

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Zielsetzung

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es zum einen, eine praktikable Methode zu finden, die ES Zellen D3 über einen langen Zeitraum zu kultivieren bei Erhalt ihrer Fähigkeit, unter definierten Kulturbedingungen zu Herzmuskelzellen zu differenzieren.

Zum anderen sollte eine Methode erarbeitet werden, die eine Beurteilung der Stammzellpopulation (während ihrer routinemäßigen Kultivierung) auf ihre Eignung für die Durchführung eines EST erlaubt. Dafür sollten die in der Literatur beschriebenen Stammzell-Marker SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1) und Alkalische Phosphatase-Aktivität auf ihre Eignung zur Charakterisierung des undifferenzierten Zustandes dieser Zellen untersucht werden.

Die Bearbeitung dieser Hauptziele erforderte einige Voruntersuchungen. Es wurden zunächst mögliche Einflussfaktoren auf das Wachstum der ES Zellen und ihre Differenzierung zu Herzmuskelzellen untersucht. Diese Untersuchungen umfassten v.a. die Zusammensetzung des Kulturmediums (Serumkonzentration, Hitzeinaktivierung des Serums) und zielten auf eine Optimierung der Kulturbedingungen für die Stammzellen im Rahmen ihrer Routine-Kultivierung und ihrer Differenzierung zu Herzmuskelzellen bei der Durchführung des EST ab. In weiteren Voruntersuchungen wurden Protokolle für den routinemäßigen Nachweis des undifferenzierten Zustands der Zellen anhand der SSEA-1-Expression der ES Zellen und ihrer Alkalische Phosphatase-Aktivität etabliert.

In der Hauptstudie wurden die embryonalen Stammzellen über den Kulturzeitraum von 50 Passagen in mehreren Ansätzen mit verschiedenen Methoden zur Hemmung der Differenzierung kultiviert (auf *Feeder Layer* und/oder Supplementierung des Kulturmediums mit chemischen Substanzen mit differenzierungshemmender Aktivität). Parallel erfolgten durchflusszytometrische und immunzytochemische bzw. zytochemische Untersuchungen dieser Zellen auf die Expression von SSEA-1 und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP). Außerdem wurde die AP-Aktivität der Zellen in photometrisch ausgewerteten Enzym-Aktivitätstests überprüft. Die Ergebnisse wurden korreliert mit der Fähigkeit dieser Zellen, unter definierten Bedingungen zu Herzmuskelzellen zu differenzieren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sollten einen Hinweis auf die Eignung der verschiedenen Methoden der Differenzierungshemmung im Hinblick auf die Verwendung der Stammzelllinie D3 für die Durchführung des EST geben. Dabei sollte z.B. untersucht werden, ob die verschiedenen Methoden der Differenzierungshemmung einen Einfluss haben auf die Fähigkeit der Zellen, zu Kardiomyozyten zu differenzieren oder auf die Empfindlichkeit der Stammzellen gegenüber Testsubstanzen.

Die Überlegungen zu der hier vorgestellten Arbeit lassen sich in folgenden Fragen zusammenfassen:

- Ist die Kultivierung von pluripotenten ES Zellen der Zelllinie D3 mit LIF oder anderen Methoden zur Hemmung der Differenzierung über einen Zeitraum von 50 Passagen möglich bei erhaltener Fähigkeit dieser Zellen, zu Kardiomyozyten zu differenzieren?
- Haben die Kultivierungsmethoden einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Testsubstanzen und damit auf die Eignung der Zellen für den EST?
- Welche Methode (immunzytochemische, zytochemische, durchflusszytometrische, photometrische Auswertung) ist am besten geeignet, um die Marker SSEA-1 und AP-Aktivität routinemäßig nachzuweisen?
- Gibt es eine Korrelation zwischen dem Anteil der SSEA-1-positiven Zellen bzw. der AP-Aktivität der Zellen und ihrer Fähigkeit, im Differenzierungstest des EST zu Kardiomyozyten zu differenzieren?

