzschlauchs beobachtet, später im HH-Stadium 16 exprimieren auch der Zuflussstrakt, das atriale Myokard und das trabekuläre ventrikuläre Myokard diesen Faktor. Da die ANP-Expression ab dem HH-Stadium 28 im kompakten ventrikulären Myokard abnimmt, markiert sie nicht während der gesamten Entwicklung das Kammermyokard. Embryonales Myokard zeigt keine ANP-Expression (Houweling et al., 2002).

Die Aktivierung kardialer muskelfibrillärer Strukturgene beginnt im HH-Stadium 6-7 und markiert die Differenzierung von mesodermalen Zellen zu Herzmuskelzellen (Bisaha und Bader, 1991; Han et al., 1992).

Die Strukturgene Troponin, Tropomyosin, Aktin, die schweren und die leichten Ketten des Myosins, sowie α -Aktinin werden als Marker für die Herzmuskeldifferenzierung genutzt.

Troponin und Tropomyosin sind Bausteine des Aktinfilaments und bilden zusammen mit Myosin den kontraktile Teil der Muskulatur (Abb. 1-7). Es werden drei Troponin-Arten unterschieden: Troponin C, I und T. Troponin C bindet Kalzium, Troponin I bindet Aktin und Troponin T bindet Tropomyosin. Die Anlagerung von Kalzium an das Troponin C verursacht eine Konformationsänderung des heterotrimeren Troponin-Komplexes und dadurch eine Änderung der Lage des Tropomyosins, wodurch die Kontaktstelle zwischen Aktin und Myosin freigegeben wird.

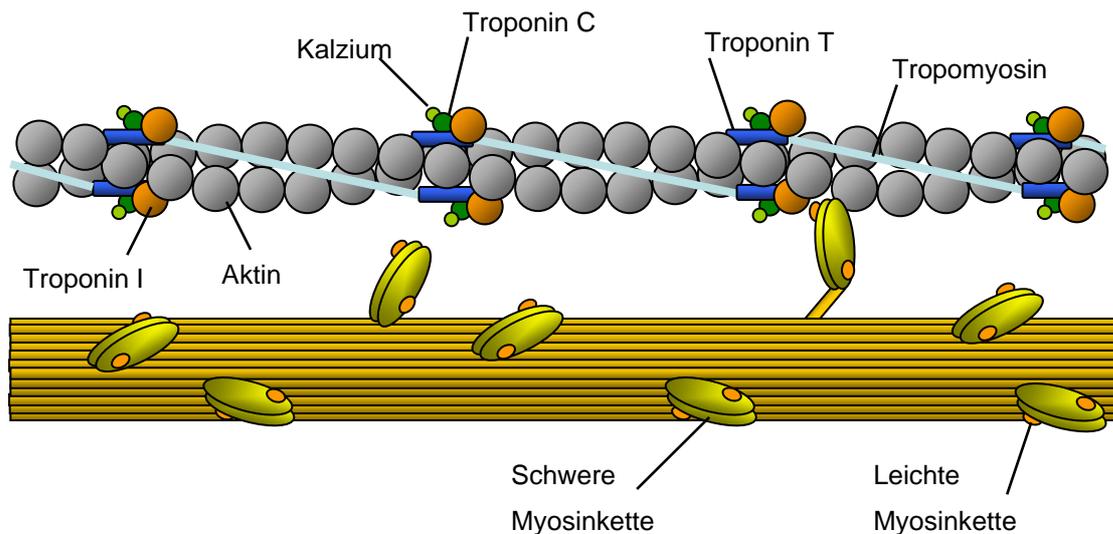


Abb. 1-7 Aufbau des kontraktile Teils der Muskulatur. Die Kontraktion entsteht durch die Wechselwirkung zwischen den Aktinfilamenten und dem Myosin. Die Anlagerung von Calcium an das Troponin C des Troponinkomplexes verursacht eine Konformationsveränderung, wodurch die Kontaktstelle zwischen Aktin und Myosin freigegeben wird.

Das kardiale Troponin I wird am stärksten im Zuflussstrakt exprimiert, die Expression nimmt über die Atrien und die Ventrikel ab und ist am geringsten im Ausflussstrakt. Damit zeigt die Troponin I-Expression einen anterior-posterioren Gradienten. Die Gene α -MHC, der atrialen leichten Myosinkette Typ 1 (*myosin light chain 1a*, MLC1a) und Typ 2 (*myosin light chain 2a*, MLC2a) werden am stärksten in den Atrien, aber auch im atrioventrikulären Kanal und dem Zuflussstrakt exprimiert. Die Gene β -MHC, der ventrikulären leichten Myosinkette Typ 1 (*myosin light chain 1v*, MLC1v) und Typ 2 (*myosin light chain 2v*, MLC2v) werden vor allem in den Ventrikeln, aber auch im atrioventrikulären Kanal und dem Ausflussstrakt exprimiert. Jedoch gibt es im primären Myokard eine Koexpression atrialer und ventrikulärer Gene in den Bereichen des Aus- und Zuflusstrakts sowie im atrioventrikulären Kanal (Franco et al., 1999).

1.4 Differenzierung von Stammzellen zu Herzmuskelzellen

Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen differenzieren bereits in den EB in Herzmuskelzellen und andere Zelltypen. Allerdings ist die Frequenz der Differenzierung sehr gering. Die existierenden Protokolle dienen daher vorrangig der Erhöhung der Anzahl an Zellen, die zu Herzmuskelzellen differenzieren. Bei murinen ESC konnte dies durch die Zugabe von Cardiogenol C (Wu et al., 2004), Ascorbinsäure (Takahashi et al., 2003), Dimethylsulfoxid (Paquin et al., 2002), Retinsäure (Rohwedel et al., 1999) oder Oxytocin (Paquin et al., 2002) zum Kulturmedium erreicht werden. Humane ESC hingegen differenzierten weder mit Dimethylsulfoxid (DMSO) noch mit Retinsäure, jedoch durch Zugabe von 5-Aza-2'-deoxycytidin zu Herzmuskelzellen (Xu et al., 2002).

Die Behandlung mit 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-deoxycytidin verursacht eine Verringerung der DNA-Methylierung, indem es in die DNA integriert und anschließend kovalente Bindungen aufbaut.

Cardiogenol C (2-(4-Methoxyanilino)-4-(1-hydroxyethylamino)pyrimidine) und Ascorbinsäure wurden auf der Suche nach Substanzen gefunden, die Differenzierungen induzieren können. Die genauen Mechanismen sind noch nicht bekannt, es kann nur bestätigt werden, dass die Wirkung von Ascorbinsäure nicht durch die antioxidativen Eigenschaften vermittelt wird (Takahashi et al., 2003).

DMSO ist eine Chemikalie, die unter anderem zum Schutz der Zelle beim Einfrieren genutzt wird. Es wird diskutiert, ob die durch DMSO induzierte Ca^{2+} -Freisetzung eine Rolle bei der Induktion der Herzmuskelzelldifferenzierung spielt.

Es wird vermutet, dass die durch Retinsäure induzierte Differenzierung der Zellen auf der Aktivierung des Oxytocin-Rezeptors beruht. Oxytocin ist ein Wachstumshormon, das im Hypothalamus gebildet wird. Kardiale Oxytocin-Rezeptoren stimulieren die Freisetzung des atrialen natriuretischen Peptids (ANP), welcher in die Regulation des Blutdrucks und des Zellwachstums involviert ist. Retinsäure kann durch Stimulation des Promotors oder durch Bindung an die nukleären Rezeptoren der Steroid-Thyroid-Retinoid-Superfamilie die Expression von Oxytocin induzieren und regulieren.

Adulte Stammzellen

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen vermögen die bisher bekannten adulten Stammzellen nicht, spontan in Herzmuskelzellen zu differenzieren. Allerdings isolierten Forscher aus den Stromazellen des Knochenmarks von Mäusen eine Herzmuskelzelllinie. Immortalisierte Stromazellen wurden durch eine viermonatige Kultivierung isoliert. Die 24 h-Behandlung mit 5'-Azacytidin bewirkte spontane Kontraktionen der Zellen. Eine Änderung in Morphologie und Genexpression ließ vermuten, dass sich ein Muskelphänotyp ausgebildet hat, wie er bei fötalen ventrikulären Herzmuskelzellen zu finden ist (Makino et al., 1999).

Dies konnte auch bei humanen mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks gezeigt werden, allerdings wurden hier die Zellen zusätzlich mit dem basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) behandelt (Xu et al., 2004). Die Familie der fibroblasten Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factor*, FGF) spielt offensichtlich eine Rolle bei der Differenzierung zu Herzmuskelzellen, im speziellen die Faktoren FGF-2, FGF-4 und FGF-8. Sie scheinen in der Kombination mit BMP-2 oder BMP-4 einen synergistischen Effekt auf die Herzmuskelzellendifferenzierung zu haben (Lough et al., 1996).

Ascorbinsäure scheint die Differenzierung zu Herzmuskelzellen unterstützen zu können, da eine Erhöhung der Expression bei verschiedenen kardialen Markern wie dem GATA-4, Nkx2.5, α -MHC, β -MHC und ANP bei Kulturen embryonaler Stammzellen mit Medium, das mit Ascorbinsäure supplementiert wurde, zu beobachten ist (Takahashi et al., 2003).

Außerdem gelang es durch eine Mediumkombination mit Rinderinsulin, humanem Transferrin und Natriumselenit in Verbindung mit Linolsäure, Ascorbinphosphat und Dexamethason einen Herzmuskelphänotyp aus mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks zu gewinnen (Shim et al., 2004).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit eine Differenzierung der unrestringierten somatischen Stammzellen in der biologischen Nische des Hühnerembryos möglich ist. Dabei ging es auf der einen Seite um die Untersuchung des Differenzierungspotenzials der USSC und auf der anderen Seite um die Etablierung eines Tiermodells, das zur schnellen Analyse von Stammzellen dienen kann. Zu diesem Zweck sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Injektionsmethoden etabliert werden und der Status der Differenzierung der injizierten USSC immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Ein weiteres Ziel war, zu analysieren, ob sich USSC in einer *in vitro*-Kultur zu Kardiomyozyten differenzieren lassen. Verschiedene Methoden, wie die Zugabe von Faktoren zum Medium, die Kokultur und die Kultur mit konditioniertem Medium sollten zu einer Differenzierung der USSC führen. Die Differenzierung sollte auf RNA-Ebene und durch den immunhistochemischen Nachweis spezifischer Herzproteine erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung der USSC

2.1.1 Zelllinien

Es wurden die USSC Zelllinien SA 061, SA 325, SA 334, SA 4/10, SA 4/56, SA 4/101, SA 5/03, SA 5/18, SA 5/50, SA 5/60 und SA 5/73 verwendet. Sie wurden von der Düsseldorfer José Carreras Stammzellbank zur Verfügung gestellt. Hierbei steht die Abkürzung SA für eine ehemalige Mitarbeiterin des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, die an der Generierung der USSC-Linien beteiligt war. Die erste Zahl steht für das Jahr, in dem das Nabelschnurblut gewonnen wurde, die zweite stellt die laufende Nummer der generierten Linien des Jahres dar. Die Zelllinien mit nur einer Zahl sind vor dem Jahr 2004 entstanden und besitzen nur eine laufende Nummer.

2.1.2 Kultivierung der USSC

Tab. 2-1 Zusammensetzung des Standard- und Einfriermediums

USSC-Zellkulturmedium (Standardmedium)	DMEM-LG without Glutamin (Cambrex) 30 % FCS (Cambrex) 2 mM L-Glutamin (Cambrex) 100 U/ml Penicillin (Cambrex) 100 µg/ml Streptomycin (Cambrex)
Einfriermedium	DMEM-LG without Glutamin (Cambrex) 30 % FCS (Cambrex) 10 % DMSO (Sigma)

Die adhärent wachsenden USSCs wurden zur Expansion im Standardmedium (Tab. 2-1) auf 25 cm² oder 75 cm² Plastik-Zellkulturflaschen (Costar/Corning) kultiviert (37 °C/5 % CO₂/max. Luftfeuchte). Das Medium wurde wöchentlich gewechselt und die Zellen wurden bei einer 80 %igen Konfluenz passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen und die Zellen 1 min mit PBS (Serag/Wiessner) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1x Trypsin (0,25 % (Cambrex) verdünnt mit PBS) bedeckt und 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe einer 20 % FCS/PBS-Lösung gestoppt und die Zellsuspension wurde zentrifugiert (7 min/4 °C/330 rcf). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen

wurden in 500 μ l-1 ml Standardmedium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Vitalität der Zellen wurde parallel zur Zählung durch die Verdünnung von 20 μ l der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (0,4 %, Sigma) kontrolliert. Die Zellen wurden danach je nach Menge und Bedarf nach folgendem Schema ausgesät (Tab. 2-2):

Tab. 2-2 Schema zum Aussähen von Zellen

	Oberfläche	Anzahl der ausgesäten Zellen	Durchschnittliche Anzahl geernteter Zellen	Volumen an Medium
T ₇₅ -Zellkulturflasche	75 cm ²	1,5x10 ⁶	5x10 ⁶	20 ml
T ₂₅ -Zellkulturflasche	25 cm ²	3-5x10 ⁵	1-1,5x10 ⁶	7 ml
10 cm Petrischale	55 cm ²	7x10 ⁵	3x10 ⁶	10 ml
6-Well-Platte	9,6 cm ²	1x10 ⁵	3-4x10 ⁵	2,5 ml
24-Well-Platte	1,9 cm ²	2x10 ⁴	1x10 ⁵	0,5 ml
4-Well-Glas oder Plastik- <i>Chamberslide</i>	1,7 cm ²	200	Diese Zellen wurden gefärbt und nicht geerntet.	1,0 ml

Zellen wurden bei Differenzierungs- und Selektionsversuchen auf 10 cm Petrischalen, 6-Well- bzw. 24-Well-Platten (Nunc) ausgesät. Die 4-Well-Plastik-*Chamberslides* (Nunc) wurden für Kulturen mit anschließender Färbung mit einem Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper verwendet. War der Zweitantikörper mit Fluoreszenz konjugiert, wurden die Zellen auf 4-Well-Glas-*Chamberslides* (Nunc) ausgesät.

Zum Einfrieren wurden Zellen wie beim Passagieren vereinzelt, in 500 μ l 30 % FCS/DMEM resuspendiert und gezählt. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 3,5x10⁵ oder 1x10⁶ Zellen/ml verdünnt. 150 μ l DMSO wurden je 2 ml Einfrier-Röhrchen (Greiner) vorgelegt und 1,35 ml der Zellsuspension wurden hinzu gegeben. Die Aliquots wurden zunächst langsam (1 °C/min) in einer Einfrierbox (Nalgene) auf -80 °C heruntergekühlt und anschließend im Stickstofftank eingelagert. Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese im Wasserbad aufgetaut und in 6 ml Standardmedium gegeben. Nach anschließender Zentrifugation (7 min/4 °C/330 rcf) wurden die Zellen gezählt und wieder nach obigem Schema ausgesät.

2.2 Markierung der USSC

Die USSC wurden mit dem Rot-fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 (Sigma) oder durch die Transfektion mit den Vektor pCL1eGFP, psCL1, pJM1 bzw. dem

Vektor pCL1nlsLacZ markiert. Dies ermöglichte die Kontrolle der Injektionseffizienz durch ein schnelles Überprüfen ganzer Embryonen.

2.2.1 Markierung der USSC mit PKH26

Die gesamte Markierung mit PKH26 (Sigma) erfolgte nach Herstellervorschrift und bei Raumtemperatur. Die zu färbenden Zellen wurden vereinzelt, gezählt und in Aliquots zu 5×10^5 Zellen aufgeteilt. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min/Raumtemperatur/400 rcf) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min/Raumtemperatur/400 rcf) und das Zellpellet in 250 μ l Diluent C aufgenommen. Danach wurden 250 μ l 2×10^{-6} M Farbstofflösung mit der Zellsuspension vermischt. Die Mischung wurde 3 min inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l FCS abgestoppt. Nach einer Inkubation von 1 min wurde 1 ml Standardmedium hinzugefügt und die Zellsuspension wurde zentrifugiert (10 min/Raumtemperatur/400 rcf). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit 3 ml PBS gewaschen, es wurden weitere 10 ml Medium hinzugefügt und erneut zentrifugiert (5 min/Raumtemperatur/400 rcf). Das entstandene Zellpellet wurde in der gewünschten Menge Medium resuspendiert und die Zellen wurden ausgesät oder für Injektionen verwendet.

2.2.2 Markierung der USSC durch Transfektion

Virale Vektoren werden verwendet, um genetisches Material in eukaryontische Zellen einzubringen. Lentivirale Vektoren sind besonders gut geeignet, da sie auch ruhende und langsam teilende Zellen sehr gut infizieren. Die infizierten Zellen integrieren die fremden genetischen Informationen in ihr Genom und vervielfältigen sie. Dadurch wird das Zielgen sowohl in der infizierten Zelle als auch den Tochterzellen stabil exprimiert (Verma und Somia, 1997).

Zur Konstruktion der Vektoren pJM1 und pCL1nlsLacZ wurden die Vektoren pBKS(+)-LacZnls und pczCFG2nlsLacZ von Lauren Field zur Verfügung gestellt, die lentiviralen Vektoren psCL1 und pCL1eGFP von Herrn Prof. Dr. Hahnenberg (Kinderklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf) und der Vektor pcDNA3 wurde von der Firma Invitrogen käuflich erworben.

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, die zur Herstellung der Vektoren pJM1 (siehe 2.2.3) und pCL1nlsLacZ (siehe 2.2.4) verwendet wurden.

2.2.2.1 Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese

Um die Größe von DNA-Fragmenten zu überprüfen oder DNA-Fragmente einer bestimmten Größe von anderen Fragmenten zu trennen und zu isolieren, wurden sie mit Hilfe eines elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt.

Tab. 2-3 bei der Agarosegel-Elektrophorese verwendete Lösungen

10x TBE Laufpuffer	890 mM Tris/Base (Merck) 890 mM Borsäure (Roth) 25 mM EDTA (Roth)
5x Probenpuffer	20 g Sucrose (Sigma) ad 50 ml H ₂ O dest. Spatelspitze Bromphenolblau (Roth) Spatelspitze Xylencyanol (Roth)
EtBr-Stammlösung	10 mg EtBr/ml H ₂ O dest. (Merck)

Die Konzentration des Agarosegels wurde abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente in den Proben gewählt. Die entsprechende Menge Agarose (Eurogentec) wurde in 1x TBE Laufpuffer (Tab. 2-3) durch kurzes Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 50-60°C wurden 3 µl EtBr-Stammlösung (Tab. 2-3) pro 100 ml Agaroselösung hinzu gegeben und die Gellösung wurde in eine Gelkammer mit Kamm (Peqlab) gegossen. Nach dem Aushärten des Gels und dem Entfernen des Kamms wurde die Gelkammer in die Elektrophoresekammer mit 1x TBE Laufpuffer gelegt. Zu den Proben wurde eine entsprechende Menge Probenpuffer (Tab. 2-3) gegeben, so dass der Probenpuffer in der endgültigen Probenlösung nur noch 1x konzentriert war. Als Größenstandard wurde eine 100 bp-DNA Leiter (Peqlab) oder 1 kb-DNA Leiter (Invitrogen) neben den mit Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen und die Fragmente wurden unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes der Größe nach getrennt. Nach ausreichender Auftrennung wurden die DNA-Fragmente durch interkaliertes Ethidiumbromid mit dem UV-Licht des Gel-Dokumentations-Systems sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.2.2 Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die meisten Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte 4-8 Basenpaar lange Sequenzen der DNA. Sie zerschneiden den Doppelstrang innerhalb dieser Erkennungssequenz. Werden beide Stränge an der gleichen Basenstelle geschnitten, entstehen so genannte glatte Enden. Häufig entstehen jedoch auch einzelsträngige Überhänge, da die beiden Stränge versetzt geschnitten werden.

Die DNA-Lösung wurde mit 1x Restriktionspuffer und der idealen Menge Restriktionsenzym (1-5 U/ μ g DNA, je nach Restriktionsenzym) versetzt und 2-4 h bei 37 °C inkubiert. Waren zwei unterschiedliche Schnittstellen notwendig, so wurde entweder nacheinander mit den verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten mit einem Zwischenschritt, der der Aufreinigung diente, oder die Reaktion erfolgte in einem Puffer, in dem beide Enzyme gut schnitten.

Die Vollständigkeit des Schneidens wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert. Die DNA-Fragmente wurden entweder direkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder nach der Isolation der entsprechenden Bande mit dem gewünschten Fragment mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 2-4 aufgelistet.

Tab. 2-4 Verwendete Restriktionsenzyme, ihre Erkennungssequenzen und Schnittstellen

Enzym	Erkennungssequenz ∇ : Schnittstelle	Puffer	Firma
<i>BsrGI</i>	5'...T [∇] GTAC A...3' 3'...A CATG _∇ T...5'	NEB 2	New England Biolabs
<i>EcoRI</i>	5'...G [∇] AATT C...3' 3'...C TTAA _∇ G...5'	RB 3	Invitrogen
<i>EcoRV</i>	5'...GAT [∇] ATC...3' 3'...CTA _∇ TAG...5'	RB 2	Invitrogen
<i>HindIII</i>	5'...A [∇] AGCT T...3' 3'...T TCGA _∇ A...5'	RB 2	Invitrogen
<i>KpnI</i>	5'...G GTAC [∇] C...3' 3'...C _∇ CATG G...5'	NEB 1	New England Biolabs
<i>NotI</i>	5'...GC [∇] GGCC GC...3' 3'...CG CCGG _∇ CG...5'	RB 3	Invitrogen
<i>ScaI</i>	5'...AGT [∇] ACT...3' 3'...TCA _∇ TGA...5'	RB 6	Invitrogen

2.2.2.3 Ligation

Mit Hilfe des Enzyms T4-Ligase konnten DNA-Fragmente, die mit Restriktionsenzymen geschnitten wurden, zusammengefügt werden. Die Vektor-DNA wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten wie das zu integrierende Fragment, welches auch Insert genannt wird.

Das Verhältnis Insert zu Vektor betrug 2:1. Das Gesamtvolumen der Ligation betrug 15 µl. Es wurden die entsprechenden Volumina des Inserts und des Vektors mit 3 µl des 5x konzentrierten Ligationspuffers, 1 µl (1 U) T4-DNA-Ligase (Invitrogen) und einer entsprechenden Menge Wasser versetzt. Die Ligation erfolgte 1 h bei 22 °C und 3 h bei 4 °C. Neben dem eigentlichen Ligationsansatz wurde auch eine Ligation ohne Vektor angesetzt, um die Häufigkeit der Religationen des geschnittenen Inserts kontrollieren zu können. Es wurde ebenfalls eine Ligation ohne Vektor zur Kontrolle der Religationen angesetzt.

2.2.2.4 Transformation

Die Transformation erfolgte mit One Shot TOP 10 kompetenten *E. coli* (Invitrogen) nach Herstellervorschrift. Die kompetenten Bakterien wurden in einem Reaktionsgefäß auf Eis aufgetaut und 8 µl des Ligationsansatzes wurden hinzu pipettiert. Nach weiteren 20 min auf Eis wurde das Gefäß mit den Bakterien 30 s in 42 °C warmes Wasser getaucht. Anschließend wurde es 1-2 min im Eis abgekühlt und nach Zugabe von 250 µl 37 °C warmem SOC-Medium 1 h bei 37 °C geschüttelt. Es wurden 50-100 µl der transformierten *E. coli* auf vorgewärmten LB-Ampicillin-Agarplatten (20 g/l LB Medium (Invitrogen), 100 µg/ml Ampicillin (Sigma), 12 g/l Selectagar (Gibco)) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.5 Minipräparation von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979), modifiziert

Tab. 2-5 Lösungen für die Minipräparation

GET (Glucose-EDTA-Tris) -Puffer	50 mM Glucose (Roth) 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl, pH 8 (Merck)
NaOH/SDS	0,2 N NaOH (Roth) 1 % (w/v) SDS (Roth)
PAS (Potassium-Acetat-Solution)	3 M Kaliumacetat, pH 4,8 (Roth)

Eine Kolonie transformierter *E. coli* wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in 2 ml LB-Ampicillin-Medium in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und über Nacht schwenkend (200 rpm) in einem horizontalen Schüttler bei 37 °C und aeroben Bedingungen inkubiert. Durch die Zugabe von Ampicillin zum LB-Medium wurden die *E. coli* einem Selektionsdruck ausgesetzt.

1,5 ml dieser Vorkultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1 min/10600 rcf). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl GET-Puffer (Tab. 2-5) resuspendiert und die Zellen wurden mit 200 µl NaOH/SDS (Tab. 2-5) aufgeschlossen, die Reaktionsgefäße wurden sechs Mal invertiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 150 µl PAS (Tab. 2-5) gefällt und das Reaktionsgefäß wurde wieder sechs mal invertiert. Nach der Zentrifugation (5 min/4 °C/10600 rcf) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde 1 ml EtOH abs. zum Überstand gegeben und das Gefäß wurde kurz invertiert und zentrifugiert (10 min/4 °C/10600 rcf). Der Überstand wurde verworfen und die DNA wurde mit 500 µl 70 %igem EtOH gewaschen und zentrifugiert (1 min/4 °C/10600 rcf). Die DNA wurde kurz an der Luft getrocknet, in 50 µl H₂O gelöst und zur Kontrolle mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel durch ein elektrisches Feld getrennt.

Die Vorkultur der DNA, die das richtige Bandenmuster zeigte, wurde für die Maxipräparation verwendet.

2.2.2.6 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für eine Maxipräparation wurden 200 ml Ampicillin-LB-Medium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 µl der Vorkultur angeimpft. Der plasmidhaltige *E. coli*-Stamm wurde wie bei der Minipräparation bei 37 °C schwenkend (200 rpm) über Nacht angezogen. Die komplette Zellsuspension wurde für die Präparation mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde nach dem Trocknen in 200 µl oder 300 µl H₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem GeneQuant *pro* UV/VIS Spektrophotometer der Firma Biochrom bestimmt. Die Schichtdicke der verwendeten Quarzküvette betrug 1 cm, Der Multiplikationsfaktor für doppelsträngige (ds) DNA beträgt 50 µg/ml, da bei dsDNA eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Die Reinheit der DNA wurde über den Quotient A_{260}/A_{280} kontrolliert und musste im Bereich 1,7-1,9 liegen.

2.2.2.8 Nachweis der β -Galaktosidase

Zellen, die zuvor mit einem der Vektoren pJM1 oder pCL1nlsLacZ transfiziert wurden, exprimierten β -Galaktosidase. Durch die Reaktion der β -Galaktosidase mit dem Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal) konnten die humanen transfizierten Zellen eindeutig nachgewiesen werden.

Tab. 2-6 Die für den Nachweis der β -Galaktosidase verwendete Lösungen

PFA-Lösung	5 mM EGTA (Sigma) 2 mM MgCl ₂ (Sigma) in 4 % PFA
Triton-Lösung	5 mM EGTA 2 mM MgCl ₂ in 0,2 % Triton/PBS
LacZ-Reaktionsmix	10 mM K ₃ Fe(CN) ₆ (Sigma) 10 mM K ₄ Fe(CN) ₆ (Sigma) 1,2 mM X-Gal (Sigma) in 0,2% Triton/PBS/EGTA/MgCl ₂

Die Zellen wurden 10 min mit der PFA-Lösung bei Raumtemperatur fixiert, danach 10 min mit Triton-Lösung bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend ½ h im LacZ-Reaktionsmix bei 37 °C inkubiert.

Die Färbung basiert darauf, dass die β -Galaktosidase das Substrat X-Gal enzymatisch spaltet und das Reaktionsprodukt durch Oxidation zu einem blauen Indigofarbstoff umgewandelt wird (Abb. 2-1).

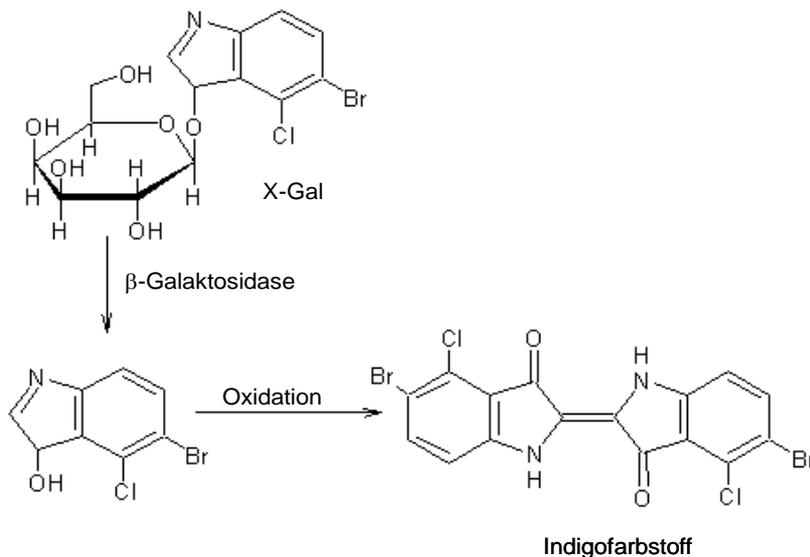


Abb. 2-1 Reaktionsmechanismus des Substrats X-Gal mit der β -Galaktosidase. Die anschließende Oxidation führt zur Bildung eines Indigofarbstoffs.

2.2.2.9 Transfektion

Bei der Transfektion wird fremde DNA von eukaryontischen Zellen aufgenommen. Es gibt verschiedene Methoden der Transfektion, darunter die Elektroporation, die Lipofektion und die virale Transfektion.

Elektroporation

Die Elektroporation gehört zu den physikalischen Verfahren. Die DNA gelangt in die Zelle, da durch einen kurzen elektrischen Impuls die Zellmembran permeabel wird.

Lipofektion

Durch die elektrostatische Wechselwirkung von negativ geladenen DNA-Molekülen mit kationischen Lipiden bildet sich ein DNA-Liposomen-Komplex, der mit der ähnlich aufgebauten Zellmembran fusionieren kann. So gelangt die DNA in das Zellinnere.

Das Fugene 6 (Roche) basiert auf Lipiden, jedoch bilden diese Lipide nach Angabe der Firma keine Liposome aus.

Transfektion mit kationischen Polymeren

Polymere wie das Polyethylenimin, das bei JetPEI (Biomol) verwendet wird, bilden einen Komplex mit der DNA. Dieser Komplex wird endozytotisch aufgenommen und verschmilzt mit Lysosomen. Durch den pH-Wert von 5 im Lysosom quillt das Polyethylenimin, zerstört die Lysosomenmembran und setzt die DNA frei.

2.2.2.10 Generierung viraler Überstände zur Transfektion der USSC

Die Generierung der viralen Überstände begann mit einer Lipid-vermittelten Transfektion von 293T-Zellen. Die Zelllinie 293T ist eine humane Zelllinie, die aus transformierten HEK (humane embryonale Nierenzellen, *human embryonic kidney*) entstand. Der Vektor, das Verpackungskonstrukt und das Helferplasmid wurden kotransfiziert.

100 mm-Platten wurden mit 0,1 %iger Gelatine beschichtet und $4,5 \times 10^6$ 293T-Zellen in 10 % FCS/PSG/DMEM wurden je Platte ausgesät. 20h später wurde das Medium der Zellen gewechselt. Es wurden eine Fugene-Lösung aus 60 µl Fugene 6-Reagenz und 200 µl DMEM und eine 21 µl Plasmid Lösung aus 7 µg Vektor, 7 µg VSV-G-Verpackungsplasmid und 7 µg pCD/NL-BH-Helferplasmid hergestellt. Die Plasmid-Lösung wurde in die Fugene 6-Lösung gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, Anschließend wurde die Mischung über die 293T-Zellen gegeben und durch Schwenken der Platte verteilt.

24-36 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Weitere 18 h später wurde der Überstand der Zellen abgenommen. Im Überstand befanden sich virale Partikel, die in der Lage waren, eukaryontische Zellen zu infizieren. Der Überstand wurde filtriert (0,45 µm Porengröße), um grobe Zelltrümmer abzutrennen.

Ein Teil des Überstands wurde bei -80 °C weg gefroren, der andere Teil diente zur Bestimmung der Transfektionseffizienz des Überstands. Diese wurde durch die Transfektion von USSC in 24-Well-Platten mit verdünntem Überstand getestet. Der Überstand wurde in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 auf die USSC gegeben und verweilte 48 h auf den Zellen. Die USSC wurden mit dem Überstand in der idealen Verdünnung transfiziert. Es wurde die höchste Verdünnung verwendet, die eine Transfektionseffizienz von ca. 98 % ergab.

2.2.3 pJM1

pJM1 war der erste Vektor, der konstruiert wurde, um das LacZ-Gen in die USSC zu transfizieren (Abb. 2-2). 3 µg des Vektors pBKS(+)-LacZnls wurden durch einen

Restriktionsverdau mit dem Enzym *ScaI* linearisiert, um den Vektor den PCR-Primern der anschließenden PCR besser zugänglich zu machen. Zur Kontrolle der Linearisierung wurden 2 µl der Reaktion auf ein 0,7 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Reaktionslösung wurde aufgereinigt und in 30 µl H₂O aufgenommen. Anschließend wurden sowohl der linearisierte Vektor pBKS(+)*LacZ* als auch der Vektor pcDNA3 mit dem Restriktionsenzym *HindIII* geschnitten und aufgereinigt. 2 µl der Reaktionen wurden zur Kontrolle auf ein 0,7 % iges Agarosegel aufgetragen.

Der mit *ScaI* und *HindIII* geschnittene Vektor pBKS(+)*LacZ* und der mit *HindIII* geschnittene Vektor pcDNA3 wurden jeweils zusätzlich mit dem Restriktionsenzym *NotI* geschnitten. Die Reaktionsansätze wurden komplett auf ein 0,7 % iges Agarosegel aufgetragen. Nach ausreichender Auftrennung der Fragmente wurden die Banden der benötigten Fragmente ausgeschnitten und aufgereinigt. 2 µl der beiden Fragmentlösungen wurden auf ein 1 % iges Agarosegel aufgetragen.

Die Ligation wurde mit 4 µl des Fragments und 6 µl des Vektors angesetzt. 8 µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation verwendet. Nach der Minipräparation wurde 1 µl der gewonnenen DNA mit je 1 µl *HindIII* und *EcoRI* in einem 10 µl Reaktionsansatz geschnitten. Die DNA mit dem für das Plasmid richtigen Bandenmuster wurde für die Maxipräparation verwendet.

Zunächst wurden HeLa-Zellen mit JetPEI (Biomol) mit dem Vektor transfiziert. Nachdem die Funktionalität des Vektors durch den Nachweis der β -Galactosidase-Expression nachgewiesen werden konnte, wurden USSC der Zelllinie SA 4/56 P3 transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit dem Human MSC Nucleofector Kit (Amaxa) im Nucleofektor (Amaxa). Vier 15 ml-Falcon-Röhrchen mit je 4×10^5 Zellen der Zelllinie SA 4/56 P3 wurden zentrifugiert (5 min/200 rcf), die Zellen wurden mit PBS gewaschen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl Nucleofektor-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette (2 mm Durchmesser) überführt und 2 bzw. 4 µg DNA wurden mit dem Programm U-23 bzw. C-17 in die Zelle überführt. Danach wurden die Zellen in Standardmedium kultiviert.

Nachdem durch einen β -Galactosidase-Nachweis gezeigt werden konnte, dass die Transfektion auch in USSC erfolgreich war, wurden außerdem Zellen der USSC-Zelllinien SA 061, SA 325, SA 334 und SA 4/10 transfiziert.

Transfizierte Zellen konnten auf Grund ihrer gewonnenen Neomycinresistenz durch Zusatz von Geneticin (G418, Invitrogen, Endkonzentration 100 µg/ml), einem Neomycin-Analogon, zum Medium selektiert werden.

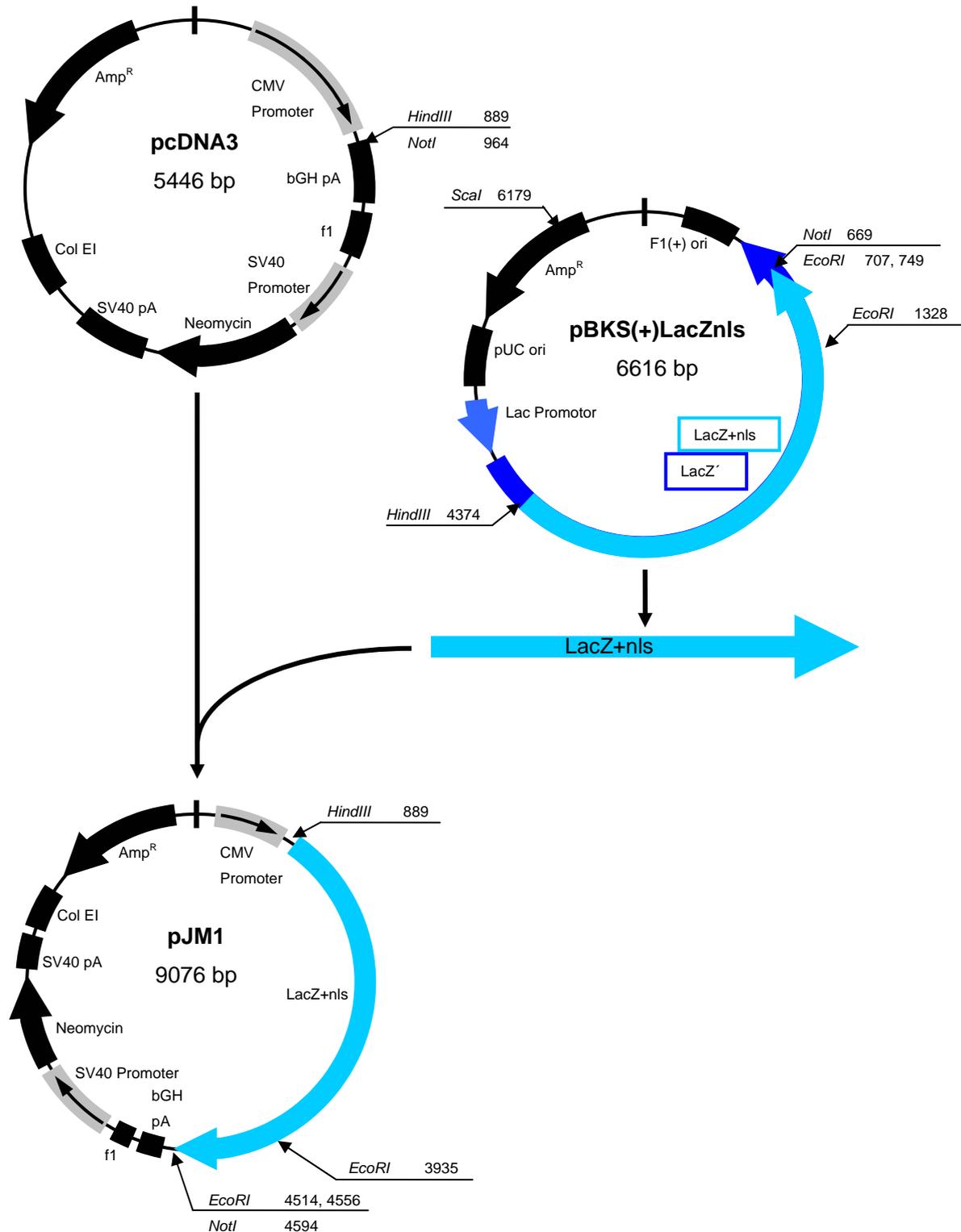


Abb. 2-2 Entwicklung des Vektors pJM1

2.2.4 pCL1nlsLacZ

Der Vektor pCL1nlsLacZ (Abb. 2-4) wurde konstruiert, da lentivirale Vektoren eine besonders gute Transfektionseffizienz haben.

Aus dem Vektor pczCFG2nlsLacZ wurde die nlsLacZ-Sequenz mittels PCR amplifiziert. Die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *KpnI* wurde durch den *Forward*-Primer und die Schnittstelle für das Enzym *BsrGI* durch den *Reverse*-Primer bei der Amplifikation zur Ursprungssequenz hinzugefügt.

Die Primer wurden bei der Firma Thermo Electron RP-HPLC-aufgereinigt bestellt.

Forward-Primer: 5'-NNN NNN GGT ACC ATG GCG CCA AAA AAG AAG AG-3'

Reverse-Primer: 5'-NNN NNN TGT ACA GTT ATT TTT GAC ACC AGA CCA AC-3'

Tab. 2-7 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

pro Reaktion	Komponente
20 µl	H ₂ O
1 µl	pczCFG2nlsLacZ (10 ng/µl)
2 µl	<i>Forward</i> -Primer (10 pmol/µl)
2 µl	<i>Reverse</i> -Primer (10 pmol/µl)
25 µl	2x PWO-Master-Mix (Roche)

Die Komponenten (Tab. 2-7) wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen (Abb. 2-3).

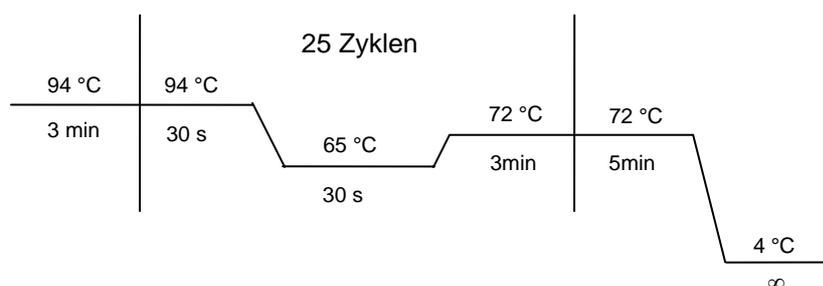


Abb. 2-3 PCR-Reaktionsbedingungen zur Amplifikation eines DNA-Fragments aus einem Vektor

2 µg des Vektors pCL1eGFP bzw. 15 µl des PCR-Fragments wurden mit den Enzymen *KpnI* und *BsrGI* im Reaktionspuffer 2 geschnitten.

Die Fragmente wurden mit einem 0,7 %igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt, die Banden mit den gewünschten Fragmenten wurden ausgeschnitten und aufgereinigt. Es wurden je 2 µl der aufgereinigten Fragmente auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, um die Fragmente auf Reinheit und Größe zu kontrollieren und eine Abschätzung der Konzentration machen zu können.

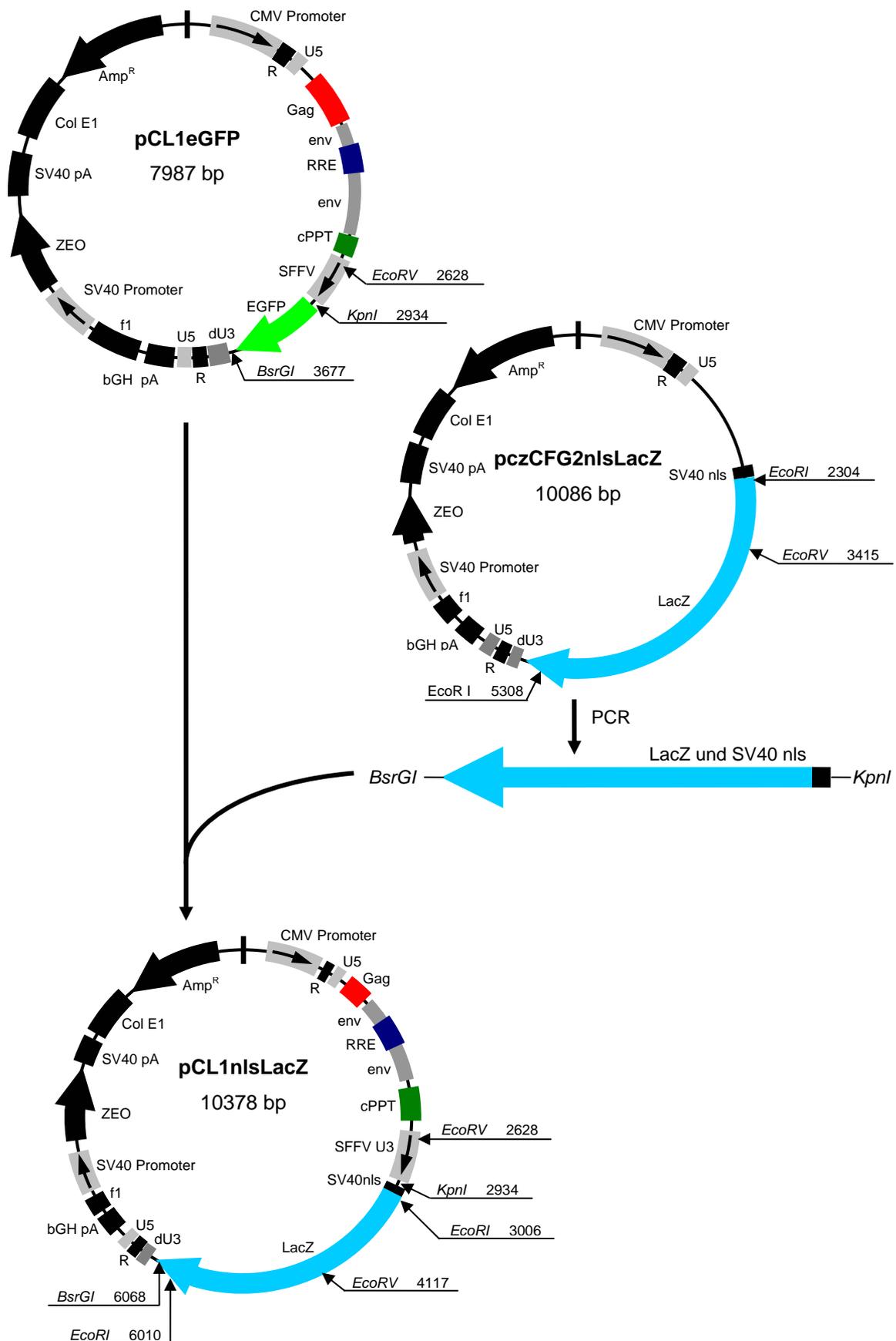


Abb. 2-4 Entwicklung des Vektors pCL1nlsLacZ

Die Ligation erfolgte mit 10 µl LacZ-Fragment und 2,5 µl Vektor-Fragment.

Für die Transformation wurden 5 µl Ligationsansatz verwendet. Die *E. coli* wurden auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen.

Aus den über Nacht gewachsenen Kolonien wurde eine Vorkultur angesetzt. Die aus der Minipräparation gewonnene DNA wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *EcoRV* zur Kontrolle geschnitten. Die Reaktion wurde auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und aus der Vorkultur mit dem richtigen Bandenmuster wurde eine Hauptkultur für die Maxipräparation angesetzt.

Abschließend wurden HeLa-Zellen mit 5 µg DNA der Vektoren pczCFG2nlsLacZ, pCL1eGFP, pCL1nlsLacZ und pJM1 mit Fugene 6 und zum Vergleich 5 µg DNA der Vektoren pCL1nlsLacZ und pJM1 mit JetPEI (Biomol) transfiziert. Die Transfektion der Vektoren pczCFG2nlsLacZ, pJM1 und pCL1eGFP dienten der Kontrolle der Transfektion. Nach erfolgter Transfektion konnte die eGFP-Fluoreszenz, der mit dem Vektor pCL1eGFP transfizierten Zellen, detektiert werden. Auch die β-Galaktosidase der mit den Vektoren pczCFG2nlsLacZ, pCL1nlsLacZ und pJM1 transfizierten Zellen konnte nachgewiesen werden (2.2.2.8). Nachfolgend wurden USSC mit dem Vektor pCL1nlsLacZ transfiziert (2.2.2.10).

2.3 Differenzierung der USSC *in vivo*

Unterschiedliche USSC-Linien wurden in Hühnerembryonen verschiedener Entwicklungsstadien injiziert. Um methodische Sicherheit zu gewinnen, erfolgte die Injektion zunächst mit markierten Zelllinien. Später wurden ebenfalls nicht markierte Zelllinien injiziert, um einen Einfluss der Markierung auf die Differenzierung auszuschließen.

2.3.1 Versuchstiere

Die Bruteier wurden von der Deindl Geflügelzucht und –vertriebs GmbH, Rietberg-Varensell bezogen und bis zu 21 Tage bei 37,8 °C und 55-60 % relativer Luftfeuchte in dem BSS 300 Brutgerät der Firma Grumbach inkubiert, bis sie das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht hatten. Die Bestimmung des Stadiums erfolgte gemäß der Entwicklungseinteilung von Hamburger und Hamilton. Wurden die Eier erst einige Tage nach der Lieferung benötigt, konnten sie bei 10 °C bis zu 10 Tage gelagert werden. Bei einer Vorinkubationszeit von über drei Tagen wurden die Hühnereier durch die Motorwende des Geräts fünf Mal täglich gewendet.

2.3.2 Manipulationen

Die Injektionen erfolgten *in ovo*. Dem Ei wurde mit einer Spritze am stumpfen Ende 1,5 ml Eiweiß entnommen, das entstandene Loch wurde mit einem Tesafilmstreifen verschlossen, ein weiterer Streifen diente zur Stabilisierung der Eierschale an der Stelle, an der dann mit einer Schere ein Loch von ca. 1,5 cm Durchmesser für die Injektion geschnitten wurde. Für die Injektion wurde mit einer Tungsten-Nadel (FST) die Vitellinmembran und das Amnion im Injektionsbereich angeritzt. Die zur Injektion verwendeten Glaspipetten wurden mit einem vertikalen Pipetten-Ziehgerät (Sutter) aus Borsilikat-Glaskapillaren (OD 1,2 mm, ID 0,69 mm, Harvard Apparatus) hergestellt. 500-10000 Zellen wurden Embryonen verschiedener Stadien mit einer ausgezogenen Glaspipette unter dem Stereomikroskop (Stemi 2000 C, Zeiss) injiziert. Nach erfolgter Injektion wurde das Loch des Eies mit einem Tesafilmstreifen verschlossen (Abb. 2-5). Die Analyse der Embryonen erfolgte 0,5-7 Tage nach Injektion.

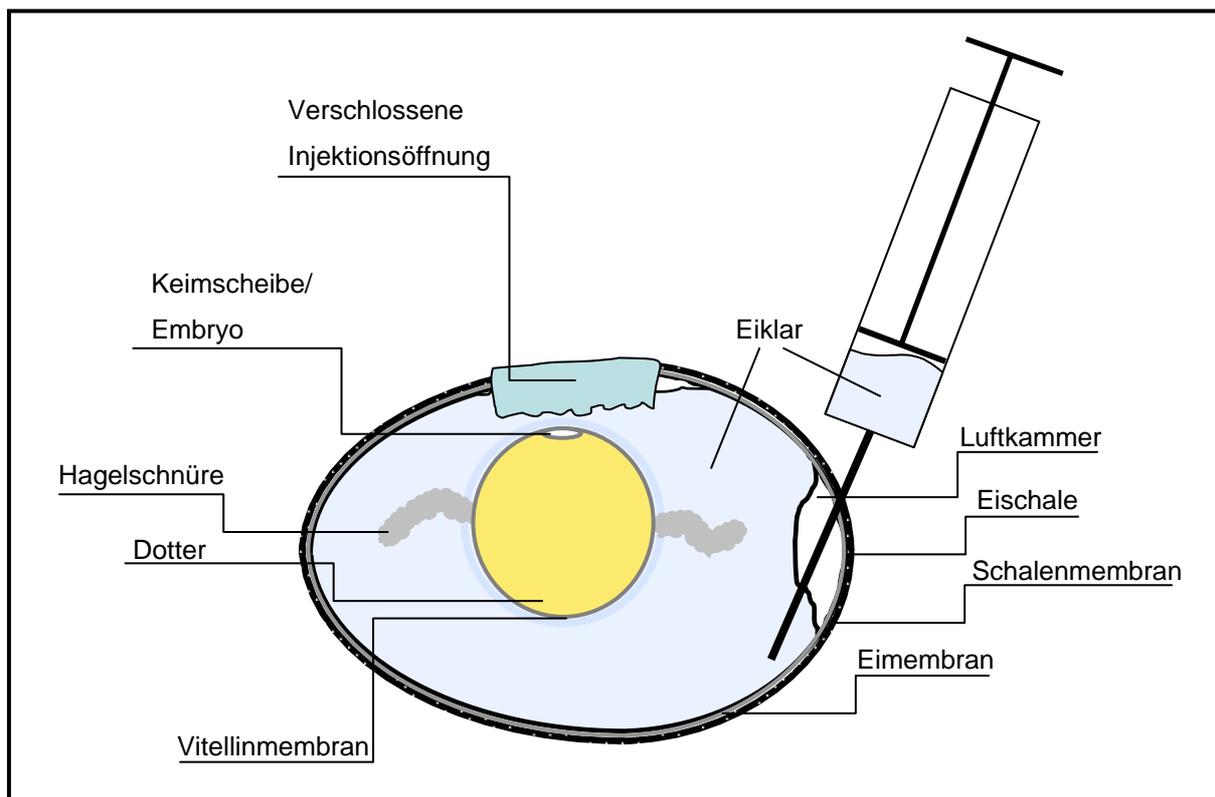


Abb. 2-5 Aufbau des Hühnereis

2.3.2.1 Applikation von USSC während der Gastrulationsphase

500 Zellen wurden in HH-Stadium 2 Embryonen (6-7 h alt) in das Blastoderm und in HH-Stadium 4-5 Embryonen (ca. 19 h alt) zwischen den Epiblast und den Hypoblast injiziert.

2.3.2.2 Applikation von USSC während der Somitogenese

Die Zellen wurden in HH-Stadium 10-14 Embryonen (33-53 h alt) appliziert. Zum Einen wurden die zuletzt gebildeten Somiten zerstört und durch Zellaggregate (ca. 500 Zellen) ersetzt, zum Anderen wurden etwa 10000 Zellen einseitig parallel zum Neuralrohrs injiziert. Zur Injektion wurde die Nadel in Höhe des zuletzt gebildeten Somiten angesetzt und bis zum zweiten Somiten vorgeschoben, wobei alle Somiten an der einen Seite verletzt wurden. Beim langsamen longitudinalen Herausziehen der Nadel wurden die Zellen appliziert.

2.3.2.3 Implantation von USSC in das zuvor geschädigte Neuralrohr

Bei diesem Modell wurde ein kleiner lateraler Teil des Neuralrohrs eines Embryos im HH-Stadium 14 (50-53 h alt) mit der Tungsten-Nadel geschädigt. An die Läsionsstelle wurden anschließend 500 USSC implantiert.

2.3.2.4 Applikation in das externe Gefäßsystem

5000 USSC bzw. CD34⁺-Zellen wurden in das externe Gefäßsystem von HH-Stadium 15 (52-55 h alt) Embryonen injiziert. Für die Injektion wurden Blutgefäße genommen, die zum Embryo hin führten und einen schwächeren Blutfluss hatten als die Hauptgefäße.

2.3.2.5 Applikation in das Gehirn

Bei dieser Injektion wurden 10000 USSC okzipital in das Gehirn von HH-Stadium 15 (52-55 h alt) und 23 Embryonen (3,5 Tage alt) appliziert.

2.3.2.6 Applikation in die Extremitätenanlage

500 USSC wurden in die Flügelanlage von HH-Stadium 23 Embryonen (4 Tage alt) appliziert. Die Injektion wird an der Flügelknospe distal angesetzt und die Zellen wurden medial abgelegt.

2.3.3 Fixierung

Die Embryonen wurden 0,5-7 Tage nach der Injektion präpariert und mit 4 % PFA (Roti-Histofix, Roth) oder 100 % eiskaltem Methanol (Merck) 15 min fixiert, anschließend wurden sie zweimal 15 min in 0,1 % Triton X-100 (Aldrich)/PBS gespült.

2.3.4 Nachweis der β -Galaktosidase exprimierenden Zellen im Hühnerembryo

Wurden mit dem Vektor pCL1nlsLacZ transfizierte Zellen in Hühnerembryonen injiziert, konnten die Zellen anschließend durch den Nachweis der β -Galaktosidase eindeutig nachgewiesen werden (vgl. 2.2.2.8). Die Embryonen wurden nach der Entnahme je nach Größe 15-60 min mit der PFA-Lösung bei 4 °C fixiert, danach 15-60 min mit Triton-Lösung in PBS bei 4° C permeabilisiert und anschließend 0,5-8h im LacZ-Reaktionsmix bei 37 °C inkubiert.

Die Embryonen wurden mit PBS gewaschen und mit Glycerin geklärt um die Färbung in Embryonen ab einem Alter von 3,5 Tagen besser erkennen zu können. Die Färbung basiert darauf, dass die β -Galaktosidase das Substrat X-Gal, das im LacZ-Reaktionsmix enthalten ist, enzymatisch spaltet und das Reaktionsprodukt durch Oxidation zu einem blauen Indigofarbstoff umgewandelt wird (Abb. 2-1).

2.3.5 Gefrierkonservierung

Um Embryonen für spätere histologische Untersuchungen zu konservieren, wurden sie mit 4 % PFA/PBS bei 4 °C je nach Größe 0,5-1 h fixiert. Anschließend wurden sie zweimal mit kaltem PBS gewaschen und über Nacht in 30 % Sucrose/PBS bei 4 °C eingelegt. Danach wurden die Embryonen von überschüssiger Sucrose-Lösung befreit und auf Trockeneis mit OCT-Einfriermedium (Vogel) in ein Tissue Tek Cryomold (Vogel) der entsprechenden Größe eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die eingefrorenen Embryonen wurden mit einem Gefriermikrotom (Leica CM 1850) in 10 μ m dicke Scheiben geschnitten, die Schnitte wurden mit einem Poly-Lysin beschichteten Objektträger (Menzel-Gläser) abgenommen. Diese Schnitte wurden 10 min bei 37 °C und 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und immunhistologisch analysiert. Bei einer Färbung am nächsten Tag wurden sie über Nacht im Kühlschrank, bei einer späteren Färbung bei -80 °C aufbewahrt.

2.4 Immunhistochemie (IHC)

Die Differenzierung der humanen Zellen im Hühnerembryo wurde, ebenso wie die der *in vitro* differenzierten Zellen, durch immunhistochemische indirekte Zwei-Schritt-Methoden nachgewiesen.

Die Embryonen wurden zunächst wie im vorherigen Kapitel beschrieben behandelt.

Die Zellen der *in vitro*-Kulturen wurden für die Isolierung von RNA, von Proteinen oder für die durchflusszytometrische Analyse vereinzelt. Ein Teil dieser Zellen wurde auf Objektträgern mit Kammersystem (*Chamberslide*) ausgesät und am darauf folgenden Tag immunhistochemisch analysiert.

Die indirekte Zwei-Schritt-Methode basiert darauf, dass zunächst ein unkonjugierter primärer Antikörper an das Antigen bindet und anschließend ein Fluoreszenz- oder Enzym-konjugierter sekundärer Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, eingesetzt wird (Abb. 2-6). Die Detektion der sekundären Antikörper erfolgte bei Fluoreszenz-Konjugation durch einen Laser und bei Enzym-Konjugation durch eine enzymatische Reaktion.

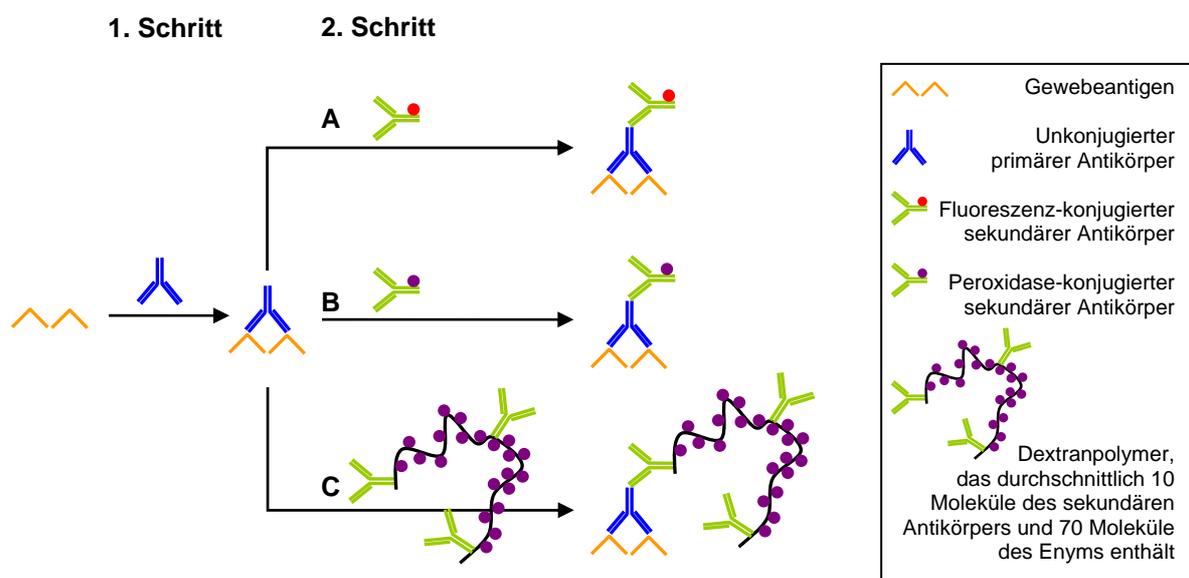


Abb. 2-6 Immunhistochemische Zwei-Schritt-Methoden. Die verschiedenen Methoden unterscheiden sich im sekundären Antikörper des zweiten Schritts. Hier wurden Fluoreszenz-konjugierte Antikörper (A), Peroxidase-konjugierte Antikörper (B) oder Dextranpolymere, die sowohl den sekundären Antikörper, als auch das Enzym trugen (C) verwendet.

Die kultivierten Zellen wurden auf den Objektträgern mit Kammersystem mit den Antikörpern (Ak) inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden vor dem Fixieren mit PBS gewaschen. Für die Färbung wurden die Kammern auf den Objektträgern gelassen. Histologische Schnitte wurden mit PBS vom Einfriermedium

befreit. Anschließend wurde gemäß des Protokolls für die Färbung mit Fluoreszenz-konjugierten (Tab. 2-10) oder Peroxidase-konjugierten (Tab. 2-11) sekundären Antikörpern verfahren. Die Schnitte und kultivierten Zellen wurden, nach der Permeabilisierung und dem Blocken vor unspezifischen Reaktionen mit dem primären Antikörper (Tab. 2-8) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte und Zellen gewaschen und entweder mit einem Peroxidase-konjugierten oder Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert (Tab. 2-9). Der Inkubation mit Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpern schloss sich eine Reaktion mit Diaminobenzidin (DAB) an.

Für die Immunhistochemie der kultivierten Zellen wurden lediglich die primären Antikörper gegen humane Zellkerne, ANF, die atriale und ventrikuläre leichte Myosinkette, Nkx2.5, Troponin I und Troponin T (Tab. 2-8) und Fluoreszenz-konjugierte sekundäre Antikörper verwendet (Tab. 2-9).

Tab. 2-8 In der Immunhistochemie verwendete primäre Antikörper

	Spezifität	Verdünnung	Wirt	Isotyp	Firma
Monoklonal	Anti-Human α -Actinin	1:800	Maus	IgG1	Sigma-Aldrich
Polyklonal	Anti-Human ANP	1:500	Kaninchen		Chemicon International
Polyklonal	Anti-Human ANP	1:100	Ziege	IgG	Santa Cruz
Monoklonal	Anti-Human Connexin-43	1:100	Maus	IgG1	BD Bioscience
Monoklonal	Anti-Human Mitochondrien	1:30	Maus	IgG1	Chemicon
Polyklonal	Anti-Human MLC2a	1:100	Ziege	IgG	Santa Cruz
Polyklonal	Anti-Human MLC2v	1:100	Ziege	IgG	Santa Cruz
Monoklonal	Anti-Human Myosin (leichte Ketten des Ventrikels)	Unverdünnt	Maus	IgG1	Axxora
Polyklonal	Anti-Human Nkx2.5	1:100	Kaninchen	IgG	Santa Cruz
Monoklonal	Anti-Human Troponin I	1:100	Maus	IgG2b	Santa Cruz
Polyklonal	Anti-Human Troponin I	1:100	Ziege	IgG	Santa Cruz
Polyklonal	Anti-Human Troponin T	1:100	Ziege	IgG	Santa Cruz
Monoklonal	Anti-Human Zellkern	1:30	Maus	IgG1	Chemicon

Tab. 2-9 In der Immunhistochemie verwendete sekundäre Antikörper

	Konjugat	Verdünnung	Spezifität	Firma
Esel-Anti-Kaninchen	Cy3	1:100	IgG (H+L)	Dianova
Rind-Anti-Kaninchen	Peroxidase	1:500	IgG	Santa Cruz
Esel-Anti-Maus	Cy3	1:100	IgG (H+L)	Dianova
Ziege-Anti-Maus	Cy3	1:100	IgG (1+2a+2b+3), Fc-Fragment	Dianova
Esel-Anti-Maus	FITC	1:100	IgG (H+L)	Dianova
Rind-Anti-Maus	Peroxidase	1:500	IgG	Santa Cruz
Ziege-Anti-Maus	Peroxidase	1:500	IgG (H+L)	Chemicon
Esel-Anti-Ziege	Cy3	1:100	IgG (H+L)	Dianova
Esel-Anti-Ziege	FITC	1:100	IgG (H+L)	Dianova
Rind-Anti-Ziege	Peroxidase	1:500	IgG	Santa Cruz

2.4.1 IHC mit Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörpern

Beim Verwenden Fluoreszenz-konjugierter sekundärer Antikörper in der Immunhistochemie musste gegen unspezifische Bindungen der Antikörper geblockt werden. Nach Beendigung des Protokolls (Tab. 2-10) wurden die Zellen und Gewebeschnitte mit AF1 Eindeckmedium (Citifluor) eingedeckelt.

Tab. 2-10 Protokoll für IHC mit Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörpern

Kultivierte Zellen	Schnitte	Schritt
Dauer (min)		
10	10	mit 4 % PFA fixieren
3x5	15	mit PBS waschen
30	30	mit 2 % BSA/3 % FCS/0,2 % Triton/PBS blocken
120	120	mit 1. Ak (1:50) in 1 % BSA/1 % FCS/0,1 % Triton/PBS inkubieren
3x5	15	mit 0,1% Triton in PBS waschen
60	60	mit 2. Ak (1:100) in 1 % BSA/1 % FCS/0,1 % Triton/PBS inkubieren
3x5	15	mit 0,1% Triton-PBS waschen
10	10	mit PBS waschen

2.4.2 IHC mit Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpern

Das Verwenden Peroxidase-konjugierter sekundärer Antikörper bedingte das Blocken unspezifischer Antikörperbindungen und endogener Peroxidaseaktivität.

Tab. 2-11 Protokoll für IHC mit Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpern

Kultivierte Zellen	Schnitte	Schritt
Dauer (min)		
10	10	mit 100 % MeOH fixieren
3x5	15	mit PBS waschen
10	10	mit 0,1 % TritonX-100 in PBS waschen
10	10	mit 3 % H ₂ O ₂ in PBS inkubieren
3x5	10	mit 0,1 % TritonX-100 in PBS waschen
15	15	mit 2 % BSA/3 % FCS/0,2 % Triton/PBS blocken
90	90	mit 1. Ak (1:100) in 1 % BSA/1 % FCS/0,1 % Triton/PBS inkubieren
3x5	15	mit 1 % BSA/0,1 % Triton/PBS waschen
45	45	mit 2. Ak (1:500) in 1 % BSA/1 % FCS/0,1 % Triton/PBS inkubieren
10	10	mit PBS waschen
1-10	1-10	mit DAB Färbelösung inkubieren (Vector) mit H ₂ O dest. waschen

Bei der Nutzung des DAKO EnVision™ System HRP Kits (DAKO Corporation) wurde nach Herstellervorschrift vorgegangen. Das DAKO EnVision™ System HRP Kit basiert auf der in Abbildung 2-6 C beschriebenen Zwei-Schritt-Methode, wodurch ein wesentlich stärkeres Signal erhalten wird als bei der in Abbildung 2-6 B beschriebenen Methode. Die Gewebeschnitte wurden anschließend mit Hämalaun-Lösung sauer nach Meyer (Roth) und Eosin G (Merck) gegengefärbt. Hierzu wurden die gewaschenen Schnitte 3 min in Hämalaun-Lösung getaucht, 2 min unter laufendem Leitungswasser entwickelt, kurz mit Aqua dest. gewaschen, 2 min in Eosin-Lösung getaucht und erneut mit Aqua dest. gewaschen. Danach wurden die Gewebeschnitte durch eine Ethanolreihe in den Schritten 50/75/96/100 % Ethanol und Roticlear (Roth) entwässert und in Entellan (Merck) eingedeckelt.

2.5 Differenzierung der USSC *in vitro*

Die Differenzierung *in vitro* erfolgte auf drei Arten: durch Zugabe von Faktoren, Kokultivierung oder Kultivierung mit konditioniertem Medium. Grundlage für die Medien war immer das Differenzierungs-Grundmedium, dessen Komponenten von der Firma Cambrex bezogen wurden. Das Differenzierungs-Grundmedium bestand aus 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in DMEM.

2.5.1 Induzierung der Differenzierung durch Zugabe von Faktoren zum Medium

$2,5 \times 10^5$ Zellen der Zelllinien SA 061, SA 325 und SA 4/10 wurden pro Well einer 6-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden als Monolayer-, Rotations- oder *hanging drop*-Kultur in den Differenzierungsmedien 1A-4B (Tab. 2-12) bis zu 21 Tage kultiviert.

5×10^5 Zellen der Zelllinien SA 5/03, SA 5/50, SA 5/60 und SA 5/73 wurden auf 10 cm-Platten ausgesät und 21 Tage mit den Differenzierungsmedien 5A-6B kultiviert.

Tab. 2-12 Differenzierungsmedien

Differenzierungsmedium 1A	Differenzierungs-Grundmedium 100 nM Oxytocin (Syntocinon, Novartis)
Differenzierungsmedium 1B	Differenzierungsmedium 1A mit 30 % FCS
Differenzierungsmedium 2A	Differenzierungs-Grundmedium 0,25 µM Cardiogenol (Calbiochem)
Differenzierungsmedium 2B	Differenzierungsmedium 2A mit 30 % FCS
Differenzierungsmedium 3A	Differenzierungs-Grundmedium 100 nM <i>all-trans</i> -Retinsäure (Sigma)
Differenzierungsmedium 3B	Differenzierungsmedium 3A mit 30 % FCS
Differenzierungsmedium 4A	Differenzierungs-Grundmedium 0,5 % DMSO
Differenzierungsmedium 4B	Differenzierungsmedium 4A mit 30 % FCS
Differenzierungsmedium 5A	Differenzierungs-Grundmedium 10 µM 5-Azacytidin
Differenzierungsmedium 5B	Differenzierungsmedium 5A mit 30 % FCS
Differenzierungsmedium 6A	Differenzierungs-Grundmedium 1x ITS, 100 µM Ascorbinphosphat
Differenzierungsmedium 6B	Differenzierungsmedium 6A mit 30 % FCS

Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Die Monolayer-Kultur erfolgte mit $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml Medium über 21 Tage. Die Rotationskultur wurde mit 1×10^5 Zellen/ml Medium angesetzt und bei 80 rpm horizontal gedreht. Nach einer Woche wurden die Zellaggregate trypsiniert und als Monolayer ausgesät (pro Zellaggregat ein Well einer 24-Well-Platte). Für die *hanging drop*-Kultur (Abb. 2-7) wurden 500 Zellen in 50 μ l Medium kultiviert und nach einer Woche in die Rotationskultur gegeben, eine weitere Woche später wurden die Zellaggregate trypsiniert und als Monolayer wie die Zellaggregate der Rotationskultur ausgesät. Einige Zellaggregate wurden auch für Implantationen verwendet (siehe 2.6.2.2).

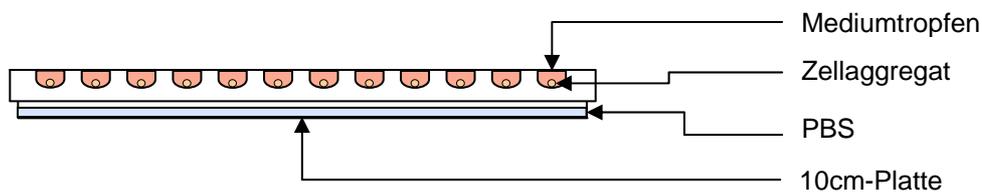


Abb. 2-7 *Hanging drop*-Kultur

2.5.2 Induzierung der Differenzierung durch Kokultivierung

Befruchtete Hühnereier wurden 50 h bei $37,8^\circ\text{C}$ inkubiert. Im HH-Stadium 14 wurden die Embryonen isoliert. Das Ei wurde geöffnet und das Eigelb vorsichtig in eine Schale mit Ringer-Lösung überführt. Längs zum Embryo wurde an beiden Seiten die Eigelbmembran eingeschnitten. Durch diesen Schnitt wurde ein Lochsieb unter den Embryo geführt, anschließend wurde der Embryo vollständig von der Eigelbmembran getrennt und in eine Petrischale mit Ringer-Lösung überführt. Die Vitellinmembran wurde mit feinen Pinzetten (FST) entfernt, das Amnion mit einer Cohan-Vannas-Federschere (FST) eingeschnitten und der Herzschlauch unter dem Stereomikroskop Stemi 2000 C (Zeiss) präpariert und in eiskaltes PBS gegeben. Zur Gewinnung von etwa 1×10^6 Herzzellen mussten 80-100 Embryonen auf diese Art präpariert werden. Die Herzen wurden durch Inkubation (7 min/ 37°C) mit 500 μ l Trypsin-EDTA (Invitrogen) vereinzelt und die enzymatische Reaktion wurde mit 5 ml 30 % FCS/PBS abgestoppt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (7 min/ 4°C /550 rcf), in einer kleinen Menge Medium aufgenommen, gezählt und mit $0,4 \times 10^5$ - 2×10^5 Zellen der Zelllinien SA 5/03, SA 5/18, SA 5/50, SA 5/60 und SA 5/73 auf 10 cm Petrischalen ausgesät. Das Verhältnis von Huhn-Herzzellen zu humanen Zellen betrug 1:1 oder 2:1. Die Zellen wurden 3-35 Tage im Differenzierungs-Grundmedium kokultiviert, das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

2.5.3 Induzierung der Differenzierung durch konditioniertes Medium

Für das konditionierte Medium wurden ebenfalls Herzzellen von Hühnerembryonen HH-Stadium 14 gewonnen (siehe 2.2.2). 1×10^5 Zellen wurden auf Gelatine (Stem Cell Technologies) beschichtete 10 cm Petrischalen ausgesät und 1 Woche in 12 ml Differenzierungs-Grundmedium kultiviert, anschließend wurde das konditionierte Medium filtriert (Minisart 0,45 µm Syringe Filter, Sartorius) und für die Kultivierung der humanen Zellen verwendet. Es wurden $0,5 \times 10^5$ - 1×10^5 Zellen auf einer 10 cm Petrischale ausgesät, das Medium wurde wöchentlich gewechselt und bestand aus 10 ml konditioniertem Medium und 2 ml frisch hergestelltem Differenzierungs-Grundmedium. Die Kultur dauerte 6-29 Tage, das Medium wurde wöchentlich gewechselt.

2.6 Färbung für die Durchflusszytometrie

Zur Quantifizierung der differenzierten Zellen wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Antikörper, die verwendet wurden sind in Tab. 2-13 und Tab. 2-14 aufgelistet.

Tab. 2-13 Primäre Antikörper der Färbung für die Durchflusszytometrie

Primärer Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Wirt	Isotyp	Firma
Polyklonal	Anti-Human ANP	1:50	Ziege	IgG	Santa Cruz
Polyklonal	Anti-Human MLC2v	1:50	Ziege	IgG	Santa Cruz
Polyklonal	Anti-Human Nkx2.5	1:50	Kaninchen	IgG	Santa Cruz
Polyklonal	Anti-Human Troponin I	1:50	Ziege	IgG	Santa Cruz
Polyklonal	Anti-Human Troponin T	1:50	Ziege	IgG	Santa Cruz

Tab. 2-14 Sekundäre Antikörper der Färbung für die Durchflusszytometrie

Sekundärer Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Spezifität	Firma
Esel-Anti-Kaninchen	Cy3	1:100	IgG (H+L)	Dianova
Esel-Anti-Ziege	Cy3	1:100	IgG (H+L)	Dianova

Die kultivierten Zellen wurden vereinzelt und 15 min bei 4 °C mit 2 ml BD Cytofix/Cytoperm fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Der Waschpuffer wurde nach Vorschrift verdünnt und zu der Zellsuspension gegeben. Nach der Zentrifugation (7 min/4 °C/450 rcf) wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden in Waschpuffer resuspendiert. Pro Färbung wurden mindestens 5×10^5 Zellen in 50 µl Waschpuffer resuspendiert. 1 µl des primären Antikörpers (Tab. 2-13) wurde hinzu

gegeben und die Zellsuspension wurde 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde mit Waschpuffer gewaschen, erneut zentrifugiert (7 min/4 °C/450 rcf) und nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl Waschpuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 µl des sekundären Antikörpers (Tab. 2-14) wurde die Zellsuspension wieder 15 min bei 4 °C inkubiert, gewaschen und zur Durchflusszytometrischen Analyse in 500 µl Waschpuffer resuspendiert.

Die Analyse der Zellen wurde mit einem FC 500 der Firma Beckman Coulter durchgeführt. Der Vorwärts- und Seitwärtsscatter wurden eingestellt und die zu analysierende Population wurde definiert.

Zur Kontrolle wurden zusätzlich mononukleäre Zellen (MNC) gefärbt. Hierzu wurden mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut isoliert. Das Nabelschnurblut wurde von der Jose Carreras-Stammzellbank Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde von den Blutproben 1 ml Vollblut in ein Eppendorfgesäß überführt, um zu einem späteren Zeitpunkt daraus DNA zu isolieren. Das Blut wurde in 50 ml-Falcon-Röhrchen gefüllt und 1:1 mit PBS verdünnt. In einem neuen 50 ml-Falcon-Röhrchen wurden 15 ml Ficoll-Lösung vorgelegt und anschließend mit 30 ml des verdünnten Blutes überschichtet. Die Röhrchen wurden 35 min bei 850 rcf und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde mit einer sterilen Pipette der Interphasering über der Ficoll-Schicht und unter dem Serumüberstand abgenommen. In dieser Phase befanden sich die mononukleären Zellen (MNC). Das Röhrchen mit den abgenommenen Zellen wurde mit PBS/EDTA aufgefüllt, um die Zellen zu waschen und anschließend 7 min bei 750 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in PBS/EDTA resuspendiert und bis zur Erythrozytenlyse auf Eis oder in den Kühlschrank gestellt. Um die restlichen Erythrozyten zu entfernen, die sich trotz des Ficollgradienten noch in der abgenommenen Zellsuspension befanden, wurde eine alkalische Lyse mit Ammoniumchloridlösung durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen in 20 ml gekühlter Ammoniumchlorid-Lösung aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde das Falcon-Röhrchen mit PBS/EDTA gefüllt und zentrifugiert (7 min/1900 rpm/4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS/EDTA resuspendiert und das Röhrchen mit PBS/EDTA aufgefüllt. Ein erneuter Waschschrift wurde durchgeführt, nach der Zentrifugation wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen in PBS/EDTA bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

2.7 Molekularbiologische Analyse der Differenzierung

2.7.1 RNA-Isolierung

Die RNA der Zellen wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit nach Herstellervorschrift isoliert. Um Verunreinigungen mit DNA auszuschließen, wurde der optionale DNase-Verdau-Schritt mit dem Qiagen RNase free DNase Set während der Aufreinigung durchgeführt.

2.7.1.1 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem GeneQuant *pro* UV/VIS Spektrophotometer der Firma Biochrom bestimmt. Die Schichtdicke der benutzten Küvette betrug 1 cm, der Multiplikationsfaktor für RNA beträgt 40 µg/ml. Die Reinheit der RNA wurde durch den Wert des Quotienten A_{260}/A_{280} abgeschätzt, dieser liegt bei reiner RNA zwischen 1,9 und 2,1.

2.7.2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR diente dem Nachweis von Veränderungen der Expression verschiedener, für die Herzdifferenzierung spezifischer Gene.

Die Oligonukleotide (Tab. 2-15, Tab. 2-17) wurden von der Firma Thermo Electron RP-HPLC-aufgereinigt bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden nach Angaben des Herstellers zu einer 100 µM Lösung in sterilem Wasser aufgenommen.

Standardmäßig wurden bei jeder RT-PCR sowohl eine Positivkontrolle (humane fötale Herz-RNA) als auch eine Wasser- und eine Crossreaktionskontrolle (RNA aus Huhn-Herzzellen) mitgeführt.

Tab. 2-15 Primersequenzen für die reverse Transkription. T_M : Schmelztemperatur nach der 4+2 Regel

Gen	Basensequenz (5' → 3')	T_M (°C)
OXTR	GGA GCA TGA CGA TGA TGA AG	60
MLC2a	AGT GAC TTG TAG TCG ATG TT	60
MLC2v	CCA CAT GGC TAA CAG ACA AG	60
ANF	CAG GTG AGG TTC TAC CTT AA	58
SERCA	CAC GGC AGT GCC TTT GTT AT	60
GATA4	GAG CTG CTG GTG TCT TAG AT	60
Nkx2.5	ACG CCG AAG TTC ACG AAG TT	60
MEF2C	TCT GAT CAT GTT GCC CAT CC	60
MYH6	TTT CTC CAG GTT TGC CTT GG	60
TNNT2	GGT CTT GGA GAC TTT CTG GT	60
TNNI3	TCT GCA GAG ATC CTC ACT CT	60
GAPDH	ACG CCT GCT TCA CCA CCT T	60

Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde mittels reverser Transkription cDNA synthetisiert. Hierzu wurde das Omniscript™RT Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden spezifische RT-Primer (Tab.2-15) eingesetzt und RNasin (Promega) wurde zusätzlich zugegeben.

Für die reverse Transkription wurden die Komponenten (Tab.2-16) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und 1 h bei 50 °C inkubiert.

Tab. 2-16 Reaktionsansatz der reversen Transkription

pro Reaktion	Komponente
	1 µl RNasin 10 U/µl
	2,5 µl Primer-Mix (3,75 pmol pro Primer)
	2 µl dNTP (5 mM/dNTP)
	2 µl 10x RT-Puffer
	1 µl Omniscript 4 U/µl
	500 ng RNA
	ad 25 µl H ₂ O

Der reversen Transkription wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angeschlossen. Die Primer wurden so ausgesucht, dass es keine Kreuzreaktionen mit der aus der Kokultur mitisolierten Huhn-RNA gab.

Tab. 2-17 Primersequenzen für die PCR. T_M : Schmelztemperatur nach der 4+2 Regel

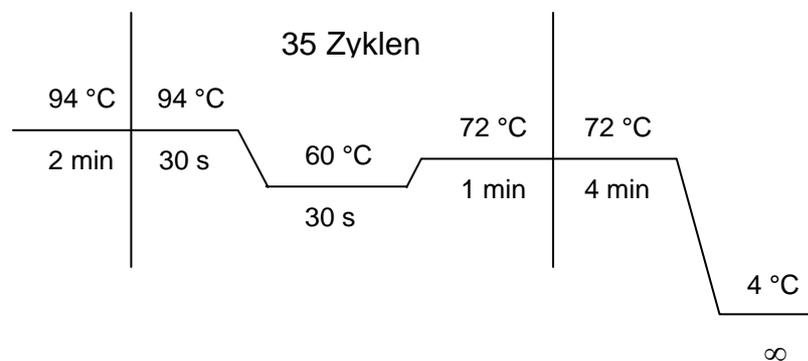
Gen		Basensequenz (5' → 3')	Länge des Amplicons	T_M (°C)
OXTR	<i>Forward-Primer</i>	CAT GAA GCA CCT AAG CAT CG	389 bp	60
	<i>Reverse-Primer</i>	GCT AGC GTG ATC CAT GTG AT		60
MLC2a	<i>Forward-Primer</i>	GAA GCC TTC AGC TGT ATC GA	281 bp	60
	<i>Reverse-Primer</i>	AGG AGA AGC TGC TTG AAC TC		60
MLC2v	<i>Forward-Primer</i>	GGA GGC CTT CAC TAT CAT GG	270 bp	60
	<i>Reverse-Primer</i>	CCG AAC GTA ATC AGC CTT CA		60
ANF	<i>Forward-Primer</i>	TCT GCC CTC CTA AAA AGC AA	249 bp	58
	<i>Reverse-Primer</i>	ATC ACA ACT CCA TGG CAA CA		58
SERCA	<i>Forward-Primer</i>	ACA GCT CTG ACT TGC CTG GT	444 bp	62
	<i>Reverse-Primer</i>	GTC CGT CTC GTA CTG CAC A		60
GATA4	<i>Forward-Primer</i>	ATC TCG ATA TGT TTG ACG ACT T	329 bp	60
	<i>Reverse-Primer</i>	CCT CTT TCC GCA TTG CAA GA		60
Nkx2.5	<i>Forward-Primer</i>	CAG CGT GCT GAA ACT CAC G	302 bp	60
	<i>Reverse-Primer</i>	CGG CAG TGC AGC TGT AGC CA		66
MEF2C	<i>Forward-Primer</i>	TCA GTT GGG AGC TTG CAC TA	237 bp	60
	<i>Reverse-Primer</i>	GAA TTC GTT CCG GTG ATC CT		60
MYH6	<i>Forward-Primer</i>	GGC TGG ATG AAA TCA TCG CT	326 bp	60
	<i>Reverse-Primer</i>	ACT GTT CTG CTG ATT AAT GTC A		60
TNNT2	<i>Forward-Primer</i>	GCA AAG GAG GCT GAA GAT G	347 bp	60
	<i>Reverse-Primer</i>	TTC CTC CTG TTC TCC TCC T		60
TNNI3	<i>Forward-Primer</i>	GAG TCT CAG CAT GGC GGA T	357 bp	60
	<i>Reverse-Primer</i>	GCC TCT ATG TCG TAT CTC TC		60
GAPDH	<i>Forward-Primer</i>	TTG GTA TCG TGG AAG GAC TC	227 bp	60
	<i>Reverse-Primer</i>	CAC CAC TGA CAC GTT GGC A		60

Es wurde ein Primer-Mix aus den jeweiligen *Forward*- und *Reverse*-Primern hergestellt, in dem die Endkonzentration 3,75 pmol/Primer betrug. Hierfür wurde die Taq DNA Polymerase mit Q-Solution (Qiagen) verwendet. Die Komponenten (Tab. 2-18) wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert.

Tab. 2-18 Reaktionsansatz der PCR

pro Reaktion	Komponente
1 µl	Forward-Primer 20 pmol/µl
1 µl	Reverse-Primer 20 pmol/µl
1,5 µl	cDNA
2,5 µl	10x Puffer
5 µl	5x Q-Solution
1,5 µl	dNTP Mix
0,125 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
ad 25 µl	H ₂ O

Die PCR erfolgte in einem GeneAmp PCR System 9700 der Firma Applied Biosystems unter folgenden Reaktionsbedingungen (Abb. 2-8):

**Abb. 2-8** Reaktionsbedingungen der RT-PCR

Die PCR-Produkte wurden zur Analyse auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Als Größenmarker wurde eine 100bp-Leiter verwendet. Nachdem die DNA-Fragmente ausreichend aufgetrennt waren, wurde die Größe der Fragmente mit dem Gel-Dokumentationssystem dokumentiert.

2.7.3 Southern Blot

Zur Kontrolle der Spezifität der Banden der RT-PCR der humanen fötalen Herz-RNA (Positivkontrolle) wurde ein Southern Blot durchgeführt. Die dabei verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2-19 aufgelistet.

Tab. 2-19 Beim Southern Blot verwendete Lösungen

Transferlösung	0,4 M NaOH 0,6 M NaCl
Neutralisationslösung	0,5 M Tris-HCl pH 7,5 1 M NaCl
Prähybridisierungspuffer	5,8 g NaCl 10 g Dextransulfat 10 ml 10 % SDS 84,6 ml Aqua bidest
Hybridisierungspuffer	10 ml Prähybridisierungspuffer 300 µl Einzelstrang-Heringssperma-DNA
2x SSC	35,06 g NaCl 17,64 g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat ad 2000 ml Aqua bidest
20x SSPE	350,6 g NaCl 71,2 g Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O 14,8 g EDTA ad 2000 ml Aqua bidest (pH mit NaOH auf 7,4 eingestellt)
Puffer A	12,5 ml 20x SSPE 0,5 ml 10 % TritonX-100 ad 50 ml Aqua bidest
Puffer B	60 g Harnstoff 10 g Dextransulfat 100 ml 100 % TritonX-100 ad 1000 ml Aqua bidest
TMACI-Stocklösung	500 g TMACI in 500 ml Aqua bidest mit 2 gehäufte Messlöffeln Aktivkohle über Nacht gerührt und anschließend abfiltriert
TMACI-Lösung	45 ml TMACI-Stocklösung 0,7 ml 10 % TritonX-100 ad 70 ml Aqua bidest
Streptavidin-Horseradish Peroxidase-Lösung	200 ml Puffer B 168 µl SHRP-Stocklösung (Amersham ECL)

Die RT-PCR-Produkte wurden in einem 1,5 %igen Agarose-Gel mittels Elektrophorese aufgetrennt. Sowohl das Whatmanpapier als auch die Membran wurden in Transferpuffer eingelegt, die verschiedenen Blot-Komponenten wurden

wie abgebildet (Abb. 2-9) arrangiert und die DNA wurde anschließend per Kapillar-Blot über Nacht auf eine DNA-bindende Membran (GeneScreen plus) übertragen.

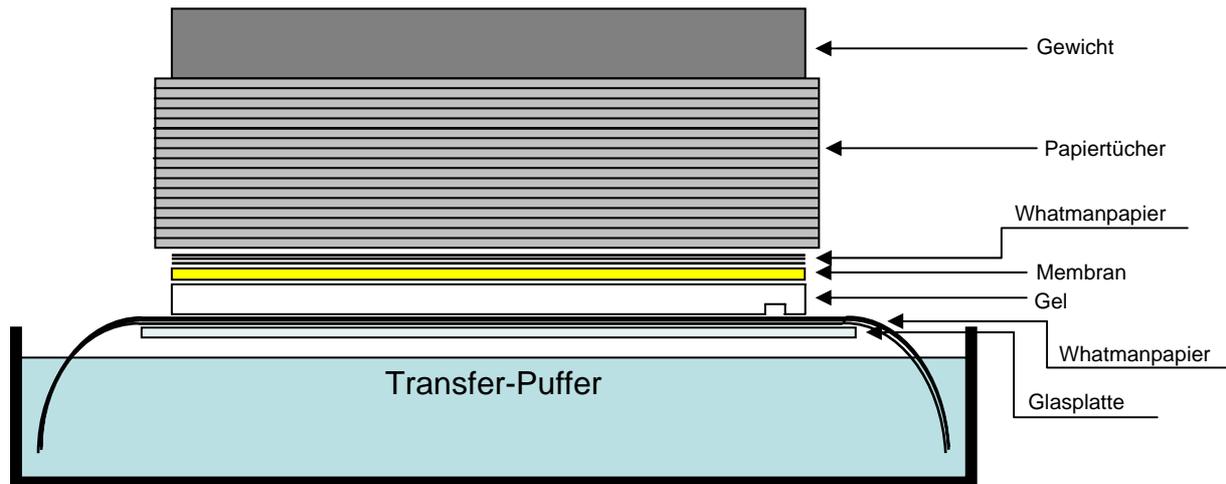


Abb. 2-9 Aufbau des Kapillar-Blots

2.7.3.1 Detektion der DNA mit Biotin-konjugierten Oligonukleotiden

Die am 5'-Ende der Sequenz mit Biotin konjugierten Oligonukleotide (Tab. 2-20) wurden von der Firma Thermo Electron RP-HPLC-aufgereinigt bezogen. Auch diese lyophilisierten Primer wurden nach Angaben des Herstellers zu einer 100 μ M Lösung in sterilem Wasser aufgenommen.

Tab. 2-20 Sequenzen der Hybridisierungsprimer

Gen	Basensequenz des Hybridisierungsprimers (5' → 3')
MLC2a	Biotin- AGA AGC TCA ATG GGA CAG AC
MLC2v	Biotin- AGA AAC TTA AGG GAG CGG AC
NPPA	Biotin- AGG GAC AGA CTG CAA GAG G
Nkx2.5	Biotin- CTA CGG TTA TAA CGC CTA CC
TNNT2	Biotin- CGA GGC TCA CTT TGA GAA CA
TNNI3	Biotin- TTG CAG CTG AAG ACT CTG CT
GAPDH	Biotin- CGT GAT GGC CGC GGG GCT CT

Nach dem Blotten wurde die DNA durch zweiminütiges Crosslinken (120 mJ) an die Membran fixiert. Zum Hybridisieren wurde die Membran 10 min bei 42 °C im Hybridisierungspuffer rotierend inkubiert, anschließend wurden 150 pmol des Hybridisierungsprimers hinzugefügt und weitere 60 min bei 42 °C inkubiert. Die

Membran wurde zunächst kurz mit Puffer A gewaschen und dann 10 min mit 10 ml des gleichen Puffers bei 42 °C inkubiert, anschließend wurde zweimal mit 15 ml TMACI-Lösung 20 min bei 62 °C inkubiert, um unspezifisch gebundene Primer zu entfernen. Die Membran wurde zunächst 1 min, dann 10 min auf einem Schüttler mit 250 ml Puffer B gewaschen und anschließend in einer Lösung aus 250 ml Puffer B und 210 µl *Streptavidin-Horseradish-Peroxidase* (ECL Streptavidin-HRP Conjugate, Amersham) 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt. Danach wurde die Membran einmal 1 min und zweimal je 10 min mit 250 ml Puffer B und einmal 1 min und je zweimal 10 min mit 250 ml 2x SSC gewaschen.

Zur Detektion wurde das Amersham ECL Plus Detection Kit (GE) nach Herstellervorschrift genutzt. Die Chemilumineszenz wurde mit einem Fujifilm LAS-3000 aufgenommen und dem dazu gehörigen ImageReader LAS 3000 ausgewertet.

2.7.4 Quantitative RT-PCR

Es wurde eine quantitative Analyse der Expression der Gene mittels RT-PCR (ABI Prism 7700 Sequence Detector, Applied Biosystems) durchgeführt. Die Analyse basiert auf der Fluoreszenzdetektion der Substanz SYBR-Green[®], die in doppelsträngige DNA interkaliert. Während der PCR wird nach jedem Elongationsschritt die Fluoreszenz detektiert. Die Effizienz der PCR wurde über eine cDNA-Konzentrationsreihe bestimmt. Die verschiedenen Komponenten (Tab. 2-21) wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert.

Tab. 2-21 Zusammensetzung der quantitativen PCR

pro Reaktion	Komponente
6,5 µl	H ₂ O
4 µl	cDNA
1 µl	<i>Forward-Primer</i> (20 pmol/µl)
1 µl	<i>Reverse-Primer</i> (20 pmol/µl)
12,5 µl	2x PCR-Mix (Absolute QPCR SYBR Green [®] ROX Mix, ABgene)

Die PCR erfolgte unter den in Abbildung 2-10 dargestellten Konditionen. Die Fluoreszenz wurde nach der Elongation detektiert.

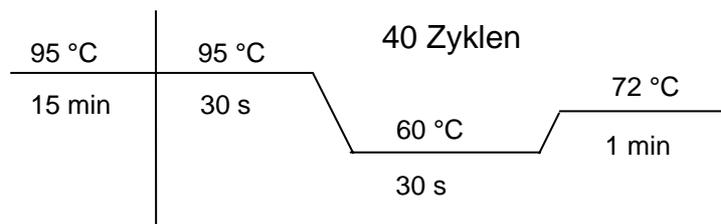


Abb. 2-10 Reaktionsbedingungen der quantitativen PCR

Zur Kontrolle der Spezifität der Produkte wurden Schmelzkurven erstellt. Da Produkte verschiedener Längen bei unterschiedlichen Temperaturen schmelzen, konnten die Schmelzkurven zeigen, ob nur das gewünschte spezifische Produkt amplifiziert wurde oder auch Primerdimer oder unspezifische Produkte. Die Erstellung der Schmelzkurven erfolgte unter den in Abbildung 2-11 dargestellten Bedingungen. Die Fluoreszenz wurde innerhalb der 20 min Temperatursteigerung kontinuierlich detektiert.

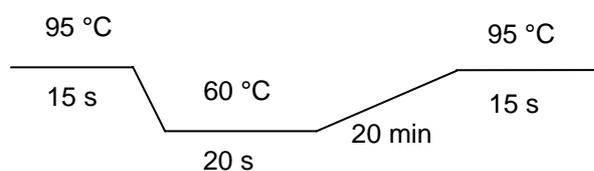


Abb. 2-11 Reaktionsbedingung zur Erstellung der Schmelzkurve

Die relative Expression zeigt die n-fache Überexpression von Genen im differenzierten Zustand im Vergleich zum undifferenzierten Zustand. Zur Bestimmung der relativen Expression wurde der C_T -Wert herangezogen. Der C_T ist der Thresholdzyklus, also der Zyklus, in dem die Hintergrundfluoreszenz durch das gewünschte Fluoreszenzsignal signifikant überstiegen wird. Die Bestimmung der relativen Expression erfolgt in drei Schritten.