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Modell/Art.-Nr.
CO ₂ -Inkubator	Heraeus	BB6220 Cu/ 51007412
Durchflusszytometer	Becton Dickinson	FACScan
Einfrierbox (Cryo 1°C Freezing Container)	Nalgene	5100-0001
Photomikroskop	Zeiss	Axiophot
Mehrkanalpipette	Costar	6616
Neubauer-Zählkammer	VWR	631-1130
Pipetten	Eppendorf	Research
Pipettierhilfe	Eppendorf	Easypet
Plattenphotometer	Dynex	Opsys MR/ IMRA 1478
Schüttler für Mikrotiterplatten	Dyatech	Mikrotiter Shaker
Umkehrmikroskop	Zeiss	4730 12-9902
Vortexer	IKA Werk	340174
Wasserbad	GEL	1038
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge
Zentrifuge	Heraeus	Minifuge RF

2.2.2 Glas- und Plastikware

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.
24-Well-Zellkulturplatten	TPP	92424
96-Well-Zellkulturplatten	TPP	92696
Bottle Top Filter (250 ml)	TPP	99250
Culture Slides	Falcon	354104
Deckgläser (24x50 No1)	Marienfeld	8590

FACS-Röhrchen (Polystyrol-Reagenzglas)	Falcon	2052
Kryoröhrchen	TPP	P89020
Bakteriologische Petrischalen (6 cm)	Greiner	628102
Bakteriologische Petrischalen (10 cm)	Greiner	633102
Pipettenspitzen 0,5-10 µl	Eppendorf	30.000.854
Pipettenspitzen 1-200 µl	Corning Inc. Costar	4866
Pipettenspitzen 1ml	Sarstedt	70.762
Reaktionsgefäße (Safe-LockTubes)	Eppendorf	0030 120.086
Serolog. Pipetten, Falcon, 10 ml	BD Labware	35 6551
Serolog. Pipetten, Falcon, 25 ml	BD Labware	35 6525
Serolog. Pipetten, Falcon, 5 ml	BD Labware	35 6543
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Schleicher&Schuell	10462200
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	TPP	90260
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	TPP	90760
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Nunc	366079
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt	62.547.254

2.2.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.
5-Fluorouracil	Sigma	F6627
Aceton	J.T. Baker	8002
Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP)	Sigma	A-3469
Liquid Substrate for ELISA		
Anti-SSEA-1	Dev.Studies Hybridoma Bank	MC-480/ ppIg
Bovines Fibronectin	Biochrom	L7127
Bovines Serumalbumin	PAA	K41012-10
Cellwash	Becton Dickinson	349524
DMEM	Biochrom	F0435
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck	1029130500

Ethanol	J.T. Baker	8228
FBS	Biochrom	S0115
Fluorescein Isothiocyanate (FITC)	Sigma	F1628
Fluorescein (FITC)-conjugated	Dianova	115-095-068
AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM		
Gelatine	Fluka	48720
Hank's Balanced Salt Solution	Biochrom	L2035
Iscove's Medium	Biochrom	F0465
Isopropanol	J.T.Baker	8119
L-Glutamin	Biochrom	K0283
LIF-ESGRO®	Chemicon	ESG1107
Mercaptoethanol	Sigma	M-7522
Methanol	J.T. Baker	8047
Mitomycin C	Serva	29805
MTT	Sigma	M 5655
NaOH	Merck	106.482
Nichtessentielle Aminosäuren	Biochrom	K0293
Oncostatin M (human)	Sigma	O 9635
PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom	L1815
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom	L1825
Penicillin G	Sigma	PEN-NA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	A2213
p-Nitrophenol-Standard	Sigma	N7760
Natriumazid	Sigma	S-2002
Tris	Merck	8382
Triton X-100	Sigma	93443
Trypsin/ EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %)	Biochrom	L2143
VECTASHIELD® Mounting Medium	Vector	H-1000
Vector® Red Alkaline Phosphatase	Vector	SK-5100
Substrate Kit		

2.2.4 Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller	Artikel-Nr.
ES Zellen (ES-D3)	ATCC	CRL-1934
STO Fibroblasten (STO)	ATCC	CRL-1503

2.2.5 Rezepturen selbst hergestellter Lösungen

Gelatine

1 % Gelatine
gelöst in Aqua dd.
autoklaviert (121° C, 30 min, 100 kPa)
Lagerung bei 4° C