- 1) Der C_T -Wert der Zielsequenz (C_{Tz}) wird auf den des Referenzgens GAPDH (C_{TR}) normalisiert: $\Delta C_T = C_{Tz} - C_{TR}$
- 2) Der ΔC_T -Wert der Zielsequenz zum Zeitpunkt x (ΔC_{Tx}) wird auf den zum Zeitpunkt 0 (ΔC_{T0}) normalisiert: $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{Tx} - \Delta C_{T0}$
- 3) Die relative Expression (X_R) wird bestimmt: $X_R = 2^{-\Delta \Delta C_T}$

2.7.5 Protein-Isolierung

Die Proteine wurden zum einen mit dem Qiagen AllPrep RNA/Protein Kit nach Herstellervorschrift isoliert und zum anderen mit nachfolgender Methode.

Tab. 2-22 Lösungen zur Protein-Isolierung

Puffer	250 mM	Trizma base (Sigma) mit 10N HCl auf pH7,5 eingestellt
Detergenz-Mix	10 mM	Trizma base (Sigma) mit 10N HCl auf pH7,5 eingestellt
	10 %	IGEPAL (Sigma)
	5 %	Sodium Deoxycholate (Sigma)
Lysis Puffer	5 ml	Puffer
	3,75 ml	1M NaCl (Sigma)
	2,5 ml	Detergenz Mix
	13,75 ml	steriles Wasser
	1Tbl	PIC (Protease Inhibitor Cocktail, Roche)

Das Zellkulturmedium wurde entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und bei 330 rcf zentrifugiert. Die Zellen wurden auf Eis mit 100 µl Lysispuffer pro 5×10^6 Zellen lysiert, das Lysat wurde 1,5 h im Kühlschrank gedreht und anschließend 7 min bei 4 °C und 15300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei –80 °C gelagert.

2.7.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung wird mit dem Lowry Assay (Lowry et al., 1951) durchgeführt. Hierzu wurden 5 µl Proteinlösung mit 25 µl Reagenz A (BioRad) und 200 µl Reagenz B (BioRad) vermischt. Nach 5 min wurde die Extinktion der Proteinlösung mit dem UV/VIS Spektrometer GeneQuant *pro* (Biochrom) gemessen. Die Konzentration der Proben wurde mit Hilfe einer Eichgerade bestimmt. Für diese wurde die Extinktion von vier Lösungen mit der Konzentration von 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml und 2 mg/ml BSA-Lösungen gemessen.

2.7.7 Western Blot

Der Western Blot diente dem Transfer der Proteine auf eine Membran und der anschließenden Visualisierung der Proteine durch Immundetektion. Die beim Western Blot verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2-23 aufgelistet.

Tab. 2-23 Beim Western Blot verwendete Lösungen

10 % SDS	10 g	Natriumdodecylsulfat auf 100 ml H ₂ O
1,5 M Tris-HCl pH < 8,8	181,7 g	Tris-HCl auf 1 l H ₂ O
0,5 M Tris-HCl pH < 6,8	60,57 g	Tris-HCl auf 1 l H ₂ O
PBST	0,1 %	Tween in PBS
10 %iges Trenngel	4,9 ml	H ₂ O
	2,5 ml	40 % Acrylamid/Bis
	2,5 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	100 µl	10 % SDS
	50 µl	10 % APS
	5 µl	Temed
4 %iges Sammelgel	6,4 ml	H ₂ O
	1 ml	40 % Acrylamid/Bis
	2,5 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	100 µl	10 % SDS
	50 µl	10 % APS
	10 µl	Temed
Laufpuffer	25 mM	Tris-Base, pH 8.3
	192 mM	Glycin
	0.1%	SDS
Transferpuffer	25 mM	Tris-Base
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol

Zunächst wurde die Lösung für das Trenngel vorbereitet, zwischen die beiden Glasplatten der Gelkammer gegossen und zur Glättung mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol abgenommen. Die Lösung für das Sammelgel wurde hergestellt, über das Trenngel geschichtet und bis zum Aushärten mit einem Probenkamm versehen. Anschließend wurden 15 µl Probenlösung mit 5 µl Lademarker gemischt und in die Probenaschen des Gels geladen. Als Größenmarker wurde der Cruz Marker Molecular Weight Standards (Santa Cruz) aufgetragen. Die Proteine wurden bei 40 mA 1 h elektrophoretisch aufgetrennt. Sechs Whatmanpapiere und die Hybond ECL Nitrocellulosemembran (GE Healthcare) wurden auf die Größe des Gels

zugeschnitten. Die Nitrocellulosmembran wurde in kaltem Transferpuffer equilibriert. Das Whatmanpapier wurde in Transferpuffer eingelegt, bis es durchtränkt war. Drei Whatmanpapiere, die Membran, das Gel und weitere drei Whatmanpapiere wurden im MBT-Multiblot-Transfergerät (LABOR-BRAND) aufeinander gelegt und die Proteine bei 2,5 mA/cm² Membran auf die Membran übertragen.

2.7.7.1 Immundetektion der Proteine mit Peroxidase-konjugierten Antikörpern

Die Immundetektion der Proteine basierte auf einer Zwei-Schritt Methode (vgl. Kapitel 2.4, Abb. 2-6, B).

Tab. 2-24 Primäre Antikörper für den Western Blot

Primärer Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Wirt	Isotyp	Firma
Monoklonal	Anti-Human α -Actinin	1:1000	Maus	IgG1	Sigma
Polyklonal	Anti-Human ANP	1:1000	Ziege	IgG	Santa Cruz
Monoklonal	Anti-Human β -Actin	1:1000	Maus	IgG2a	Sigma
Polyklonal	Anti-Human MLC2v	1:1000	Ziege	IgG	Santa Cruz
Polyklonal	Anti-Human Nkx2.5	1:1000	Kaninchen	IgG	Santa Cruz
Polyklonal	Anti-Human Troponin I	1:1000	Ziege	IgG	Santa Cruz
Polyklonal	Anti-Human Troponin T	1:1000	Ziege	IgG	Santa Cruz

Tab. 2-25 Sekundäre Antikörper für den Western Blot

Sekundärer Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Spezifität	Firma
Rind-Anti-Kaninchen	Peroxidase	1:10000	IgG	Santa Cruz
Rind-Anti-Maus	Peroxidase	1:10000	IgG	Santa Cruz
Rind-Anti-Ziege	Peroxidase	1:10000	IgG	Santa Cruz

Die Membran wurde zweimal je 10 min mit PBS gewaschen und eine Stunde mit PBST/5 % Blocking Agent (GE Amersham) geblockt, anschließend wurde einmal 15 min und zweimal je 5 min mit PBST gewaschen, um die Membran dann über Nacht mit dem primären Antikörper (Tab. 2-24) in 10 ml PBST bei 4 °C zu inkubieren. Die Membran wurde einmal 15 min und dreimal je 5 min mit PBST gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper (Tab. 2-24) in 10 ml Blocklösung bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran erneut einmal 15 min und dreimal je 5 min mit PBST gewaschen. Zur Detektion wurde das Amersham ECL Plus Western Blotting Reagent Pack (GE) nach Herstellervorschrift verwendet.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden 11 USSC-Zelllinien verwendet. Die unrestringierten somatischen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut sind adhärent wachsend und bei einer Konfluenz von 50 % zeigen sie eine spindelförmige (Abb. 3-1, A) Morphologie. Bei einer Konfluenz von 90 % zeigen sie eine länglich flache stromlinienförmige Morphologie (Abb. 3-1, B).

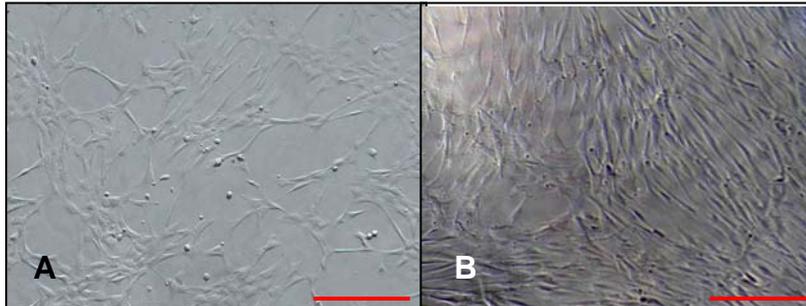


Abb. 3-1 USSC bei einer Konfluenz von 50 % zeigen eine spindelförmige Morphologie (A). USSC bei einer Konfluenz von 90 % zeigen eine stromlinienförmige Morphologie (B). Maßstabsbalken: 200 μ m.

3.1 Differenzierung der USSC *in vivo*

3.1.1 Markierung der USSC

Es wurde eine Möglichkeit gesucht, Zellen so zu markieren, dass sie eindeutig in ganzen Embryonen und Gewebeschnitten zu identifizieren sind.

Die USSC wurden zunächst vor der Injektion mit dem Membranfarbstoff PKH26 markiert. Diese Markierung der Zellen war zwar sehr homogen und auch sichtbar, jedoch sind die Zellen durch die etwas diffuse rote Fluoreszenz nur schwer lokalisierbar (Abb. 3-2). Es war schwierig, die Markierung in einem ganzen Embryo zu detektieren sobald dieser älter als 3,5 Tage war.

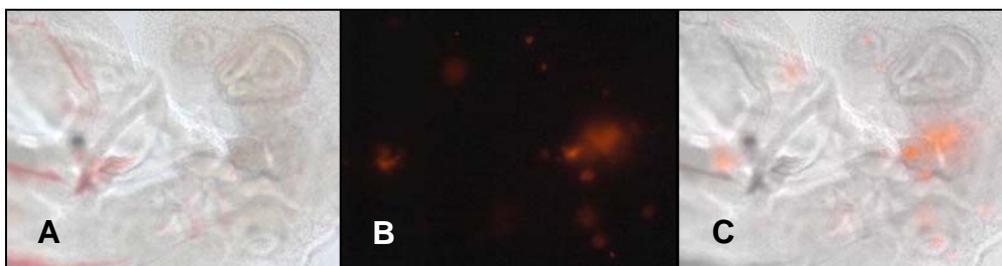


Abb. 3-2 56 h alter Embryo (A). Die injizierten Zellen sind durch die rote Fluoreszenz des PKH26 Membranfarbstoffs zu erkennen (B). Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit dem Bild des Embryos sieht (C).

Daher wurden Vektoren konstruiert, die das LacZ-Gen in das Genom integrierten und dadurch einen Nachweis der β -Galaktosidase ermöglichten. Die Kernlokalisierungssequenz interagiert mit Importinen, die die β -Galaktosidase in den Zellkern transportierten. Dadurch konnte die β -Galaktosidase nur dort nachgewiesen werden. Zunächst wurde der Vektor pJM1 hergestellt und HeLa-Zellen wurden wie beschrieben transfiziert (2.2.3), nachdem durch den Nachweis der β -Galaktosidase gezeigt werden konnte, dass der Vektor funktioniert (Abb. 3-3, A), wurden anschließend Zellen der USSC-Zelllinie SA 4/56 P3 transfiziert (Abb. 3-3, B).

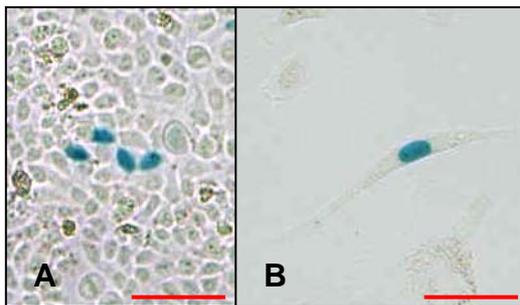


Abb. 3-3 In HeLa-Zellen (A) und in Zellen der USSC-Zelllinie SA 4/56 (B), die mit dem Vektor pJM1 transfiziert wurden, konnte die β -Galaktosidase nachgewiesen werden. Maßstabsbalken: 50 μ m.

Die Transfektionseffizienz war sehr gering. Generell resultierte die Transfektion mit dem Human MSC Nucleofector Kit (Amaxa) im Programm C-17 in einer niedrigeren Transfektionsrate, aber einer höheren Überlebensrate der Zellen, als die Transfektion im Programm U-23. Die Transfektion mit dem Programm C-17 mit 2 μ g DNA zeigte eine Transfektionseffizienz von 5 %; wurden 4 μ g DNA eingesetzt konnte eine Effizienz von 6 % gezeigt werden. Im

Programm U-23 konnte die Effizienz beim Einsetzen von 2 μ g DNA um 5 % gesteigert werden, beim Einsatz von 4 μ g DNA sogar um 11 %. Es wurden Zellen der Zelllinien SA 061 P11, SA 061 P9, SA 325 P7, SA 334 P7 und SA 4/10 P6 und SA 4/10 P7 transfiziert. Um die Anzahl der markierten Zellen zu erhöhen, wurden die transfizierten Zellen mit Geneticin selektiert, um im Anschluss eine reine markierte Population zu erhalten. Mit dieser Methode konnten maximal 1×10^3 Zellen generiert werden, die für eine Injektionsreihe nicht ausreichten.

Die virale Transfektion der USSC mit dem Vektor psCL1 führte zu einer Transfektionsrate von 75 %, jedoch zeigte sich ein ähnliches Problem wie bei der Membranfärbung: Es war eindeutig, dass die grün fluoreszierende Zelle eine USSC war, jedoch ergab sich auch hier die Schwierigkeit, die grüne Fluoreszenz in ganzen Embryonen zu erkennen, die älter als 3,5 Tage waren. Hinzu kam, dass die eGFP-Fluoreszenz durch die Hintergrundfluoreszenz des Huhngewebes teilweise nur schwer zu erkennen war.

Nach der Herstellung des Vektors pCL1nlsLacZ wurden HeLa-Zellen mit dem klonierten Vektor pCL1nlsLacZ und den Ursprungsvektoren pCL1eGFP und pczCFG2NLSLacZ wie beschrieben (2.2.2.10) transfiziert (Abb. 3-4, A-D). Durch die Vektoren pCL1nlsLacZ und pczCFG2NLSLacZ integrierte das LacZ-Gen in das Genom der Zellen und die β -Galaktosidase konnte nachgewiesen werden. Der Vektor pCL1eGFP integrierte das eGFP-Gen in das Genom und die Fluoreszenz war in transfizierten Zellen detektierbar. Nachdem die Funktionalität des Vektors in HeLa-Zellen gezeigt werden konnte, wurden USSC der Zelllinien SA 325 und SA 4/101 transfiziert (Abb. 3-4, E).

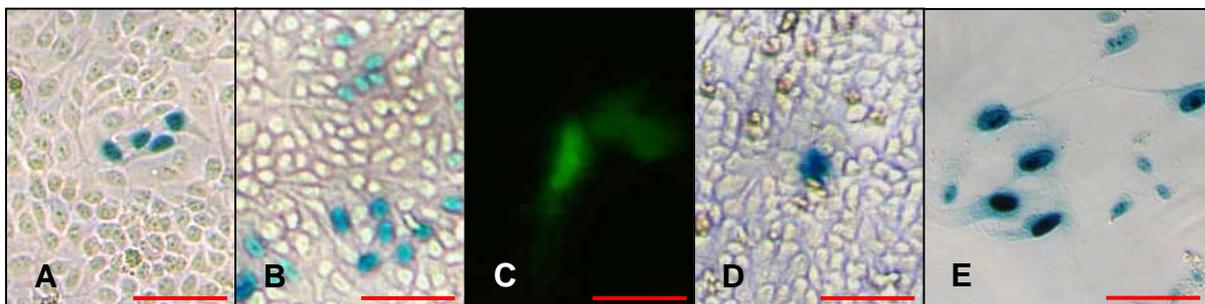


Abb. 3-4 HeLa-Zellen (A, B, D) wurden mit den Plasmiden pCL1nlsLacZ (A), pJM1 (B), pCL1eGFP (C), pczCFG2NLSLacZ (D) transfiziert. USSC wurden mit dem Plasmid pCL1nlsLacZ transfiziert (E). In den Zellen, die mit den Vektoren pCL1nlsLacZ (A, E), pJM1 (B) und pczCFG2NLSLacZ (D) konnte die β -Galaktosidase nachgewiesen werden und die Zellen, die mit dem Vektor pCL1eGFP (C) transfiziert wurden, konnten durch die eGFP-Fluoreszenz detektiert werden. Maßstabsbalken: 50 μ m.

Unmarkierte USSC konnten durch einen Antikörper gegen humane Zellkerne bzw. einem Antikörper gegen humane Mitochondrien eindeutig identifiziert werden. Um die Kreuzreaktivität der Antikörper zu testen, wurden Fibroblastenzellen des Huhns zu USSC gesät und die Zellen wurden mit dem Antikörper gegen humane Kerne in einer Zwei-Schritt-Methode mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper gefärbt. Die Antikörper waren nicht kreuzreaktiv mit den Huhnzellen (Abb. 3-5).

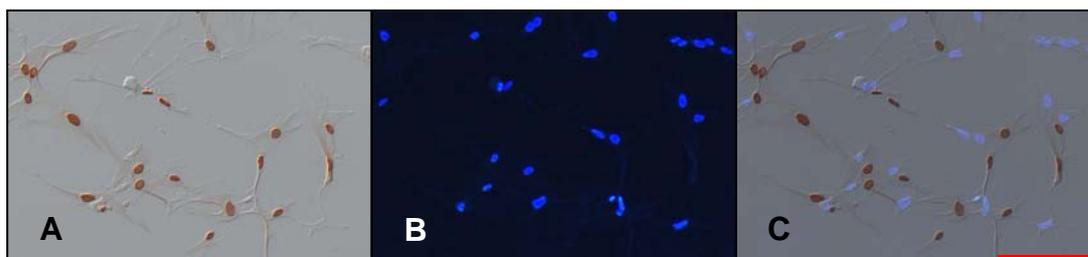


Abb. 3-5 Die USSC wurden durch die Immunhistochemie mit dem Ak gegen humane Zellkerne identifiziert (A). Die Zellkerne der Fibroblastenzellen des Huhns wurden durch die DAPI-Fluoreszenz sichtbar gemacht (B). Der Ak war nicht kreuzreaktiv (C). Maßstabsbalken: 100 μ m.

3.1.2 Applikation ins Blastoderm

USSC wurden ins Blastoderm von Hühnerembryonen im HH-Stadium 2 injiziert, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, bereits frühe Signale der Embryonalentwicklung erhalten zu können. Sie sollten dadurch in die verschiedenen Zelltypen differenzieren. Ziel war es außerdem, eine möglichst homogene Verteilung der humanen Zellen im Hühnerembryo zu erreichen.

Die Injektion in das Blastoderm störte die Entwicklung des Embryos stark. Die Überlebensrate betrug 27 % und der Anteil der missgebildeten Embryonen 54 % der überlebenden Embryonen.

Bei dieser Injektionsmethode wurden ausschließlich Zellen injiziert, die vorher mit dem Vektor pCL1nlsLacZ transfiziert wurden. Dadurch konnten die humanen Zellen durch die Expression der β -Galaktosidase eindeutig identifiziert werden. Wurden die Embryonen 24 h nach der Injektion präpariert, konnten ca. 200 von 500 humanen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-6, A). Die Zellen wurden in den äußeren Bereichen detektiert (Abb. 3-6, B). Bei der Präparation fünf Tage nach der Injektion konnten in 35 % der überlebenden Embryonen vereinzelte Zellen dokumentiert werden (Abb. 3-6, C).

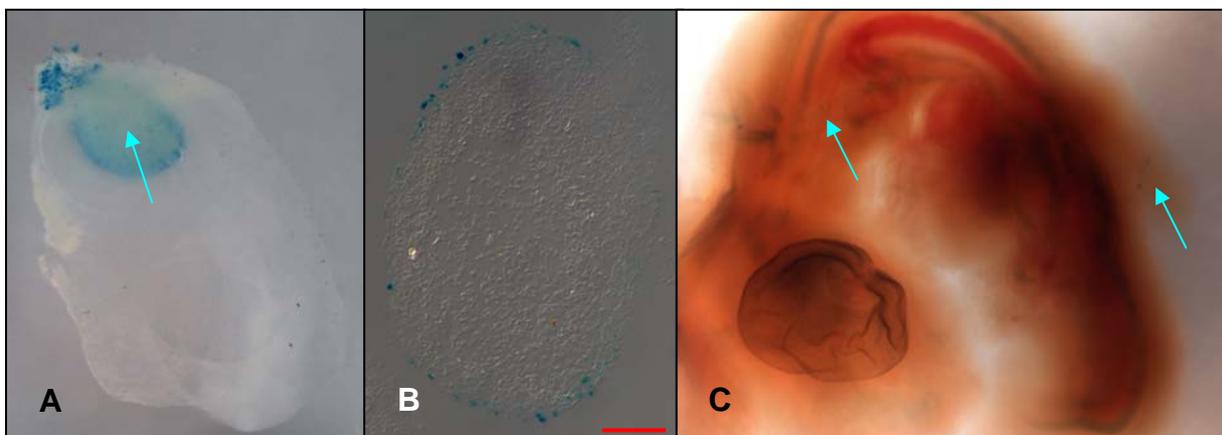


Abb. 3-6 Der Hühnerembryo wurde 12 h nach der Injektion präpariert und die mit dem Vektor pCL1nlsLacZ transfizierten Zellen wurden durch den Nachweis der β -Galaktosidase identifiziert (blau gefärbte Zellen in Bild A und B). Bild A zeigt den ganzen Hühnerembryo nach der Präparation. Im Bild B wird ein Schnitt durch die Injektionsstelle gezeigt, die als Wölbung (blauer Pfeil in Bild A) im präparierten Embryo sichtbar war. Maßstabsbalken: 100 μ m. Fünf Tage alter Hühnerembryo, der vereinzelte humane Zellen aufweist (C).

3.1.3 Applikation während der Gastrulationsphase

Die Injektion erfolgte in Embryonen im HH-Stadium 4-5. Diese Embryonen waren vor der Injektion bereits 12 h weiter entwickelt als die Embryonen, die für die Blastoderm-Injektion genutzt wurden. Trotzdem sollten die injizierten Zellen, genauso wie bei der Blastoderm-Injektion, von früh ausgesendeten Signalen profitieren und differenzieren. Dabei sollte die Überlebensrate steigen und die Rate der missgebildeten Embryonen sinken.

Tatsächlich resultierte der Unterschied im Zeitpunkt der Injektion in einer Erhöhung der Überlebensrate auf 40-47 %. Der Anteil an Missbildungen blieb mit 49-53 % gleich (Abb. 3-7, A; Abb. 3-8, A). Die Anzahl der Embryonen in denen humane Zellen nachgewiesen werden konnten stieg um 6 % auf 41 %.

Die humanen Zellen wurden sehr häufig in der Nähe des Herzschlauches nachgewiesen (Abb. 3-7, A; Abb. 3-8, A).

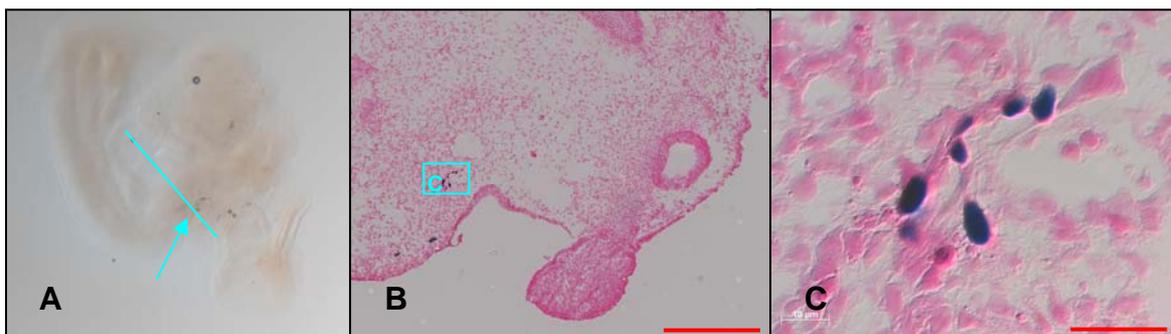


Abb. 3-7 Der Hühnerembryo (A) wurde 12 h nach der Injektion präpariert. Der blaue Pfeil zeigt den Bereich, in dem humane Zellen nachgewiesen werden konnten, der blaue Strich zeigt die Schnittebene des Bildes B und C. Bild B zeigt die Lokalisation der humanen Zellen (durch den β -Galaktosidase-Nachweis indigoblau), die in Bild C vergrößert dargestellt sind, in der Übersicht. Maßstabsbalken: 200 μ m (B), 20 μ m (C).

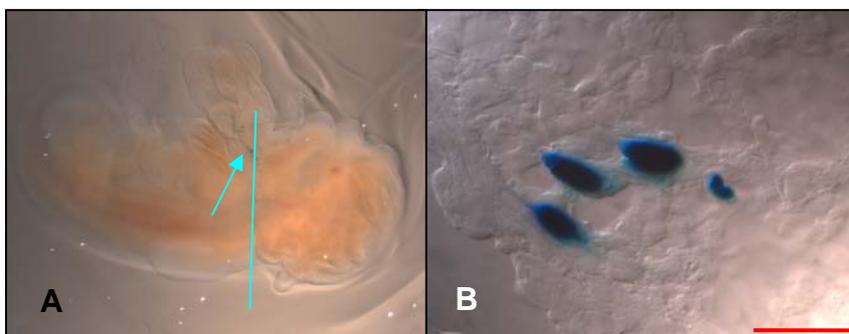


Abb. 3-8 Der Hühnerembryo (A) wurde 12 h nach der Injektion präpariert und die humanen Zellen wurden durch den β -Galaktosidase-Nachweis identifiziert. Sie waren im Bereich des blauen Pfeils lokalisiert. Die Schnittebene wird durch den blauen Strich gezeigt. Im Schnitt sind die humanen Zellen zu sehen (B). Maßstabsbalken: 20 μ m.

3.1.4 Manipulation von Somiten

Die Manipulation der Somiten im HH-Stadium 14 diente der Beobachtung der Migration.

Bei dieser Art der Manipulation betrug die Überlebensrate 88 %, in 50 % der überlebenden Embryonen wurden humane Zellen nachgewiesen und nur 5 % der überlebenden Embryonen waren missgebildet. Dies entspricht einem prozentualen Anteil wie er auch in den Kontrollgruppen vorkam.

Das Ersetzen der Somiten durch Zellaggregate scheiterte an der Größe der geformten Zellaggregate. Da mindestens 500 Zellen transplantiert werden sollten, wurden die Zellen nicht als Aggregat, sondern als Zellsuspension transplantiert.

Durch die Injektion einer Zellsuspension konnte nicht mehr eine auf die Injektionsstelle beschränkte Verteilung der Zellen sichergestellt werden. Dadurch war eine Aussage über die Migration der Zellen nicht möglich. Es konnte lediglich festgestellt werden, dass die humanen Zellen in den Regionen detektiert werden konnten, in der die manipulierten Somiten lagen.

Sowohl bei der Entfernung des 2. Somiten dexter kaudal im HH-Stadium 10 (Abb. 3-9), als auch bei der Entfernung des 6. und 7. Somiten dexter kranial im HH-Stadium 14 (Abb. 3-10) und anschließender Injektion humaner Zellen, konnten die Zellen im präparierten Embryo in der dem Somiten entsprechenden Höhe detektiert werden.

Die fluoreszierenden humanen Zellen konnten in den Schnitten nicht mehr detektiert werden. Da es jedoch nicht den Anschein hatte, dass die Zellen migrieren, wurde der Versuch nicht mit β -Galaktosidase exprimierenden USSC wiederholt.

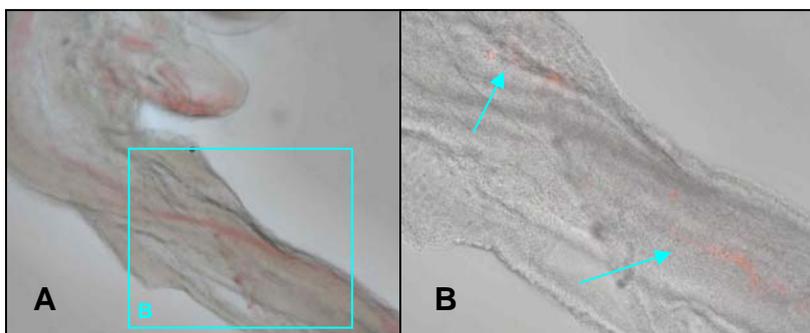


Abb. 3-9 Dem Embryo wurde im HH-Stadium 10 der 2. Somite rechts unten entfernt. Nachdem der Embryo 12 h später präpariert wurde, konnte die Fluoreszenz der PKH26 markierten USSC an der gleichen Stelle detektiert werden, an der auch die Injektion stattfand. Der blaue Kasten in Bild A zeigt den Ausschnitt des Bildes B. In Bild B markieren die blauen Pfeile die Bereiche, in denen die fluoreszierenden USSC detektiert werden konnten.

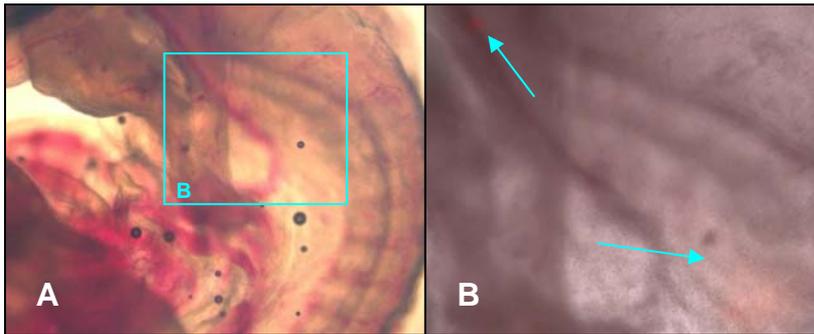


Abb. 3-10 Dem Embryo wurde im HH-Stadium 14 der 6. und 7. Somit rechts oben entfernt, die Fluoreszenz der PKH26 markierten USSC konnte in der, dem Somiten entsprechenden Höhe, detektiert werden.

3.1.5 Applikation an die Somiten

Bei der Injektion an die Somiten wurden auf Grund der Injektionsart alle Somiten einer Seite läsiert. Die injizierten Zellen waren longitudinal verteilt und sollten so an der Entwicklung von Geweben, die sich aus Somiten bilden, teilhaben.

Diese Injektion resultierte in einer Überlebensrate von 47-80 %. Von den 80 % überlebenden Embryonen konnten in 67 % humane Zellen nachgewiesen werden.

Bei dieser Injektionsart wurden Zellen an den Somiten parallel zum Neuralrohr exakt dem Injektionsverlauf entsprechend wieder gefunden (Abb. 3-11, A). Anfangs wurden Zellen injiziert, die mit dem Vektor pCL1eGFP transfiziert wurden, daher konnten die Zellen durch ihre eGFP-Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 3-11, A).

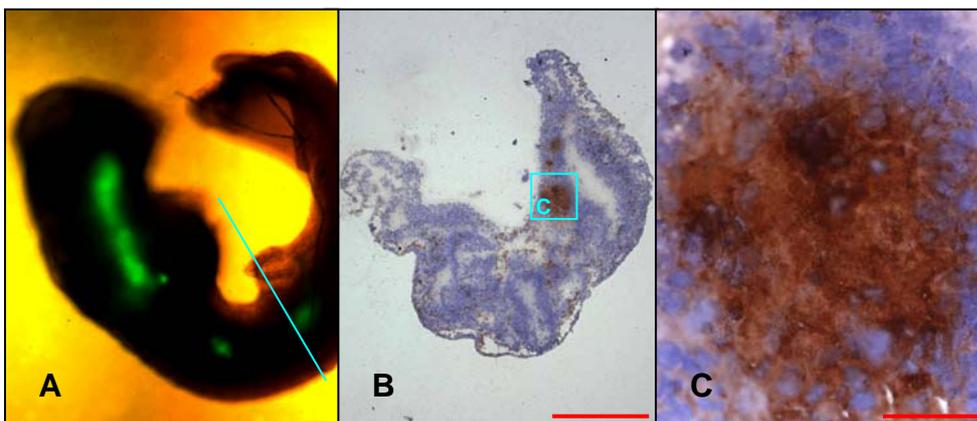


Abb. 3-11 Dem Hühnerembryo wurden im HH-Stadium 10 transfizierte USSC, die eGFP exprimierten, injiziert. Der Embryo wurde 20h später präpariert und analysiert. Die eGFP-Fluoreszenz war gut zu detektieren (A). Der blaue Strich zeigt die Schnittebene des Schnitts (B, C). Die USSC wurden immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen eGFP und einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper und anschließender DAB-Reaktion analysiert. Der Schnitt wurde mit Hämalaun zur Visualisierung der Kerne gegengefärbt. Der blaue Kasten in Bild B markiert den in Bild C gezeigten Ausschnitt. Maßstabsbalken: 200 μ m (B), 20 μ m (C).

Zusätzlich konnten die Zellen im Gewebeschnitt durch die immunhistochemische Zwei-Schritt-Methode mit einem primären Antikörper gegen eGFP und einem

Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper und anschließender DAB-Reaktion nachgewiesen werden (Abb. 3-11, B und C).

Die Fluoreszenz von eGFP konnte in älteren Embryonen nicht mehr eindeutig detektiert werden und die Immunhistochemie zeigte kein eindeutiges Ergebnis, daher wurden später USSC injiziert, die β -Galaktosidase exprimierten.

Durch den Nachweis der β -Galaktosidase war eine eindeutige Identifikation der humanen Zellen möglich und durch das Klären der Embryonen mit Glycerin konnten tiefer im Gewebe liegende humane Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-12, A und D).

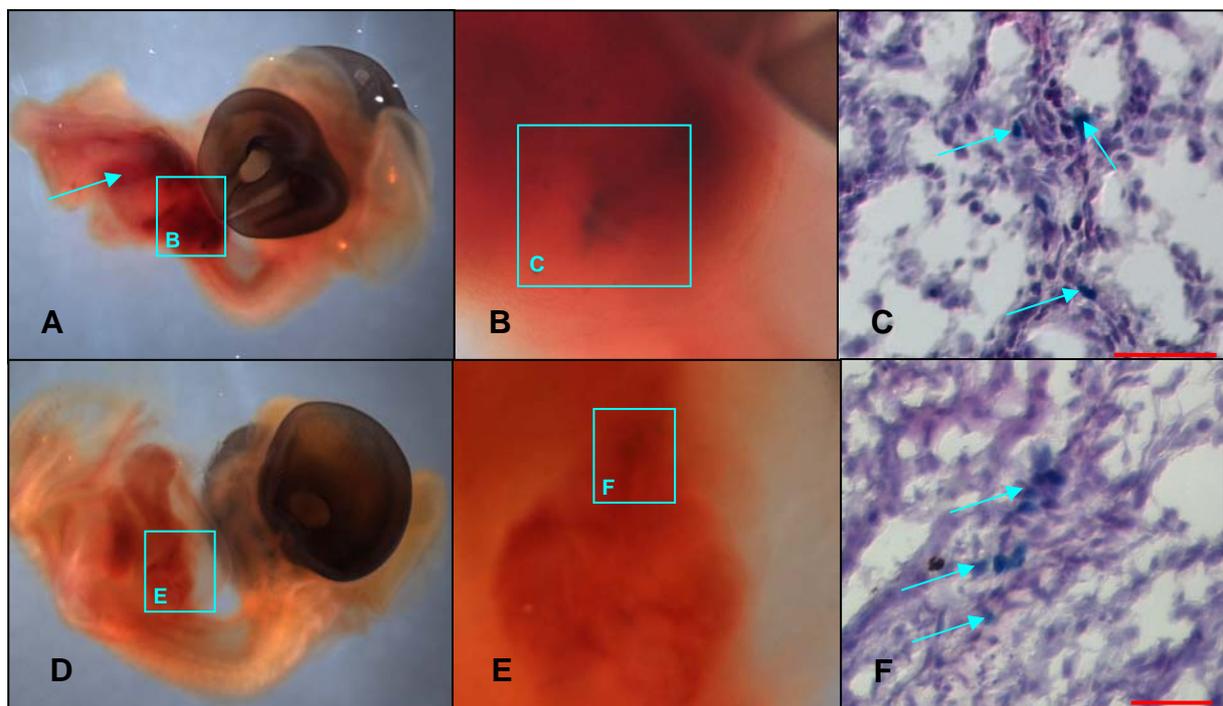


Abb. 3-12 Transfizierte USSC wurden dem Hühnerembryo im HH-Stadium 12 an die Somiten injiziert. Die Embryonen wurden vier (A) bzw. fünf (D) Tage später präpariert. Die USSC konnten an der linken Bauchseite im Muskelgewebe (blauer Pfeil in Bild A kennzeichnet den Bereich) und im Herzen (B, E) durch den Nachweis der β -Galaktosidase nachgewiesen werden. Die humanen Zellen (durch die blauen Pfeile markiert) befanden sich im intraventrikulären Septum (C, F). Die Schnitte wurden mit Hämalaun angefärbt, um die Kerne der Huhnzellen zu visualisieren. Maßstabsbalken: 25 μ m.

Bei der Injektion an die Somiten wurden in älteren Embryonen humane Zellen in Brusthöhe im Muskelgewebe und im oder am Herzen nachgewiesen (Abb. 3-12, A, B, D und E). In den Gewebeschnitten konnte die genaue Lokalisation der Zellen ermittelt werden (Abb. 3-13). Die humanen Zellen konnten im intraventrikulären Septum (Abb. 3-12, C, D; Abb. 3-13; Abb. 3-14) oder im Trabekelwerk der Kammern (Abb. 3-15) nachgewiesen werden.

Nachdem die Injektionsmethode etabliert war, wurden neben den β -Galaktosidase exprimierenden humanen Zellen auch unmarkierte humane Zellen injiziert. Diese wurden mit Hilfe der Immunhistochemie detektiert (Abb. 3-15). Dazu wurden humanspezifische (Abb. 3-15) oder gewebespezifische (Abb. 3-14) primäre Antikörper in Kombination mit Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörpern verwendet.

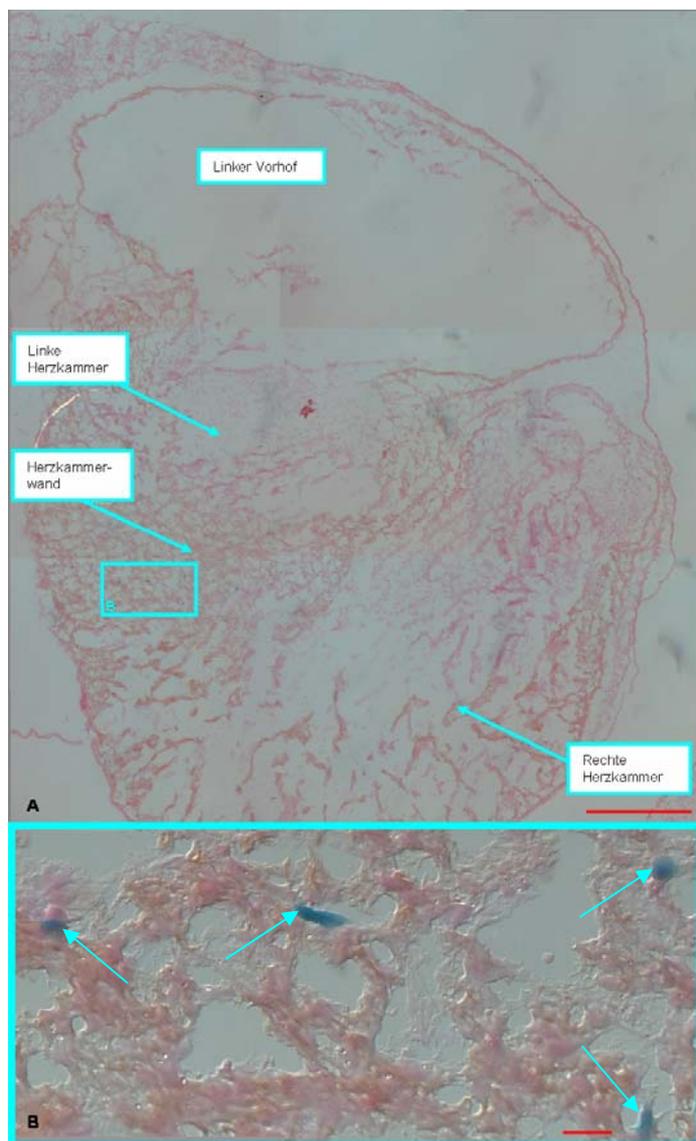


Abb. 3-13 Die humanen Zellen im Herzen des Embryos der Abbildung 3-12 A konnten im intraventrikulären Septum nachgewiesen werden. Bild A zeigt einen Schnitt durch das Herz. Die rechte und linke Herzkammer so wie der linke Vorhof und die Herzkammerwand (intraventrikuläres Septum) sind markiert. Der Ausschnitt des Bildes B ist in Bild A durch den blauen Kasten hervorgehoben. Die humanen Zellen sind auf Grund des β -Galaktosidase-Nachweises eindeutig identifizierbar. In Bild B sind sie zusätzlich durch blaue Pfeile markiert. Das Cytoplasma der Zellen wurde zusätzlich mit Eosin angefärbt. Maßstabsbalken: 200 μ m (A), 10 μ m (B).



Abb. 3-14 Die humanen Zellen im Herzen des Embryos der Abbildung 3-12 konnten im Gewebeschnitt immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen MLC2v und einem Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörper markiert werden. Die grüne Fluoreszenz konnte detektiert werden. Die Abbildung zeigt die Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit dem Bild des Gewebeschnitts im Nomarski-Interferenzkontrast. Maßstabsbalken: 25 μm (A), 10 μm (B).

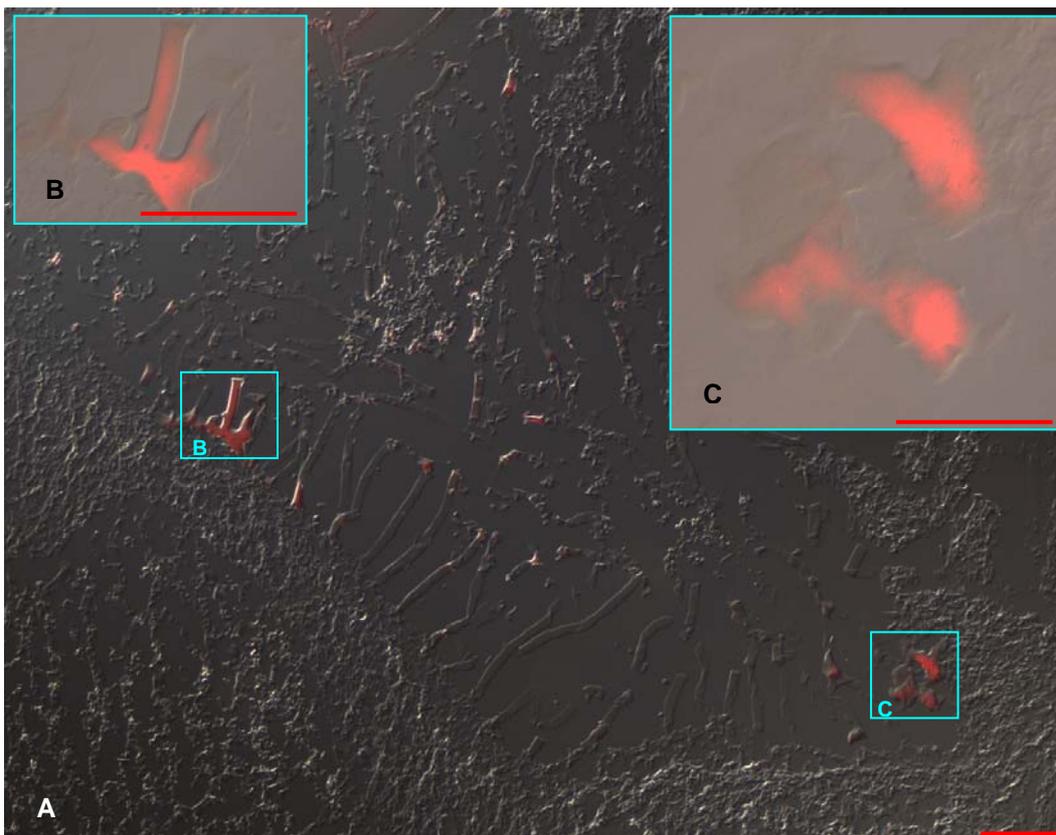


Abb. 3-15 Einem Embryo im HH-Stadium 10 wurden unmarkierte humane Zellen an die Somiten injiziert. Der Embryo wurde eingefroren und geschnitten. Die humanen Zellen wurden im Gewebeschnitt immunhistochemisch detektiert. Die Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit dem Bild des Gewebeschnitts im Nomarski-Interferenzkontrast zeigt die Fluoreszenz der humanen Zellen im Trabekel der Kammer des Herzens des Hühnerembryos. Maßstabsbalken: 50 μm (A, B), 25 μm (C).

3.1.6 Applikation an das zuvor geschädigte Neuralrohr

Die Injektion an das geschädigte Neuralrohr diente der Untersuchung des regenerativen Potenzials der USSC.

Die rechte Seite des Neuralrohrs von Embryonen im HH-Stadium 14 wurde geschädigt. An die Läsionsstelle wurden β -Galaktosidase exprimierende USSC injiziert.

Bei dieser Injektion überlebten 67 % der Embryonen. Davon enthielten 91 % der Embryonen humane Zellen.

Die humanen Zellen verblieben am Applikationsort im Bereich der Schädigung. Da die Schädigung nur auf der einen Seite des Neuralrohrs vorlag, konnte die andere Seite als Kontrolle herangezogen werden.

Die humanen Zellen konnten zwar am Schädigungsort nachgewiesen werden (Abb. 3-16), jedoch konnte keine Gewebe-spezifische Färbung und dementsprechend keine Differenzierung gezeigt werden.

Zusätzlich war die Überlebensrate der Kontrollgruppe mit Schädigung und ohne Injektion die gleiche. Das beschädigte Gewebe entwickelte sich auch bei dieser Gruppe normal.

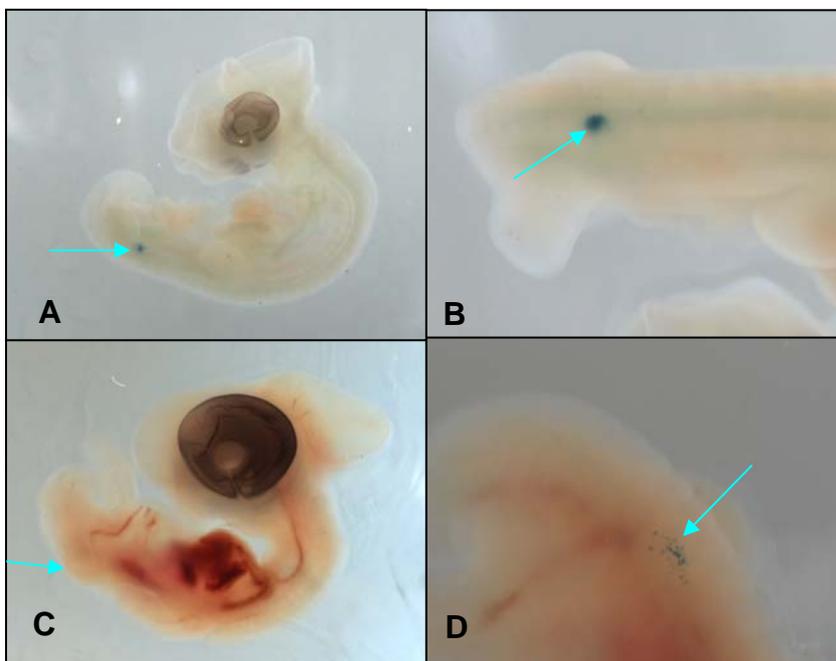


Abb. 3-16 Das Neuralrohr von Embryonen im HH-Stadium 14 wurde läsioniert und humane Zellen wurden an die Schädigungsstelle injiziert. Die Embryonen wurden zwei (A) und vier (C) Tage nach der Manipulation präpariert und die β -Galaktosidase der humanen Zellen wurde nachgewiesen. Die humanen Zellen befanden sich an der Läsionsstelle (blauer Pfeil A-D). Die Bilder B und D zeigen eine Vergrößerung des Bereiches, an dem die humanen Zellen detektiert werden konnten.

3.1.7 Applikation ins Herz

Die Injektion in das Herz des Hühnerembryos bot sich an, da es die offensichtlichste Möglichkeit war, in das Blutgefäßsystem des Embryos zu gelangen. Durch die Injektion sollte das Migrationsverhalten der Zellen beobachtet werden.

Die Überlebensrate betrug 58-88 %. Von den 88 % der überlebenden Embryonen wiesen 41 % humane Zellen auf.

Die Injektion erfolgte mit transfizierten, β -Galaktosidase exprimierenden USSC. Sie wurden in die Herzen von Embryonen im HH-Stadium 14 injiziert.

Während die humanen Zellen 12 h nach der Injektion im gesamten Gefäßsystem nachgewiesen werden konnten (Abb. 3-17, A), gelang es 48 h nach der Injektion nur noch vereinzelte Zellen im Herzen zu finden (Abb. 3-17, B, C; Abb. 3-18).