0,1 % Gelatine
gelöst in Aqua dd.
autoklaviert (121° C, 30 min, 100 kPa)
Lagerung bei 4° C

TrisHCl (100 mM)

6 g Tris gelöst in 450 ml Aqua dd.
mit 1 M HCl auf pH 8,35 eingestellt
aufgefüllt mit Aqua dd. auf 500 ml
Lagerung bei 4° C

HF (Hank's Balanced Salt Solution + 2 % FBS)

2 % FBS (hitzeinaktiviert)
in HBSS
Lagerung bei 4° C

MTT-Lösung (5 mg/ml)

5 mg MTT
gelöst in 1 ml PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
Lagerung bei -20° C

MTT-Desorb-Lösung

480 ml Isopropanol
20 ml HCl (1 N)
Lagerung bei Raumtemperatur

Fibronectin (0,02 mg/ml)

1 mg Bovines Fibronectin
gelöst in 50 ml sterilem Aqua dd.
Lagerung bei -20° C

PBS Azid (0,05 %)

0,05 % Natriumazid
gelöst in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Lagerung bei 4° C

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Zelllinien

Nach Erhalt der embryonalen Stammzellen D3 wurden diese mit dem nachfolgend beschriebenen Standard-Kulturmedium unter Zusatz von 1000 U/ml LIF (Leukemia Inhibitory Factor) vermehrt. Nach insgesamt neun Passagen wurden sie bis zu ihrer Verwendung in Portionen von jeweils 5×10^6 Zellen pro Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.1.2 Kulturmedien für die Kultivierung von ES Zellen und STO-Fibroblasten

Für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES Zellen) und STO-Fibroblasten wurden die nachfolgenden Kulturmedien verwendet. Es handelt sich dabei jeweils um Medien für die routinemäßige Kultivierung in Zellkulturflaschen, um Einfriermedien für die Lagerung in flüssigem Stickstoff sowie um Testmedien für die Proliferations- und Differenzierungstests. Als Ergebnis von in Zusammenarbeit mit der Biochrom AG durchgeführten Voruntersuchungen wurden abweichend vom Protokoll des Embryonic Stem Cell Test (Spielmann and Scholz, 1999) die in der hier vorgelegte Arbeit verwendeten Kulturmedien für ES Zellen mit dem Basismedium Iscove anstelle des Basismediums DMEM hergestellt .

Standard-Kulturmedium für embryonale Stammzellen

20	% FBS
2	mM Glutamin
50	U/ml Penicillin
50	µg/ml Streptomycin
1	% NAA
0,1	mM β-Mercaptoethanol
	Iscove

Für die routinemäßige Kultivierung der embryonalen Stammzellen in den Zellkulturflaschen wurde dem Standard-Kulturmedium 1000 U/ml LIF zur Hemmung der Differenzierung zugesetzt.

Standard-Kulturmedium für STO-Fibroblasten

10 % FBS
4 mM Glutamin
50 U/ml Penicillin
50 µg/ml Streptomycin
DMEM

Einfriermedium für ES Zellen

40 % FBS
2 mM Glutamin
50 U/ml Penicillin
50 µg/ml Streptomycin
1 % NAA
0,1 mM β-Mercaptoethanol
10 % DMSO
Iscove

Einfriermedium für STO-Fibroblasten

20 % FBS
4 mM Glutamin
50 U/ml Penicillin
50 µg/ml Streptomycin
10 % DMSO
DMEM

Testmedium für Proliferations- und Differenzierungstests

15	%	FBS
2	mM	Glutamin
50	U/ml	Penicillin
50	µg/ml	Streptomycin
1	%	NAA
0,1	mM	β-Mercaptoethanol
		Iscove

2.3.1.3 Routinevorgänge in der Zellkultur

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei der Kultivierung der embryonalen Stammzellen bzw. der als *Feeder Layer* verwendeten STO-Fibroblasten durchgeführt.