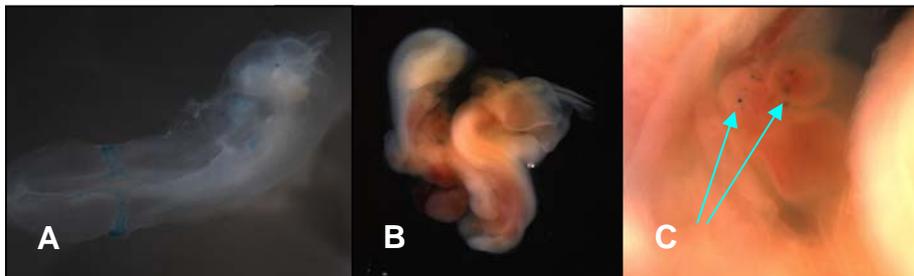


Abb. 3-17 Auf Grund des Nachweises der β -Galaktosidase, die von den humanen transfizierten Zellen exprimiert wurde, konnten die humanen Zellen an Hand des Indigofarbstoffs eindeutig identifiziert werden. Wurden die Embryonen 12 h nach der Injektion ins Herz (HH-Stadium 14) präpariert, konnten die Zellen über das gesamte Gefäßsystem nachgewiesen werden (A). Eine Präparation 48 h nach der Injektion zeigte nur noch vereinzelte Zellen im Herzen der Embryonen (B, blaue Pfeile Bild C). Bild B, C zeigen außerdem eine typische Anomalie, die daraus resultiert, wenn sich zwei Primitivstreifen auf einem Blastoderm entwickeln und die anterioren Enden kollidieren.

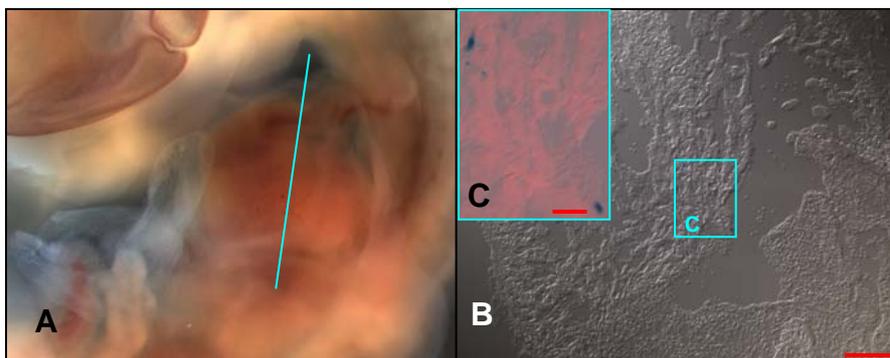


Abb. 3-18 Die Injektion erfolgte ins Herz eines Embryos im HH-Stadium 14. Der Embryo wurde fünf Tage später präpariert und die β -Galaktosidase der humanen Zellen wurde nachgewiesen. Die humanen Zellen befanden sich im Herzen (A). Der blaue Strich zeigt die Schnittebene des in Bild B im Nomarski-Interferenzkontrast dargestellten Gewebeschnitts. Der Bereich im intraventrikulären Septum, in dem humane Zellen nachgewiesen werden konnten, ist in Bild C vergrößert dargestellt. Die Huhnzellen sind durch einen Antikörper gegen Myosin und einen Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörper angefärbt. Maßstabsbalken: 100 μ m (B), 25 μ m (C).

3.1.8 Applikation ins Gehirn

Die direkte Injektion ins Gehirn diente der Untersuchung der neuralen Differenzierung der USSC. Bei dieser Injektionsart überlebten 67 % der Embryonen.

PKH26 markierte USSC wurden in das Gehirn von Embryonen im HH-Stadium 15 injiziert. Die Präparation der Embryonen erfolgte 12 h später (Abb. 3-19).

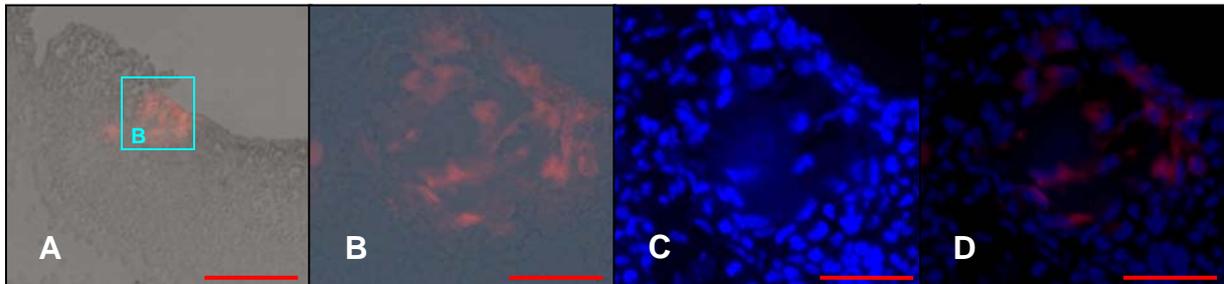


Abb. 3-19 Die Abbildung zeigt den Gewebeschnitt eines Embryos im HH-Stadium 15. Diesem Embryo wurden im HH-Stadium 10 mit PKH26 markierte USSC in den Kopf injiziert. Der Injektionsbereich ist auf Grund der roten Fluoreszenz der USSC klar erkennbar. Die Bilder A und B zeigen die Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit dem Hellfeldbild. Der blaue Kasten in Bild A zeigt den Ausschnitt, der in Bild B vergrößert dargestellt ist. Die Zellkerne wurden zusätzlich durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der an die DNA bindet, visualisiert (C). Bild D zeigt die Überlagerung der Fluoreszenzbilder. Maßstabsbalken: 100 μ m (A), 50 μ m (B-D).

Die humanen Zellen konnten in den Gewebeschnitten durch den fluoreszierenden Membranfarbstoff detektiert werden. β -Galaktosidase exprimierende USSC wurden in das Gehirn von Embryonen im HH-Stadium 10 injiziert (Abb. 3-20). Bei Die Embryonen wurden 12 h nach der Injektion präpariert, eingefroren und am darauf folgenden Tag geschnitten. Die Zellen konnten an der Injektionsstelle nachgewiesen werden. Bei einer Präparation der Embryonen 48 h nach der Injektion, konnten keine Zellen mehr nachgewiesen werden.

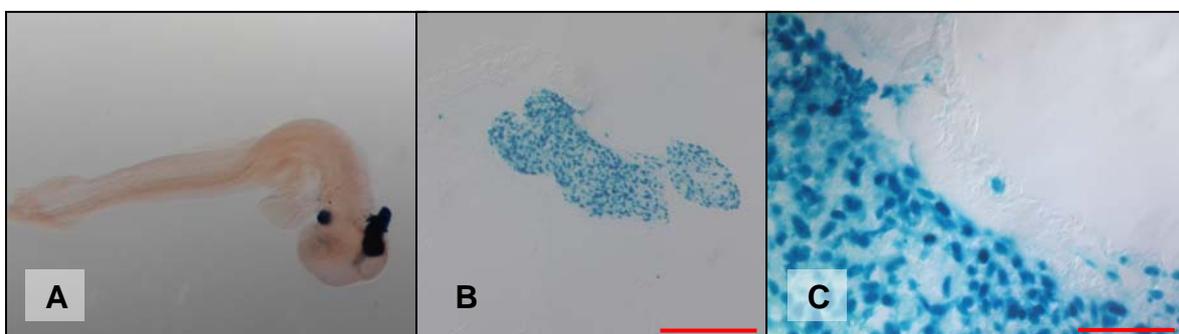


Abb. 3-20 Dem Embryo wurden β -Galaktosidase exprimierende USSC im HH-Stadium 10 ins Gehirn injiziert. 12 h nach der Injektion konnten die Zellen an der Injektionsstelle nachgewiesen werden (A). Im Gewebeschnitt zeigt sich ein deutlich abgegrenztes Areal von humanen Zellen (B, C). Maßstabsbalken: 200 μ m (B), 50 μ m (C).

3.1.9 Applikation in das externe Gefäßsystem

Durch diese Injektion sollte, ebenso wie bei der Injektion in das Herz, die Migration der Zellen untersucht werden.

Bei dieser Injektion überlebten 72-74 % der Embryonen und 47 % der Embryonen enthielten humane Zellen.

Die humanen Zellen wurden in ein Gefäß des externen Gefäßsystems eines Embryos im HH-Stadium 15 injiziert. Der Nachweis der humanen Zellen erfolgte auf Grund ihrer β -Galaktosidase-Expression. Die Präparation 12 h nach der Injektion zeigte eine Verteilung der humanen Zellen über das gesamte Gefäßsystem (Abb. 3-21, A und B), häufig mit einer erhöhten Anzahl an Zellen im Herzen (Abb. 3-21, B).

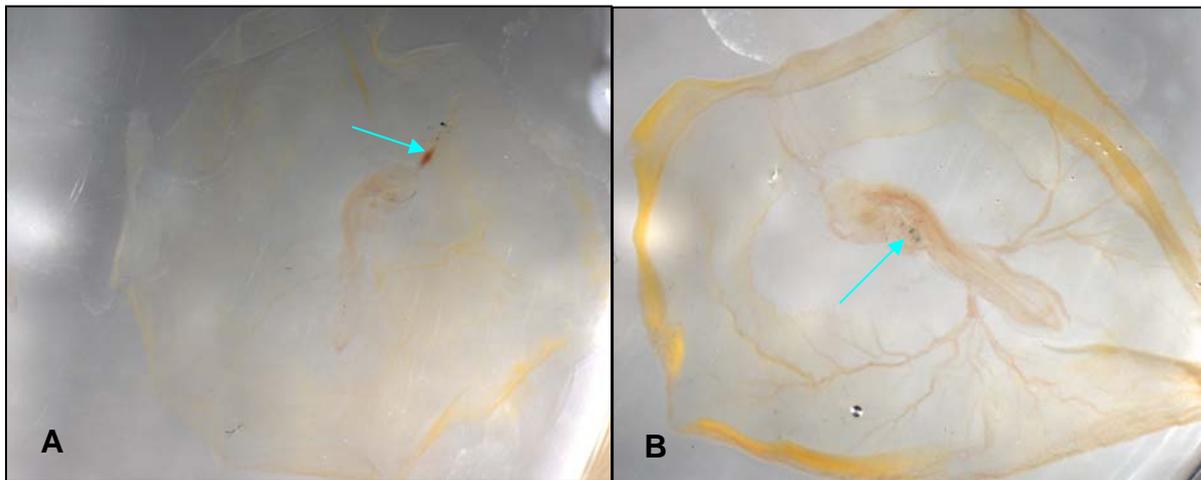


Abb. 3-21 Den Embryonen wurden im HH-Stadium 15 β -Galaktosidase exprimierende Zellen injiziert. Sie wurden 12 h später präpariert und die humanen Zellen wurden durch den Nachweis der β -Galaktosidase detektiert. Manchmal konnte die Injektionsstelle auf Grund einer Blutung noch nach der Präparation lokalisiert werden (blauer Pfeil in Bild A kennzeichnet eine solche Stelle). Der blaue Pfeil in Bild B kennzeichnet humane Zellen im Herzen des Embryos.

3.1.10 Applikation in die Extremität

Die Injektion in die Flügelanlage diente der Untersuchung des Differenzierungspotenzials der USSC zu Muskelzelle, Bindegewebe und Knochen.

Bei dieser Injektion überlebten 82-83 % der Embryonen, bei 77 % der Embryonen konnten humane Zellen nachgewiesen werden.

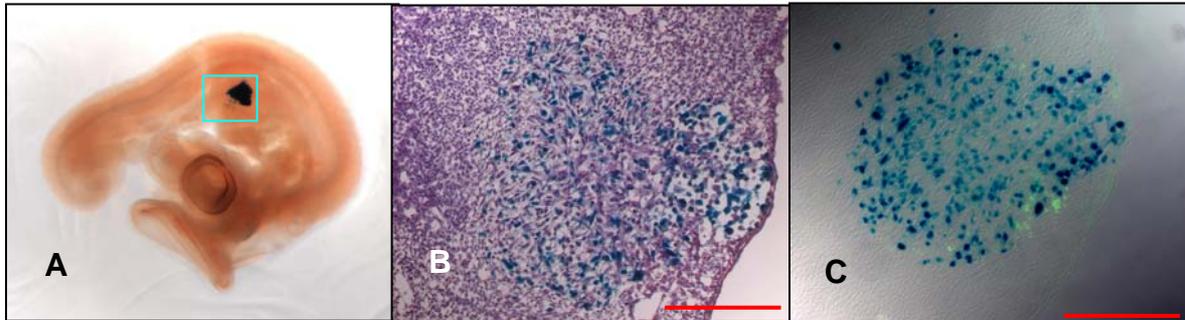


Abb. 3-22 Diesem Embryo wurden im HH-Stadium 23 humane β -Galaktosidase exprimierende Zellen in die Flügelanlage injiziert. Der Embryo wurde 12 h später präpariert und die humanen Zellen wurden durch den Nachweis der β -Galaktosidase detektiert (A). Im Gewebeschnitt konnten die humanen Zellen (indigo) verteilt zwischen den Huhnzellen lokalisiert werden (B). Die Zellkerne des Gewebeschnitts wurden zur Visualisierung der Huhnzellen mit Hämalaun angefärbt. In einer immunhistochemischen Analyse mit einem primären Antikörper gegen humanes α -Aktinin und einem Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörper (grün fluoreszierend) konnte vereinzelt die Expression von α -Aktinin nachgewiesen werden (C). Maßstabsbalken: 125 μ m (B).

Embryonen im HH-Stadium 23 wurden β -Galaktosidase exprimierende USSC in die Flügelanlage injiziert. Die Embryonen wurden 12 h (Abb. 3-22) oder ein bis drei Tage (Abb. 3-23) nach der Injektionen präpariert und die humanen Zellen wurden durch den Nachweis der β -Galaktosidase detektiert.

Die Zellen nahmen nicht an der Bildung des Knochens teil. Jedoch integrierten sie in das umliegende Gewebe und exprimierten vereinzelt das Muskel-spezifische Protein α -Aktinin (Abb. 3-22, C; Abb. 3-23, E).

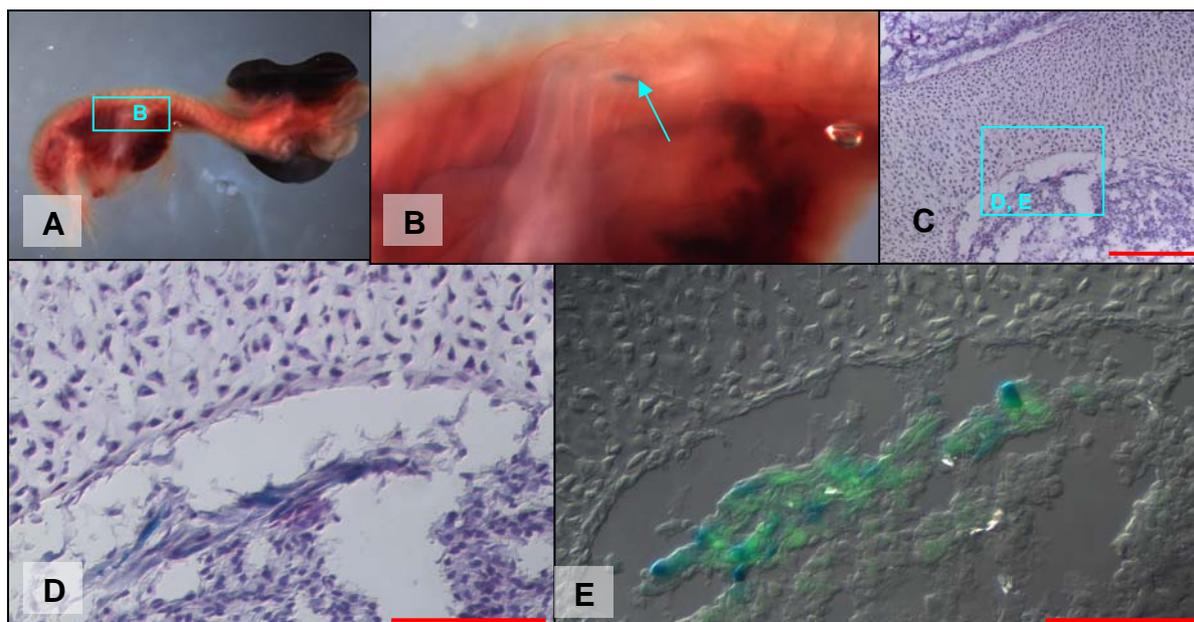


Abb. 3-23 Dieser Embryo wurde drei Tage nach Applikation der USSC in die Flügelanlage präpariert. Die Detektion der USSC erfolgte über den Nachweis der β -Galaktosidase. Die humanen Zellen waren im Flügel lokalisiert (A). Der blaue Kasten in Bild A markiert den in Bild B gezeigten Ausschnitt. Der blaue Pfeil in Bild B zeigt auf den Bereich, in dem die humanen Zellen lokalisiert werden konnten. Der genaue Bereich wird im Gewebeschnitt deutlicher (C-E). Die Zellkerne wurden zur Visualisierung der Huhnzellen mit Hämalaun angefärbt (C, D). Der blaue Kasten in Bild C zeigt den Ausschnitt der Bilder D und E. Die humanen Zellen sind im Gewebe direkt neben dem Knochen lokalisiert (D). Die Zellen wurden zusätzlich immunhistochemisch mit einem primären Antikörper gegen humanes α -Aktinin und ein Fluoreszenz-konjugierten sekundären Antikörper (grün fluoreszierend) analysiert. Die Zellen zeigten eine Expression von α -Aktinin (E). Bild E zeigt die Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit dem Bild des Gewebeschnitts im Nomarski-Interferenzkontrast. Maßstabsbalken: 100 μm (C), 50 μm (D, E).

3.1.11 Übersicht der manipulierten Embryonen

Die folgenden zwei Tabellen fassen die durchgeführten Injektionen zusammen, aufgeschlüsselt nach der Injektionsart, der Gesamtzahl der injizierten Embryonen, der Anzahl überlebender und missgebildeter Embryonen, sowie der Anzahl an positiven Embryonen. Positiv waren Embryonen, in denen humane Zellen auf Grund ihrer Markierung detektiert werden konnten. Der Prozentsatz der überlebenden Embryonen bezieht sich auf die Gesamtzahl injizierter Embryonen, während sich der Anteil an missgebildeten und positiven Embryonen auf die Anzahl überlebender Embryonen bezieht. In der Tabelle 3-1 sind die Injektionen mit markierten USSC dargestellt.

Tab. 3-1 Injektionen mit markierten Zellen

Injektionsart	Anzahl injizierter Embryonen	Anzahl überlebender Embryonen	Anzahl missgebildeter Embryonen	Anzahl positiver Embryonen
Injektion ins Blastoderm HH 1-2	200	54 (27 %)	29 (54 %)	19 (35 %)
Injektion während der Gastrulation HH 4	665	266 (40 %)	130 (49 %)	108 (41 %)
Injektion an die Somiten HH 10-14	97	78 (80 %)	5 (6 %)	52 (67 %)
Ersetzen von Somiten HH 10-14	185	163 (88 %)	8 (5 %)	81 (50 %)
Injektion ins Herz HH 13/14	94	83 (88 %)		34 (41 %)
Manipulation des Neuralrohrs HH 14	72	48 (67 %)		44 (91 %)
Injektion ins externe Gefäßsystem HH 15	103	76 (74 %)		36 (47 %)
Injektion in die Flügelanlage HH 23	79	65 (82 %)		50 (77 %)

Die Tabelle 3-2 stellt die Injektionen mit unmarkierten Zellen dar. Über den Anteil an Embryonen, in denen humane Zellen detektiert wurden, kann keine prozentuale Angabe gemacht werden.

Tab. 3-2 Injektionen mit unmarkierten Zellen

Injektionsart	Anzahl injizierter Embryonen	Anzahl überlebender Embryonen	Anzahl missgebildeter Embryonen
Injektion während der Gastrulation HH 4	226	107 (47 %)	57 (53 %)
Injektion an die Somiten HH 10-14	61	29 (47 %)	1 (3 %)
Injektion ins Herz HH 13/14	19	11 (58 %)	
Manipulation des Neuralrohrs HH 14	31	19 (61 %)	
Injektion ins externe Gefäßsystem HH 15	36	26 (72 %)	
Injektion ins Gehirn HH 10-15	15	10 (67 %)	
Injektion in die Flügelanlage HH 23	40	33 (83 %)	

3.2.1 Differenzierung durch Zugabe von Faktoren

Die Zugabe der Faktoren Oxytocin, Cardiogenol, Retinolsäure, DMSO, 5-Azacytidin oder ITS und Ascorbinsäure zum Medium ergab keine Differenzierung.

Es gelang weder durch die RT-PCR eine Genexpression nachzuweisen, noch konnte ein immunhistochemischer Nachweis mit einem Antikörper gegen die kardiale schwere Kette des Myosins erfolgen. Es machte keinen Unterschied, ob die Zellen zunächst als Suspensions- oder *hanging drop*-Kultur oder direkt als Monolayer-Kultur kultiviert wurden. Die durchflusszytometrische Analyse ergab auch keine messbare Expression der Proteine ANF, Nkx2.5, MLC2a, MLC2v, Troponin I und Troponin T.

3.2.2 Differenzierung durch Kokultivierung

Für die Kokultivierung wurden Herzzellen von Hühnerembryonen im HH-Stadium 16 mit USSC kultiviert. Es konnten kontrahierende Bereiche der Herzzellen des Huhns in der Kultur beobachtet werden (Abb. 3-25, A). Die Kontrollkultur zeigte vorrangig zwei Zelltypen. Der eine Zelltyp war morphologisch breit und flach mit klaren Sarkomerstrukturen (Abb. 3-25, B), der andere zeigte auffällige Vakuolen im Zytoplasma (Abb. 3-25, C).

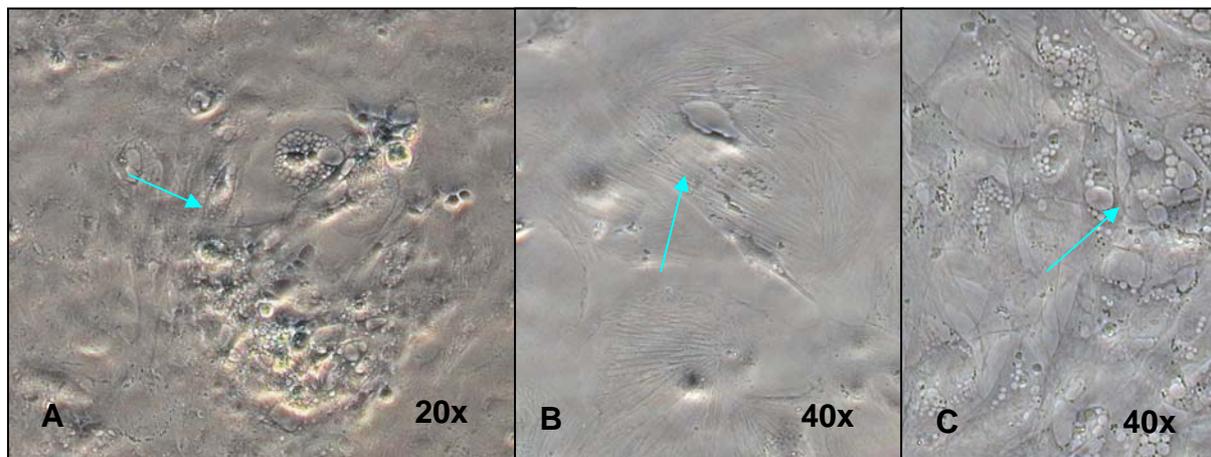
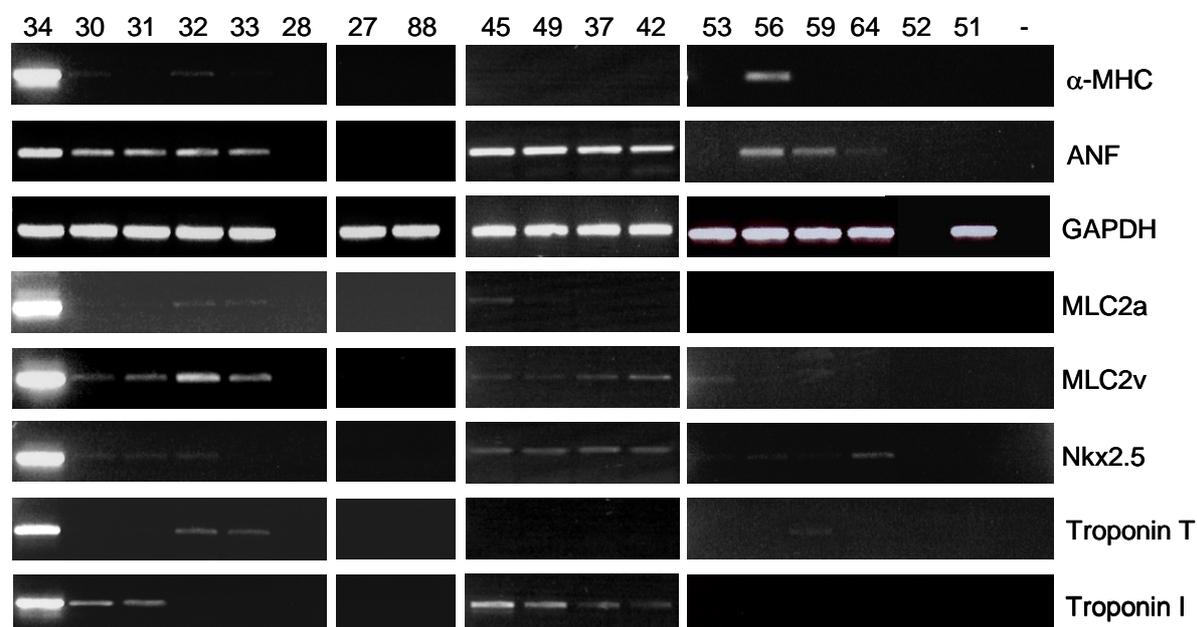


Abb. 3-25 Bild A stellt repräsentativ eine Kokultur von Herzzellen des Huhns und USSC in 20facher Vergrößerung dar. Der Pfeil in Bild A zeigt auf einen typischen kontrahierenden Bereich, bestehend aus Herzzellen des Huhns wie er in allen Kokulturen beobachtet werden konnte. In Bild B und C werden die beiden, in der Kontrollkultur der Herzzellen des Huhns dokumentieren, Zelltypen in 40facher Vergrößerung dargestellt. Die blauen Pfeile markieren die typischen Zellen (B, C).

3.2.2.1 RT-PCR

Mittels RT-PCR wurde die Genexpression von α -MHC, ANF, MLC2a, MLC2v, Nkx2.5, Troponin T und Troponin I qualitativ untersucht.



Nr.	RNA aus	Kulturdauer	Nr.	RNA aus	Kulturdauer
34	Humane Total-RNA aus fötalem Herz	Kontrolle	37	SA 5/50 P7: HZ \rightarrow $0,5 \times 10^5$: $0,75 \times 10^5$	4 Wochen
30	SA 5/18 P9: HZ \rightarrow $0,7 \times 10^5$: $0,6 \times 10^5$	3 Wochen	42	SA 5/50 P7: HZ \rightarrow $0,5 \times 10^5$: $0,75 \times 10^5$	5 Wochen
31	SA 5/18 P9: HZ \rightarrow $0,7 \times 10^5$: $0,36 \times 10^5$	3 Wochen	53	SA5/03 P9: HZ \rightarrow 1×10^5 : 1×10^5	3 Tage
32	SA 5/18 P10: HZ \rightarrow $0,5 \times 10^5$: $0,5 \times 10^5$	3 Wochen	56	SA5/03 P9: HZ \rightarrow 1×10^5 : 1×10^5	6 Tage
33	SA 5/18 P10: HZ \rightarrow $0,5 \times 10^5$: $0,75 \times 10^5$	3 Wochen	59	SA5/03 P9: HZ \rightarrow 1×10^5 : 1×10^5	9 Tage
28	HZ HH16	Kontrolle	64	SA5/03 P9: HZ \rightarrow 1×10^5 : 1×10^5	32 Tage
27	SA 5/18 P8	Kontrolle	52	HZ HH16	Kontrolle
88	SA 5/50 P8	Kontrolle	51	SA5/03 P9	Kontrolle
45	SA 5/50 P7: HZ \rightarrow 2×10^5 : $0,7 \times 10^5$	8 Tage	-	kein Template	Kontrolle
49	SA 5/50 P7: HZ \rightarrow 1×10^5 : $1,4 \times 10^5$	15 Tage			

Abb. 3-26 Repräsentative Agarosegele der RT-PCR. Eingesetzt wurde die RNA von vier Kokulturen der Zelllinie SA 5/18 (Nr. 30-33), die RNA von vier Kokulturen der Zelllinie SA 5/50 (Nr. 45, 49, 37, 42), die RNA von vier Kokulturen der Zelllinie SA 5/03 (Nr. 53, 56, 59, 64) und die RNA der Huhn-Kontrollkultur (Nr. 28, 52), die RNA der Kontrollkulturen der Zelllinie SA 5/18 (Nr. 27), der Zelllinie SA 5/50 (Nr. 88), der Zelllinie SA 5/03 (Nr. 51) und die Kontroll-RNA aus humanem fötalem Herz (Nr. 34). Die Nummern entsprechen den im Laufe der Arbeit vergebenen RNA-Nummern. Die Spalte „RNA aus“ zeigt, aus welcher Kultur und Kokultur die RNA isoliert wurde und die Anzahl ausgesäeter Zellen, die bei der Kokultur das Verhältnis von den humanen Zellen zu den Herzzellen des Huhns (HZ) widerspiegelt, sowie die Dauer der Kultur. Gezeigt werden die Banden der amplifizierten DNA-Fragmente. Die Expression von GAPDH diente als Kontrolle.

Die Analyse ergab, dass die Expression von ANF, MLC2v und Nkx2.5 am häufigsten auftrat. Die Expression von ANF war in 25 von 27 Proben nachzuweisen, die Expression von MLC2v in 24 von 27 Proben und die Expression von Nkx2.5 in 25

Troponin I beobachtet. Nur sechs der 27 Proben zeigten eine Expression von MLC2a, fünf von 27 Proben eine Expression von Troponin T und sieben von 27 Proben eine Expression von Troponin I. Die Expression von α -MHC konnte in 3 der 27 Proben gezeigt werden.

Aufgrund der Häufigkeit der Expression von MLC2v, ANF und Nkx2.5 war diese Kombination am häufigsten, jedoch war die Expression der Gene nicht zwangsläufig aneinander gebunden. Es konnte außerdem die Expression von MLC2v in Kombination mit ANF bzw. in Kombination mit Nkx2.5 gezeigt werden, genauso wie die Kombination der Expression von ANF und Nkx2.5 vorhanden war. Eine Expression von Troponin I oder Troponin T ohne die Expression der anderen drei Gene konnte in keiner Probe nachgewiesen werden.

In der Abbildung 3-26 sind repräsentativ Agarosegele dargestellt. Die Expressionsmuster der RNA aus den Zelllinie SA 5/18 (Nr. 30-33), SA 5/50 (Nr. 45, 49, 37, 42) und SA 5/03 (Nr. 53, 56, 59, 64) sind, wie oben beschrieben, typisch. Die Kokulturen Nr. 30 und Nr. 31 zeigten eine Expressionskombination von ANF, MLC2v, Nkx2.5 und Troponin I. Die Kokultur 32 zeigte die Kombination mit Troponin T statt Troponin I und die Kokultur 33 die Kombination von Kultur 32 ohne die Expression von Nkx2.5. Auch die Kokulturen Nr. 45, 49, 37, 42 zeigen die Kombination von ANF, MLC2v, Nkx2.5 und Troponin I, nur die Kultur Nr. 45 zeigt zusätzlich die Expression von MLC2a. Die Kokulturen mit der Zelllinie SA 5/03 zeigten unterschiedliche Expressionen. Während die Zellen der Kultur Nr. 53 nur eine leichte Expression von Nkx2.5 und MLC2v zeigten, exprimierten die Zellen der Kokultur Nr. 56 neben Nkx2.5 und MLC2v auch ANF und α -MHC. Die Zellen der Kokultur Nr. 59 zeigten eine Expression von ANF, MLC2v, Nkx2.5 und Troponin T und die der Kokultur Nr. 64 nur eine Expression von ANF und Nkx2.5. Die Huhnkontrolle (Nr. 28, 62) zeigte keine Expression. Die Kontrollkulturen der Zelllinie SA 5/18 (Nr. 27), der Zelllinie SA 5/50 (Nr. 88) und der Zelllinie SA 5/03 (Nr. 51) zeigten ausschließlich die Expression von GAPDH, während die Kontrolle aus humanem fötalem Herz (Nr. 34) die Expression aller analysierten Gene zeigt.

3.2.2.2 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR diente der Untersuchung der Expressionsveränderung der Gene ANF, MLC2a, MLC2v, Nkx2.5, Troponin I und Troponin T im Verlauf der Differenzierung. Die Effizienz der quantitativen RT-PCR wurde zunächst mit cDNA aus käuflich erworbener humaner fötaler totaler Herz-RNA überprüft. Die Effizienz der PCR lag bei 96-99 % und in der Schmelzkurve zeigte sich, dass nur ein Produkt amplifiziert wurde. Bei der Verwendung der eigens isolierten RNA für die RT-Reaktion zeigte sich ein zweiter Peak, der auf ein unspezifisches Produkt schließen lässt. Dies kam bei allen Primerpaaren, außer dem für GAPDH, vor. Die Erhöhung der Template-Menge ergab keine Verbesserung. In der Kontrolle mit humaner fötaler Herz-Total-RNA traten keine unspezifischen Produkte auf. Das Ergebnis deutet auf Probleme bei der Qualität der präparierten RNA hin. Es wurden nur Proben zur Auswertung verwendet, wenn die Schmelzkurve nur einen Peak zeigte. Es musste mindestens eine Verdopplung der Expression eines Gens vorliegen um als Veränderung gewertet zu werden.

Die quantitative RT-PCR zeigte Expressionsveränderungen in allen Zelllinien und allen Genen (Abb. 3-27). Die relative Expressionsveränderung der Gene MLC2a, ANF und Troponin I war hoch, die der Gene MLC2v und Nkx2.5 geringer und die des Gens Troponin T sehr gering. Die Stärke der Veränderung war sehr unterschiedlich zwischen den Zelllinien.

Die Zelllinie SA 5/18 wies eine 37fache Erhöhung in der Expression von ANF auf. Die MLC2a-Expression stieg um den Faktor 16. Die Expression von Nkx2.5 erhöhte sich um das 6fache, die Troponin I-Expression stieg um das 4fache, die des Troponin T um das 3fache und die von MLC2v um das Doppelte.

Die Veränderungen der Genexpression der Zelllinie SA 5/50 waren geringer. Die Expression der Gene MLC2a, MLC2v, Nkx2.5, Troponin I und Troponin T war nicht verändert. Lediglich die ANF-Expression stieg nach 21 Tagen in Kultur um das 7fache und nach 5 Wochen um das 12fache.

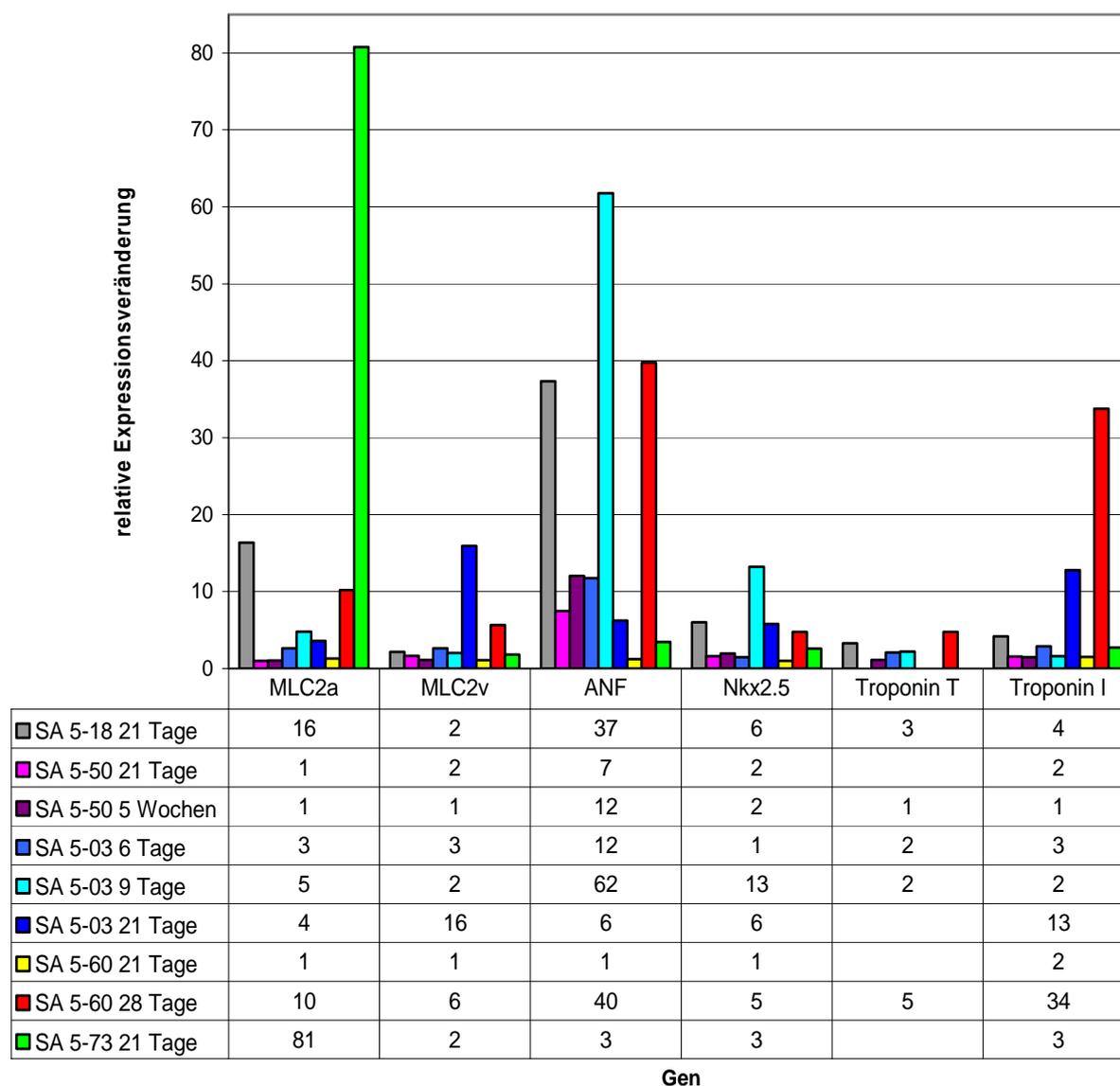


Abb. 3-27 Das Diagramm zeigt die relative Expressionsveränderung der Gene MLC2a, MLC2v, ANF, Nkx2.5, Troponin I und Troponin T, für Kokulturen der Zelllinien SA 5/18 (grau), SA 5/50 (rosa und lila), SA 5/03 (taubenblau, türkis und dunkelblau), SA 5/60 (gelb und rot) und SA 5/73 (grün). In der linken Spalte sieht man die bei der Kultur verwendete Zelllinie und die Kulturdauer. Für Troponin T konnten einige Werte nicht verwendet werden.

Während die Zelllinie SA 5/03 nach einer Dauer von sechs Tagen in Kultur eine 2-3fache Erhöhung der Genexpression von Troponin T, MLC2a, MLC2v und Troponin I aufwies, blieb die Nkx2.5-Expression unverändert. Jedoch stieg die Expression von ANF um das 12fache. Nach 9 Tagen in Kultur blieb es bei einer Verdopplung der Expression der Gene MLC2v und Troponin T, während die Troponin I-Expression unverändert blieb. Die MLC2a-Expression stieg um das 5fache, die Nkx2.5-Expression um das 13fache und die ANF-Expression sogar um das 62fache. Das Expressionsmuster veränderte sich erneut nach 21 Tagen in Kultur. Die relative Expression von Nkx2.5 und ANF verringerte sich auf eine 6fache

relative Expressionsveränderung, wohingegen die Expression von Troponin I um das 13fache und die Expression von MLC2v um das 16fache anstieg.

Bei der Zelllinie SA 5/60 war nach 21 Tagen Kulturdauer keine Veränderung in der Expression der untersuchten Gene nachzuweisen, außer eine Verdopplung der Troponin I-Expression. Jedoch wurden alle Gene nach 28 Tagen in Kultur um ein Vielfaches mehr exprimiert. Es zeigte sich eine 5-6fache Erhöhung der Expression von Nkx2.5, Troponin T und MLC2v. Die Expression von MLC2a nahm um das 10fache zu, während die Troponin I-Expression um das 34fache und die ANF-Expression um das 40fache anstieg.

Nach der 21tägigen Kokultur der Zelllinie SA 5/73 erhöhte sich die MLC2v-, ANF-, NKX2.5- und Troponin I-Expression um das 2-3fache, während die Expression von MLC2a um das 81fache stieg.

Alle Zelllinien wiesen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei allen Genen Veränderungen in der Expression auf.

3.2.2.3 Western Blot

Um die untersuchten Gene auch auf Protein-Ebene nachzuweisen wurden die Zellen auf die Strukturproteine α -Aktinin, MLC2a, MLC2v, Troponin T und Troponin I und auf die Proteine ANF und Nkx2.5 mittels Western Blot untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Zuvor wurden immunhistochemisch Crossreaktionen mit den Huhnzellen und unspezifische Bindungen an undifferenzierten USSC ausgeschlossen.

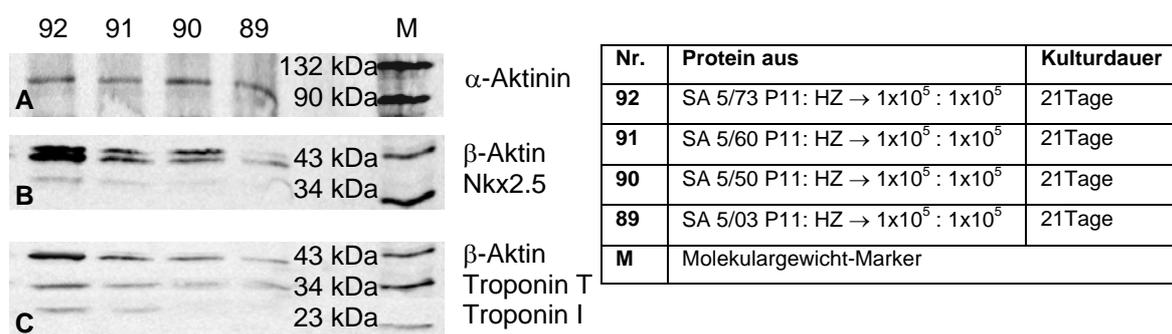


Abb. 3-28 Die Nummern der Kulturen entsprechen der im Laufe der Arbeit vergebenen Protein-Nummern. Bild A zeigt eine Bande mit einem Molekulargewicht von 100 kDa, das dem des α -Aktinins entspricht. Das Protein ist in allen vier Kulturen nachweisbar. In Bild B wird die Bande des β -Aktins gezeigt und für die Zelllinien SA 5/73, SA 5/60 und SA 5/50 wird auch das Protein Nkx2.5 nachgewiesen, das mit einem Molekulargewicht von 40 kDa detektiert werden konnte. Bild C zeigt, dass in allen vier Kulturen das Protein Troponin T nachweisbar war, das ein Molekulargewicht von 34 kDa hat und in den Kulturen der Zelllinien SA 5/73 und SA 5/60 konnte ebenfalls das Protein Troponin I nachgewiesen werden.

In allen Zelllinien konnten mindestens zwei der untersuchten Proteine nachgewiesen werden (Abb. 3-28). Jedoch konnte weder ANF, noch MLC2a oder MLC2v detektiert werden.

Es konnten Banden gezeigt werden, welche den erwarteten Banden von α -Aktinin (100 kDa), Nkx2.5 (40 kDa), Troponin T (34 kDa) und Troponin I (30 kDa) entsprachen.

In der Kokultur mit der Zelllinie SA 5/03 (Abb. 3-28, Nr. 89) konnten die Proteine α -Aktinin und Troponin T nachgewiesen werden. Die Kokultur mit der Zelllinie SA 5/50 (Abb. 3-28, Nr. 90) wies die Proteine α -Aktinin, Nkx2.5 und Troponin T auf. Bei der Kokultur mit der Zelllinie SA 5/60 (Abb. 3-28, Nr. 91) und der Zelllinie SA 5/73 (Abb. 3-28, Nr. 92) konnten die Proteine α -Aktinin, Nkx2.5, Troponin T und Troponin I nachgewiesen werden.

3.2.2.4 Immunhistochemie

Die Expression der Gene konnte in der RT-PCR und in der quantitativen RT-PCR nachgewiesen werden. Die Proteine wurden bereits im Western Blot nachgewiesen. Um jedoch einschätzen zu können, ob nur eine Genexpression oder die Bildung des Proteins oder bereits die Faltung der Proteine stattgefunden hat, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt.

Obwohl keine Reaktion der Herzzellen des Huhns mit den Antikörpern beobachtet werden konnte, wurden die humanen Zellen zusätzlich mit einem Antikörper gegen humane Kerne gefärbt.

Die atriale und ventrikuläre leichte Myosinkette, Troponin I und T wie auch der Transkriptionsfaktor Nkx2.5 konnten mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden (Abb. 3-29 bis Abb. 3-34). An Tag 0 zeigten die USSC keines der Proteine.

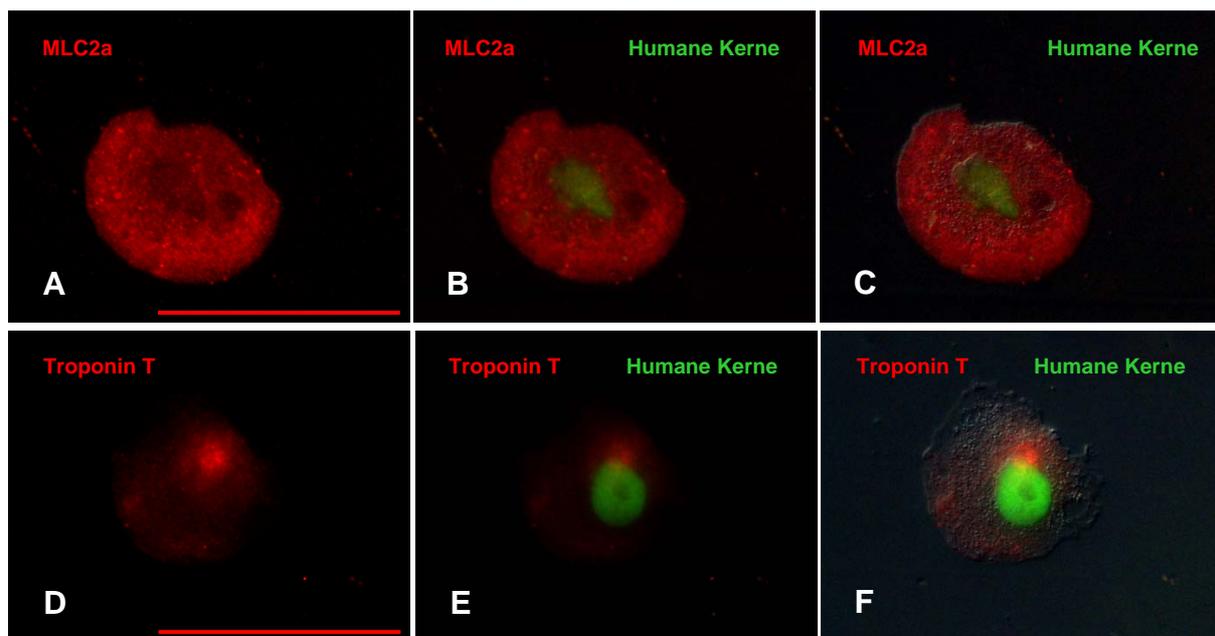


Abb. 3-29 Die Bilder zeigen repräsentativ eine 100x Vergrößerung einzelner immunhistochemisch gefärbter Zellen der Zelllinie SA 5/03, die 21 Tage mit Huhnherzzellen kokultiviert wurden. Die Zellen waren nach der Kokultivierung positiv für die Proteine MLC2a (A) und Troponin T (D). In Bild B ist die Zelle doppelt gefärbt für MLC2a (rot) und humane Kerne (grün). Die Doppelfärbung für Troponin T (rot) und humane Kerne (grün) ist in Bild E zu sehen. Die Überlagerung des Bildes der Doppelfärbung mit dem Bild im Nomarski-Interferenzkontrast (C, F) verdeutlicht die Struktur der Zelle. Maßstabsbalken: 50 μ m.

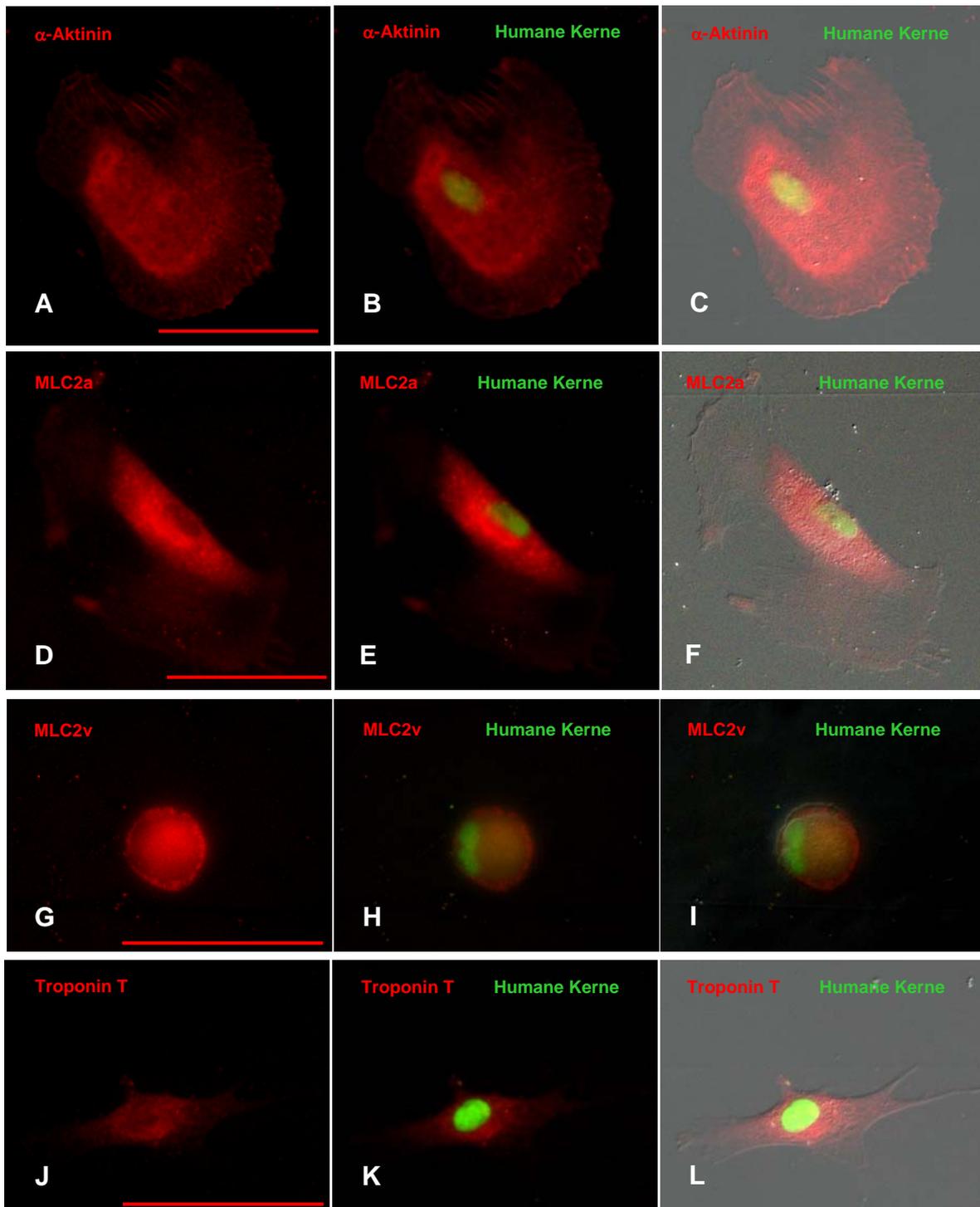


Abb. 3-30 In der Abbildung werden beispielhaft einzelne Zellen der Zelllinie SA 5/50 gezeigt, die 21 Tage mit Huhnherzzellen kokultiviert wurden und anschließend immunhistochemisch analysiert wurden. Die Zellen zeigten nach der Kokultivierung die Proteine α -Aktinin (A), MLC2a (D), MLC2v (G) und Troponin T (J). In den Bildern B, E, H und K sind die Zellen doppelt gefärbt für α -Aktinin (B), MLC2a (E), MLC2v (H) oder Troponin T (K) (rot) und humane Kerne (grün). Die Überlagerung des Bildes der Doppelfärbung mit dem Bild im Nomarski-Interferenzkontrast (C, F, I, L) verdeutlicht die Struktur der Zelle. Maßstabsbalken: 50 μ m.

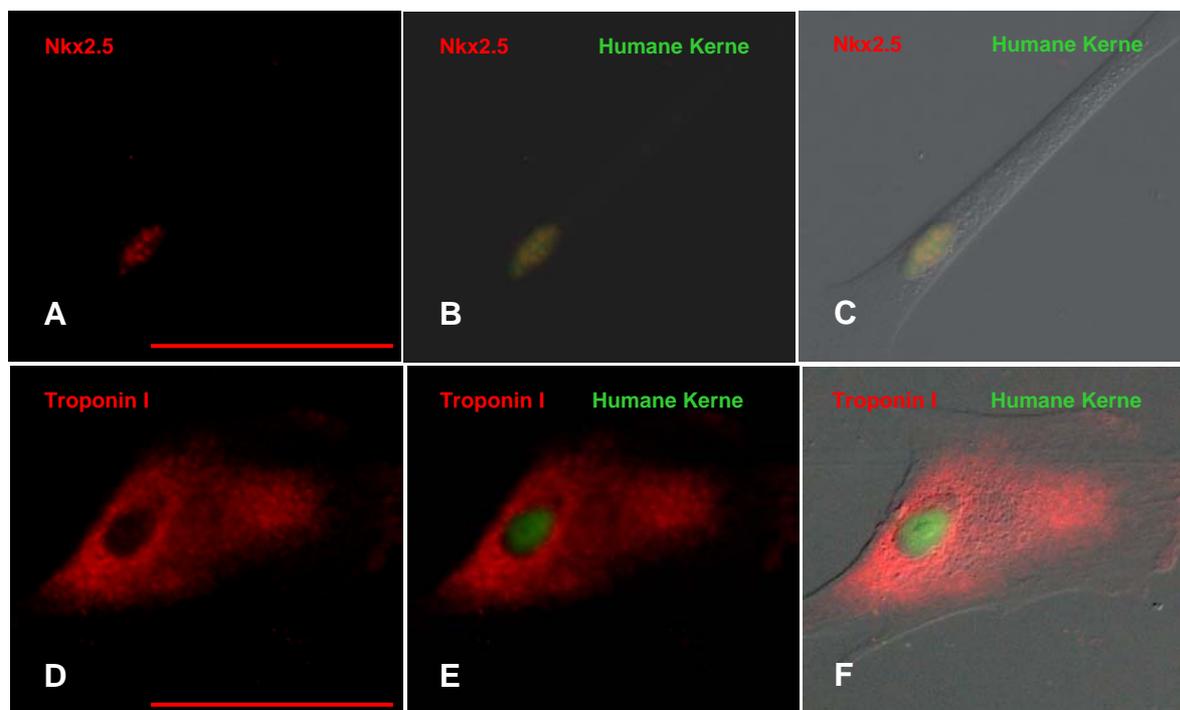


Abb. 3-31 Diese Abbildungen zeigen einzelne Zellen der Zelllinie SA 5/50, die 21 Tage mit Huhnherzzellen kokultiviert wurden. Für die anschließende immunhistochemische Analyse wurden primäre Antikörper gegen die Proteine Nkx2.5 (A, B), Troponin I (D, E) (rot) und humane Kerne (B, E) (grün) verwendet. Die Bilder C und F zeigen die Überlagerung des Bildes der Doppelfärbung mit dem Bild im Nomarski-Interferenzkontrast. Maßstabsbalken: 50 μ m.

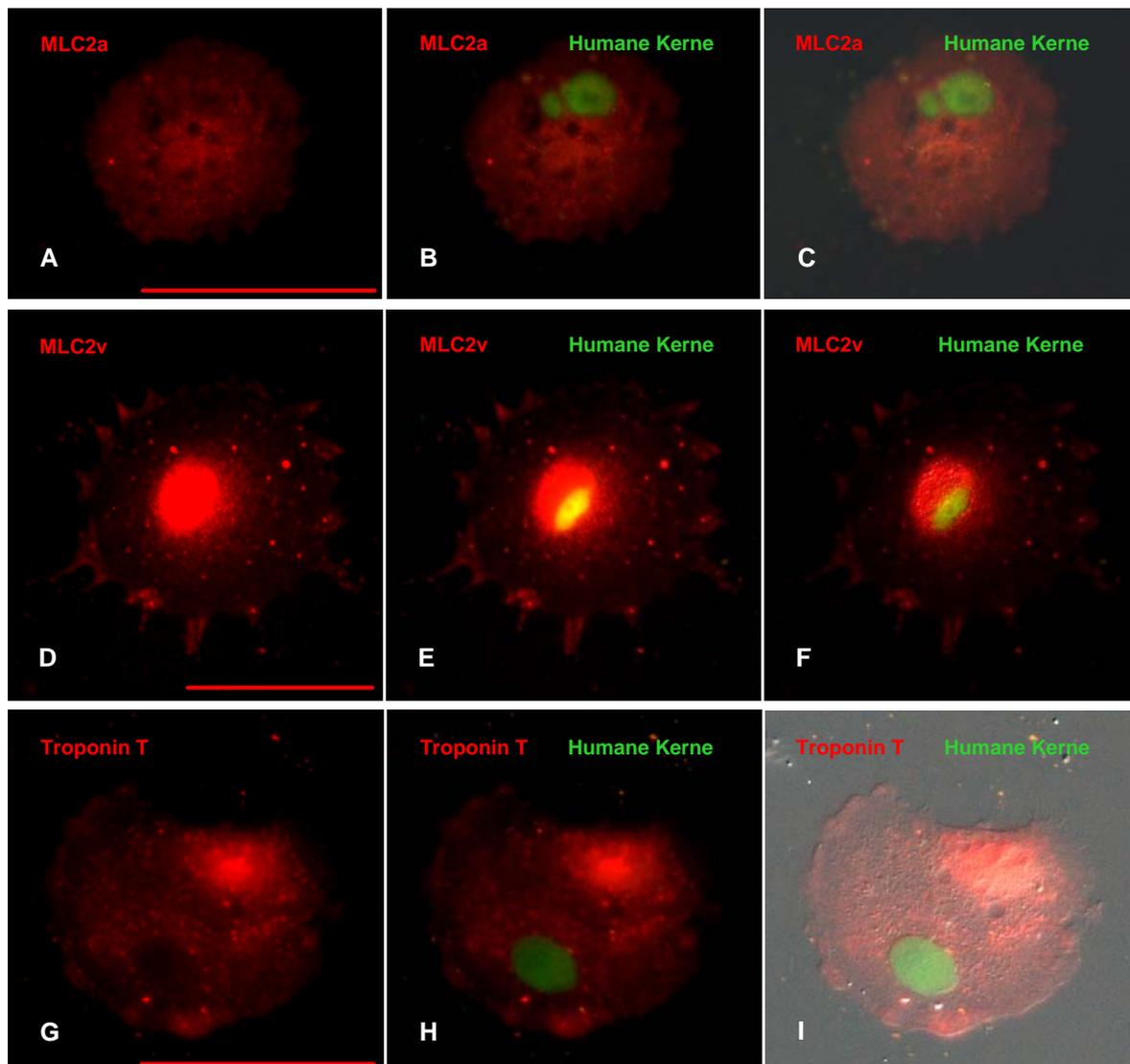


Abb. 3-32 Die Abbildungen zeigen einzelne repräsentative Zellen der Zelllinie SA 5/60, die 21 Tage mit Huhnherzzellen kokultiviert wurden. Es konnten die Strukturproteine MLC2a (A), MLC2v (D) und Troponin T (G) immunhistochemisch nachgewiesen werden. Auf Grund des Cy3-konjugierten sekundären Antikörpers, erscheinen die Strukturproteine rot-fluoreszierend (A-I). Der primäre Antikörper gegen humane Kerne wurde mit einem grün-fluoreszierenden sekundären Antikörper verbunden (B, C, E, F, H, I). Die Struktur der Zellen wird durch die Überlagerung des Bildes der Doppelfärbung mit dem Bild im Nomarski-Interferenzkontrast (C, F, I) verdeutlicht. Maßstabsbalken: 50 μ m.

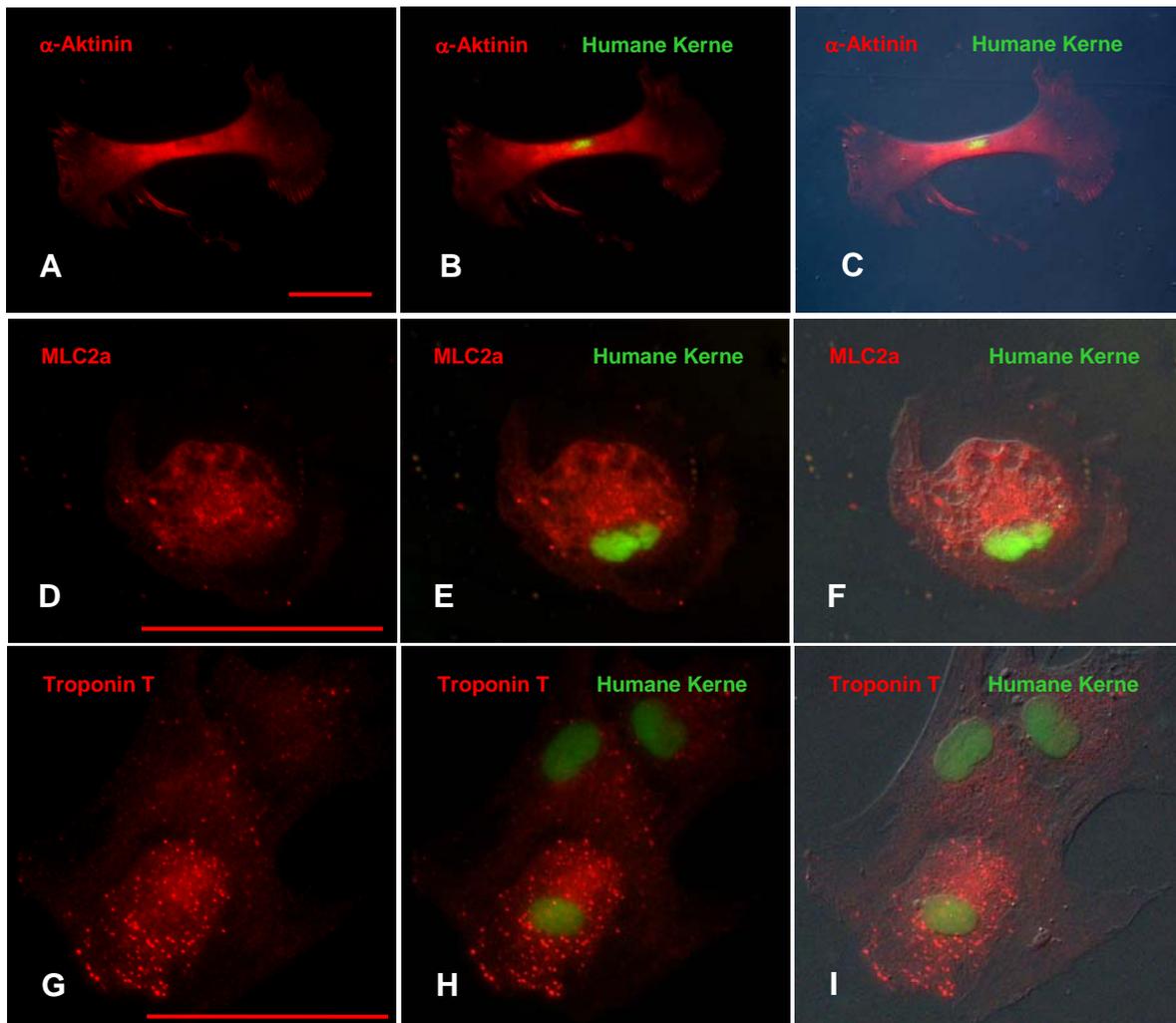


Abb. 3-33 Im immunhistochemischen Nachweis konnte gezeigt werden, dass die Zellen der Zelllinie SA 5/73 nach 21tägiger Kokultur mit Huhnherzzellen den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 (A) und die Strukturproteine Troponin I (D) und Troponin T (G) aufwiesen. Da die dazugehörigen sekundären Antikörper mit Cy3 konjugiert waren, ist die auf den Bildern A-I zu sehende rote Fluoreszenz Nkx2.5 (A-C), Troponin I (D-F) und Troponin T (G-I) zuzuordnen. Der primäre Antikörper gegen humane Kerne ist an einen FITC-konjugierten sekundären Antikörper gebunden worden, der eine grüne Fluoreszenz zeigt (B, C, E, F, H, I). Die Morphologie der Zelle wird durch die Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit dem Bild im Nomarski-Interferenzkontrast deutlich (C, F, I). Maßstabsbalken: 50 μ m.

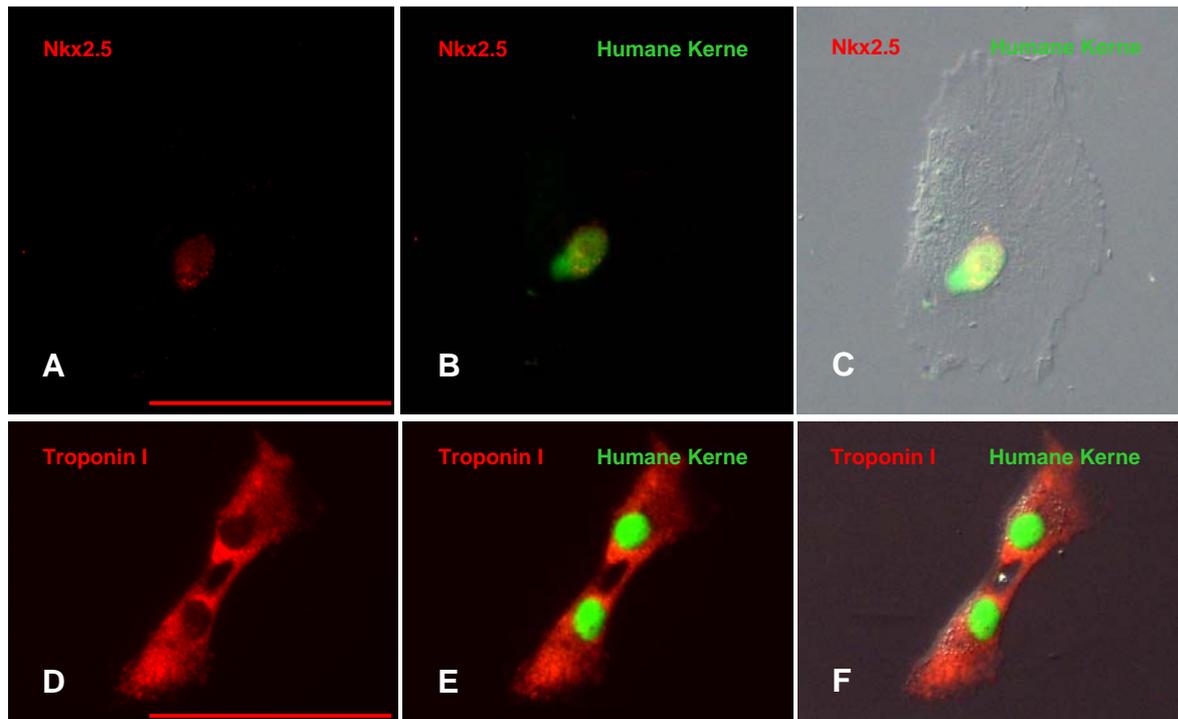


Abb. 3-34 Die Abbildungen zeigen, dass die Zellen der Zelllinie SA 5/73 nach 21tägiger Kokultur ebenfalls positiv für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 (A) und das Strukturprotein Troponin I (D) waren. Die rote Fluoreszenz kennzeichnet die Proteine Nkx2.5 (A-C) und Troponin I (D-F). Der primäre Antikörper gegen humane Kerne wird durch eine grüne Fluoreszenz gekennzeichnet (B, C, E, F). Die Bilder C und F zeigen die Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit dem Bild im Nomarski-Interferenzkontrast. Maßstabsbalken: 50 µm.

3.2.2.5 Durchflusszytometrie

Es wurden Zellen der Zelllinien SA 5/03, SA 5/50, SA 5/60 und SA 5/73 durchflusszytometrisch analysiert. Diese Untersuchung gab Aufschluss über den prozentualen Anteil an positiven Zellen für verschiedene kardiale Marker. Als Marker wurden der Transkriptionsfaktor Nkx2.5, das Protein ANF und die Strukturproteine MLC2v, Troponin I und Troponin T verwendet.

In der Abbildung 3-35 sind die erhaltenen Graphen dargestellt. Der Bereich, in dem die Zellen als positiv für einen Marker galten, wurde anhand der erhaltenen Graphen der Negativkontrolle (undifferenzierte USSC mit den entsprechenden primären und sekundären Antikörpern gefärbt) und der Isotypkontrolle (differenzierte USSC mit den entsprechenden sekundären Antikörpern gefärbt) festgelegt. Dieser Bereich wird durch den Balken mit der Bezeichnung „Cy3 positive“ gekennzeichnet. In der Überlagerung ist die Verschiebung nach rechts erkennbar. Die Zellen, die außerhalb des Graphen der Negativkontrolle liegen sind positiv.

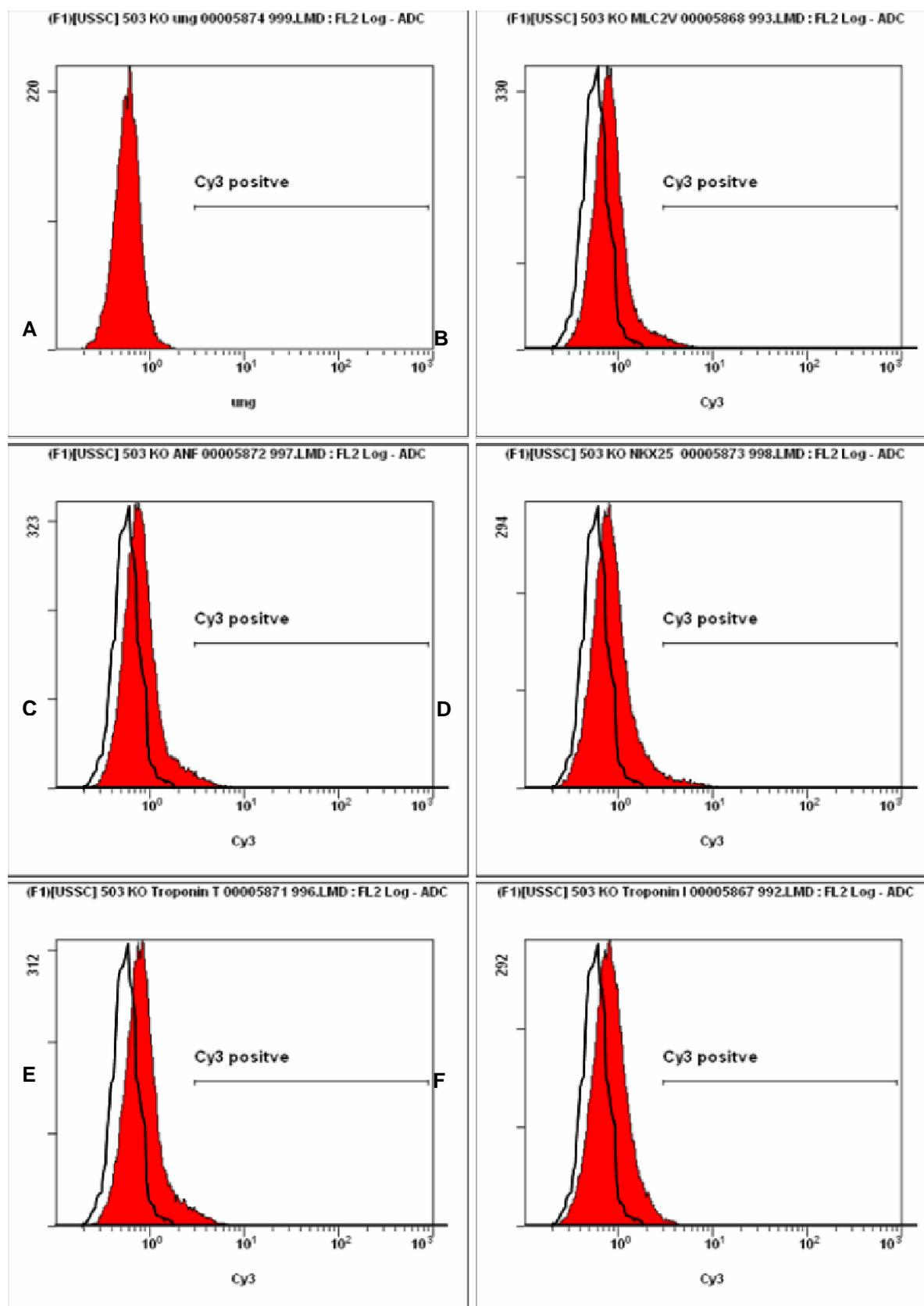


Abb. 3-35 Repräsentatives Bild der Diagramme der durchflusszytometrischen Analyse. Bild A zeigt die Negativkontrolle. Die Bilder B-F zeigen die Überlagerung des Graph der Negativkontrolle mit dem Graphen der Messung des Markers MLC2v (B), ANF (C), Nkx2.5 (D), Troponin T (E) und Troponin I (F).

In der Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Analysen der Kokulturen (Tab. 3-3) sind die prozentualen Anteile der für ein Protein positiven Zellen der verschiedenen Zelllinien dargestellt.

Tab. 3-3 Die Tabelle zeigt die prozentualen Anteile für einen Marker positiver Zellen.

Protein	Anteil positiver USSC in %			
	SA 5/03	SA 5/50	SA 5/60	SA 5/73
MLC2v	4,43	1,17	2,36	0,35
ANF	3,71	1,71	2,32	1,15
Nkx25	4,28	0,25	1,15	1,14
Troponin I	5,12	7,78	8,87	2,29
Troponin T	2,35	1,71	3,44	1,00

Alle Zelllinien waren positiv für alle Marker, allerdings war der Prozentsatz positiver Zellen unterschiedlich. Der Vergleich der Prozentsätze der unterschiedlichen Marker einer Zelllinie zeigte, dass Troponin I immer den höchsten Prozentsatz aufwies. Die Zelllinien SA 5/03 und SA 5/50 zeigten insgesamt höhere Anteile an Zellen, die einen Marker trugen, als die beiden anderen Zelllinien.

Der Anteil an positiven Zellen für die verschiedenen Marker war bei der Zelllinie SA 5/03 mit 2,35 % Troponin T-positiver Zellen, 3,71 % ANF-positiver Zellen, 4,28 % Nkx2.5-positiver Zellen, 4,43 % MLC2v-positiver Zellen und 5,12 % Troponin I-positiver Zellen am höchsten.

Die Zelllinie SA 5/60 zeigte 1,15 % positiver Zellen für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5, 2,36 % der Zellen waren positiv für MLC2v und 2,32 % der Zellen waren positiv für ANF. Der Anteil an Troponin T-positiven Zellen lag bei 3,44 % und der an Troponin I-positiven Zellen bei 8,87 %.

Die Zelllinie zeigte 1-2 % an positiven Zellen für MLC2v, ANF und Troponin T. Unter 1 % der Zellen waren Nkx2.5-positiv, hingegen waren 7,78 % der Zellen positiv für Troponin I.

Die Zelllinie SA 5/73 zeigte den geringsten Anteil an Zellen, die für einen Marker positiv waren. Der Prozentsatz lag zwischen 0,35 % und 2,29 %.

Differenzierung durch Kultivierung mit konditioniertem Medium

3.2.3.1 RT-PCR

Die Analyse der Kulturen mit konditioniertem Medium erfolgten analog zu der Analyse der Kokulturen. Es wurde ebenfalls von Kulturen der Zelllinien SA 5/03, SA 5/50, SA 5/60 und SA 5/73 zunächst die Genexpression von α -MHC, ANF, MLC2a, MLC2v, Nkx2.5, Troponin T und Troponin I mittels RT-PCR untersucht. Die Veränderungen der Expression der verschiedenen Gene waren bei der Kultivierung in einer Kultur mit konditioniertem Medium geringer als bei der Kultivierung als Kokultur.

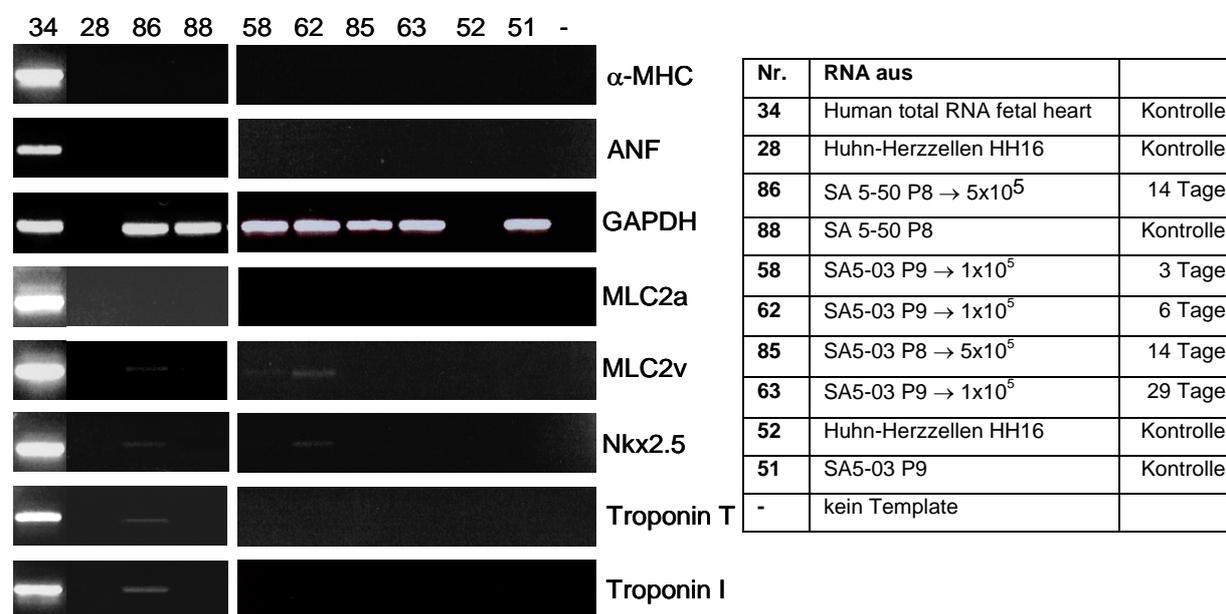


Abb. 3-36 Repräsentative Agarosegele der RT-PCR. Eingesetzt wurde die RNA einer Kultur der Zelllinie SA 5/50 mit konditioniertem Medium (Nr. 88), die RNA von vier Kulturen der Zelllinie SA 5/03 mit konditioniertem Medium (Nr. 58, 62, 85, 63) und die RNA der Huhn-Kontrollkultur (Nr. 28, 52), der Kontrollkulturen der Zelllinien SA 5/50 (Nr. 88) und SA 5/03 (Nr. 51) und die Kontroll-RNA aus humanem fötalem Herz (Nr. 34). Die Nummern entsprechen den im Laufe der Arbeit vergebenen RNA-Nummern. Die Spalte „RNA aus“ zeigt, aus welcher Kultur die RNA isoliert wurde wie viele Zellen ursprünglich ausgesät wurden. Gezeigt werden die Banden der amplifizierten DNA-Fragmente. Die Expression von GAPDH diente als Kontrolle und wurde von allen Kulturen mit humanen Zellen exprimiert.

Wie bei der Kokultur war die Expression von Nkx2.5, MLC2v und ANF am häufigsten nachzuweisen. Die Genexpression von Nkx2.5 konnte in sieben von 13 Proben gezeigt werden. In sechs von 13 Proben konnte eine Expression von MLC2v nachgewiesen werden und fünf von 13 Proben zeigten eine Expression von ANF (5/13). Die Expression von Troponin I konnte nur in einer von 13 Proben nachgewiesen werden, ebenso für die Expression von Troponin T.

In der Abbildung 3-36 werden repräsentativ Agarosegele der RT-PCR dargestellt. Die Kulturen 58, 85 und 63 zeigten keine Expression der Gene α -MHC, ANF, MLC2a, MLC2v, Nkx2.5, Troponin T und Troponin I. Die Kultur Nr. 58 zeigte nur eine Expression von MLC2v, während die Kultur Nr. 62 zusätzlich eine Expression von Nkx2.5 aufwies. Die Kultur 86 hingegen zeigte eine Expression von MLC2v, Nkx2.5, Troponin I und Troponin T. Die Expression der Gene der Huhnkultur (Nr. 28, 52) konnten nicht detektiert werden. Die Kontrollkulturen der Zelllinien SA 5/50 (Nr. 88) und SA 5/03 (Nr. 51) zeigten keine Expression der ausgesuchten kardialen Marker. Wohingegen die als Positivkontrolle genutzte RNA aus humanem fötalem Herz (Nr. 34) die Expression aller untersuchter Gene zeigte.

3.2.3.2 Quantitative RT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurden die Veränderungen der Expression der Gene ANF, MLC2a, MLC2v, Nkx2.5, Troponin I und Troponin T gegenüber der Expression des Referenzgens GAPDH und der Expression des entsprechenden Gens in der Ursprungszelllinie untersucht.

Die quantitative RT-PCR zeigte Expressionsveränderungen in allen Zelllinien (Abb. 3-37). Sie waren jedoch insgesamt schwächer, als die bei der Analyse der Kokulturen beobachteten Expressionsveränderungen (3.2.2.2) und von Zelllinie zu Zelllinie wieder sehr unterschiedlich. Hoch war die relative Expressionsveränderung für die Gene MLC2a und ANF, die Veränderung der Expression der Gene MLC2v, Nkx2.5 und Troponin I war geringer, die Veränderung der Expression von Troponin T war in den beiden analysierten Kulturen nur gering.

Lag mindestens eine Verdopplung der Expression des Gens vor, wurde die Expression als verändert gewertet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3-37 zusammengefasst.

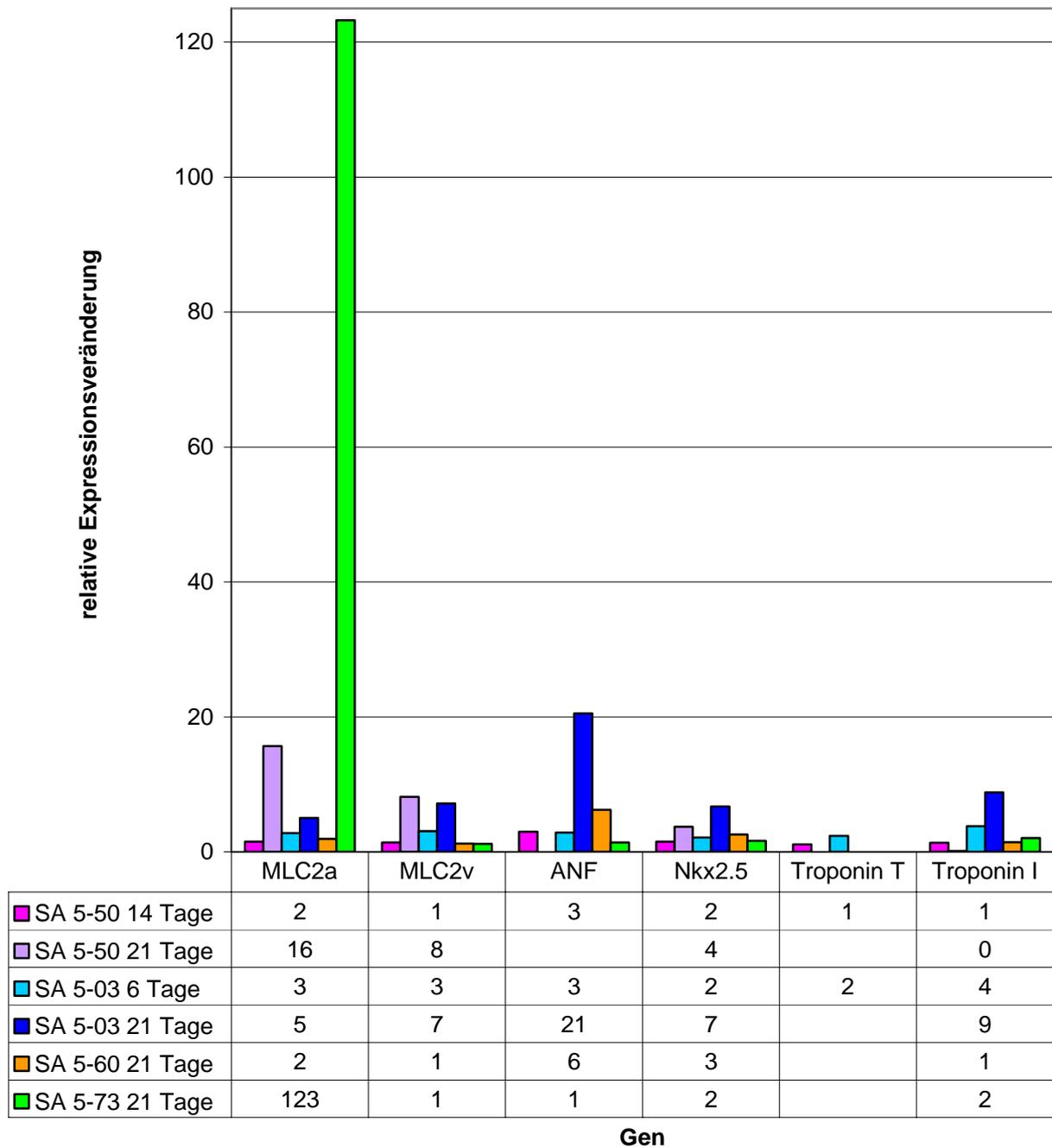


Abb. 3-37 Das Diagramm zeigt die relative Expressionsveränderung der Gene MLC2a, MLC2v, ANF, Nkx2.5, Troponin I und Troponin T, für Kokulturen der Zelllinien SA 5/50 (rosa und lila), SA 5/03 (türkis und dunkelblau), SA 5/60 (orange) und SA 5/73 (grün). In der linken Spalte sieht man die bei der Kultur verwendete Zelllinie und die Kulturdauer. Für Troponin T und ANF konnten einige Werte nicht verwendet werden.

Während die Kultur der Zelllinie SA 5/50 nach 14 Tagen in Kultur keine Expressionsveränderung der Gene MLC2a, MLC2v, Nkx2.5, Troponin T und Troponin I zeigte, stieg die Expression von ANF um das 3fache. Nach 21 Tagen Kulturdauer war keine Expressionsveränderung des Gens Troponin I nachzuweisen. Hingegen stieg die Nkx2.5-Expression um das 3fache, die MLC2v-Expression um das 8fache und die MLC2a-Expression erhöhte sich um das 15fache.

Die Veränderungen der Expression der Gene MLC2a, MLC2v, ANF, Nkx2.5, Troponin T und Troponin I lagen für die 6tägige Kultur der Zelllinie SA 5/03 bei einer Erhöhung um das 2-3fache. Nach 21 Tagen in Kultur stieg die Expression von MLC2a um das 5fache, die von Nkx2.5 um das 6fache, die von MLC2v um das 7fache, die von Troponin I um das 8fache, wohingegen sich die Expression von ANF um das 20fache erhöhte.

Die 21tägige Kultivierung der Zelllinie SA 5/60 resultierte in keiner Veränderung der Expression der Gene MLC2a, MLC2v und Troponin I. Die Nkx2.5-Expression erhöhte sich um das 2fache und die Expression von ANF um das 6fache.

Die 21tägige Kultivierung der Zelllinie SA 5/73 resultierte in keiner Veränderung der Expression der Gene MLC2v, ANF und Nkx2.5. Die Troponin I-Expression stieg leicht um das 2fache, wohingegen die MLC2a-Expression sich deutlich um den Faktor 123.

3.2.3.3 Western Blot

Im Western Blot wurde die in der RT-PCR gezeigte Expression verschiedener Gene auf Proteinebene untersucht. Es wurden die Proteine ANF, α -Aktinin, MLC2a, MLC2v, Nkx2.5, Troponin T und Troponin I untersucht. Die Detektion des Proteins β -Aktin diente der Kontrolle. Unspezifische Bindungen der Antikörper an Huhnezellen oder undifferenzierte USSC wurden immunhistochemisch ausgeschlossen.

Jede der untersuchten Kulturen zeigte mindestens ein vorhandenes Protein der untersuchten Proteine (Abb. 3-38). Die Proteine ANF, MLC2a, MLC2v und Troponin I konnten nicht detektiert werden.

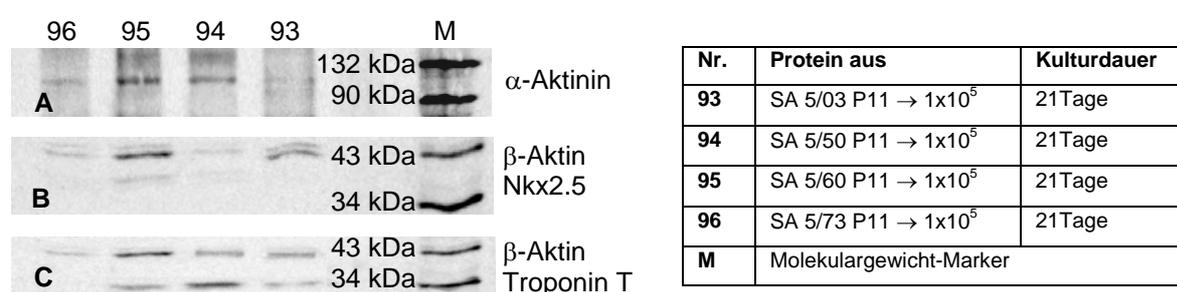


Abb. 3-38 Die Nummern der Kulturen entsprechen der im Laufe der Arbeit vergebenen Protein-Nummern. In Bild A ist eine Bande mit einem Molekulargewicht von 100 kDa sichtbar, das dem des α -Aktinins entspricht. Das Protein ist in drei der Kulturen nachweisbar, nur in der Kultur mit der Zelllinie SA 5/03 nicht. Bild B zeigt, dass das Protein Nkx2.5 nur in der Kultur mit der Zelllinie SA 5/60 nachgewiesen werden konnte. Das Protein Troponin T ist ebenfalls in drei der vier Kulturen nachweisbar, jedoch nicht in der Kultur mit der Zelllinie SA 5/73 (C).

Die Bande bei 100 kDa entsprach dem erwarteten Molekulargewicht von α -Aktinin, die Bande bei 40 kDa Nkx2.5 und die Bande bei 34 kDa Troponin T.

Die Kultur mit der Zelllinie SA 5/03 (Abb. 3-38, Nr. 93) zeigte nur das Protein Troponin T. Bei der Kultur mit der Zelllinie SA 5/50 (Abb. 3-38, Nr. 94) konnte zusätzlich das Protein α -Aktinin nachgewiesen werden. Die Kultur mit der Zelllinie SA 5/60 (Abb. 3-38, Nr. 95) wies zusätzlich das Protein Nkx2.5 auf. In der Kultur mit der Zelllinie SA 5/73 (Abb. 3-38, Nr. 96) konnte nur das Protein α -Aktinin nachgewiesen werden.

3.2.3.4 Immunhistochemie

Analog zur Kokultur wurden auch die Zellen der Kultur mit konditioniertem Medium immunhistochemisch untersucht. Allerdings wurden nur primäre Antikörper gegen MLC2v, Nkx2.5 und Troponin I verwendet. Wie in den Abbildungen 3-39 bis 3-42 dargestellt, konnten nur Nkx2.5 und Troponin I detektiert werden.

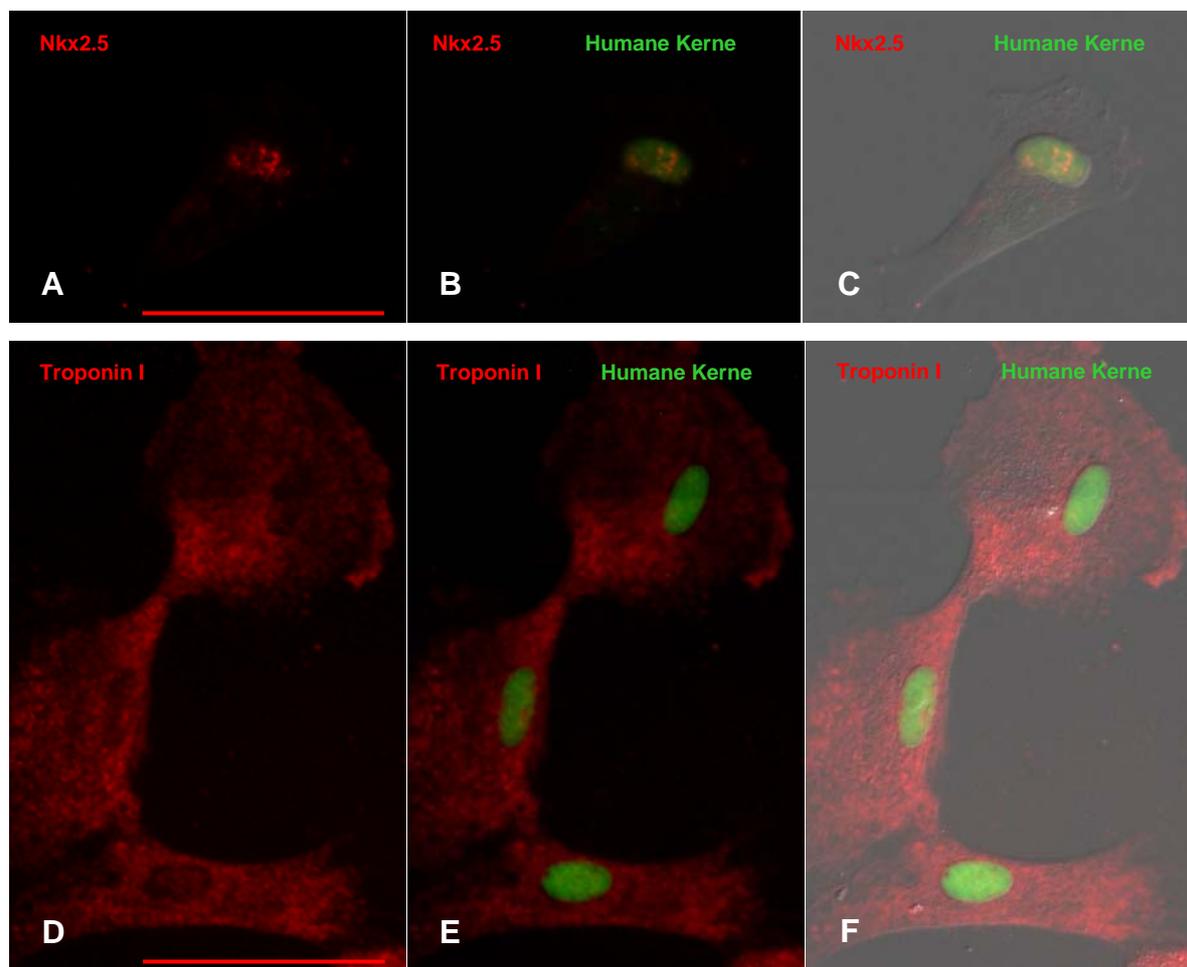


Abb. 3-39 Diese Abbildung zeigt repräsentativ immunhistochemisch analysierte Zellen der Zelllinie SA 5/03, die 21 Tage mit konditioniertem Medium kultiviert wurden. Die Zellen zeigten kern-lokalisiert Nkx2.5 (A-C) und das Strukturprotein Troponin I (D-F). Die analysierten Marker wurden auf Grund des Cy3-konjugierten sekundären Antikörpers rot-fluoreszierend detektiert. Die humanen Zellkerne fluoreszierten grün (B, C, E, F), da der primäre Antikörper mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper kombiniert wurde. In der Überlagerung (C, F) des Bildes mit der Doppelfärbung (B, E) mit dem Bild im Nomarski-Interferenzkontrast ist die Morphologie der Zelle deutlicher erkennbar. Maßstabsbalken: 50 μ m

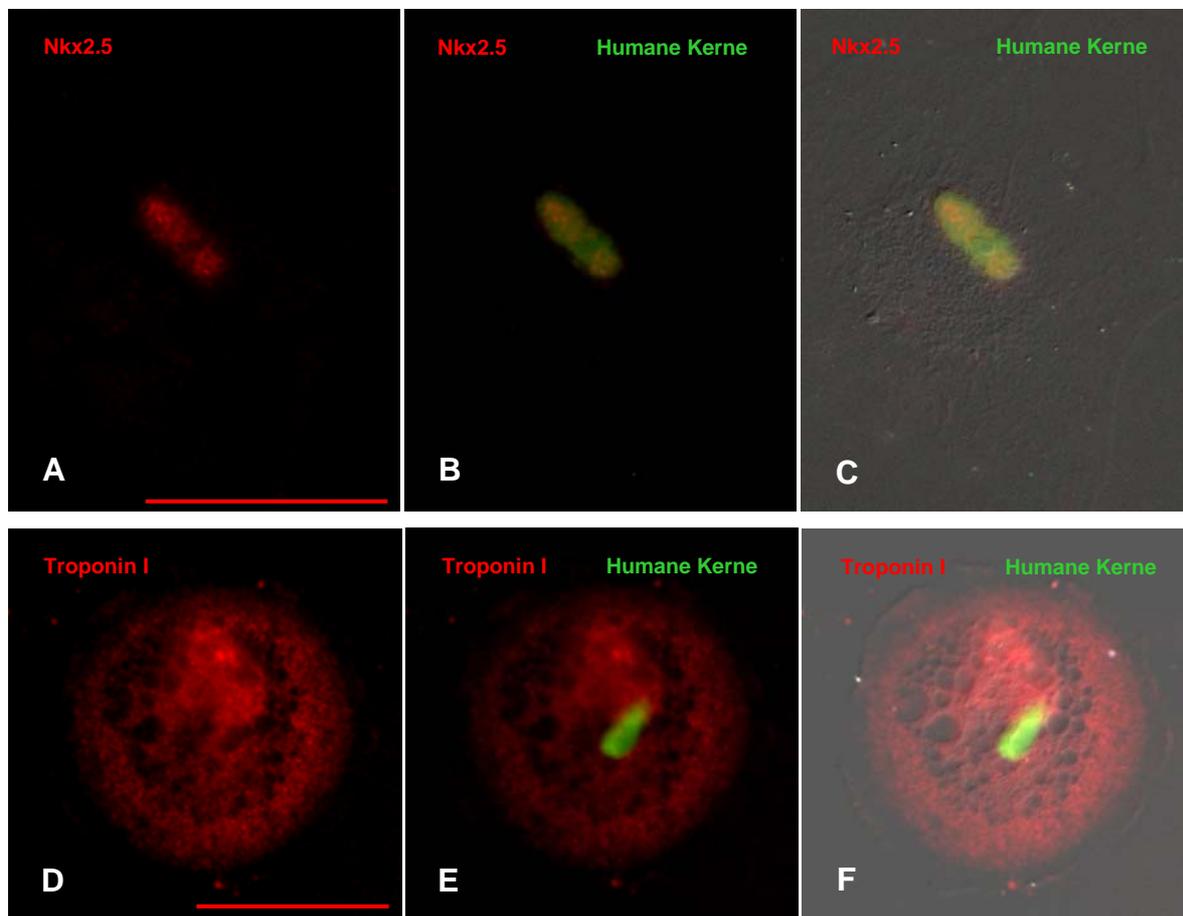


Abb. 3-40 Die Analyse der Zellen der Zelllinie SA 5/50, nach 21tägiger Kultur mit konditioniertem Medium, wies ebenfalls die Proteine Nkx2.5 (A-C) und Troponin I (D-F) nach. Die Bilder B, C, E und F zeigen doppelt gefärbte Zellen. Die nachgewiesenen Herz-spezifischen Proteine sind rot-fluoreszierend und die humanen Kerne grün-fluoreszierend. Die Überlagerung (C, F) des Bildes der Doppelfärbung (B, E) mit dem entsprechenden Bild im Nomarski-Interferenzkontrast zeigt deutlicher die Struktur der Zelle. Maßstabsbalken: 50 μ m.