Einige dieser Kulturmethode wurden in Vorversuchen auf ihre Praktikabilität und Eignung für ES Zellen untersucht. Die hier vorgestellten Protokolle beruhen demnach auf den Erkenntnissen, die aus den Vorversuchen zur Optimierung der Kulturbedingungen gewonnen wurden (s. Kapitel 3.1).

Hitzeinaktivierung des Fetalen Bovinen Serums (FBS)

Das FBS ist ein Bestandteil des Kulturmediums. Für die embryonalen Stammzellen wurde es für 30 min bei 56° C im Wasserbad inaktiviert und anschließend sterilfiltriert. Bis zur Verwendung wurde es portioniert bei -20° C gelagert.

Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Gelatine

Die Anhaftung und das Wachstum von Zellen kann durch die Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Adhäsionsfaktoren beeinflusst werden. Für einige der in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Arbeitsschritte wurden die Zellkulturgefäße mit Gelatine beschichtet. Die Beschichtung der Zellkulturflaschen erfolgte dabei mit 0,1 %iger Gelatine-Lösung über 3 h im Brutschrank. Die für die Durchführung der Proliferationstests verwendeten 96-Well-Platten wurden mit 1 %iger Gelatinelösung (30µl/Well) beschichtet und für mindestens 30

min im Brutschrank inkubiert. Vor der Verwendung der beschichteten Zellkulturgefäße wurden diese mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen.

Brutschrank

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO_2 -Inkubator (Heraeus) bei 37°C mit 7,5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Zentrifugieren

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen in der Minifuge (Heraeus, Rotor Cat. No. 2150) mit 900 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, im Verhältnis 1:10 mit dem entsprechenden Standard-Kulturmedium verdünnt und zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml des Standard-Kulturmediums (für ES Zellen mit 1000 U/ml LIF) resuspendiert und in eine mit Gelatine beschichtete 25-cm^2 -Zellkulturflasche überführt.

Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden mit dem entsprechenden Einfriermedium Zellsuspensionen mit Zellkonzentrationen von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Nach Einbringen von jeweils 1 ml Zellsuspension pro Kryoröhrchen wurden diese in Einfrierboxen zunächst für 24 h bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Subkultivierungen der Zellen

Die Zellen wurden jeden zweiten bis dritten Tag subkultiviert (passagiert), um durch Reduktion der Zellzahl die Zelldichte in der Zellkulturflasche innerhalb des tolerierten Schwankungsbereichs zu halten.

Dafür wurde das Kulturmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 5 ml PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Trypsin von dem Boden der Zellkulturflasche bei Raumtemperatur gelöst.

Nach Zugabe von 9 ml Routine-Kulturmedium zum Stoppen der Trypsinreaktion wurden die Zellen vereinzelt durch mehrmaliges Ansaugen und Ausblasen mit der Pipette. Etwa $\frac{1}{4}$ der Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Kulturmediumsüberstand abgegossen und die Zellen resuspendiert in 10 ml des entsprechenden Routine-Kulturmediums (für ES Zellen mit 1000 U/ml LIF). Die Zellen wurden anschließend in eine neue 25-cm²-Zellkulturflasche eingebracht und im Brutschrank kultiviert. Die Passagezahl der Zellen wurde mit jeder Subkultivierung um 1 erhöht.

Inaktivierung der STO-Fibroblasten

Vor der Kultivierung der Stammzellen auf den STO-Fibroblasten als *Feeder Layer* müssen die Fibroblasten inaktiviert werden, d.h. ihre Mitose-Aktivität muss irreversibel und vollständig gehemmt werden. Die in den hier vorgestellten Untersuchungen verwendeten STO-Fibroblasten wurden durch Inkubation mit Mitomycin C inaktiviert.

Vorbereitend wurden dazu die STO-Fibroblasten in 75-cm²-Zellkulturflaschen ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Inaktivierung semikonfluent vorlagen. Für die Inaktivierung wurde das Mitomycin C mit Routine-Kulturmedium für STO-Fibroblasten auf 10 µg/ml eingestellt und anschließend sterilfiltriert (Tessarollo, 2001). Von den STO-Fibroblasten wurde das Kulturmedium entfernt und in jede der Zellkulturflaschen 18 ml des Mitomycin C-Mediums (MC-Medium) pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 4 h im Brutschrank.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das MC-Medium von den STO-Fibroblasten abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit je 15 ml PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ und einmal mit 15 ml PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und die Zellzahl der Zellsuspension unter Verwendung einer Neubauer-Kammer bestimmt. Von den inaktivierten Zellen wurden nach dem Zentrifugieren und Resuspendieren in Kulturmedium für STO-Fibroblasten je $1,5 \times 10^6$ Zellen in mit Gelatine beschichtete 25-cm²-Zellkulturflaschen überführt.