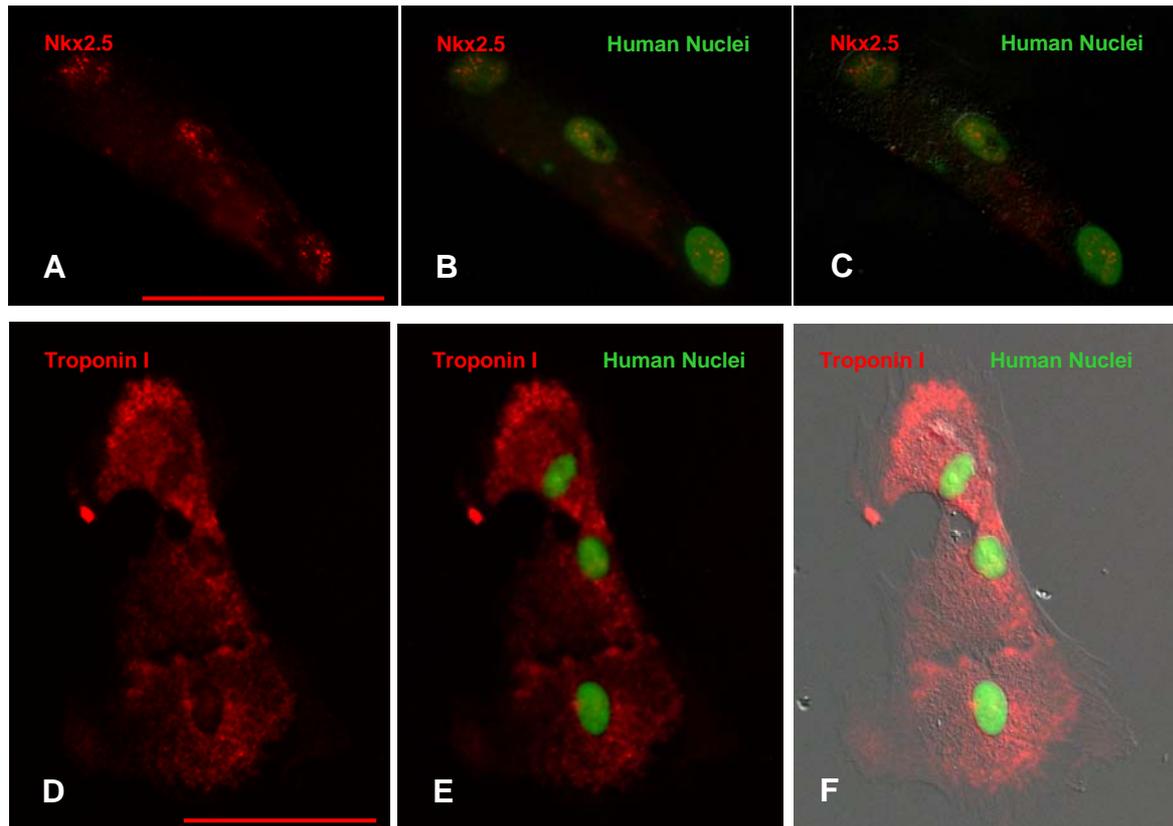


Abb. 3-41 Auch die immunohistochemische Untersuchung der Zellen der Zelllinie SA 5/60 zeigte, dass die Zellen nach 21tägiger Kultur mit konditioniertem Medium die Proteine Nkx2.5 (A-C) und Troponin I (D-F) aufwiesen. Die Proteine Nkx2.5 (A-C) und Troponin I (D-F) konnten auf Grund der roten Fluoreszenz des sekundären Antikörpers detektiert werden. Die humanen Kerne wurden auf Grund der grünen Fluoreszenz detektiert (C, F). Die Bilder B, C, E und F zeigen die doppelt gefärbten Zellen. Die Morphologie der Zellen zeigt sich deutlicher in der Überlagerung (C, F) des Bildes der Doppelfärbung (B, E) mit dem entsprechenden Bild im Nomarski-Interferenzkontrast zeigt. Maßstabsbalken: 50 μ m.

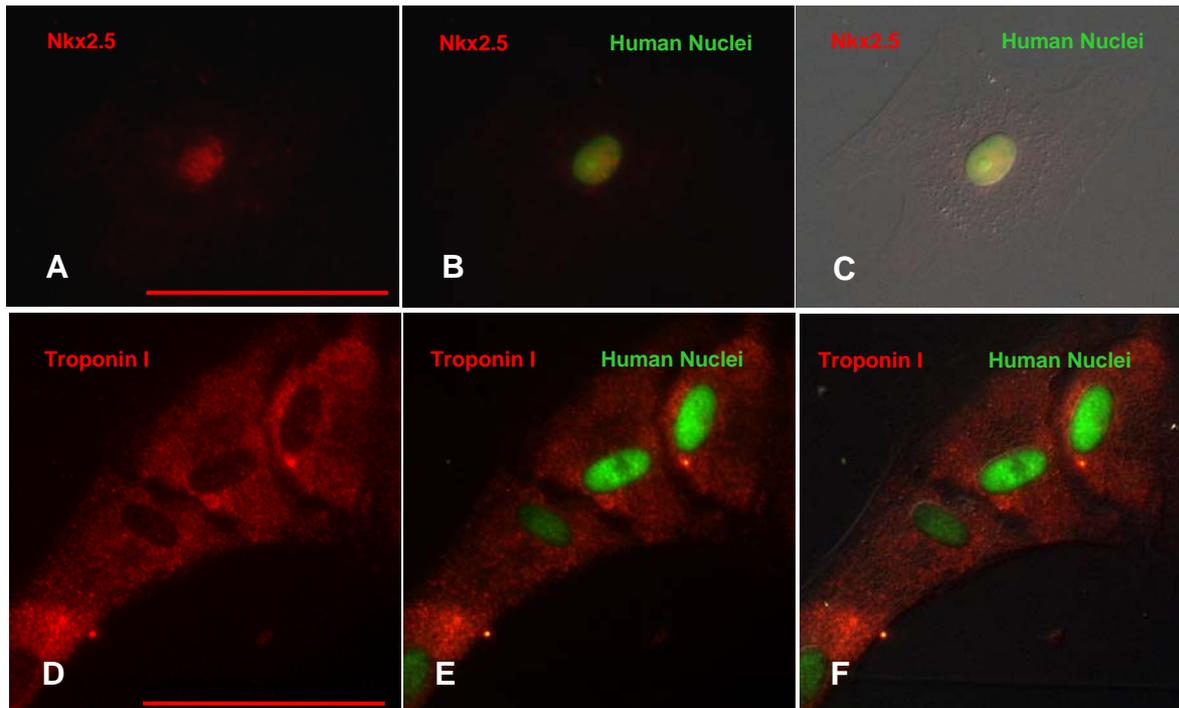


Abb. 3-42 Der immunhistochemische Nachweis der Zellen der Zelllinie SA 5/73 zeigte nach der Kultur von 21 Tagen mit konditioniertem Medium den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 (A-C) und das Strukturprotein Troponin I (D-F). Auch hier wurden die Proteine durch die rote Fluoreszenz des sekundären Antikörpers detektiert (A-F) und die humanen Kerne durch die Verwendung des grün-fluoreszierenden sekundären Antikörpers (B, C, E, F). In den Bildern C und F wird durch die Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit dem Bild im Nomarski-Interferenzkontrast die unterschiedliche Morphologie deutlich. Maßstabsbalken: 50 μm .

3.2.3.5 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit Zellen der Zelllinien SA 5/03 und SA 5/73 durchgeführt. Anhand der Analyse konnte der Prozentsatz an Zellen gezeigt werden, die einen kardialen Marker aufwiesen. Die Proteine MLC2v, ANF, Nkx2.5, Troponin I und Troponin T dienen als Marker.

Die bei der Analyse erhaltenen Graphen sind in der Abbildung 3-43 dargestellt. Die Graphen der Negativkontrolle (undifferenzierte USSC mit den verschiedenen primären Antikörpern und sekundären Antikörpern gefärbt) und der Isotypkontrolle (differenzierte USSC mit den verschiedenen sekundären Antikörpern gefärbt) dienen der Festlegung des Marker-positiven Bereiches. Zellen, die in dem Bereich „Cy3 positive“ liegen, sind positiv für den gemessenen Marker. Die Überlagerung der Graphen zeigt deutlicher den Shift nach rechts. Die Zellen, die außerhalb des Graphen der Negativkontrolle liegen sind positiv.

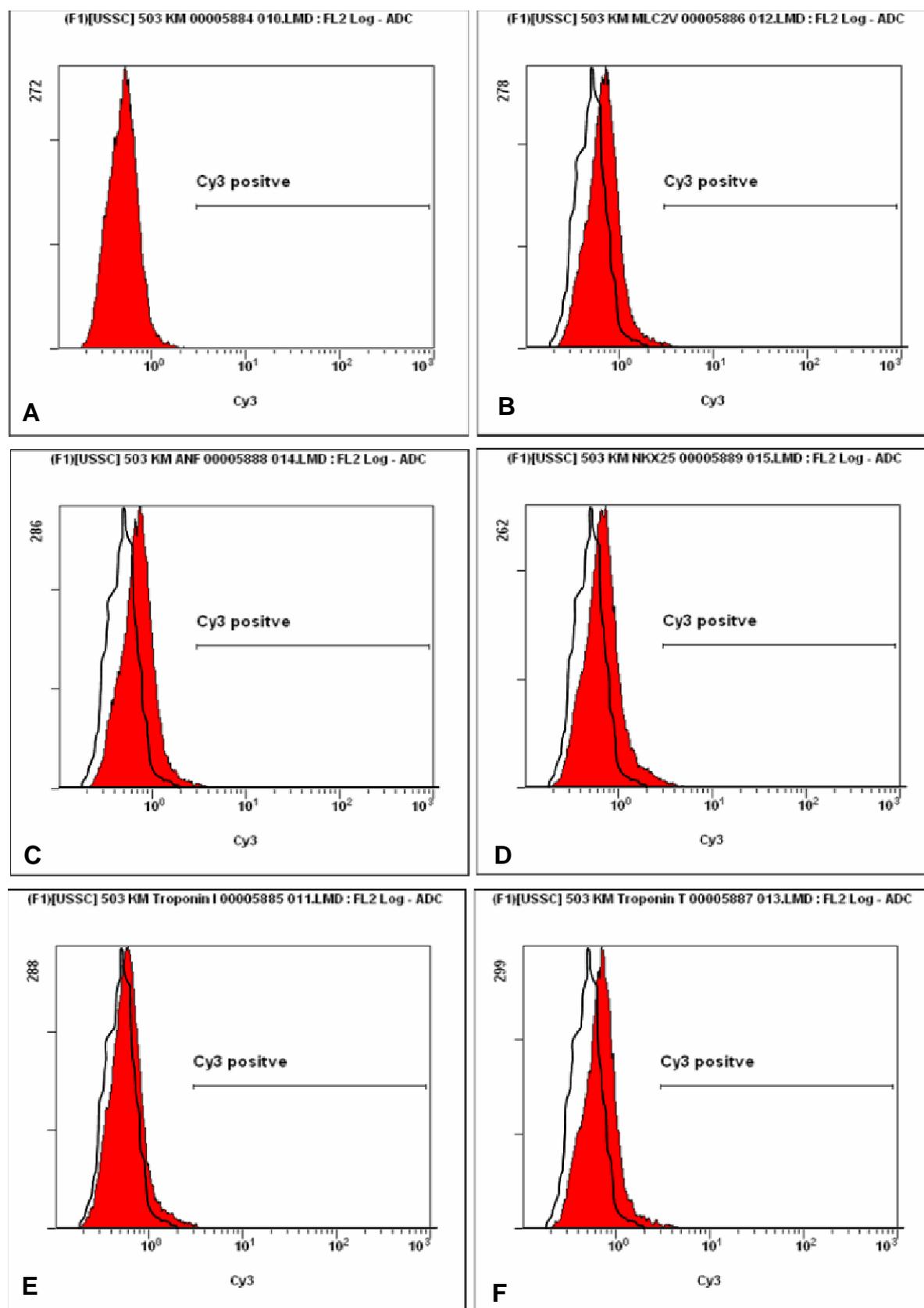


Abb. 3-43 Die Abbildung zeigt repräsentativ die Diagramme einer durchflusszytometrischen Analyse. Bild A zeigt die Negativkontrolle. In den Bildern B-F sind die Überlagerung des Graphen der Negativkontrolle mit dem Graphen der Messung des Markers MLC2v (B), ANF (C), Nkx2.5 (D), Troponin T (E) und Troponin I (F) zu sehen.

Die Zusammenfassung der durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen zeigt, dass die Zelllinie SA 5/73 nur schwach positiv für die verschiedenen Marker war (Tab. 3-4).

Tab. 3-4 Die Tabelle zeigt den Prozentsatz an Zellen, die für einen Marker positiv sind. Der Marker, auf den sich die Prozentzahl bezieht ist in der Spalte Protein ausgewiesen.

Protein	Anteil positiver Zellen (in % der USSC der Zelllinien)	
	SA 5/03	SA 5/73
MLC2v	1,10	0,21
ANF	1,11	0,09
Nkx25	1,34	0,02
Troponin I	0,70	0,15
Troponin T	1,09	0,35

Die Zelllinie SA 5/03 wies für Troponin I 0,7 % positiver Zellen auf, der Anteil an positiven Zellen für die restlichen Marker MLC2v, ANF und Troponin T lag bei ca. 1 %, Nkx2.5 bei 1,34 %. Die Zelllinie SA 5/73 zeigte weniger positive Zellen. Die Anteile lagen zwischen 0,02 und 0,35 %.

3.2.4 Vergleich der Ergebnisse der Kokultivierung mit der Kultivierung mit konditioniertem Medium

3.2.4.1 **Nachweis auf RNA-Ebene**

In der RT-PCR gab es deutliche Unterschiede in der Expression zwischen den Zelllinien. So exprimierten die Zelllinien SA 5/03, SA 5/18 und SA 5/50 mehr Herz-spezifische Gene nach der Kokultivierung der USSC mit Herzzellen des Huhns bzw. der Kultivierung mit konditioniertem Medium, als die Zelllinien SA 5/60 und SA 5/73. Die Marker ANF und Nkx2.5 konnten in allen Zelllinien bei beiden Kultivierungsmethoden detektiert werden. Wie in der Tabelle 3-5 dargestellt, wurde die Expression der Gene α -MHC, ANF, MLC2a, MLC2v, Nkx2.5, Troponin T und Troponin I für die kokultivierten Zellen nachgewiesen. Die Zellen, die mit konditioniertem Medium kultiviert wurden, zeigten eine Expression von ANF, MLC2v, Nkx2.5 und Troponin I.

Es konnte somit nach der Kokultivierung der USSC mit Herzzellen des Huhns die Expression von mehr Genen nachgewiesen werden als nach der Kultivierung mit konditioniertem Medium.

Tab. 3-5 Übersicht über die in der RT-PCR dokumentierten Expressionen. Die Ergebnisse der RT-PCR waren für eine Zelllinie und eine Kulturart zu den verschiedenen untersuchten Zeitpunkten und in den verschiedenen durchgeführten Kulturen unterschiedlich. Dargestellt wird eine Zusammenfassung, in der ein Gen als exprimiert gilt, wenn es in mindestens einer RT-PCR als exprimiert detektiert werden konnte. KoK: Kokultur, KM: Kultur mit konditioniertem Medium

Zelllinie	Kultur	Gen						
		MLC2a	MLC2v	ANF	Nkx2.5	Troponin T	Troponin I	α -MHC
SA 5/03	KoK	-	+	+	+	+	-	+
	KM	-	+	+	+	-	-	-
SA 5/18	KoK	+	+	+	+	+	+	+
SA 5/50	KoK	+	+	+	+	+	+	-
	KM	+	+	+	+	+	+	-
SA 5/60	KoK	-	+	+	+	-	-	-
	KM	-	+	+	+	-	-	-
SA 5/73	KoK	-	-	+	+	+	-	-
	KM	-	-	+	+	-	-	-

-	nicht exprimiert
+	exprimiert

Die in der RT-PCR untersuchten Gene wurden zusätzlich in der quantitativen RT-PCR untersucht. In der Tabelle 3-6 sind die Veränderungen der Expression der unterschiedlichen Gene dargestellt. Die Werte zeigen, um ein Wievielfaches sich die Expression eines Gens bei einer bestimmten Zelllinie nach 6,9, 14, 21, 28 oder 35 Tagen Kultivierungsdauer im Verhältnis zur Expression der undifferenzierten USSC erhöht hat.

Tab. 3-6 In der Tabelle wird die Höhe der Veränderung der Gene MLC2a, MLC2v, ANF, Nkx2.5, Troponin T und Troponin I der Zelllinien SA 5/03, SA 5/18, SA 5/50, SA 5/60 und SA 5/73 dargestellt. KoK: Kokultur, KM: Kultur mit konditioniertem Medium, ↑: Wert mindestens einfach höher als am vorherigen Zeitpunkt, ↑↑: Wert mindestens vierfach höher als am vorherigen Zeitpunkt, ↓: Wert um mindestens eins niedriger als am vorherigen Zeitpunkt.

Zelllinie	Kultur	Dauer (Tage)	Gen					
			MLC2a	MLC2v	ANF	Nkx2.5	Troponin T	Troponin I
SA 5/03	KoK	6	+	+	++		+	+
	KoK	9	+ ↑	+	+++	++	+	
	KoK	21	+ ↓	++	+	+		++
SA 5/03	KM	6	+	+	+	+	+	+
	KM	21	+ ↑	+ ↑↑	++	+ ↑↑		+ ↑↑
SA 5/18	KoK	21	++	+	+++	+	+	+
SA 5/50	KoK	21			+			
	KoK	35			++			
SA 5/50	KM	14			+			
	KM	21	++	+		+		
SA 5/60	KoK	21						
	KoK	28	++	+	+++	+	+	+++
SA 5/60	KM	21			+	+		
SA 5/73	KoK	21	+++		+	+		+
SA 5/73	KM	21	+++					+

	kein Wert vorhanden
	Veränderung < 2fach
+	Veränderung > 2fach, aber < 10fach
++	Veränderung > 10fach, aber < 30fach
+++	Veränderung > 30fach

In allen Zelllinien ist neben einem Anstieg der ANF-Expression eine Erhöhung der Nkx2.5-Expression nachweisbar. Im folgenden wird zum Einen verglichen, welches Gen sich bei welcher Zelllinie am deutlichsten in der Expression verändert und zum Anderen, welche Gene sich zu einem bestimmten Kultivierungszeitpunkt bei welcher Zelllinie am stärksten verändern. Beim generellen Vergleich der untersuchten Gene wurde beobachtet, dass die höchste Expressionszunahme sowohl in der Kokultur als auch in der Kultur mit konditioniertem Medium bei den drei Zelllinien SA 5/03,

SA 5/50 und SA 5/60 bei der Expression von ANF zu verzeichnen war. Die Zelllinie SA 5/73 zeigte den höchsten Anstieg bei der Expression von MLC2a. Bei der Zelllinie SA 5/18, die nur in der Kokultur verwendet wurde, stieg ebenfalls die ANF-Expressionen am deutlichsten an.

Die maximalen Werte der Veränderung lagen für ANF bei den kokultivierten Zellen im Bereich 12-61fach und bei den Zellen, die mit konditioniertem Medium kultiviert wurden im Bereich 3-20fach. Die MLC2a-Expression stieg um den Faktor 80 bei den kokultivierten SA 5/73 und um einen Faktor > 100 bei den Zellen aus der Kultur mit konditioniertem Medium.

Der Vergleich der Veränderungen nach 21 Tagen Kokultur zeigt, dass es deutliche Unterschiede in der Expression zwischen den Zelllinien gibt. Dies wurde ebenfalls in der RT-PCR beobachtet. Während sich bei der Zelllinie SA 5/03 die Expression von MLC2v erhöhte, stieg bei den Zelllinien SA 5/18 und SA 5/50 die Expression von ANF. Hingegen stieg bei der Zelllinie SA 5/73 die Expression von MLC2a am stärksten an. Die Zelllinie SA 5/60 zeigte zu diesem Zeitpunkt keinerlei Unterschied zu Tag 0. Diese Zelllinie zeigte erst sieben Tage später Erhöhungen der MLC2a-, MLC2v-, ANF-, Nkx2.5- und Troponin I-Expression. Jedoch war auch hier der Anstieg in der ANF-Expression am höchsten. Während die Zelllinie SA 5/60 erst nach 28 Tagen Kulturdauer eine Veränderung zeigte, konnte bei der Zelllinie SA 5/03 bereits nach sechs Tagen die erste Steigerung in der ANF-Expression nachgewiesen werden. Nach neun Tagen Kulturdauer stieg diese ANF-Expression um das 50fache im Vergleich zu Tag sechs, daneben zeigten sich noch Veränderungen der MLC2a- und Nkx2.5-Expression und nach 21 Tagen war die MLC2v- und Troponin I-Expression deutlich verändert.

Wie auch bei der Kokultur veränderte sich bei den Kulturen mit konditioniertem Medium bei den gleichen Zelllinien die Expression der gleichen Gene am stärksten.

Die quantitative RT-PCR ergab, dass sich bei beiden Kultivierungsmethoden die Expression aller untersuchten Gene in allen Zelllinien veränderte. Die Gene, die sich mehr als 2fach veränderten, waren von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich. Durch die Kultur mit konditioniertem Medium erhöhten sich zwar weniger Gene mehr als 2fach, aber trotz allem gehörten diese zu den Genen, die sich auch durch die Kokultur veränderten. Die Zelllinie SA 5/60 bildete eine Ausnahme, da sich bei dieser Zelllinie durch die Kultur mit konditioniertem Medium weniger Gene veränderten, als in der Kokultur.

3.2.4.2 Nachweis auf Proteinebene

Die Tabelle 3-7 stellt die Ergebnisse der Untersuchungen auf RNA-Ebene und auf Protein-Ebene dar. Im Western Blot sollten die Proteine α -Aktinin, MLC2a, MLC2v, ANF, Nkx2.5, Troponin T und Troponin I nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass im Western Blot in keiner der Kulturen MLC2a, MLC2v und ANF nachgewiesen werden konnten und im Western Blot der Kulturen mit konditioniertem Medium auch kein Troponin I.

Das Protein α -Aktinin war in allen Kulturen außer der Kultur der Zelllinie SA 5/03 mit konditioniertem Medium nachweisbar. In der Kultur mit konditioniertem Medium der Zelllinie SA 5/73 war das Protein Troponin T nicht nachzuweisen, das in allen anderen Kulturen evident vorhanden war. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen auf RNA-Ebene, allerdings konnte da keine mRNA für Troponin T in der Kultur mit konditioniertem Medium der Zelllinie SA 5/60 gezeigt werden. Der Nachweis des Proteins Nkx2.5 verlief nur für die Kokulturen der Zelllinien SA 5/50, SA 5/60 und SA 5/73 sowie für die Kultur der Zelllinie SA 5/60 mit konditioniertem Medium positiv. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der RNA-Expression, wo für alle Kulturen, bis auf die Kokultur der Zelllinie SA 5/50, eine Expression nachgewiesen werden konnte. Das Protein Troponin I war nur in den Kokulturen mit den Zelllinien SA 5/60 und SA 5/73 nachweisbar.

Die präsentierten immunhistochemischen Nachweise entsprechen den in den Untersuchungen auf RNA-Ebene erworbenen Ergebnissen. Das einzige diskrepante Ergebnis zwischen der RT-PCR und der Immunhistochemie zeigte sich im Nachweis von Troponin I in der Kultur mit konditioniertem Medium der Zelllinie SA 5/60.

Die durch die immunhistochemische Zweischnittfärbung vereinzelter kultivierter Zellen nachgewiesenen Proteine ergänzten sehr gut die im Western Blot erhaltenen Daten, da bei der Methode in den Kokulturen weder MLC2a, noch MLC2v und ANF nachgewiesen werden konnten und in den Kulturen mit konditioniertem Medium auch kein Troponin I.

Durch die Durchflusszytometrie konnten in allen vier Kokulturen und der Kultur mit konditioniertem Medium der Zelllinien SA 5/03 Zellen mit einem Marker nachgewiesen werden.

Die Kokultivierung ergab höhere Anteile an Zellen, die einen Marker trugen, als die Kultivierung mit konditioniertem Medium.

Tab. 3-7 Darstellung der Ergebnisse der Untersuchungen auf RNA-Ebene, des Western Blots, der Immunhistochemie und der Durchflusszytometrie. Die Untersuchungen der Expression sind unter RT zusammengefasst. Die Zeile WB und IHC beinhaltet die Ergebnisse des Western Blots und der Immunhistochemie. Die Daten der Durchflusszytometrie sind in der Zeile DFZ dargestellt.

Zelllinie Kultur	Methode	Gen						
		MLC2a	MLC2v	ANF	Nkx2.5	Troponin T	Troponin I	α -Aktinin
SA 5/03 KoK	RT	+	+	+	+	+	+	
	WB, IHC	+	-	-	-	+	-	+
	DFZ		+	+	+	+	+	
SA 5/03 KM	RT	+	+	+	+	+	+	
	WB, IHC	-	-	-	+	+	+	-
	DFZ		+	+	+	+	-	
SA 5/50 KoK	RT	+	+	+	+	+	+	
	WB, IHC	+	+	-	+	+	+	+
	DFZ		+	+	-	+	+	
SA 5/50 KM	RT	+	+	+	+	+	+	
	WB, IHC	-	-	-	+	+	+	+
	DFZ							
SA 5/60 KoK	RT	+	+	+	+	+	+	
	WB, IHC	+	+	-	+	+	+	+
	DFZ		+	+	+	+	+	
SA 5/60 KM	RT	-	+	+	+	-	-	
	WB, IHC	-	-	-	+	+	+	+
	DFZ							
SA 5/73 KoK	RT	+	-	+	+	+	+	
	WB, IHC	+	-	-	+	+	+	+
	DFZ		-	+	+	+	+	
SA 5/73 KM	RT	+	-	+	+	-	+	
	WB, IHC	-	-	-	+	-	+	+
	DFZ		-	-	-	-	-	

	RT	WB, IHC	DFZ
-	nicht exprimiert/verändert	nicht nachgewiesen	Anteil pos. Zellen < 1 %
+	exprimiert/verändert	nachgewiesen	Anteil pos. Zellen > 1 %
	kein Wert	kein Wert	kein Wert

Der Anteil an Zellen, bei denen das Protein MLC2v nachgewiesen werden konnte, betrug 1,1-4,4 %, außer bei der Kokultur der Zelllinie SA 5/73. Dies stimmt mit den Ergebnissen der RT-PCR überein. Die Detektion von ANF-, Nkx2.5- und Troponin T-positiven Zellen deckt sich ebenfalls mit den Resultaten der RT-PCR. Hier konnte auch die Präsenz des Proteins Troponin I auf den Zellen der Kokultur der Zelllinie SA 5/03 bestätigt werden.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie ergänzen die restlichen Daten. Im Großen und Ganzen wurden alle Resultate der Untersuchungen auf RNA-Ebene durch den Nachweis der Proteine bestätigt. Lediglich in der Kultur mit konditioniertem Medium wurden Proteine nachgewiesen, deren Expression nicht gezeigt werden konnte.

Die Kulturen der Zelllinien SA 5/03 sowie die Kokulturen der Zelllinie SA 5/50 und SA 5/60 weisen ähnliche Muster auf, ebenso die Kultur mit konditioniertem Medium der Zelllinie SA 5/50 im Vergleich mit der gleichen Kultur der Zelllinie SA 5/60, nur dass bei der Zelllinie SA 5/60 weniger Genexpression nachgewiesen werden konnte. Die Zelllinie SA 5/73 ist deutlich anders. Diesen Zellen exprimierten kein MLC2v und die Zellen der Kultur mit konditioniertem Medium auch kein Troponin T.

4 Diskussion

In der Arbeit von Kögler et al. (2004) wurde die aus dem Nabelschnurblut stammenden USSC beschrieben. Diese Zellpopulation kann *in vitro* homogen zu Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten, hämatopoetischen und neuralen Zellen differenzieren. *In vivo* wurde im fötalen Schafmodell die Differenzierung der USSC zu Leberzellen und Kardiomyozyten gezeigt.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit das allgemeine Differenzierungspotenzial der USSC untersucht. Da der Hühnerembryo das Potenzial hat, die Differenzierungsmöglichkeiten einer Zelle in einem kurzen Zeitraum zu beantworten, wurde ein Hühnerembryomodell etabliert. Der Hühnerembryo wird seit dem 18. Jahrhundert auf Grund der guten Zugänglichkeit des Embryos in allen Entwicklungsstufen als Modellorganismus für entwicklungsbiologische Untersuchungen genutzt (Stern, 2005).

Die unterschiedlichen Applikationen der USSC in Hühnerembryonen verschiedener Entwicklungsstadien dienten der Untersuchung des allgemeinen Differenzierungspotenzials. Es wurden USSC zu frühen Zeitpunkten appliziert, um ihnen die Möglichkeit zu bieten, an den frühen Signalen der ersten Entwicklungsschritte Teil zu haben. Oder sie wurden in Hühnerembryonen späterer Entwicklungsstadien an einen bestimmten Ort appliziert, um eine organspezifische Differenzierung genauer untersuchen zu können.

Es wurde ein weiterer Schwerpunkt auf die Differenzierung der USSC zu Herzmuskelzellen gelegt, da nach der Applikation der USSC in das Blastoderm, an die Somiten, in das Herz und in das Gefäßsystem USSC im Herzen detektiert wurden. Neben den Applikationen der USSC in das Hühnermodell wurde daher versucht, die Differenzierung der USSC zu Herzmuskelzellen *in vitro* zu induzieren. Hierzu wurden die USSC in Medien mit 100 nM Oxytocin, 0,25 µM Cardiogenol, 100 nM *all-trans*-Retinsäure, 0,5 % DMSO, 10 µM 5-Azacytidin oder die Kombination von ITS und 100 µM Ascorbinphosphat kultiviert. Es wurde ebenfalls untersucht, ob die Induktion der Differenzierung durch Kokultivierung der USSC mit Herzzellen des Huhns bzw. durch Kultivierung der USSC in Medium, das durch Herzzellen des Huhns konditioniert wurde, erreicht werden kann. Die *in vitro*-Differenzierung von Stammzellen zu Herzmuskelzellen ist, wie in der Einleitung bereits ausgeführt, von großem therapeutischen Interesse.

4.1 Nachweis der USSC im Hühnerembryo

Bei der Etablierung der Injektionsmethoden war es wichtig, eine Markierung für die injizierten Zellen zu finden, die auch in größeren Embryonen noch erkennbar war (vgl. Kapitel 3.1.1).

Die USSC wurden zur Identifizierung zunächst mit dem Membranfarbstoff PKH26 markiert. Der Nachteil dieser Markierung ist, dass der rote Fluoreszenzfarbstoff bei größeren Embryonen auf Grund der Zelldichte nicht ohne weiteres erkennbar war. Somit war ein schnelles Überprüfen der Embryonen bereits drei Tage nach der Injektion nicht mehr möglich. Hinzu kommt, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Huhnzellen Zellfragmente gestorbener humaner markierter Zellen aufnehmen und dadurch ebenfalls eine Fluoreszenz zeigen.

Die Transfektion von USSC mit lentiviralen Vektoren zur Expression von Markergenen bot eine andere Möglichkeit, die Limitierung der Markierung mit einem Membranfarbstoff umgehen zu können. Die Expression von eGFP war für den Zellenachweis in größeren Embryonen ungeeignet, da ein vielschichtiger Embryo die Fluoreszenz in tieferen Schichten verdeckte. Die Transfektion der humanen Zellen mit lentiviralen Vektoren, die das LacZ-Gen trugen, ermöglichte die schnelle Überprüfung der Embryonen auf humane Zellen. Das LacZ-Gen integrierte in das Genom und die transfizierten Zellen konnten über ihre kernlokalisierte β -Galaktosidase-Expression eindeutig nachgewiesen werden. Durch das Klären der Embryonen mit Glycerin konnten gefärbte Zellen auch in größeren Embryonen inmitten von Organanlagen auf Einzelzellniveau problemlos identifiziert werden. Zusätzlich war durch den Enzymnachweis sichergestellt, dass nur lebende Zellen nachgewiesen werden.

Nach der Etablierung der Injektionen wurden ebenfalls unmarkierte USSC injiziert, um einen möglichen Einfluss der Markierung auf das Differenzierungsvermögen auszuschließen. Diese Zellen wurden immunhistochemisch in einer Zwei-Schritt-Methode mit einem Antikörper, der gegen humane Zellkerne gerichtet ist, nachgewiesen. Alternativ konnte auch ein Antikörper gegen humane Mitochondrien verwendet werden. Vorversuche mit transfizierten USSC, die GFP exprimierten, ergaben, dass durch beide Antikörper eindeutig humane Zellen nachgewiesen werden konnten und zudem die Antikörper keine Kreuzreaktionen mit Huhnzellen zeigten.

4.2 Differenzierung der USSC *in vivo*

Die USSC wurden für die *in vivo*-Versuche als Monolayer in Zellkulturflaschen kultiviert (Kögler et al., 2004). Lediglich für die Applikation der USSC während der Somitogenese wurde das aus der ESC-Kultur bekannte Verfahren der *Hanging drop*-Kultur verwendet. Der Vorteil ist, dass sich in jedem *hanging drop* Zellaggregate mit definierter Zellzahl ausbilden (Wobus et al., 1991).

Die Injektion ins Blastodermstadium (HH-Stadium 1-2) diente der Untersuchung des Differenzierungspotenzials der USSC. Eine möglichst frühe Injektion der Zellen erschien sinnvoll, da die Zellen so die Möglichkeit haben, von früh ausgesendeten Signalen zu profitieren und bereits an den ersten Entwicklungsschritten des Embryos teilnehmen zu können. Diese Methode wurde bereits von zahlreichen Arbeitsgruppen zur Herstellung von Huhn-Wachtel-Chimeren erfolgreich genutzt (Petitte et al., 1990; Watanabe et al., 1992; Carsience et al., 1993; Kagami et al., 1995; Etches et al., 1996). Zwei kritische Punkte bei den frühen Injektionen sind die Überlebensrate und die Anzahl an gebildeten Chimeren. Bei den Versuchen der Arbeitsgruppe um Kagami überlebten 18,2 % der Embryonen die Injektion und erreichten Tag 14 oder schlüpfen. Von diesen überlebenden Embryonen waren 63,6 % chimer. Bei der frühen Injektion der USSC in die Hühnerembryonen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Überlebensrate von 27 % ausgemacht werden. Diese im Vergleich zu Kagami et al. höhere Rate ergab sich jedoch durch die frühzeitige Analyse der Embryonen 1-5 Tage nach der Injektion. Weiterhin waren 54 % der überlebenden Embryonen missgebildet, so dass diese Embryonen wahrscheinlich nicht 14 Tage überlebt hätten. Hinzu kommt, dass nur einzelne Zellen in 35 % der überlebenden Embryonen wiederzufinden waren.

Die Injektion 16 Stunden später (HH-Stadium 4), während der Gastrulationsphase, zeigte eine bessere Überlebensrate (40 %), jedoch konnten auch hier bei 41 % der überlebenden Embryonen nur vereinzelte Zellen nachgewiesen werden. Die Überlebensrate und die Rate der chimeren Embryonen waren zwar besser, als die Raten, die bei der Injektion von murinen adulten Neurosphen in die Amnionhöhle von Hühnerembryonen des gleichen Entwicklungsstadiums erreicht wurden (Clarke et al., 2000), allerdings war dort die Anzahl der ins Gewebe integrierten Zellen höher. Dies lag wahrscheinlich an der Applikation der Zellen als Neurosphen, denn bei der Applikation von Zellsuspensionen konnten keine Chimere nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit führte die Applikation von Zellaggregaten zu abgekapselten

Zellverbänden im Gewebe, weswegen die Applikation von Zellsuspensionen bevorzugt wurde.

Die Schnitte der Embryonen, die 12 h nach der Injektion präpariert wurden (vgl. Kapitel 3.1.2), lassen vermuten, warum die Zellzahl humaner Zellen so niedrig war. Die Blastoderm-Zellen des Huhns proliferieren so schnell, dass die humanen Zellen dadurch scheinbar nach außen gedrängt werden und damit nicht mehr an der Bildung des Embryos teilnehmen können. Allerdings war auch bei anderen Applikationsarten die Anzahl verbleibender humaner Zellen sehr gering. Während 12 h nach der Injektion noch 70 % der injizierten Zellen nachgewiesen werden konnten, waren es weitere 24 h später nur noch 10 % der Zellen. Sechs Tage später waren schließlich nur noch 0,1 % der Zellen zu finden. Dies kann verschiedene Ursachen haben: Einige der verbleibenden Zellen werden apoptotisch und sterben, andere werden bei der Injektion durch das Bluten der Läsion wieder aus dem Embryo herausgeschwemmt.

Zusammenfassend sind die in dieser Arbeit erzielten Überlebensraten ähnlich den in der Literatur verzeichneten. Jedoch konnten in dieser Arbeit fünf Tage nach Applikation nur vereinzelte humane Zellen in den Hühnerembryonen detektiert werden. Eine genaue Aussage über die Ursache könnte im Rahmen einer Überwachung der markierten Zellen nach der Injektion gemacht werden. Da der Hühnerembryo sich im Ei entwickelt und das Gewebe ab dem dritten Tag zu dick wird, reicht es nicht aus, die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Eine Möglichkeit, den Weg der Zellen zu verfolgen, bietet die Transfektion der Zellen mit Luziferase und anschließender Detektion der Biolumineszenz, eine Methode, die auch im Mausmodell zur Untersuchung von Tumorzellen genutzt wird (de Boer et al., 2006). Des Weiteren könnte die Markierung der Zellen mit *superparamagnetic iron oxide* (SPIO) Nanopartikeln der Beobachtung der Zellmigration im Hühnerembryo durch Magnetresonanztomographie dienen (Arbab et al., 2004). Die Zellen können außerdem mit *gadolinium rhodamine dextran* (GRID) markiert werden, das sowohl in der Magnetresonanztomographie als auch durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden kann (Modo et al., 2002).

Neben den Applikationen der USSC in das Blastoderm wurden die Zellen in sich entwickelnde Gewebe appliziert, um zu untersuchen, ob eine Differenzierung zu gewebetypischen Zellen induziert werden kann.

Die Läsion des Neuralrohrs mit anschließender Transplantation der USSC (vgl. Kapitel 3.1.6) zeigte zwar, dass die Zellen am Injektionsort verweilen, jedoch konnte keine Differenzierung zu neuronalen Zellen nachgewiesen werden.

Bei der Zellablage in den Bereich der kranialen Somiten (vgl. Kapitel 3.1.5) zeigte sich, dass die USSC das Vermögen haben, mit den Huhn-Neuralleistenzellen zum Herzen zu wandern. Zellen, die auf diese Weise in Embryonen injiziert wurden, konnten bei der Analyse wiederholt im Herzen gefunden werden. Die USSC wurden im Ausflusstrakt und im intraventrikulären Septum gefunden. Demnach können die Zellen mit den Neuralleistenzellen migrieren. Zellen, die ins Herzgewebe integrieren scheinen sich auch an der Bildung des Septums zu beteiligen. Es konnte bei vier analysierten Embryonen das herzmuskelspezifische Protein MLC2v nachgewiesen werden, nicht jedoch α -MHC. Der positive MLC2v-Nachweis kann auf eine Differenzierung in kardiale Richtung hindeuten.

Nach der Injektion der USSC in die Flügelanlage (vgl. Kapitel 3.1.10) hingegen konnte ein positiver α -Aktinin-Nachweis bei humanen im Gewebe der Flügelanlage integrierten Zellen gezeigt werden. Der positive α -Aktinin-Nachweis lässt die Vermutung zu, dass USSC potenziell zu Skelettmuskelzellen differenzieren können.

Insgesamt konnte bei den Transplantationsversuchen sowohl eine potenzielle Differenzierung zu Skelettmuskelzellen bei der Injektion in die Flügelanlage als auch eine potenzielle Differenzierung zu Herzmuskelzellen bei der Applikation der USSC lateral zum Neuralrohr an die Somiten nachgewiesen werden. Gründe für die geringe Anzahl an festgestellten Differenzierungen könnten sein, dass die Zellen mehr Zeit benötigen, um zu differenzieren oder dass der Hühnerembryo nicht die geeignete Umgebung für die USSC bietet.

Zu berücksichtigen ist, dass sich ein Hühnerembryo innerhalb von 21 Tagen entwickelt und schlüpft. Ein menschlicher Embryo benötigt bis zur Geburt neun Monate. Der humane Embryo ist bei der Geburt um ein Vielfaches schwerer als ein Hühnerküken beim Schlüpfen, weswegen man damit argumentieren könnte, dass mehr Masse produziert werden muss, wofür mehr Zeit benötigt wird. Die Entwicklung im Hühnerembryo verläuft schneller als die Entwicklung eines menschlichen Embryos. Ein Beispiel hierfür ist die Somitenentwicklung. Beim humanen Embryo entstehen neun Tage nach Beginn der Gastrulation die ersten Somiten, während der Hühnerembryo bereits nach 28 h das gleiche Stadium erreicht. Damit ist es möglich, dass die humanen Zellen zwar auf die vorhandenen Signale reagieren können,

jedoch für die Differenzierung eine längere zeitliche Präsenz der Signale benötigen, als es für die Huhnzellen nötig ist.

Die durch den positiven α -Aktinin-Nachweis gezeigte potenzielle Differenzierung der USSC zu Skelettmuskelzellen und der in einigen Embryonen positive MLC2v-Nachweis stehen nicht im Widerspruch zu der Theorie, dass die Anwesenheit der Signale für eine eindeutige Differenzierung länger erforderlich ist. Eine Differenzierung in Richtung Skelettmuskelzelle kann beispielsweise auch durch eine kürzere Präsenz entscheidender Signale erfolgen. Für die Differenzierung zu Skelettmuskelzellen wurde bei bestimmten Zelltypen, wie primären Fibroblasten, Adipozyten, glatten Muskelzellen, Nieren- und Leberzellen aus Hamsterembryonen herausgefunden, dass die Expression des Faktors MyoD ausreicht, damit diese Zellen einen Muskelphänotyp annehmen und Muskelzellmarker, wie die schwere und leichte Kette des Myosins exprimieren (McGrew et al., 1999). Diese Resultate von McGrew et al. weisen darauf hin, dass MyoD ein Schlüsselgen in der Skelettmuskeldifferenzierung darstellt, jedoch konnte beispielsweise in HeLa- und CV1-Zellen keine Expression von Muskelmarkern aktiviert werden (Weintraub et al., 1989). Im Hühnerembryo wird im HH-Stadium 22 MyoD nicht nur von epaxialen Muskelvorläuferzellen exprimiert, sondern auch von den Myoblasten, die die tiefere Zellschicht der Flügelanlage bilden (Christ und Brand-Saberi, 2002). Durch die Applikation der USSC medial in die Flügelknospe profitieren die USSC wahrscheinlich von der MyoD-Expression der Myoblasten und starten so die Signalkette, die zur Skelettmuskeldifferenzierung führt.

In den Arbeiten von Lee et al. (2006) konnte gezeigt werden, dass durch die Injektion von humanen ESC in die Amnionhöhle ein Neuralrohrdefekt verringert werden kann. Die detektierten ESC befanden sich nicht im geschlossenen Neuralrohr, sondern sie überdeckten die Stelle des Defekts. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe konnte lediglich eine Verbesserung der Schließung des Neuralrohrs festgestellt werden. Ähnliche Beobachtungen wurden in dieser Arbeit bei der Läsionierung des Neuralrohrs mit anschließender Applikation der USSC gemacht (vgl. Kapitel 3.1.6).

Es kann angenommen werden, dass die USSC durch ihre Anwesenheit und das Ausschütten von Faktoren die Regeneration zusätzlich unterstützt haben. Um dies zu untersuchen, würde es sich anbieten, ältere Embryonen zu läsionieren, deren Zellen eine niedrigere Teilungsrates haben als die Zellen der ersten Entwicklungsstadien und dadurch längere Zeit zur Heilung einer Läsion benötigen. Bleibt die Läsion in der

Kontrollgruppe erhalten, gäbe es einen Hinweis darauf, dass die USSC einen Einfluss auf den Regenerationsprozess hat. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die USSC nicht an den Läsionsort direkt sondern an eine andere Stelle zu implantieren. Eine Migration zur Läsionsstelle würde dafür sprechen, dass die USSC auf Signale reagiert, die von läsierten Zellarealen ausgehen. Käme es nicht zur Migration und die Läsionsstelle würde sich trotzdem regenerieren, könnte davon ausgegangen werden, dass die Regeneration der Embryonen völlig unabhängig von den USSC abläuft.

Um die zeitliche Limitierung des Verbleibs der Zellen als mögliche Ursache für das Ausbleiben der Differenzierung auszuschließen, müssten die Zellen länger im Embryo verweilen. Dies könnte durch ein späteres Präparieren der Embryonen erreicht werden. Allerdings bleibt dabei die Differenz der Teilungsraten beider Zellarten vorhanden. So liegt die *population doubling* (PD)-Zeit bei den USSC bei 24-48 h, während die Huhnzellen der *Area opaca* des Blastoderms in den HH-Stadien 1-7 eine PD-Zeit von 6 h haben, sie erhöht sich bis zu den HH-Stadien 8-12 auf 12 h (McMaster und Modak, 1977), was immer noch deutlich unter der PD-Zeit der USSC liegt. Murine ESC besitzen in Kultur eine PD-Zeit von durchschnittlich 21,1 h (Abranches et al., 2003), während humanen ESC ebenfalls nur eine PD-Zeit von 24-48 h besitzen (Cowan et al., 2004). Die Applikation von humanen ESC an die Somiten ergab zwar die Integration der ESC in das mesodermale Wirtsgewebe, jedoch ohne nachweisbare Differenzierung. Lediglich das Ersetzen von Somiten ergab eine durch den neuronalen Marker β -III-Tubulin nachweisbare neuronale Differenzierung (Goldstein et al., 2002). Das Ersetzen von Somiten durch adulte Knochenmark-Stromazellen der Ratte ergab ebenfalls eine Integration in das Wirtsgewebe, zusätzlich konnten jedoch die Proteine der schweren Kette α des Myosins und Cardiotin nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass die Zellen teilweise differenzieren konnten (Pochampally et al., 2004).

Diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass zwar eine Integration in das Wirtsgewebe möglich ist, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, dass jedoch nicht notwendigerweise auch eine Differenzierung stattfindet. Jedoch schließt keine dieser Untersuchungen den Zeit- und Proliferationsfaktor aus. Eine Verzögerung der Entwicklung durch Bestrahlung der Embryonen mit γ -Strahlen einer Co^{60} -Quelle oder durch Verringerung der Inkubationstemperatur vor der Applikation der Zellen könnte den USSC die Möglichkeit geben, alle nötigen Signale für eine

Differenzierung zu erhalten. Dieses Verfahren wurde bereits früher bei der Applikation von Wachtel-Blastodermzellen ins EK Stadium X von Hühnern zur Herstellung von Chimeren genutzt (Kagami et al., 1995; Etches et al., 1996).

4.3 Differenzierung der USSC durch Zugabe von Faktoren zum Medium

Für die Differenzierung durch Zugabe von Faktoren zum Kulturmedium wurde zusätzlich zur normalen Kultur als Monolayer ein weiteres Kultivierungsverfahren verwendet. Zunächst wurden die Zellen in einer Rotationskultur und anschließend als Monolayer kultiviert. Diese Kultivierungsabfolge ist aus der ESC-Forschung bekannt und führt dort zu vielfältigen Differenzierungen. Die spontane Differenzierung von undifferenzierten ESC zu Kardiomyozyten erfolgt meist in einer Rotationskultur in einem bestimmten Medium, das von Spezies zu Spezies verschieden ist. Bei dieser Kultivierungsmethode bilden sich *embryoid bodies* (EB) aus, in denen die Zellen unter anderem zu Herzmuskelzellen differenzieren (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Die EB werden 7-10 Tage später als Monolayer-Kultur ausgesät, weitere 4-22 Tage später können spontane Kontraktionen von humanen ESC (Kehat et al., 2001). Bei der Kultivierung von Rhesusaffen-ESC können bereits einen Tag nach dem Wechsel zur Monolayer-Kultur Kontraktionen beobachtet werden (Schwanke et al., 2006).

Auf Grund der veröffentlichten Daten zur *in vitro*-Differenzierung (vgl. Kapitel 1.4) von Zellen zu Herzmuskelzellen wurden als Mediumzusätze 100 nM Oxytocin (Paquin et al., 2002; Matsuura et al., 2004), 0,25 µM Cardiogenol (Wu et al., 2004), 100 nM *all-trans*-Retinsäure (Wobus et al., 1997), 0,5 % DMSO (Paquin et al., 2002), 10 µM 5-Azacytidin/ 5-Aza-2'-deoxycytidin (Makino et al., 1999; Fukuda, 2001; Xu et al., 2002; Xu et al., 2004) oder 100 µM Ascorbinphosphat (Takahashi et al., 2003) und ITS (Shim et al., 2004) getestet.

Diese Substanzen zeigten vor allem bei ESC eine Erhöhung des Anteils der zu Herzmuskel differenzierten Zellen (Wobus et al., 1997; Paquin et al., 2002; Xu et al., 2002; Takahashi et al., 2003; Wu et al., 2004). Oxytocin konnte ebenfalls bei adulten Stammzellen aus dem Herzen der Maus eine Differenzierung zu Herzmuskelzellen hervorrufen (Matsuura et al., 2004), was für eine Stammzellreserve im Herzen spricht, die regenerativ fungieren kann. Stromazellen aus dem Knochenmark der Maus lassen sich mit dem Zusatz von 5-Azacytidin (Makino et al., 1999; Fukuda, 2001) und humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark

durch den Zusatz von 5-Azacytidin (Xu et al., 2004) oder ITS und Ascorbinphosphat (Shim et al., 2004) zu herzmuskelartigen Zellen differenzieren.

Cardiogenol, DMSO, 5-Azacytidin und die Kombination von ITS und Ascorbinphosphat vermochten jedoch nicht, die USSC zu Herzmuskel zu differenzieren. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass in USSC der Oxytocin-Rezeptor stark exprimiert wird, wurden ebenfalls *all-trans*-Retinsäure oder Oxytocin eingesetzt, um eine kardiale Differenzierung zu erreichen. Auch diese beiden Faktoren induzierten keine Differenzierung. Etablierte Protokolle für murine ESC lassen sich offensichtlich nicht ohne weiteres auf die humanen USSC übertragen, sie benötigen andere Faktoren zur Differenzierungsinduktion.

Im Zellverband bekommen Zellen während der Organentwicklung die richtigen Signale zum richtigen Zeitpunkt in der richtigen Reihenfolge. Dies zu simulieren ist nicht einfach, da noch kein Gen gefunden wurde, das als Mastergen die Kaskade aktiviert (vgl. Kapitel 1.3.4.2). Es scheint, als wäre eine Expressionskombination verschiedener Gene nötig, um die Herzmuskelzell-Differenzierung zu aktivieren.

Davon ausgehend, dass Oxytocin und die anderen Zusätze die kardiale Differenzierung fördern können, wenn eine Zelle bereits bis zu einem bestimmten Punkt der kardialen Differenzierungslinie gekommen ist, befindet sich die USSC vor diesem Punkt und benötigt mehr als nur diesen einen Faktor, um kardial zu differenzieren. Dementsprechend wären die im EB vordifferenzierten ESC und die Herz-Stammzelle der Maus bereits bis zu diesem Punkt differenziert. Es ist wichtig herauszufinden, welche Faktoren die Zellen benötigen, um diesen Differenzierungspunkt zu erreichen.

Die untersuchten Faktoren sind offensichtlich nicht die richtigen für die Induktion der Differenzierung zu Herzmuskelzellen in USSC. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Faktoren zu einem erhöhten Anteil differenzierter Zellen führen könnten, wenn die USSC vordifferenziert wäre.

4.4 Differenzierung durch Kokultivierung und durch Kultivierung mit konditioniertem Medium und deren Analyse

In der Literatur werden unterschiedliche Kokultivierungen beschrieben, bei denen es zum Einen zur Auslösung der kardialen Differenzierungslinie kommt und zum Anderen zu einem erhöhten Anteil kontrahierender Zellen. So wird bei der Kokultivierung humaner ESC mit viszeral-endoderm ähnlichen Zellen (END-2) eine

spontane Induktion der Differenzierung zu Herzmuskelzellen hervorgerufen (Mummery et al., 2003). Diese Differenzierung wird ebenfalls bei Kokultivierung der beiden Zelltypen in serumfreiem Medium aktiviert (Passier et al., 2005). Sowohl über die Kokultivierung humaner endothelialer Progenitorzellen (huEPC) mit neonatalen Kardiomyozyten der Ratte (NRCM) (Badorff et al., 2003; Gruh et al., 2006) als auch über das Differenzierungsvermögen von humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC) zu Herzmuskelzellen durch die Kultur mit NRCM (Condorelli et al., 2001; Welikson et al., 2006) gibt es widersprüchliche Berichte, ob eine Differenzierung zu Herzmuskelzellen induziert werden kann oder nicht. Die Gruppen, die von einer Differenzierung ausgingen (Condorelli et al., 2001; Badorff et al., 2003), stellten fest, dass die Differenzierung nur durch die Kokultivierung, nicht aber durch eine Kultivierung mit konditioniertem Medium ausgelöst werden konnte. Durch die Kokultivierung von murinen ESC mit dem perkardialen Huhn-Endo- und Mesoderm kommt es zu einem erhöhten Anteil kontrahierender Zellen (Rudy-Reil und Lough, 2004), während die Kokultivierung von murinen hämatopoetischen Progenitorzellen mit Herzzellen von Hühnerembryonen des HH-Stadiums 16 eine Differenzierung zu herzmuskelähnlichen Zellen auslösen kann (Eisenberg et al., 2003).

Auf Grund der in der Literatur veröffentlichten Resultate wurden in dieser Arbeit fünf USSC-Linien (SA 5/03, SA 5/18, SA 5/50, SA 5/60 und SA 5/73) mit Herzzellen des Herzschlauchs von Hühnerembryonen im HH-Stadium 10 kokultiviert. Zusätzlich wurde Medium vor der Zugabe zu den USSC mit Herzzellen des gleichen Entwicklungsstadiums eine Woche konditioniert, um zu untersuchen, ob die Veränderungen im Genexpressionsprofil von Faktoren abhängig ist, die von den Zellen sezerniert werden oder ob der Zell-Zell-Kontakt essenziell ist.

Der Differenzierungsstatus der USSC wurde mit verschiedenen Methoden analysiert. Sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene konnten bei der Differenzierung durch Kokultivierung mehr herzspezifische Faktoren nachgewiesen werden, als bei der Differenzierung durch Kultivierung mit konditioniertem Medium.

4.4.1 Nachweis der Genexpression

Für die Analyse der Genexpression wurden herzspezifische Gene ausgewählt, die in der Literatur standardmäßig zur Einschätzung einer kardialen Differenzierung verwendet werden. In der in den Kapiteln 4.4 und 4.5 genannten Literatur wurden für die Analyse der Genexpression folgende Gene untersucht: GATA-2, GATA-4, GATA-5, GATA-6, Nkx2.5, dHAND, eHAND, MEF2A, MEF2C, MEF2D, kardiales MHC, MLC (atrial und ventrikulär), kardiales Troponin T und Troponin I, Tropomyosin, α -Aktin, α -Aktinin, ANP, BNP, OXTR, Connexin43, SERCA und Desmin. Diese Gene werden während der Differenzierung zu Herzmuskelzellen exprimiert.

In der Tabelle 4-1 ist die Expression der in dieser Arbeit in der RT-PCR analysierten Gene für verschiedene Gewebe aufgeführt.

Die Gene OXTR, ATP2A1 (=SERCA) und MEF2C wurden bereits in den undifferenzierten USSC exprimiert. Daher konnte die Expression von SERCA und MEF2C nicht zum Nachweis der Induktion einer kardialen Differenzierung herangezogen werden. Die Expression von OXTR wurde untersucht um zu beurteilen, ob die USSC überhaupt den Rezeptor für Oxytocin exprimiert und somit durch eine Zugabe von Oxytocin zum Medium (vgl. Kapitel 4.3) in eine kardiale Richtung geleitet werden könnte.

GAPDH wurde als Kontrollgen genutzt, da es in allen Geweben und allen Entwicklungsstadien exprimiert wird. Als Kontrolle für die Funktionalität der Primer wurde eine kommerziell erhältliche RNA aus humanen fötalen Herzen genutzt.

GATA-4 wird in allen Entwicklungsstadien in Zellen von verschiedenen Geweben wie den Eierstöcken, dem Dünndarm, dem Pankreas, dem Magen, der Leber und dem Herz exprimiert.

Die Expression der Gene MYL2 (=MLC2v), MYL7 (=MLC2a), Nkx2.5, NPPA (=ANF-Vorläuferprotein), TNNI3 (=Troponin I) und TNNT2 (=Troponin T) ist gemäß *Unigene* auf das Herz beschränkt. Während die Expression von MYL2, MYL7, NPPA, TNNI3 und TNNT2 auf das fötale Entwicklungsstadium beschränkt sind, wird MYH7 im adulten Entwicklungsstadium exprimiert und Nkx2.5 in allen Stadien.

Tab. 4-1 Expression der für die RT-PCR ausgewählten Gene in den unterschiedlichen Geweben. Die Daten wurden der NCBI Unigene Gendatenbank entnommen. MYH7: kardiale schwere Myosinkette 7, das Protein ist der kardialen Isoform der schweren Myosinkette α zu 99,95% ähnlich; MYL2: kardiale regulatorische leichte Myosinkette 2=MLC2v; MYL7: regulatorische leichte Myosinkette 7=MLC2a; NPPA: *natriuretic peptide precursor A*, das Protein ist dem Vorläufer des atrialen natriuretischen Faktors zu 99,35% ähnlich; ATP2A1: sarkoplasmatisches Retikulum Kalzium ATPase=SERCA.

Gewebe	Untersuchte Gene und deren Unigene Gruppennummer											
	GAPDH Hs.544577	GATA-4 Hs.243987	MYH7 Hs.278432	MYL2 Hs.75535	MYL7 Hs.75636	Nkx2.5 Hs.54473	NPPA Hs.75640	TNNI3 Hs.644596	TNNT2 Hs.533613	OXTR Hs.2820	ATP2A1 Hs.183075	MEF2C Hs.635685
	Transkripte pro Million gemäß <i>Unigene's EST Profile Viewer</i>											
Blase	2273	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0
Blut	3036	0	0	0	0	0	0	0	15	0	7	69
Knochen	1978	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0
Knochenmark	1002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	143
Gehirn	1775	9	1	0	0	2	4	0	14	20	5	163
Kolon	3027	4	0	0	0	4	0	4	9	0	4	44
Auge	3430	19	4	4	4	0	9	0	14	4	38	33
Herz	1762	44	2532	3614	3948	356	2041	847	1583	11	111	245
Niere	2321	0	0	4	0	0	0	0	18	103	0	28
Kehlkopf	5616	0	591	558	0	0	0	0	65	0	624	65
Leber	2301	47	9	128	4	4	0	33	9	23	95	52
Lunge	4024	11	31	48	80	5	115	40	20	2	11	37
Lymphknoten	1928	0	0	10	0	0	10	0	0	0	20	503
Brustdrüse	3014	5	5	5	0	0	0	0	0	0	5	17
Mund	708	0	144	43	0	0	0	14	14	0	477	57
Muskel	3623	0	3737	1872	0	0	0	0	17	0	905	261
Nerven	3294	0	479	59	0	0	0	0	0	0	59	119
Eierstöcke	6729	122	9	9	0	9	0	9	0	18	18	18
Pankreas	2334	59	4	4	0	0	22	9	0	0	36	22
Plazenta	2417	20	3	0	0	0	0	0	6	0	0	67
Prostata	2675	5	60	80	0	0	5	0	0	5	10	40
Haut	8389	5	0	0	0	0	0	5	0	132	0	63
Dünndarm	1873	90	0	0	0	45	0	0	0	0	0	90
Magen	2398	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29
Hoden	1681	51	5	2	5	0	5	5	0	0	22	97
Thymus	231	12	0	0	12	0	12	12	0	0	25	25
Nabelschnur	1843	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gebärmutter	3037	0	0	0	4	0	12	4	8	41	0	33
Gefäße	611	0	0	39	0	0	0	0	0	0	0	197
Embryo	4934	32	10	10	16	16	0	5	16	0	21	188
Embryoid body	3589	69	27	0	13	13	0	0	55	27	13	0
Fötus	835	44	115	143	579	10	262	39	100	5	52	414
Adult (> 17 Jahre)	2308	20	225	131	5	3	11	13	20	6	63	55

limitierte Expression

Es zeigte sich, dass alle Zelllinien zu allen untersuchten Zeitpunkten entweder Nkx2.5 oder/und ANF exprimierten. Die Expression der anderen Gene war sehr unterschiedlich. Bei den kokultivierten Zellen wurden zusätzlich die Gene α -MHC, MLC2a, MLC2v, Troponin T und Troponin I nachgewiesen, bei den Zellen, die mit

konditioniertem Medium kultiviert wurden, lediglich eine Expression von MLC2v und Troponin I zusätzlich. Generell war eine Expression der Gene für MLC2a, MLC2v, Troponin T und Troponin I nur zu beobachten, wenn bereits entweder ANF oder/und Nkx2.5 exprimiert wurde. Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen Abfolge der Genexpression während der Entwicklung des Herzens (vgl. Kapitel 1.3.4.2). Allerdings ist dort eindeutig dokumentiert, dass die Expression von ANF erst nach der Expression von Nkx2.5 stattfindet, was bei RT-PCR-Versuchen dieser Arbeit zum Teil anders dokumentiert wurde.

Nachdem in der RT-PCR gezeigt werden konnte, dass verschiedene herzspezifische Faktoren exprimiert wurden, wurde eine quantitative RT-PCR zur Dokumentation der Veränderungen in der Expression durchgeführt.

Die quantitative RT-PCR ergab, dass sich bei einer Kokultivierung die Expression aller untersuchten Gene bei allen fünf Zelllinien (SA 5/03, SA 5/18, SA 5/50, SA 5/60 und SA 5/73) verändert, während es bei der Kultivierung mit konditioniertem Medium zwar Variationen in allen untersuchten Genen gab, jedoch nicht bei allen vier untersuchten Zelllinien (SA 5/03, SA 5/50, SA 5/60 und SA 5/73). Da nicht alle Kulturen die stärkste Expressionszunahme beim gleichen Gen zeigten und auch der Zeitpunkt dieser höchsten Expression nicht immer der gleiche war, ist es notwendig sich verschiedene Zeitpunkte und unterschiedliche Gene anzuschauen, um eine Einschätzung des Differenzierungsstatus machen zu können.

Der Vergleich der Daten der RT-PCR mit denen der quantitativen RT-PCR ergibt, dass sich bei den Kulturen der Zelllinie SA 5/03 und den Kokulturen der Zelllinie SA 5/60 und SA 5/73 mehr Gene verändern, als in der normalen RT-PCR detektiert wurden. Dagegen veränderten sich in den Kulturen der Zelllinie SA 5/50 und der Kultur mit konditioniertem Medium der Zelllinie SA 5/60 weniger Gene, als die in der normalen RT-PCR als exprimiert nachgewiesenen. In der Kultur mit konditioniertem Medium der Zelllinie SA 5/73 veränderten sich andere Gene. Die Unterschiede sind vor allem bei den Genen MLC2a und Troponin I vorhanden. Diese Differenzen zwischen den Ergebnissen der RT-PCR und denen der quantitativen RT-PCR könnten daran liegen, dass die quantitative RT-PCR sensitiver ist und trotz einer Veränderung die Menge an gebildetem Amplifikat zu gering ist, um im Gel detektiert zu werden. Es gibt jedoch keinen ersichtlichen Grund, warum die Unterschiede gerade bei den beiden Genen MLC2a und Troponin I in Erscheinung treten.

Insgesamt entsprechen die in der RT-PCR beobachteten Veränderungen auf mRNA-Ebene den in der Literatur dokumentierten Veränderungen. Bei der Differenzierung humaner ESC zu Kardiomyozyten wurde allerdings an Tag vier zunächst nur eine Expression von Nkx2.5 gezeigt. Jedoch wurde an den Tagen 6, 10, 15 und 20 die Koexpression von ANF, MLC2a, GATA-4 und Nkx2.5 nachgewiesen (Wei et al., 2005). Bei der Differenzierung der USSC konnte zu keinem Zeitpunkt GATA-4 nachgewiesen werden. In der Literatur wird immer wieder darauf hingewiesen, dass der ANF-Promotor durch Nkx2.5 alleine oder in Synergie mit GATA-4 aktiviert werden kann (Durocher et al., 1997; Shiojima et al., 1999). Die Beobachtung, dass ANF stärker exprimiert wird als Nkx2.5, kann daraus resultieren, dass die Expression von ANF in der USSC durch Mef2C, das bereits in undifferenzierten USSC exprimiert wird, zusätzlich aktiviert wird. Denn auch dHAND und Mef2C können durch die Bildung eines Komplexes an den ANF-Promotor binden und die Expression von ANF auslösen (Zang et al., 2004). An Tag 10 wurde in der Literatur neben der Expression der oben genannten Gene auch eine schwache Expression der Gene α -MHC, MLC2v, Troponin I und Troponin T dokumentiert (Kehat et al., 2001). Herauszuheben ist, dass bei der Zelllinie SA 5/03 ein deutlicher Anstieg der MLC2v-Expression über die 21 Tage der Differenzierungskultivierung gezeigt werden konnte. Dies ist interessant, da MLC2a während der Herzentwicklung im ganzen Herzen exprimiert wird, während die Expression von MLC2v auf die Ventrikel beschränkt ist (Lee et al., 1992).

Die Expression von MLC2v sowie die Expression von α -MHC, Troponin I und Troponin T nach der Kokultivierung und nach der Kultivierung mit konditioniertem Medium lassen die Vermutung zu, dass sich die Zellen über das frühe kardiale Differenzierungsstadium hinweg entwickelt haben und dadurch nicht nur die frühen kardialen Marker exprimieren, sondern auch Expressionen zeigen, die für eine Differenzierung zur Herzmuskelzelle sprechen.

4.4.2 Nachweise des Proteins

Wenn Veränderungen der RNA-Expression nachgewiesen werden, ist es wichtig die Protein-Expression zu untersuchen, da mRNA-Expression post-transkriptionell reguliert wird und nicht zwangsläufig Protein gebildet wird. Die Proteine werden mit Hilfe von Antikörpern detektiert. In der Literatur werden meist die Proteine für GATA-4, Nkx2.5, MEF2, kardiales MHC, MLC (atrial und ventrikulär), kardiales Troponin T

und Troponin I, Tropomyosin, α -Aktin, α -Aktinin, ANP, Connexin43, Desmin und die Proteine diverser Ionenkanäle immunhistochemisch analysiert.

Im Western Blot konnten die Ergebnisse der Untersuchungen auf RNA-Ebene teilweise bestätigt werden, das Protein α -Aktinin konnte zusätzlich nachgewiesen werden. Da der Nachweis der RNA nicht zwangsweise bedeutet, dass das Protein ebenfalls dokumentiert werden kann und ebenso die Präsenz eines Proteins nicht heißen muss, dass die RNA auch nachzuweisen ist, sind bestehende Unterschiede zwischen den Ergebnissen möglich.

Es kann an methodischen Schwierigkeiten oder schlechter Proteinpräparation liegen, dass in Western Blots in keiner der Kulturen MLC2a, MLC2v und ANF nachgewiesen werden konnte und im Western Blot der Kulturen mit konditioniertem Medium auch kein Troponin I. Allerdings sind auch trotz der Konzentrationsbestimmung die eingesetzten Mengen an Protein sehr unterschiedlich, was bei Betrachtung der β -Aktin-Bande auffällt. Demnach kann es sein, dass im Falle der Kultur mit konditioniertem Medium der Zelllinie SA 5/73 kein Protein außer α -Aktinin nachweisbar ist, weil die eingesetzte Proteinmenge zu niedrig war.

Immunhistochemische Analysen sollten die Ergebnisse des Western Blots erweitern und Aufschluss über die Morphologie der Zellen geben. Es konnten α -Aktinin, die atriale und ventrikuläre leichte Kette des Myosins, Troponin I und T wie auch der Transkriptionsfaktor Nkx2.5 durch Immunhistochemie nachgewiesen werden.

Die Färbung des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 war, wie zu erwarten, im Zellkern lokalisiert. Außer der α -Aktinin- und der Troponin I-Färbung erscheint keines der anderen Strukturproteine klar definiert, es erscheint nur eine diffuse Färbung. Jedoch ist durch die Negativkontrolle (undifferenzierte USSC) und die Belichtungszeit von 300-600 ms eine unspezifische Färbung ausgeschlossen. Für drei Fälle ist eine Störung der myofibrillären Strukturen beschrieben:

1. Es kann bei der Kultivierung von Kardiomyozyten zu einem Verlust der sarkomeren Strukturen und zu einem Verfließen der sarkomeren Proteine kommen (Bird et al., 2003).
2. Eine diffuse Färbung kann eine Zerstörung der sarkomeren Strukturen durch den Vorgang der Vereinzelung der Zellen mit Trypsin zur Ursache haben, was für humane Herzzellen, die trypsiniert und wieder ausgesät wurden, gezeigt wurde (Nag et al., 1996).

3. Die myofibrilläre Struktur der Kardiomyozyten bricht während der Mitose zusammen (Kaneko et al., 1984; Ahuja et al., 2004).

Da die immunhistochemische Analyse einen Tag nach der Vereinzelung der Zellen stattfand und die Mitose länger dauert, ist es wahrscheinlich, dass der erste Fall zutrifft.

Der Problematik, dass zweidimensionale Bilder durch mögliche Überlagerungen mehrerer Zellschichten in der Kokultur nur wenig aussagekräftig sind (Gruh et al., 2006), wurde durch Vereinzelung der Zellen und ein Aussähen in einer sehr geringen Zelldichte (100 Zellen/cm²) vorgebeugt.

Nachdem spezifische Proteine nachgewiesen werden konnten, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, um den Anteil an Zellen zu ermitteln, die einen spezifischen Marker tragen. Die Marker Nkx2.5, ANF, MLC2v, Troponin T und Troponin I konnten auch in der durchflusszytometrischen Analyse nachgewiesen werden. Die Aussagekraft durchflusszytometrischer Analysen bei der Einschätzung des Differenzierungsstatus ist je nach Zelltyp sehr unterschiedlich, so zeigen neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM) eine starke Autofluoreszenz, die falsch positive Ergebnisse bei der durchflusszytometrischen Analyse bewirken kann (Gruh et al., 2006). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Kontrollen kombiniert. Nach der Kokultur war der Anteil an Huhnzellen lediglich 0,1 %, außerdem konnte durch die Auswahl des USSC-Bereiches für die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten ausgeschlossen werden, dass bei den Kokulturen Huhnzellen die Ergebnisse verfälschen. Die sekundär-Ak-Kontrollen stellten zusätzlich sicher, dass nicht unspezifische Bindungen des sekundären Ak an die USSC die Werte verfälschten. Auch die Eigenfluoreszenz der USSC wurde bei der Messung berücksichtigt und das Gerät entsprechend eingestellt.

Die Untersuchung der Expression von Nkx2.5, GATA-4, ANF, α -Aktinin, MLC2a, MLC2v, Troponin T und Troponin I und deren immunhistochemischer Nachweis sind in der Literatur etablierte Methoden zur Einschätzung einer Differenzierung in die kardiale Richtung. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden angewandt, um die Differenzierung der USSC zu untersuchen. Es kamen RT-PCR, quantitative RT-PCR, Western Blot, immunhistochemische Färbungen fixierter Zellen und durchflusszytometrische Analysen zum Einsatz.

4.4.3 Funktioneller Nachweis

Es wurde in dieser Arbeit kein funktioneller Nachweis gemacht, da dieser nur dann erbracht wird, wenn spontane Kontraktionen der differenzierten Zellen beobachtet werden. Die Charakterisierung der unterschiedlichen Aktionspotenziale der verschiedenen bei der Differenzierung entstehenden Zelltypen wurde bei ausgesäten EB humaner ESC (He et al., 2003) und auf zellulärem Level (Mummery et al., 2003) untersucht. Es wird zwischen drei verschiedenen Aktionspotenzialen unterschieden, dem Sinusknoten-, Atrium- und Ventrikel-ähnlichen Potenzial. Zusätzlich wird der Nachweis von Ionenkanälen herangezogen, um die Funktionalität einer zu Herzmuskel differenzierenden Zelle einzuschätzen (Hescheler et al., 1997). Dies geschieht häufig in Kombination mit der Reaktion der Zellen auf Pharmazeutika, die auf Herzmuskelzellen wirken (Schwanke et al., 2006). Spontane Kontraktionen konnten auch bei murinen Knochenmark-Stromazellen nach der Kultivierung mit Medium, das mit 5'-Azacystein versetzt wurde, beobachtet und Aktionspotenziale, die denen der Zellen am Sinusknoten und im Ventrikel ähnlich waren, gemessen werden (Makino et al., 1999; Fukuda, 2001).

4.4.4 Einschätzung des Differenzierungsstatus

Die Untersuchung der Expression von Nkx2.5, GATA-4, ANF, α -Aktinin, MLC2a, MLC2v, Troponin T und Troponin I und deren immunhistochemischer Nachweis sind in der Literatur etablierte Methoden zur Einschätzung einer Differenzierung in kardiale Richtung.

Die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse zeigen, dass es nicht ausreicht, nur eine Nachweismethode zur Bestimmung des Differenzierungsstatus heranzuziehen. Es ist eine Kombination der unterschiedlichen molekularbiologischen und immunhistochemischen Nachweismethoden nötig, gepaart mit funktionellen Analysen, um Aussagen über eine Differenzierung tätigen zu können (Gruh et al., 2006). ESC scheinen zu funktionellen Kardiomyozyten differenzierbar zu sein, da sie nach der Differenzierung alle Kriterien erfüllen. Neben der spontanen Kontraktion, der Expression diverser Herzmuskel-spezifischer Marker und der charakteristischen Morphologie, reagieren sie auf Pharmazeutika wie es für eine Herzmuskelzelle üblich ist (Baharvand et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde die Expression verschiedener herzmuskelspezifischer Marker molekularbiologisch und immunhistochemisch nachgewiesen. Zusätzlich konnten

verschiedene Zelltypen umschrieben werden, die grob mit der Morphologie von kultivierten Kardiomyozyten übereinstimmten (Bird et al., 2003). Allerdings konnten nicht die typischen sarkomerischen Charakteristika gezeigt werden und eine spontane Kontraktion konnte auch nicht beobachtet werden.

Die erhaltenen Daten weisen darauf hin, dass sich eine Herzmuskel-ähnliche Zelle ausgebildet hat.

4.5 Transdifferenzierung und Fusion

Bei einer Differenzierung *in vivo* und bei einer Kokultivierung wird immer wieder das Vorkommen der Transdifferenzierung und der Fusion diskutiert.

Das Wort Transdifferenzierung beschreibt auf der einen Seite die Umwandlung von Zellen eines Keimblatts in die eines anderen Keimblatts und auf der anderen Seite den Wechsel von einer Differenzierungsrichtung in eine andere Richtung. Davon ausgehend, dass die adulte Stammzelle bereits durch das Gewebe, aus dem sie isoliert wurde, auf eine Differenzierungsrichtung festgelegt wurde, wäre jede Differenzierung einer adulten Stammzelle eine Transdifferenzierung. Eine Differenzierung in ein naiveres Stadium wird häufig De-Differenzierung genannt. So lange nicht bekannt ist, welchen Status die adulten Stammzellen haben, wird allgemein von Differenzierung gesprochen.

Die ursprüngliche Vermutung, dass adulte gewebespezifische Stammzellen ein auf ihr Gewebesystem limitiertes Differenzierungsspektrum besitzen, ist in den letzten Jahren durch experimentelle Ergebnisse widerlegt worden (vgl. Kapitel 1.2.2). Seitdem nehmen die Vermutungen zu, dass das Differenzierungspotenzial durch das Phänomen der Fusion zustande kommt.

Enddifferenzierte Zellen scheinen durch die Fusion mit Stammzellen die Möglichkeit zu bekommen, sich epigenetisch zu reprogrammieren und das vollständige Differenzierungspotenzial zurück zu erlangen (Ying et al., 2002). Adulte Knochenmarkstammzellen scheinen nach Transplantation durch Fusion zu Leberzellen differenzieren zu können (Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003). Durch das Phänomen der Fusion wurde die therapeutische Verwendbarkeit von Knochenmarkstammzellen in Frage gestellt (Wagers und Weissman, 2004). Der Nachweis, dass Knochenmarkstammzellen zwar fusionieren, dies jedoch nur in einem Maß von 2-11 Klonen pro 10^6 Knochenmarkzellen beobachtet werden konnte, lässt die Vermutung zu, dass die beobachteten Differenzierungen von

Knochenmarkstammzellen nicht nur auf Grund von Fusionen zustande gekommen sein kann (Terada et al., 2002).

Zellfusion erfolgt während der gesamten Entwicklung eines Wirbeltiers. Zum Beispiel findet zu Beginn die Fusion von Samenzelle und Eizelle statt. Skelettmuskelfasern entstehen durch Zellfusion von Myoblasten. Eine Differenzierung einer Zelle durch Fusion mit einer bereits spezialisierten Zelle muss nicht zwangsläufig ein Nachteil sein, wenn sich dadurch z. B. therapeutische Möglichkeiten ergeben.

In den in dieser Arbeit angesetzten Kokulturen konnte jedoch keine Fusion festgestellt werden. Die Bilder im Nomarski-Interferenzkontrast lassen klare Aussagen darüber zu, wie viele Zellkerne eine Zelle hat. Bei einer stattgefundenen Fusion müssten zwei Zellkerne zu beobachten sein, wobei sich nur einer der Zellkerne humanspezifische anfärben lassen sollte.

4.6 Homogenität und Heterogenität

Die in der *in vitro*-Differenzierung dokumentierten Unterschiede zwischen und innerhalb der Zelllinien deuten auf eine heterogene Population hin. Die Zelllinien weisen zu verschiedenen Zeitpunkten Veränderungen in der quantitativen PCR auf und nicht alle Zellen einer Zelllinie differenzieren gleichzeitig.

Homogenität bezeichnet die Gleichartigkeit von Erscheinungen/Eigenschaften über die gesamte Ausdehnung eines Systems. Was bedeutet das für eine Zellpopulation? In ihrer Erscheinung gleichartig ist eine Zellpopulation, wenn die Zellen alle die gleiche Morphologie aufweisen. Die Gleichartigkeit der Eigenschaften setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen, wie z. B. die gleiche ontogenetische Herkunft, das gleiche Erbgut, das gleiche Differenzierungspotenzial, das gleiche Expressionsprofil oder die gleiche Reaktion auf extrinsische Faktoren.

Es ist schwierig, eine Grenze für die Eigenschaften zu setzen, die erfüllt sein müssen, um eine Zellpopulation homogen nennen zu können. Die Homogenität zu testen, ist eine schwierige Aufgabe. Zellen, die aus einer Probe eines Spenders isoliert wurden, haben das gleiche Erbgut. Bei der Isolierung aus einem bestimmten Gewebe und anschließender gleicher Morphologie kann auch von der gleichen ontogenetischen Herkunft ausgegangen werden. Die anderen Eigenschaften, wie das Differenzierungspotenzial, das Expressionsprofil, die Reaktion auf extrinsische Faktoren und der Zellzyklus, können nur an zahlreichen Einzelzellen getestet werden, jedoch lässt sich bei einem solchen Test nicht ausschließen, dass das

erhaltene Ergebnis auf Grund von Stressreaktionen der Zelle auf die Prozedur zustande kam. Daher sollten verschiedene Zelltypen getestet werden, um zu schauen, ob das Ergebnis nur stress- oder tatsächlich zelltypspezifisch ist. Problematisch ist bei der Analyse auf Einzelzellebene die Menge an Ausgangsmaterial. Zur Amplifikation von mRNA kann die Methode der RT-PCR genutzt werden. Der Nachweis von Proteinen ist jedoch wesentlich diffiziler. Er kann nur immunhistochemisch erfolgen, da für einen Western Blot nicht genügend Material zur Verfügung steht. Es ist jedoch nicht festgelegt, wie viele Antigene nachgewiesen werden müssen, um sicher zu stellen, dass die Zellpopulation homogen ist. Selbst bei der Untersuchung von MSC, die bereits nach den Kriterien CD 29⁺, CD105⁺, CD166⁺, CD34⁻ und CD45^{-/low} ausgewählt wurden, konnte die Existenz verschiedener Kalziumströme auf einzelnen Zellen dokumentiert werden (Heubach et al., 2004), was für eine heterogene Population spricht. Dies kann trotz der relativ homogenen Ausgangspopulation (in fünf Oberflächenmarkern übereinstimmend) für eine Heterogenität der Zellen sprechen.

Bei allen Schwierigkeiten, die sich beim Nachweis der Homogenität einer Zellpopulation ergeben, muss beachtet werden, dass die Homogenität in der Praxis wichtig ist.

Am Beispiel der ESC wird deutlich, dass die Homogenität für den therapeutischen Einsatz entscheidend ist, da bereits eine undifferenzierte ESC ein Teratom ausbilden kann. Bei der Transplantation von ESC wurden Teratombildungen beobachtet (Fujikawa et al., 2005). Die Teratombildung ist ein Risiko, dass im therapeutischen Alltag nicht eingegangen werden kann. Daher liegt in der Arbeit mit embryonalen Stammzellen ein Schwerpunkt auf der Aufreinigung differenzierter Zellen. Da bereits eine nicht ausreichend vordifferenzierte Zelle genügt, um Teratome zu bilden, ist eine 100 %ige Reinheit der zu transplantierenden Zellen ausschlaggebend. Diese ist mit den methodischen Möglichkeiten momentan nicht zu erreichen.

Die Transplantation von Zellen, die durch eine Transfektion einen Selektionsmarker (z. B. Antibiotikaresistenzen) erhalten haben und über diesen selektiert wurden, ist bedenklich, da die Veränderung der Zelle durch die Transfektion zu Schwierigkeiten führen kann. Jede Selektion durch ein Gerät, wie die durchflusszytometrische Analyse mit anschließender Kultivierung der selektierten Zellen, hat außerdem mit dem Fehlerquotienten des Geräts zu kämpfen.

Bei Zellpopulationen, die keine Teratombildung in Tierversuchen zeigen, wie es bisher bei adulten Stammzellen der Fall ist, muss vor einem therapeutischen Einsatz sicher gestellt werden, dass nur die gewünschte Differenzierung im Empfängerorganismus von statten geht. Die Heterogenität der Zellen bedingt eine ausreichende Effizienz bei der gewünschten Funktion. Dies ist jedoch nicht essenziell, da bei der maximalen Anzahl an Zellen mit der gewünschten Funktion die Zellen mit anderen Eigenschaften keine negativen Auswirkungen haben sollten. Dabei muss auch hier darauf geachtet werden, dass das Leben des Patienten nicht gefährdet wird.

Auch wenn die folgenden Eigenschaften für Homogenität der USSC-Population sprechen, weisen die Unterschiede der RNA- und Proteinanalysen auf eine heterogene Zellpopulation hin. Die Zellen haben das gleiche Erbgut in einer Population und sind sicherlich auch ontogenetisch gleichen Ursprungs. Sie haben eine einheitliche Morphologie und das Differenzierungspotenzial scheint auch einheitlich, wie anhand der Differenzierung klonaler Populationen gezeigt werden konnte. Jedoch ist dadurch nicht vollständig geklärt, ob die eingesetzte Population homogen war. Da mit Differenzierung häufig auch Zelltod verbunden ist, kann nie eine klare Aussage darüber getroffen werden, ob nur ein Teil der Zellen differenziert oder ob alle das Potenzial dazu haben.

Ein Vorteil der USSC im Gegensatz zu den ESC für die Praxis ist, dass im Schafmodell keine Teratombildung beobachtet werden konnte (Kögler et al., 2004). Zwar konnte auch in keinem der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche Teratombildung gezeigt werden, jedoch wurde eine Bildung von Teratomen auf Grund der kurzen Kultivierungsdauer von maximal 18 Tagen auch nicht erwartet.

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern Ansätze für weiterführende Untersuchungen. Es konnte der Beweis erbracht werden, dass sich das Huhn als Modellorganismus zur Untersuchung der Zelldifferenzierung zu Skelettmuskelzellen und Herzmuskelzellen eignet.

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Huhn als Modell für die Einschätzung des Differenzierungspotenzials von USSC sehr gut geeignet ist. Es sollte untersucht werden, ob eine längere Verweildauer der Zellen oder eine spätere Injektion in intaktes funktionelles Gewebe in einer eindeutigen Differenzierung resultieren. Die Verweildauer könnte durch die Bestrahlung der

Embryonen oder eine Reduktion der Inkubationstemperatur und die dadurch bedingte Retardation der Entwicklung verlängert werden.

Durch die Injektion in bereits differenziertes intaktes Gewebe könnte der Hühnerembryo als Läsionsmodell dienen. Davon ausgehend, dass im Bereich der Läsion von anderen Zellen Faktoren segregiert werden, die zur Differenzierung von Zellen führen, könnte dieses Verfahren auf einem schnelleren Weg eine Differenzierung in zu untersuchenden Zellen induzieren.

Außerdem könnte die Injektion eines anderen Zelltyps klären, ob der Verbleib der USSC im Herzen eine Eigenschaft der USSC ist oder ob es ein Injektions-spezifisches Phänomen ist.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Herzzellen des Huhns die Differenzierung zu Herzmuskel-ähnlichen Zellen mittels Kokultivierung und Konditionierung von Medium zu induzieren vermögen.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie und Durchflusszytometrie zeigen zwar, dass es Zellen gibt, die für ein spezifisches Protein positiv sind, jedoch ist nicht geklärt, ob es auch Zellen gibt, die mehrere spezifische Marker tragen. Das Verwenden von mehreren primären Antikörpern in einem Ansatz und die anschließende durchflusszytometrische Analyse könnte Aufschluss darüber geben und aufzeigen, ob es bestimmte bevorzugte Markerkombinationen gibt. Des Weiteren können verschiedene Differenzierungszeitpunkte analysiert werden um ein genaueres Bild der Markerkombinationen zu erhalten.

Es wäre interessant, die durch die *in vitro*-Kultivierung vordifferenzierten Zellen mit den in der ESC-Differenzierung genutzten Reagenzien zu behandeln und zu untersuchen, inwiefern sich die Zellen weiter differenzieren lassen und ob eine spontane Kontraktion der Zellen induzierbar ist. Einen weiteren positiven Einfluss könnte die Kokultivierung der Zellen bzw. die Konditionierung von Medium mit dem perkardialen Mesoderm und Endoderm bringen, da für murine ESC bei einer Kokultivierung eine deutliche Erhöhung des Anteils kontraktiler Kardiomyozyten gezeigt werden konnte (Rudy-Reil und Lough, 2004). Sollte es zu Kontraktionen kommen, sollten anschließend auch funktionelle Analysen folgen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das allgemeine Differenzierungspotenzial der USSC untersucht, zu diesem Zweck wurde ein Hühnerembryomodell etabliert. USSC wurden zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten in Hühnerembryonen appliziert. Die Applikation in das Blastoderm diente der Ermittlung des vollen Differenzierungspotenzials. Die Applikation in sich entwickelnde Gewebe sollte der Untersuchung einer organspezifischen Differenzierung dienen.

Da die USSC nach der Applikation im Huhn detektiert werden konnten, kann gesagt werden, dass das Huhn als Modell für die Einschätzung des Differenzierungspotenzials der USSC sehr gut geeignet ist. Die erzielten Überlebensraten sind ähnlich den in der Literatur verzeichneten. Jedoch konnten fünf Tage nach Applikation nur vereinzelte humane Zellen in den Hühnerembryonen detektiert werden. Insgesamt konnten bei den Transplantationsversuchen eine potenzielle Differenzierung von USSC zu Skelettmuskelzellen bei der Injektion in die Flügelanlage und zu Herzmuskelzellen durch die Applikation lateral zum Neuralrohr an die kranialen Somiten nachgewiesen werden.

Da bei den *in vivo*-Versuchen unabhängig vom Ort der Applikation immer wieder USSC in der Herzregion detektiert wurden, war ein weiteres Ziel, die Differenzierung der USSC zu Herzmuskelzellen *in vitro* zu induzieren. Hierzu wurden die USSC in Medien mit 100 nM Oxytocin, 0,25 µM Cardiogenol, 100 nM *all-trans*-Retinsäure, 0,5 % DMSO, 10 µM 5-Azacytidin oder ITS und 100 µM Ascorbinphosphat kultiviert. Die untersuchten Faktoren sind jedoch offensichtlich nicht die geeigneten für die Induktion der Differenzierung zu Herzmuskelzellen in USSC. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Faktoren zu einem erhöhten Anteil differenzierter Zellen führen könnten, wenn die USSC vordifferenziert wurden.

Es wurde ebenfalls versucht, eine Differenzierung *in vitro* durch die Kultivierung der USSC mit Huhn-Herzzellen oder in Medium, das durch Huhn-Herzzellen konditioniert wurde, auszulösen. Die Expression von MLC2v sowie die Expression von α -MHC, Troponin I und Troponin T der USSC nach der Kokultivierung und nach der Kultivierung mit konditioniertem Medium lassen die Vermutung zu, dass sich die Zellen über das frühe kardiale Differenzierungsstadium hinweg entwickelt haben und dadurch nicht nur die frühen kardialen Marker exprimieren (Nkx2.5, ANF und MLC2a), sondern auch Expressionen zeigen, die für eine Differenzierung zur Herzmuskelzelle sprechen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Herzzellen des Huhns die Differenzierung der USSC zu Herzmuskel-ähnlichen Zellen mittels Kokultivierung und Konditionierung von Medium zu induzieren vermögen.

6 Summary

In this thesis the general differentiation potential of the USSC was examined. For this purpose a chicken embryo model was established. USSC were applied in chicken embryos to different time points of developmental stages. The application into the blastoderm served the determination of the full differentiation potential. The application into developing tissues should serve the investigation of an organ-specific differentiation.

Since the USSC could be detected after the application in the chicken can it be said that the chicken can be used as model for the estimate of the differentiation potential of the USSC. The obtained survival rates are similarly in the literature registered. However five days after application only isolated human cells could be detected in the chicken embryos. Altogether a potential differentiation from USSC to skeleton muscle cells could be proven with the injection into the wing bud and the differentiation to heart muscle cells with the application laterally to the neural tube next to the cranial somites.

Since during the investigation of the general differentiation potential USSC were detected again and again in the heart region independent from the application site, a further attempt was to induce the differentiation of the USSC to heart muscle cells *in vitro*. For this the USSC were cultivated in media with 100 nm Oxytocin, 0.25 μ M Cardiogenol, 100 nm all-trans-retinoic acid, 0.5% DMSO, 10 μ M 5-azacytidin or ITS and 100 μ M ascorbatephosphate. The examined factors are obviously not the correct for the induction of the differentiation to heart muscle cells in USSC. It is not to be excluded that these factors could lead to an increased portion of differentiated cells, if the USSC were before-differentiated.

A differentiation was tried to be induced likewise *in vitro* by the cultivation of the USSC with chicken heart cells or in medium, which was conditioned by chicken heart cells. As the USSC do not only express the early cardiac markers like Nkx2.5, ANF and MLC2a, but also MLC2v as well as α -MHC, Troponin I and Troponin T after the cocultivation and after the cultivation with condition medium the assumption is permitted that the cells have developed to a later developmental cardiac stage.

It could be shown that the heart cells of the chicken are able to induce in the USSC the differentiation to heart-muscle-similar cells by means of cocultivation and cultivation in chicken conditioned medium.

7 Literaturverzeichnis

- Abranches E, Bekman E, Henrique D und Cabral JMS (2003) Expansion and neural differentiation of embryonic stem cells in adherent and suspension cultures. *Biotechnology Letters* 25:725-730.
- Ahuja P, Perriard E, Perriard J-C und Ehler E (2004) Sequential myofibrillar breakdown accompanies mitotic division of mammalian cardiomyocytes. *J Cell Sci* 117:3295-3306.
- Alsan B und Schultheiss T (2002) Regulation of avian cardiogenesis by fgf8 signaling. *Development* 129:1935-1943.
- Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ und Frank JA (2004) Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular mri. *Blood* 104:1217-1223.
- Bach SP, Renehan AG und Potten CS (2000) Stem cells: The intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 21:469-476.
- Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM und Dimmeler S (2003) Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 107:1024-1032.
- Baharvand H, Piryaeei A, Rohani R, Taei A, Heidari MH und Hosseini A (2006) Ultrastructural comparison of developing mouse embryonic stem cell- and in vivo-derived cardiomyocytes. *Cell biology international* 30:800-807.
- Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle A-M und Peault B (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:2804-2808.
- Becker A, McCullough E und Till J (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197:452-454.
- Bird SD, Doevendans PA, van Rooijen MA, Brutel de la Riviere A, Hassink RJ, Passier R und Mummery CL (2003) The human adult cardiomyocyte phenotype. *Cardiovascular Research* 58:423-434.
- Birnboim H und Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-1523.
- Bisaha J und Bader D (1991) Identification and characterization of a ventricular-specific avian myosin heavy chain, vmhc1: Expression in differentiating cardiac and skeletal muscle. *Developmental Biology* 148:355-364.
- Bjornson C, Rietze R, Reynolds B, Magli M und Vescovi AL (1999) Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283:534-537.
- Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID und McKay RDnG (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. *Science* 285:754-756.