Trennung der ES Zellen von den STO-Fibroblasten

Die direkte Co-Kultur von ES Zellen auf STO-Fibroblasten erfordert bei dem Passagieren der Stammzellen zusätzliche Arbeitsschritte zur Trennung der beiden Zelllinien. Zur Separation

wurde in der vorgelegten Arbeit die durch die Zellgröße bedingte höhere Senkungsgeschwindigkeit der STO-Fibroblasten genutzt.

In Anlehnung an die von Oyamada (Oyamada et al., 1996) beschriebene Methode zur Trennung der Stammzellen von den STO-Fibroblasten wurde die Zellsuspension nach dem Stoppen der Trypsinreaktion mit Kulturmedium und Vereinzeln der Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und dieses in einen Zentrifugenröhrchenständer gestellt. Nach 5 min wurden vorsichtig 7,5 ml des Überstandes abgesaugt und in eine mit Gelatine beschichtete 25-cm²-Zellkulturflasche eingebracht. Nach 20-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand aus der Zellkulturflasche vorsichtig abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Aus diesem Zentrifugenröhrchen wurde nun die weitgehend von STO-Fibroblasten aufgereinigte Stammzellsuspension für die jeweiligen Untersuchungen entnommen.

2.3.2 Proliferations- und Differenzierungstests

Die Untersuchungen zum Proliferations- und Differenzierungsverhalten der embryonalen Stammzellen wurden zunächst nach dem von Spielmann 1999 veröffentlichten Protokoll des Embryonic Stem Cell Test (EST) durchgeführt (Spielmann and Scholz, 1999). Nach den Voruntersuchungen zur Verbesserung der Kulturbedingungen für die ES Zellen wurde das EST-Protokoll teilweise entsprechend den Ergebnissen (s. Kapitel 3.1) modifiziert.

Alle Proliferations- und Differenzierungstests wurden mit unbehandeltem Kulturmedium durchgeführt (unbehandelte Kontrolle). Zusätzlich wurden in dem 50-Passagen-Versuch eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle diente Penicillin G (Pen) in einer Konzentration von 1000 µg/ml (Penicillin-Kontrolle). Als Positivkontrolle wurde 5-Fluorouracil (FU) in einer Konzentration von 0,025 µg/ml verwendet (Fluorouracil-Kontrolle).

Alle aufgetauten Stammzellen wurden mittels einer Qualitätskontrolle auf ihre Eignung für die Durchführung des EST überprüft. Dafür wurden neben der unbehandelten Kontrolle (UK) und der Negativkontrolle (1000 µg/ml Penicillin G) steigende Konzentrationen 5-Fluorouracil (0,015 µg/ml FU; 0,03 µg/ml FU; 0,045 µg/ml FU; 0,06 µg/ml FU) als Positivkontrolle untersucht.

2.3.2.1 Proliferationstest

Die Proliferationstests wurden durchgeführt, um mögliche wachstumshemmende oder –fördernde Effekte verschiedener Faktoren (z.B. Serumkonzentration im Kulturmedium, Hitzeinaktivierung des Serums) zu untersuchen. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Proliferation der Zellen im Kulturgefäß in LIF-freiem Testmedium. Nach einer Kulturdauer von 10 Tagen wird die Vitalität der Zellen bestimmt.

Für den Proliferationstest wurden die ES Zellen nach dem Trypsinieren und einmaligem Waschen mit Kulturmedium auf eine Zellkonzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml Testmedium der unbehandelten Kontrolle eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 20 µl pro Well in die entsprechenden Wells der gelatinebeschichteten 96-Well-Platten vorgelegt. Das entspricht einer Zellzahl von 500 Zellen pro Well. Anschließend wurden 180 µl des entsprechenden Testmediums (UK, Pen bzw. FU) in die entsprechenden Wells pipettiert. Abweichend von der im Kapitel 2.3.1.2 genannten Zusammensetzung des Testmediums

mussten für die Negativ- und Positivkontrollen am „Versuchstag 0“ Testmedien mit der 1,1-fachen Konzentration Pen bzw. FU verwendet werden, um die gewünschten Endkonzentrationen in den Wells zu erreichen.

B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	B
B	Pen	Pen	Pen	Pen	Pen	Pen	Pen	Pen	Pen	Pen	B
B	FU 0,06	FU 0,06	FU 0,06	FU 0,06	FU 0,06	FU 0,06	FU 0,06	FU 0,06	FU 0,06	FU 0,06	B
B	FU 0,045	FU 0,045	FU 0,045	FU 0,045	FU 0,045	FU 0,045	FU 0,045	FU 0,045	FU 0,045	FU 0,045	B
B	FU 0,03	FU 0,03	FU 0,03	FU 0,03	FU 0,03	FU 0,03	FU 0,03	FU 0,03	FU 0,03	FU 0,03	B
B	FU 0,015	FU 0,015	FU 0,015	FU 0,015	FU 0,015	FU 0,015	FU 0,015	FU 0,015	FU 0,015	FU 0,015	B
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Abb. 1: Pipettierschema

Beispielhaftes Pipettierschema für den im Rahmen einer Qualitätskontrolle der ES Zellen durchgeführten Proliferationstest in einer 96-Well-Zellkulturplatte.

B: Blank (Leerwert), UK: unbehandelte Kontrolle, Pen: Penicillin G (1000 µg/ml); FU: 5-Fluorouracil (Konzentrationsangaben in µg/ml).

Die 96-Well-Zellkulturplatten wurden über 10 Tage im Brutschrank kultiviert. An den Versuchstagen 3 und 5 wurden Wechsel der Testmedien durchgeführt, indem nach Entfernen der Testmedien jeweils 200 µl der entsprechenden frischen Testmedien (mit den einfachen Konzentrationen) pipettiert wurden.

Die Auswertung der Proliferationstests erfolgte am Versuchstag 10 mittels des MTT-Vitalitätstests. Dieses Testprinzip beruht auf der Umsetzung des gelben Thiazol durch eine mitochondriale Dehydrogenase lebender Zellen in blaues Formazan. Dazu wurden 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) in jedes Well pipettiert und die Zellkulturplatten anschließend 5 min auf dem Schüttler für Mikrotiterplatten vorsichtig geschüttelt. Nach 3 h Inkubation im Brutschrank wurde das Kulturmedium aus den Platten entfernt, 100 µl MTT-Desorb-Lösung pro Well zugegeben und die Platten anschließend für 10 min auf dem Schüttler für Mikrotiterplatten geschüttelt.

Die Messung der optischen Dichte des Reaktionsproduktes (blaues Formazan) erfolgte im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm mit der Software „Revelation QuickLink“.

Für die unbehandelte Kontrolle des Proliferationstests wird im EST Protokoll für die embryonalen Stammzellen D3, bezogen von der ATCC, ein Referenzbereich der optischen Dichte von 0,9-1,6 angegeben.

2.3.2.2 Differenzierungstest

Durch die Kultivierung von zunächst undifferenzierten Stammzellen in dreidimensionalen Zellaggregaten unter LIF-Entzug wird die Differenzierung dieser Zellen zu Herzmuskelzellen gefördert. Durch Zugabe von Testsubstanzen zum Kulturmedium kann deren Einfluss auf die Differenzierung zu Herzmuskelzellen untersucht werden.

Die Differenzierungstests wurden mit den gleichen Ansätzen durchgeführt wie die Proliferationstests. Für jeden der Testansätze (UK, Pen, FU) wurde eine Zellsuspension in den entsprechenden Testmedien mit einer Zellkonzentration von jeweils $3,75 \times 10^4$ Zellen/ml eingestellt. Von diesen Zellsuspensionen wurden 60-80 Tropfen à 20 µl in die Deckel bakteriologischer Petrischalen (10 cm Durchmesser) gesetzt. Nach vorsichtigem Umdrehen der Deckel wurden diese auf die mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gefüllten Böden der Petrischalen aufgesetzt. Diese sog. „Hängenden Tropfen“ wurden über 3 Tage im Brutschrank inkubiert.