- Carsience R, Clark M, Verrinder Gibbins A und Etches R (1993) Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117:669-675.
- Chen C und Schwartz R (1995) Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx2.5. *J Biol Chem* 270:15628-15633.
- Christ B und Ordahl C (1995) Early stages of chick somite development. *Anat Embryol* 191:381-396.
- Christ B und Brand-Saberi B (2002) Limb muscle development. *The International journal of developmental biology* 46:905-914.
- Christ B, Huang R und Scaal M (2004) Formation and differentiation of the avian sclerotome. *Anat Embryol* 208:333-350.
- Clark WA, Jr. und Fischman DA (1983) Analysis of population cytogenetics of chick myocardial cells in tissue culture. *Dev Biol* 97:1-9.
- Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, Lendahl U und Frisén J (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288:1660-1663.
- Coles BLK, Angenieux B, Inoue T, Del Rio-Tsonis K, Spence JR, McInnes RR, Arsenijevic Y und van der Kooy D (2004) Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *PNAS* 101:15772-15777.
- Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E und Cossu G (2001) Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: Implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10733-10738.
- Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, McMahon AP, Powers D und Melton DA (2004) Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350:1353-1356.
- Cretu A, Fotos J, Little B und Galileo D (2005) Human and rat glioma growth, invasion, and vascularization in a novel chick embryo brain tumor model. *Clin Exp Metastasis* 22:225-236.
- de Boer J, van Blitterswijk C und Löwik C (2006) Bioluminescent imaging: Emerging technology for non-invasive imaging of bone tissue engineering. *Biomaterials* 27:1851-1858.
- Doetsch F, Caille I, Lim D, Garcia-Verdugo J und Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz R und Nemer M (1997) The cardiac transcription factors nkx2-5 and gata-4 are mutual cofactors. *Embo J* 16:5687-5696.
- Eglitis MA und Mezey É (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:4080-4085.

- Eisenberg LM, Burns L und Eisenberg CA (2003) Hematopoietic cells from bone marrow have the potential to differentiate into cardiomyocytes in vitro. *The Anatomical Record* 274A:870-882.
- Etches RJ, Clark ME, Toner A, Liu G und Gibbins AM (1996) Contributions to somatic and germline lineages of chicken blastodermal cells maintained in culture. *Molecular reproduction and development* 45:291-298.
- Evans M und Kaufman M (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Eyal-Giladi H und Kochav S (1976) From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Developmental Biology* 49:321-337.
- Eyal-Giladi H, Debby A und Harel N (1992) The posterior section of the chick's area pellucida and its involvement in hypoblast and primitive streak formation. *Developmental Biology* 116:819-830.
- Fair JH, Cairns BA, LaPaglia M, Wang J, Meyer AA, Kim H, Hatada S, Smithies O und Pevny L (2003) Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm. *Surgery* 134:189-196.
- Fernandes KJL, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabe-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui C-C und Miller FD (2004) A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 6:1082-1093.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G und Mavilio F (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530.
- Fontaine-Perus J, Jarno V, Fournier le Ray C, Li Z und Paulin D (1995) Mouse chick chimera: A new model to study the in ovo developmental potentialities of mammalian somites. *Development* 121:1705-1718.
- Franco D, Markman M, Wagenaar G, Ya J, Lamers WH und Moorman A (1999) Myosin light chain 2a and 2v identifies the embryonic outflow tract myocardium in the developing rodent heart. *Anat Rec* 254:135-146.
- Fujikawa T, Oh S-H, Pi L, Hatch HM, Shupe T und Petersen BE (2005) Teratoma formation leads to failure of treatment for type 1 diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am J Pathol* 166:1781-1791.
- Fukuda K (2001) Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artificial Organs* 25:187-193.
- Goldstein RS, Drukker M, Reubinoff BE und Benvenisty N (2002) Integration and differentiation of human embryonic stem cells transplanted to the chick embryo. *Developmental Dynamics* 225:80-86.
- Gossler A und Hrabe de Angelis M (1998) Somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 38:225-287.
- Grepin C, Dagnino L, Robitaille L, Haberstroh L, Antakly T und Nemer M (1994) A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Molecular and cellular biology* 14:3115-3129.

- Gruh I, Beilner J, Blomer U, Schmiedl A, Schmidt-Richter I, Kruse M-L, Haverich A und Martin U (2006) No evidence of transdifferentiation of human endothelial progenitor cells into cardiomyocytes after coculture with neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* 113:1326-1334.
- Hamburger V und Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology* 88:49-92.
- Han Y, Dennis J, Cohen-Gould L, Bader D und Fischman D (1992) Expression of sarcomeric myosin in the presumptive myocardium of chicken embryos occurs within six hours of myocyte commitment. *Developmental Dynamics* 193:257-265.
- Hatada Y und Stern CD (1994) A fate map of the epiblast of the chick embryo. *Development* 120:2879-2889.
- He J-Q, Ma Y, Lee Y, Thomson JA und Kamp TJ (2003) Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes. *Circulation Research* 93:32-39.
- Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B und Camussi G (2006) Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 24:2840-2850.
- Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM und Addicks K (1997) Embryonic stem cells: A model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 36:149-162.
- Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, Bock M, Balana B, Zahanich I, Christ T, Boxberger S, Wettwer E und Ravens U (2004) Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol (Lond)* 554:659-672.
- Hirata H, Ohtsuka T, Bessho Y und Kageyama R (2000) Generation of structurally and functionally distinct factors from the basic helix-loop-helix gene *hes3* by alternative first exons. *J Biol Chem* 275:19083-19089.
- Houweling A, Somi S, Van Den Hoff M, Moorman A und Christoffels V (2002) Developmental pattern of *anf* gene expression reveals a strict localization of cardiac chamber formation in chicken. *Anat Rec* 266:93-102.
- Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H und Benvenisty N (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Molecular medicine* 6:88-95.
- Jiang Y, Tarzami S, Burch J und Evans T (1998) Common role for each of the *cgata-4/5/6* genes in the regulation of cardiac morphogenesis. *Dev Genet* 22:263-277.
- Kagami H, Clark ME, Verrinder Gibbins AM und Etches RJ (1995) Sexual differentiation of chimeric chickens containing zz and zw cells in the germline. *Molecular reproduction and development* 42:379-387.
- Kaneko H, Okamoto M und Goshima K (1984) Structural change of myofibrils during mitosis of newt embryonic myocardial cells in culture. *Exp Cell Res* 153:483-498.
- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J und Gepstein L (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108:407-414.

- Kirby M und Waldo K (1990) Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation* 82:332-340.
- Kirby M und Waldo K (1995) Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* 77.
- Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY und Field LJ (1996) Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98:216-224.
- Kögler G, Sensken S, Airey J, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg R, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici Ö, Gao J, Caplan A, Colletti E, Almeida-Porada G, Müller H, Zanjani E und Wernet P (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200:123-135.
- Krause D, Theise N, Collector M, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S und Sharkis S (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377.
- Kunzi-Rapp K, Genze F, Kufer R, Reich E, Hautmann R und Gschwend J (2001) Chorioallantoic membrane assay: Vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model. *J Urol* 166:1502-1507.
- Ladd A, Yatskievych T und Antin P (1998) Regulation of avian cardiac myogenesis by actinvin/tgfbeta and bone morphogenic proteins. *Developmental Biology* 204:407-419.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL und Grompe M (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6:1229-1234.
- Laverriere A, MacNeill C, Mueller C, Poelmann R, Burch J und Evans T (1994) Gata-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 269:23177-23184.
- Lee DH, Kim EY, Park S, Phi JH, Kim SK, Cho BK, Lim J und Wang KC (2006) Reclosure of surgically induced spinal open neural tube defects by the intraamniotic injection of human embryonic stem cells in chick embryos 24 hours after lesion induction. *J Neurosurg* 105:127-133.
- Lee KJ, Ross RS, Rockman HA, Harris AN, O'Brien TX, van Bilsen M, Shubeita HE, Kandolf R, Brem G, Price J, Evans SM, Zhu H, Franz W-M und Chien KR (1992) Myosin light chain-2 luciferase transgenic mice reveal distinct regulatory programs for cardiac and skeletal muscle-specific expression of a single contractile protein gene. *J Biol Chem* 267:15875-15885.
- Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L und Chen T-H (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103:1669-1675.
- Lemaire L und Kessel M (1997) Gastrulation and homeobox genes in chick embryos. *Mechanisms of Development* 67:3-16.
- Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor J und Langer R (2003) Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:12741-12746.

- Lewis J und Trobaugh FJ (1964) Haematopoietic stem cells. *Nature* 204:589-590.
- Lough J, Barron M, Brogley M, Sugi Y, Bolender D und Zhu X (1996) Combined bmp-2 and fgf-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm. *Developmental Biology* 178:198-202.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R und McKay R (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292:1389-1394.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J-i, Umezawa A und Ogawa S (1999) Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103:697-705.
- Martin G (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:7634-7638.
- Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H und Komuro I (2004) Adult cardiac sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 279:11384-11391.
- Maximow A (1906) Über experimentelle erzeugung von knochenmarks-gewebe. *Anat Anz* 28:24-38.
- McGrew M, Xavier-Neto J, Pourquoi O und Rosenthal N (1999) Molecular genetics of skeletal muscle development. In: *Heart development* (Harvey R, Rosenthal N, eds), pp 493-517. San Diego: Academic Press.
- McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71.
- McMaster G und Modak SP (1977) Cellular and biochemical parameters of growth of chick blastoderms during early morphogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* 8:145-152.
- Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MVG, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G und Giacomello A (2004) Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 95:911-921.
- Mezey É, Chandross K, Harta G, Maki R und McKercher S (2000) Turning blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779-1782.
- Modo M, Cash D, Mellodew K, Williams SCR, Fraser SE, Meade TJ, Price J und Hodges H (2002) Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. *NeurImage* 17:803-811.
- Molkentin C, Kalvakolanu D und Markham B (1994) Transcription factor gata-4 regulates cardiac muscle specific expression of the alpha-myosin heavy chain gene. *Molecular and cellular biology* 14:4947-4957.

- Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R und Tertoolen L (2003) Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: Role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107:2733-2740.
- Murga M, Yao L und Tosato G (2004) Derivation of endothelial cells from cd34- umbilical cord blood. *Stem Cells* 22:385-395.
- Nag AC, Lee ML und Sarkar FH (1996) Remodelling of adult cardiac muscle cells in culture: Dynamic process of disorganization and reorganization of myofibrils. *J Muscle Res Cell Motil* 17:313-334.
- Olson EN und Srivastava D (1996) Molecular pathways controlling heart development. *Science* 272:671-676.
- Ordahl C und Le Douarin N (1992) Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* 114:339-353.
- Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM und Gutkowska J (2002) Oxytocin induces differentiation of p19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *PNAS* 99:9550-9555.
- Passier R, Oostwaard DW, Snapper J, Kloots J, Hassink RJ, Kuijk E, Roelen B, de la Riviere AB und Mummery C (2005) Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* 23:772-780.
- Petersen BE, Bowen W, Patrene K, Mars W, Sullivan A, Murase N, Boggs S, Greenberger J und Goff J (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S und Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Pochampally RR, Neville BT, Schwarz EJ, Li MM und Prockop DJ (2004) Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *PNAS* 101:9282-9285.
- Redkar A, Montgomery M und Litvin J (2001) Fate map of early avian cardiac progenitor cells. *Development* 128:2269-2279.
- Rudy-Reil D und Lough J (2004) Avian precardiac endoderm/mesoderm induces cardiac myocyte differentiation in murine embryonic stem cells. *Circ Res* 94:e107-116.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman T, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper D und Sanberg P (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells on vitro. *Exp Neurol* 164:247-256.
- Schultheiss T, Xydas S und Lassar A (1995) Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development* 121:4203-4214.
- Schultheiss T, Burch J und Lassar A (1997) A role of bone morphogenic proteins in the induction of early cardiac morphogenesis. *Genes & Development* 11:451-462.
- Schwanke K, Wunderlich S, Reppel M, Winkler ME, Matzkies M, Groos S, Itskovitz-Eldor J, Simon AR, Hescheler J, Haverich A und Martin U (2006) Generation and

- characterization of functional cardiomyocytes from rhesus monkey embryonic stem cells. *Stem Cells* 24:1423-1432.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR und Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *PNAS* 95:13726-13731.
- Shim WSN, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Seng Tan Y, Sin YK, Lim CH, Chua T und Teh M (2004) Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324:481-488.
- Shiojima I, Komuro I, Oka T, Hiroi Y, Mizuno T, Takimoto E, Monzen K, Aikawa R, Akazawa H, Yamazaki T, Kudoh S und Yazaki Y (1999) Context-dependent transcriptional cooperation mediated by cardiac transcription factors *csx/nkx-2.5* and *gata-4*. *J Biol Chem* 274:8231-8239.
- Sigurjonsson OE, Perreault M-C, Egeland T und Glover JC (2005) Adult human hematopoietic stem cells produce neurons efficiently in the regenerating chicken embryo spinal cord. *PNAS* 102:5227-5232.
- Soria B, Skoudy A und Martin F (2001) From stem cells to beta cells: New strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 44:407-415.
- Spangrude GJ, Smith L, Uchida N, Ikuta K, Heimfeld S, Friedman J und Weissman IL (1991) Mouse hematopoietic stem cells. *Blood* 78.
- Srivastava D und Olson EN (2000) A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 407:221-226.
- Steinbrook R (2005) The cord-blood-bank controversies. *N Engl J Med* 351:2255-2257.
- Stern CD, Fraser S, Keynes RJ und Primmitt D (1988) A cell lineage analysis of segmentation in the chick embryo. *Development* 104 Suppl:231-244.
- Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR und Lee RT (2003) Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 107:1912-1916.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE und Scott EW (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545.
- Theise N, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei P, Morgan G, Teperman L, Henegariu O und Krause DS (2000) Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32:11-16.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS und Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Vassilopoulos G, Wang P-R und Russell DW (2003) Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422:901-904.
- Verma I und Somia N (1997) Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* 389:239-242.
- Wagers AJ und Weissman IL (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116:639-648.

- Waldo K, Kumiski D, Wallis K, Stadt H, Hutson M, Platt D und Kirby M (2001) Conotruncal myocardium arises from secondary heart field. *Development* 128:3179-3188.
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S und Grompe M (2003) Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422:897-901.
- Watanabe M, Kinutani M, Naito M, Ochi O und Takashima Y (1992) Distribution analysis of transferred donor cells in avian blastodermal chimeras. *Development* 114:331-338.
- Wei H, Juhasz O, Li J, Tarasova YS und Boheler KR (2005) Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: Phenotypic and molecular analyses. *J Cell Mol Med* 9:804-817.
- Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB und Miller AD (1989) Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of myod. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5434-5438.
- Welikson RE, Kaestner S, Reinecke H und Hauschka SD (2006) Human umbilical vein endothelial cells fuse with cardiomyocytes but do not activate cardiac gene expression. *Journal of molecular and cellular cardiology* 40:520-528.
- Wiles M und Keller G (1991) Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (es) cells in culture. *Development* 111:259-267.
- Wobus AM, Wallukat G und Hescheler J (1991) Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and ca²⁺ channel blockers. *Differentiation; research in biological diversity* 48:173-182.
- Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P und Schoneich J (1984) Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152.
- Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J und Franz WM (1997) Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29:1525-1539.
- Wu X, Ding S, Ding Q, Gray NS und Schultz PG (2004) Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *J Am Chem Soc* 126:1590-1591.
- Xu C, Police S, Rao N und Carpenter MK (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circulation research* 91:501-508.
- Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H und Chen Y (2004) Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Experimental Biology and Medicine* 229:623-631.
- Ying Q-L, Nichols J, Evans EP und Smith AG (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416:545-548.
- Zhang S, Wang D, Estrov Z, Raj S, Willerson JT und Yeh ETH (2004) Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood cd34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation* 110:3803-3807.

8 Anhang

8.1 Übersicht der *in vitro* Differenzierungsansätze

In der folgenden Tabelle (Tab. 8-1) sind alle *in vitro* Differenzierungsansätze festgehalten. Neben dem Namen der Kultur werden die verwendete Zelllinie, die Anzahl der ausgesäten Zellen, das eingesetzte Medium, der Mediumzusatz, die Größe der Kulturschale, die Dauer der Kultur und die RNA- und Proteinnummern mit zugehöriger Konzentration aufgeführt.

Tab. 8-1 Übersicht der Differenzierungsansätze. K: Kontrollkultur, K-EB: Kontrollkultur für die *Embryoid body*-Kultur, K-M: Kontrollkultur für die Monolayer-Kultur, KF-EB: Kultur mit Mediumzusatz als *Embryoid body*, KF-M: Kultur mit Mediumzusatz als Monolayer, K-V: Kontrolle der Vorversuche, KoK: Kokultur, KM: Kultur mit konditioniertem Medium

Name der Kultur	Zelle	Anzahl der ausgesäten Zellen	Medium	Medium-zusatz	Schale	Dauer	RNA/ Protein-Nr	RNA-Konz. (ng/μl)	Protein-Konz. (mg/ml)
K-EB/1-1	SA 061 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		6-Well	19 Tage			
KF-EB/1-1	SA 061 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	19 Tage			
KF-EB/1-2	SA 061 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	19 Tage			
KF-EB/1-3	SA 061 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	19 Tage			
KF-EB/1-4	SA 061 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	19 Tage			
K-EB/1-2	SA 061 P9	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM		6-Well	19 Tage			
K-M/1-1	SA 061 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		6-Well	25 Tage			
KF-M/1-1	SA 061 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	25 Tage			
KF-M/1-2	SA 061 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	25 Tage			
KF-M/1-3	SA 061 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	25 Tage			
KF-M/1-4	SA 061 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	25 Tage			
K-M/1-2	SA 061 P9	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM		6-Well	25 Tage			
K-EB/2	SA 061 P14	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		6-Well	16 Tage			
KF-EB/2-1	SA 061 P14	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	16 Tage			
KF-EB/2-2	SA 061 P14	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	16 Tage			
KF-EB/2-3	SA 061 P14	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	16 Tage			
KF-EB/2-4	SA 061 P14	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	16 Tage			
K-EB/3	SA 061 P14	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM		6-Well	16 Tage			
KF-EB/3-1	SA 061 P14	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	16 Tage			
KF-EB/3-2	SA 061 P14	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	16 Tage			
KF-EB/3-3	SA 061 P14	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	16 Tage			
KF-EB/3-4	SA 061 P14	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	16 Tage			
K-M/2	SA 061 P14	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		6-Well	22 Tage			
KF-M/2-1	SA 061 P14	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	22 Tage			
KF-M/2-2	SA 061 P14	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	22 Tage			
KF-M/2-3	SA 061 P14	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	22 Tage			
KF-M/2-4	SA 061 P14	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	22 Tage			
K-M/3	SA 061 P14	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM		6-Well	22 Tage			
KF-M/3-1	SA 061 P14	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	22 Tage			
KF-M/3-2	SA 061 P14	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	22 Tage			
KF-M/3-3	SA 061 P14	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	22 Tage			
KF-M/3-4	SA 061 P14	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	22 Tage			
K-EB/4	SA 325 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		6-Well	16 Tage			
KF-EB/4-1	SA 325 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	16 Tage			
KF-EB/4-2	SA 325 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	16 Tage			

KF-EB/4-3	SA 325 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	16 Tage			
KF-EB/4-4	SA 325 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	16 Tage			
K-EB/5	SA 325 P8	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM		6-Well	16 Tage			
KF-EB/5-1	SA 325 P8	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	16 Tage			
KF-EB/5-2	SA 325 P8	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	16 Tage			
KF-EB/5-3	SA 325 P8	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	16 Tage			
KF-EB/5-4	SA 325 P8	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	16 Tage			
K-M/4	SA 325 P8	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		6-Well	22 Tage			
KF-M/4-1	SA 325 P8	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	22 Tage			
KF-M/4-2	SA 325 P8	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	22 Tage			
KF-M/4-3	SA 325 P8	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	22 Tage			
KF-M/4-4	SA 325 P8	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	22 Tage			
K-M/5	SA 325 P8	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM		6-Well	22 Tage			
KF-M/5-1	SA 325 P8	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	22 Tage			
KF-M/5-2	SA 325 P8	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	22 Tage			
KF-M/5-3	SA 325 P8	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	22 Tage			
KF-M/5-4	SA 325 P8	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	22 Tage			
K-EB/6	SA 061 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		6-Well	12 Tage			
KF-EB/6-1	SA 061 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	12 Tage			
KF-EB/6-2	SA 061 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	12 Tage			
KF-EB/6-3	SA 061 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	12 Tage			
KF-EB/6-4	SA 061 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	12 Tage			
K-EB/7	SA 061 P11	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM		6-Well	12 Tage			
KF-EB/7-1	SA 061 P11	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	12 Tage			
KF-EB/7-2	SA 061 P11	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	12 Tage			
KF-EB/7-3	SA 061 P11	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	12 Tage			
KF-EB/7-4	SA 061 P11	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	12 Tage			
K-M/6	SA 061 P11	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		6-Well	18 Tage	17	74	
KF-M/6-1	SA 061 P11	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	18 Tage	18	104	
KF-M/6-2	SA 061 P11	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	18 Tage	19	104	
KF-M/6-3	SA 061 P11	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	18 Tage	20	21	
KF-M/6-4	SA 061 P11	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	18 Tage	21	20	
K-M/7	SA 061 P11	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM		6-Well	18 Tage	22	108	
KF-M/7-1	SA 061 P11	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	18 Tage	23	19	
KF-M/7-2	SA 061 P11	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	18 Tage	24	106	
KF-M/7-3	SA 061 P11	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	18 Tage	25	106	
KF-M/7-4	SA 061 P11	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	18 Tage	26	58	
K-EB/8	SA 4/10 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		6-Well	20 Tage			
KF-EB/8-1	SA 4/10 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	20 Tage			
KF-EB/8-2	SA 4/10 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	20 Tage			
KF-EB/8-3	SA 4/10 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	20 Tage			
KF-EB/8-4	SA 4/10 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	20 Tage			
K-EB/9	SA 4/10 P9	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM		6-Well	20 Tage			
KF-EB/9-1	SA 4/10 P9	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	20 Tage			
KF-EB/9-2	SA 4/10 P9	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	20 Tage			
KF-EB/9-3	SA 4/10 P9	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	20 Tage			
KF-EB/9-4	SA 4/10 P9	1x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	20 Tage			
K-M/8	SA 4/10 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		6-Well	20 Tage			
KF-M/8-1	SA 4/10 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	20 Tage			
KF-M/8-2	SA 4/10 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	20 Tage			
KF-M/8-3	SA 4/10 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	20 Tage			
KF-M/8-4	SA 4/10 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	20 Tage			
K-M/9	SA 4/10 P9	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM		6-Well	20 Tage			
KF-M/9-1	SA 4/10 P9	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Oxytocin	6-Well	20 Tage			
KF-M/9-2	SA 4/10 P9	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Cardiogenol	6-Well	20 Tage			
KF-M/9-3	SA 4/10 P9	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	Retinolsäure	6-Well	20 Tage			
KF-M/9-4	SA 4/10 P9	0,5x10 ⁵	30 % FCS/DMEM	DMSO	6-Well	20 Tage			
K-V/1	SA 4/101 P8	0,5x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		4er CS	5 Tage			
K-V/2	SA 4/101 P8	1x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		4er CS	5 Tage			
KoK/1-1	SA 4/101 P8	0,5x10 ⁴ + 1 tr. Herz	10 % FCS/DMEM		4er CS	5 Tage			

KoK/1-2	SA 4/101 P8	0,5x10 ⁴ + 1 Herz	10 % FCS/DMEM		4er CS	5 Tage		
KoK/1-3	SA 4/101 P8	0,5x10 ⁴ + 2 Herzen	10 % FCS/DMEM		4er CS	5 Tage		
KoK/1-4	SA 4/101 P8	1x10 ⁴ + 1 tr. Herz	10 % FCS/DMEM		4er CS	5 Tage		
KoK/1-5	SA 4/101 P8	1x10 ⁴ + 1 Herz	10 % FCS/DMEM		4er CS	5 Tage		
KoK/1-6	SA 4/101 P8	1x10 ⁴ + 2 Herzen	10 % FCS/DMEM		4er CS	5 Tage		
KoK/1-7	SA 4/101 P8	0,5x10 ⁴ + 1 tr. Gehirn	10 % FCS/DMEM		4er CS	4 Tage		
KoK/1-8	SA 4/101 P8	0,5x10 ⁴ + 1 Gehirn	10 % FCS/DMEM		4er CS	4 Tage		
KoK/1-9	SA 4/101 P8	1x10 ⁴ + 1 tr. Gehirn	10 % FCS/DMEM		4er CS	4 Tage		
KoK/1-10	SA 4/101 P8	1x10 ⁴ + 1 Gehirn	10 % FCS/DMEM		4er CS	4 Tage		
K-V/3	SA 4/101 P8	1x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
K-V/4	SA 4/101 P8	1,5x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
K-V/5	SA 4/101 P8	2x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
K-V/6	SA 4/101 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	15 Tage		
KoK/2-1	SA 4/101 P8	1x10 ⁴ : 1x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-2	SA 4/101 P8	1,5x10 ⁴ : 1,5x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-3	SA 4/101 P8	2x10 ⁴ : 2x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-4	SA 4/101 P8	1x10 ⁴ + 3 Herzen	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-5	SA 4/101 P8	1,5x10 ⁴ + 3 Herzen	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-6	SA 4/101 P8	2x10 ⁴ + 3 Herzen	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-7	SA 4/101 P8	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	15 Tage		
K-V/7	SA 4/101 P8	1x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
K-V/8	SA 4/101 P8	1,5x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
K-V/9	SA 4/101 P8	2x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
K-V/10	SA 325 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	15 Tage		
KoK/2-8	SA 325 P11	1x10 ⁴ : 1x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-9	SA 325 P11	1,5x10 ⁴ : 1,5x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-10	SA 325 P11	2x10 ⁴ : 2x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-11	SA 325 P11	1x10 ⁴ + 3 Herzen	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-12	SA 325 P11	1,5x10 ⁴ + 3 Herzen	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-13	SA 325 P11	2x10 ⁴ + 3 Herzen	10 % FCS/DMEM		6-Well	15 Tage		
KoK/2-14	SA 325 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	15 Tage		
K/1	SA 5-18 P8	1,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	0 Tage	27	1344
K/2-1	Huhn Herzzellen	1,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	0 Tage	28	620
KoK/3-1	SA 5/18 P9	1,5x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Wochen	29	740
KoK/3-2	SA 5/18 P9	0,7x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Wochen	30	1322
KoK/3-3	SA 5/18 P9	0,7x10 ⁵ : 0,36x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Wochen	31	976
KoK/3-4	SA 4/101 P8	1,5x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Wochen		
KoK/3-5	SA 4/101 P8	0,7x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Wochen		
KoK/3-6	SA 4/101 P8	0,7x10 ⁵ : 0,36x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Wochen		
KoK/4-1	SA 5-18 P10	0,5x10 ⁵ : 0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Wochen	32	558
KoK/4-2	SA 5-18 P10	0,5x10 ⁵ : 0,75x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Wochen	33	182
	Human total fetal heart		10 % FCS/DMEM		100 mm	Kontrolle	34	2848
KoK/5-1	SA5-50 P7	0,5x10 ⁵ : 0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	4 Wochen	35	1704
KoK/5-2	SA5-50 P7	0,5x10 ⁵ : 0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	4 Wochen	36	1428
KoK/5-3	SA5-50 P7	0,5x10 ⁵ : 0,75x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	4 Wochen	37	2116
KoK/5-4	SA5-50 P7	0,5x10 ⁵ : 0,75x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	4 Wochen	38	1486
KoK/5-5	SA5-50 P7	0,5x10 ⁵ : 1,0x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	4 Wochen	39	1916
KoK/5-6	SA5-50 P7	0,5x10 ⁵ : 1,0x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	4 Wochen	40	1354
KoK/5-7	SA5-50 P7	0,5x10 ⁵ : 0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	5 Wochen	41	390
KoK/5-8	SA5-50 P7	0,5x10 ⁵ : 0,75x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	5 Wochen	42	400
K/3-1	SA5-50 P7	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	5 Wochen	43	354
K/2-2	Huhn Herzzellen	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	5 Wochen	44	512
KoK/6-1	SA5-50 P7	2x10 ⁵ : 0,7x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	8 Tage	45	396
KoK/6-2	SA5-50 P7	1x10 ⁵ : 1,4x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	8 Tage	46	324
KoK/6-3	SA5-50 P7	2x10 ⁵ : 1,4x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	8 Tage	47	372
KoK/6-4	SA5-50 P7	2x10 ⁵ : 0,7x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	15 Tage	48	288
KoK/6-5	SA5-50 P7	1x10 ⁵ : 1,4x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	15 Tage	49	452
KoK/6-6	SA5-50 P7	2x10 ⁵ : 1,4x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	15 Tage	50	340
K/4-1	SA5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	0 Tage	51	606,8

K/2-3	Huhn Herzzellen	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	0 Tage	52	432,8	
KoK/7-1	SA5-03 P9	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Tage	53	147,6	
KoK/7-2	SA5-03 P9	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Tage	54	107,6	
KoK/7-3	SA5-03 P9	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	6 Tage	55	339,6	
KoK/7-4	SA5-03 P9	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	6 Tage	56	353,2	
KM/1-1	SA5-03 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Tage	57	226,0	
KM/1-2	SA5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	3 Tage	58	352,4	
KoK/7-5	SA5-03 P9	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	9 Tage	59	664,8	
KoK/7-6	SA5-03 P9	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	9 Tage	60	640	
KM/2-1	SA5-03 P9	0,5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	6 Tage	61	155,2	
KM/2-2	SA5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	6 Tage	62	580,4	
KM/2-3	SA5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	29 Tage	63	116	
KoK/7-7	SA5-03 P9	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	32 Tage	64	218	
K/4-2	SA5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	32 Tage	65	92	
K/2-4	Huhn Herzzellen	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	32 Tage	66	488	
KoK/8-1	SA5-03 P9	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	70 Tage	67	17,6	
KoK/8-2	SA5-03 P9	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	70 Tage	67		3,51
KoK/9-1	SA5-03 P11	1x10 ⁴ : 1x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		4er CS	21 Tage			
KoK/9-2	SA5-03 P11	8x10 ³ : 8x10 ³	10 % FCS/DMEM		4er CS	21 Tage			
KoK/9-3	SA5-03 P11	6x10 ³ : 6x10 ³	10 % FCS/DMEM		4er CS	21 Tage			
KoK/9-4	SA5-03 P11	5x10 ³ : 5x10 ³	10 % FCS/DMEM		4er CS	21 Tage			
KoK/9-5	SA5-03 P11	4x10 ³ : 4x10 ³	10 % FCS/DMEM		4er CS	21 Tage			
KoK/9-6	SA5-03 P11	5x10 ³ : 1x10 ⁴	10 % FCS/DMEM		4er CS	21 Tage			
KoK/9-7	SA5-03 P11	4x10 ³ : 8x10 ³	10 % FCS/DMEM		4er CS	21 Tage			
KoK/9-8	SA5-03 P11	3x10 ³ : 6x10 ³	10 % FCS/DMEM		4er CS	21 Tage			
KoK/9-9	SA5-03 P11	2,5x10 ³ : 5x10 ³	10 % FCS/DMEM		4er CS	21 Tage			
KoK/9-10	SA5-03 P11	2x10 ³ : 4x10 ³	10 % FCS/DMEM		4er CS	21 Tage			
KoK/10-1	SA5-03 P10	0,4x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	68	19,2	
KoK/10-2	SA5-03 P10	0,4x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	68		0,16
KoK/10-3	SA5-60 P7	0,7x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	69	82,4	
KoK/10-4	SA5-60 P7	0,7x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	69		2,94
KoK/10-5	SA5-73 P8	0,5x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	70	155	
KoK/10-6	SA5-73 P8	0,5x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	70		1,79
KM/3-1	SA5-03 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	71	19,2	
KM/3-2	SA5-03 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	71		0,68
KM/3-3	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	72	18,6	
KM/3-4	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	72		0,52
KM/3-5	SA5-73 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	73	23,3	
KM/10-6	SA5-73 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	7 Tage	73		1,70
KoK/10-7	SA5-03 P10	0,4x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	74	16,0	
KoK/10-8	SA5-03 P10	0,4x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	74		2,99
KoK/10-9	SA5-60 P7	0,7x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	75	44,0	
KoK/10-10	SA5-60 P7	0,7x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	75		1,23
KoK/10-11	SA5-73 P8	0,5x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	76	108,0	
KoK/10-12	SA5-73 P8	0,5x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	76		0,79
KoK/10-13	SA5-60 P7	0,7x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage	77	621,6	
KoK/10-14	SA5-60 P7	0,7x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage	77		
KoK/10-15	SA5-60 P7	0,7x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage			
KoK/10-16	SA5-73 P8	0,5x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage	78	627,2	
KoK/10-17	SA5-73 P8	0,5x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage	78		
KoK/10-18	SA5-73 P8	0,5x10 ⁵ : 0,6x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage			
KM/4-1	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	79	174,4	
KM/4-2	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	79		
KM/4-3	SA5-73 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	80	288,8	
KM/4-4	SA5-73 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	80		
KM/4-5	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	81	115,2	
KM/4-6	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	81		2,51
KM/4-7	SA5-73 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	82	178,4	
KM/4-8	SA5-73 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	82		3,27
K/5-1	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage	83	51,2	

K/5-2	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage	83		
K/5-3	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage			
K/6-1	SA5-73 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage	84	124,8	
K/6-2	SA5-73 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage	84		
K/6-3	SA5-73 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	28 Tage			
KM/5-1	SA5-03 P8	5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	85	601,6	
KM/5-2	SA5-03 P8	5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	85		
KM/5-3	SA5-03 P8	5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage			
KM/5-4	SA5-50 P8	5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	86	261,1	
KM/5-5	SA5-50 P8	5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	86		
KM/5-6	SA5-50 P8	5x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage			
K/4-3	SA5-03 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	87	99,2	
K/4-4	SA5-03 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	87		
K/4-5	SA5-03 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage			
K/3-2	SA5-50 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	88	118,4	
K/3-3	SA5-50 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage	88		
K/3-4	SA5-50 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	14 Tage			
KM/6-1	SA 5-03 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	89	116	
KM/6-2	SA 5-03 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	89		20,68
KM/6-3	SA 5-03 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-4	SA 5-03 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-5	SA 5-03 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-6	SA 5-50 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	90	103	
KM/6-7	SA 5-50 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	90		19,70
KM/6-8	SA 5-50 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-9	SA 5-50 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-10	SA 5-50 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-11	SA 5-60 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	91	47	
KM/6-12	SA 5-60 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	91		15,04
KM/6-13	SA 5-60 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-14	SA 5-60 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-15	SA 5-60 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-16	SA 5-73 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	92	99	
KM/6-17	SA 5-73 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	92		7,06
KM/6-18	SA 5-73 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-19	SA 5-73 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/6-20	SA 5-73 P11	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-1	SA 5-03 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	93	120	
KoK/11-2	SA 5-03 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	93		15,75
KoK/11-3	SA 5-03 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-4	SA 5-03 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-5	SA 5-03 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-6	SA 5-50 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	94	12	
KoK/11-7	SA 5-50 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	94		4,10
KoK/11-8	SA 5-50 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-9	SA 5-50 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-10	SA 5-50 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-11	SA 5-60 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	95	62	
KoK/11-12	SA 5-60 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	95		3,85
KoK/11-13	SA 5-60 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-14	SA 5-60 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-15	SA 5-60 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-16	SA 5-73 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	96	180	
KoK/11-17	SA 5-73 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage	96		23,16
KoK/11-18	SA 5-73 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-19	SA 5-73 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KoK/11-20	SA 5-73 P11	1x10 ⁵ : 1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/7-1	SA 5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/7-2	SA 5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
KM/7-3	SA 5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			

KF-M/11-4	SA 5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-5	SA 5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-6	SA5-50 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-7	SA5-50 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-8	SA5-50 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-9	SA5-50 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-10	SA5-50 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-11	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-12	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-13	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-14	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-15	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-16	SA5-73 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-17	SA5-73 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-18	SA5-73 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-19	SA5-73 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
KF-M/11-20	SA5-73 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM	bFGF	100 mm	21 Tage			
K/4-6	SA5-03 P9	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
K/3-5	SA5-50 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
K/5-4	SA5-60 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			
K6-4	SA5-73 P8	1x10 ⁵	10 % FCS/DMEM		100 mm	21 Tage			

8.2 Material und Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Analysenwaage	440-LA	KERN
Blotting Kammer	MBT-Multiblot-Transfergerät	LABOR-BRAND
CO ₂ -Brutschrank	HERAcell	Kendro
FACS	FC 500	Beckman Coulter
Gefriermikrotom	CM 1850	Leica
Gel-Dokumentations-System	Transilluminator, UVT-28M, EASY 429K und P91 Drucker	Herolab und Mitsubishi
Gelkammer	PerfectBlue Gelsystem Maxi	Peqlab
Heizblock	Thermo mixer comfort	Eppendorf
Mikroskop für Injektionen	Stemi 2000 C	Zeiss
Mikroskop für Objektträger	Axioplan2 imaging	Zeiss
Mikroskop für Zellkulturplatten	Leica DM IRB	Leica
Mikroskopkamera	AxioCam HRc	Zeiss
PCR-Maschine	Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems
PCR-Maschine	ABI PRISM 7700	Applied Biosystems
Power-Supply	Bio-Rad Power Pac 3000	Bio-Rad
Sterilbank	KR Biowizard Silver Line	Kojair
UV-Transilluminator	UVT-28 M	Herolab
UV/VIS Spektrophotometer	GeneQuant pro	Biochrom
Wasserbad	GFL 1002 Wasserbad	GFL
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf
Zentrifuge	5415 R	Eppendorf

Bezeichnung Chemikalie	Firma
100bp DNA-Leiter peqGOLD	Peqlab
1kb DNA Ladder	Invitrogen
2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt	BioChemika
2-Propanol	Aldrich
2-Propanol-Rotipuran	Roth
Aceton p.a.	Merck
Acrylamid/bis	Biorad
Agarose Mol Biol Grade	Eurogentec
Albumin Fraktion V	Roth
Allprep RNA/Protein Kit (50)	Qiagen
Ampicillin	Sigma
APS	Sigma
Aqua ad iniectabilia	Braun
Äthanol vergällt 80%	Aposchein
BD Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences
Bromphenolblau	Roth
BsrG I	New England Biolabs
Cardiogenol	Calbiochem
Citifluor Ltd AF1	Citifluor
Connexin 43	BD Transduction Lab
IgG (H+L)-Cy3 konjugiert Esel anti-Maus	Dianova
IgG (H+L)-Cy3 konjugiert Esel anti-Kaninchen	Dianova
IgG (H+L)-Cy3 konjugiert Esel anti-Ziege	Dianova
IgG (1+2a+2b+3), Fc-Fragment-Cy3 konjugiert Esel anti-Maus	Dianova
IgG (H+L)-Cy3 konjugiert Esel anti-Maus	Dianova
IgG (H+L)-Cy3 konjugiert Esel anti-Ziege	Dianova
IgG-Peroxidase konjugiert Rind anti-Kaninchen	Santa Cruz
IgG- Peroxidase konjugiert Rind anti-Maus	Santa Cruz
IgG (H+L)- Peroxidase konjugiert Ziege anti-Maus	Chemicon
IgG- Peroxidase konjugiert Rind anti-Ziege	Santa Cruz
IPEGAL	Sigma
DAB substrate Kit	Vector
DABCO 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]oktan	Sigma
Dapi	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM-LG without Glutamine)	Cambrex
ECL Kit	GE Amersham
Eco R I	Invitrogen
EcoR V	Invitrogen
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
EGTA: Ethylen-glycol-bis(2-aminoethylether)-NNNN-tetraacetic acid	Sigma
Ethidiumbromid	Merck
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Entellan neu	Merck
Envision + kit (HRP, mouse, DAB)	DAKO
Eosin G Certistain	Merck
Ethanol 96%	Roth
Ethanol p.a.	Merck
FCS	Cambrex
Fibroblast growth factor from bovine	Sigma
Fugene 6	Roche
Gelatine	StemCell Technologies

Geneticin (G418)	Invitrogen
Glucose	Sigma
Glutaraldehyd Lösung 25%	Sigma
Glycerin Rotipuran	Roth
Goat Anti Mouse IgG Peroxidase conjugated	Chemicon
Goat Anti Mouse IgG, F(ab)2-Fragment, Biotin conj.	Dianova
Hämalaun Lsg sauer nach Mayer	Roth
Hind III	Invitrogen
Human MSC Nucleofector Kit	Amaxa
Incidur Spray	Aposchein
IST + 1 medium supplement	Sigma
JetPEI transfection reagent	Biomol
Kaisers glycerol gelatine	Merck
Kernechtrot Certistain	Merck
Kpn I	New England Biolabs
L-ascorbic acid	Sigma
L-Glutamin	Cambrex
LB-Medium	Invitrogen
MAB Anti-alpha-Actinin	Sigma
MAB beta Galactosidase	Promega
MAB Maus anti-Caspase-3	Dianova
MAB Maus anti-Collagen type II	Chemicon
MAB Maus anti-human mitochondria	Chemicon
MAB Maus anti-human myosin	Axxora
MAB Maus anti-human nuclei	Chemicon
MAB Troponin I cardiac (human)	Santa Cruz
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma
MCDB-201	Sigma
MEM non essential AS (100 x)	Invitrogen
Methanol p.a.	Merck
Methylgrün Certistain	Merck
Mitomycin C	Sigma
Myosin, sarcomere supernatant	DSHB
Natriumchlorid	Sigma
Natriumhydrogenphosphat	Sigma
Natriumhydroxid	Sigma
Natriumdeoxycholat	Sigma
SDS: Natriumdodecylsulfat	Sigma
Nonidet P 40	Roche
Not I	Invitrogen
Omniscript RT kit	Qiagen
One Shot Top 10 competent cells	Invitrogen
PCR Nucleotide Mix	Roche
Penicillin/Streptomycin, Mixture	Cambrex
Phosphate buffered saline	Serag/Wiessner
PAB Kaninchen anti-human ANP	Chemicon
PAB Kaninchen anti-human Nkx2.5	Santa Cruz
PAB Ziege anti-human ANP	Santa Cruz
PAB Ziege anti-human MLC2a	Santa Cruz
PAB Ziege anti-human MLC2v	Santa Cruz
PAB Ziege anti-human Troponin I	Santa Cruz
PAB Ziege anti-human Troponin T	Santa Cruz
Potassiumhexacyanoferrat (II)	Sigma
Potassiumhexacyanoferrat (III)	Sigma
Primer	Thermo
Protease Inhibitor Cocktail	Roche

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
React 2 Buffer	Invitrogen
Retinolsäure	Sigma
Rnase-free Dnase Set (50)	Qiagen
RNAsin	Promega
RNAsin	Promega
Rneasy Mini Kit	Qiagen
Roticlear	Roth
Roti-Histofix	Roth
Sca I	Invitrogen
Selectagar	Gibco
Sucrose	Sigma
Syntocinon, 10 IE/ Amp	Novartis
T4-DNA-Ligase	Invitrogen
Taq DNA Polymerase (1000U)	Qiagen
TEMED	Biorad
Tissue Tek OCT Medium	Vogel
Tris/Base	Roth
Tris.HCl	Sigma
Triton X-100	Aldrich
Trizma Base	Sigma
Trypanblau solution 0,4%	Sigma
Trypsin 1:250 (10x) Bio Whittaker	Cambrex
Trypsin/ EDTA	Invitrogen
Vectastain Elite ABC Kit (Standard)	Vector
Wasserstoffperoxid 30% p.a.	Roth
X-gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside	Sigma
Xylenyanol	Roth

8.3 Herstellerliste

Firma	Firmensitz
Advanced ImmunoChemical	Long Beach, USA
Amara	Köln
Applied Biosystems	Darmstadt
Axxora	Grünberg
BD Biosciences	Heidelberg
Beckman Coulter	Krefeld
Biochemika	Steinheim
Biochrom	Berlin
Biomol	Hamburg
Bio-Rad Laboratories GmbH Life Science	München
Calbiochem	Läufelfingen, Schweiz
Cambrex	Verviers, Belgien
Chemicon	Temecula, USA
Citifluor	London, UK
Costar/Corning	Wilmington, USA
DAKO	Hamburg

Dianova	Hamburg
DSHB	Iowa City, USA
Eurogentec	Seraing, Belgien
Eppendorf	Hamburg
FST Fine Science Tools	Heidelberg
GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel
Greiner	Frickenhausen
Harvard Apparatus	March-Hugstetten
Herolab	Wiesloch
Invitrogen	Karlsruhe
KERN	Balingen-Frommern
Kendro Laboratory Products GmbH	Hanau
LABOR-BRAND	Gießen
Leica	Solms
Menzel-Gläser	Braunschweig
Merck	Darmstadt
Nalgene	Rochester, USA
Neolab	Heidelberg
New England Biolabs	Frankfurt am Main
Novartis	Nürnberg
Nunc	Roskilde, Dänemark
Peqlab	Erlangen
Promega	Mannheim
Roche	Mannheim
Roth	Karlsruhe
Qiagen	Hilden
R&D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt
Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
Sartorius	Göttingen
Serag-Wiessner	Naila
Sigma-Aldrich	Steinheim
Stem Cell Technologies	St. Katharinen
Synaptic Systems	Göttingen
Thermo LifeSciences	Egelsbach
Vogel	Giessen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen recht herzlich bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Wernet für das interessante Thema bedanken. Herr Prof. Dr. Wernet hat es mir ermöglicht, meine Arbeit selbständig zu planen und mich in konstruktiven Gesprächen immer wieder auf neue Ideen gebracht.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Peter Proksch aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Dr. Robert Zweigerdt danke ich für die Anregungen bei der Planung von Experimenten, ob aus dem Büro nebenan oder aus der Ferne. Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther, Herrn Prof. Dr. Bodo Christ und Herrn PD Dr. Ruijin Huang für die Einführung in die große Welt der Hühnerembryonen. Prof. Dr. Gesine Kögler danke ich für die Bereitstellung der Zellen und Dr. Ingo Trompeter für die eine oder andere Erleuchtung beim Kampf mit den Plasmiden.

Weiterhin danke ich Dr. Thorsten Trapp, PD Dr. Rüdiger Sorg und PD Dr. Markus Uhrberg für die interessanten wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Gespräche, die gesparten Kalorien und die Versorgung mit Espresso und Kaffee.

Vielen Dank der NWG Uhrberg für die „Adoption“ und die damit verbundenen schönen Bräuche wie das Nikolaus-Waffel-Glühwein-Event, die Nachmittage und Abende auf der größten Kirmes am Rhein und die große Hilfe in diversen Materialnotstandssituationen, an dieser Stelle geht ein besonderer Dank an Julia Christ.

Es war immer wieder schön, mit Julia Beckmann fachliche und weniger fachliche Gespräche zu führen. Bei Silke Dickel, Martina Weizmann und Gernot Brauers bedanke ich mich für die Unterstützung per Mail und vor Ort und die lustigen Doppelkopfabende, die immer wieder für viel Spaß und neue Erkenntnisse in der Cocktailherstellung gesorgt haben. Frank Krause und Tim Schnarr danke ich für ein immer offenes Ohr, die zwischenzeitliche Ablenkung und Entspannung. Ein herzlicher Dank geht an Jens Krane und Georgia Makridou dafür, dass sie immer für mich da waren und sind.

Anja Knaupp, Dr. Sandra Sensken, Sandra Weinhold, Christophe Klumb, Sabine Krause, Kathrin Schönberg und Martina Sribar... alleine dafür, dass ich euch kennen gelernt habe, hat es sich gelohnt, diese Promotion gemacht zu haben! Ihr seid die besten Freunde, die man sich wünschen kann und es war immer wieder schön, mit euch Freud und Leid zu teilen. Vielen Dank für die zahlreichen Gespräche, ob im Labor, im Scottis, in der Altstadt oder fast atemlos am Unterbacher See. Es ist schön zu wissen, dass es Menschen gibt, die genauso verrückt sind wie ich. Nicht vergessen: erster Mi im Monat 3001 oder jeden Mi Sub oder Salsa, Mo-Fr Joggen am U-See, Grillen bei Martina, „Jin, zieh die Brille an!“, „Es gibt Dinge, die muss ich nicht verstehen!“, „Alles wird gut!“, „Spaß ist, was wir draus machen!“, „Er kann es regnen lassen.“, „Ist Realitätsverlust ansteckend?“, „Sind noch Vitamine im Kühlschrank?“ und lange Nächte in LA.

Ein recht herzlicher Dank geht an die Apotheke im Hauptbahnhof in Düsseldorf, insbesondere an Herrn Garrecht, Herrn Dr. Kersting und Frau Wrede, die mich noch vor Anfang meines Studiums familiär in die Apotheke aufgenommen haben und mich bis heute begleitet haben. Vielen Dank für die Unterstützung, die aufmunternden Worte und die zahlreichen Perspektiven, die mir eröffnet wurden.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung, den Rückhalt, für die günstige „Einkaufsmöglichkeit“, wenn der Kühlschrank mal wieder gähnend leer war und vor allem für den sonntäglichen Ruhepol. Durch diese Unterstützung konnte ich immer wieder genügend Energie für neue Ideen und Experimente sammeln.

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 29.05.2007

(Jin Mann)