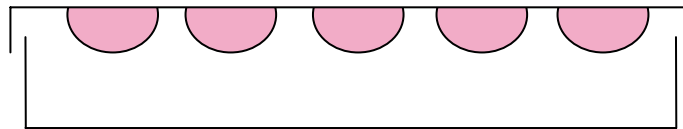
Am dritten Tag wurden die in den Hängenden Tropfen aus den Zellen gebildeten „Embryoid Bodies“ mit jeweils 5 ml des entsprechenden Testmediums abgespült und in bakteriologische Petrischalen (5 cm Durchmesser) überführt. Diese Suspensionskulturen wurden weitere zwei Tage im Brutschrank inkubiert.

Am fünften Tag erfolgte die Überführung der Embryoid Bodies in 24-Well-Zellkulturplatten. Dazu wurden für jeden Testansatz in die Wells einer Platte je 1 ml des Testmediums vorgelegt und anschließend ein entsprechender Embryoid Body pro Well eingesetzt. In den folgenden fünf Versuchstagen wurden die 24-Well-Zellkulturplatten im Brutschrank inkubiert.

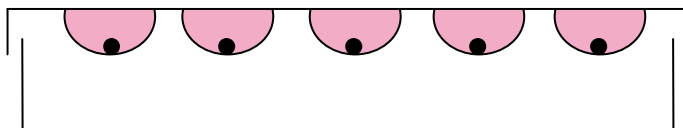
An den Tagen 7 und 10 erfolgte unter dem Umkehrmikroskop die morphologische Auswertung der Embryoid Body-Auswüchse. Die zu Herzmuskelzellen differenzierten Zellen wurden auf Kontraktionen untersucht. Dabei wurde in Anlehnung an das EST-Protokoll nur

das Ereignis „Kontraktionen“ gewertet, nicht jedoch die Größe der Kontraktionen aufweisenden Areale.

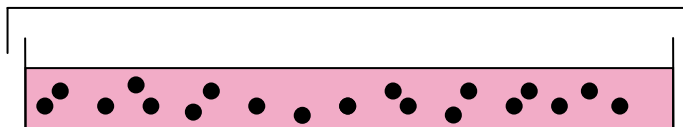
In dem EST Protokoll wurde als Qualitätskriterium festgelegt, dass die unbehandelten Kontrolle eines Differenzierungstests in mindestens 21 von 24 Wells kontrahierende Herzmuskelzellen aufweisen muss.



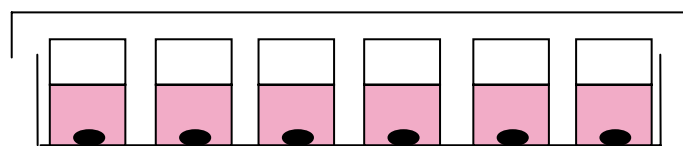
Versuchstag 0:
Hängende Tropfen (750 ES Zellen/20 μ l Zellsuspension)



Versuchstag 1-3:
Bildung von Zellaggregaten (Embryoid Bodies)



Versuchstag 3-5:
Embryoid Bodies in Suspensionskultur
(bakteriologische Petrischale)



Versuchstag 5-10:
Embryoid Bodies in Adhäsionskultur
(24-Well-Zellkulturplatte)

Abb. 2: Durchführung des Differenzierungstests
Schematische Darstellung der Kultivierung von ES
Zellen im Differenzierungstest

2.3.3 Untersuchungen zu den Kulturbedingungen

Die Untersuchungen zu den Kulturbedingungen von embryonalen Stammzellen wurden auf der Grundlage der eben beschriebenen Proliferations- und Differenzierungstests durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss der Serumkonzentration auf die Proliferation und die Differenzierung der embryonalen Stammzellen in einem Konzentrationsbereich von 5 – 30 % untersucht. Außerdem wurde der Einfluss von unbehandeltem und hitzeinaktiviertem FBS in Konzentrationsbereichen von 10 – 20 % untersucht.

2.3.4 Methoden zur Beurteilung des undifferenzierten Status der ES Zellen

Undifferenzierte embryonale Stammzellen der Maus sind kleine runde Zellen, die typischerweise in dreidimensionalen Kolonien wachsen. Außerdem exprimieren sie u.a. das Oberflächenantigen stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) und weisen eine hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) auf.

Um den undifferenzierten Zustand der Stammzellen während ihrer Kultivierung zu überprüfen, wurden die ES Zellen in der hier vorgestellten Arbeit neben der morphologischen Beurteilung auch mit verschiedenen Methoden auf diese beiden Marker (SSEA-1 und AP-Aktivität) untersucht.

2.3.4.1 Morphologische Untersuchung

Die Beurteilung der Kolonieform und -dichte sowie der Morphologie der ES Zellen in den Zellkulturflaschen erfolgte mithilfe des Umkehrmikroskops (bei 25- bis 100-facher Vergrößerung).

2.3.4.2 Immunzytochemische und zytochemische Untersuchungen

Vorversuche

Um die Stammzellen mit zytochemischen bzw. immunzytochemischen Methoden auf SSEA-1 und Alkalische Phosphatase-Aktivität untersuchen zu können, war eine Kultivierung der Zellen auf speziellen Objektträgern mit Kammeraufsatz (Culture Slides) erforderlich.

Vorbereitend wurden zahlreiche methodische Untersuchungen durchgeführt, in denen die pro Fläche einzusetzende Zellzahl, die Verkürzungen der Anhaftdauer der Zellen zur Vermeidung

einer übermäßigen Koloniebildung, die Beschichtung der Culture Slides mit verschiedenen Adhäsionsfaktoren für eine verbesserte Anhaftung der Zellen und verschiedene Fixierungsmethoden überprüft wurden. Dabei stellten sich die Beschichtung der Culture Slides mit Fibronectin und die Fixierung der Zellen in Methanol/Aceton im Verhältnis 7:3 als am besten geeignete Methoden heraus.

Außerdem wurden in den Voruntersuchungen zum Nachweis der SSEA-1-Expression verschiedene Verdünnungsstufen und Inkubationszeiten der beiden Antikörper (Anti-SSEA-1 und FITC-konjugierter sekundärer Antikörper) untersucht. Zur Kontrolle der Spezifität dieser Färbung wurden Fibroblasten, die kein SSEA-1 exprimieren, mit diesen Antikörpern inkubiert und untersucht. Darüber hinaus wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen die Stammzellen nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden, um eine unspezifische Bindung dieses Antikörpers auszuschließen.

Die Voruntersuchungen zum Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität umfassten verschiedene Inkubationszeiten der Substratlösung bzw. die mehrfache Inkubation mit Substrat und die Möglichkeit der Verstärkung der Fluoreszenz durch Inkubation der Zellen mit Ethanol nach den Färbeschritten. Auch diese Methode wurde mit Fibroblasten als Negativ-Kontrolle durchgeführt und erwies sich als spezifisch für embryonale Stammzellen.

Vorbereitung der immunzytochemischen und zytochemischen Untersuchungen

Zur Beschichtung wurden 225 µl Fibronectin (0,02 mg/ml) in jede Kammer der Culture Slides eingebracht und diese über Nacht unter der sterilen Werkbank luftgetrocknet. Am nächsten Tag wurden von allen Ansätzen (A-F) Zellsuspensionen mit einer Zellzahl von 4×10^5 Zellen/ml in dem entsprechenden Kulturmedium (je nach Zelllinie bzw. Versuchsansatz) hergestellt. Von jeder der Zellsuspensionen wurde 1 ml in eine Kammer der Culture Slides pipettiert (für die Negativkontrolle in eine weitere Kammer 1 ml der Zellsuspension des Ansatzes A mit 1000 U/ml LIF) und die Culture Slides für 5 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal für 5 min in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und anschließend über 10 min in Methanol/Aceton (7:3) bei -20°C fixiert. Vor der Färbung der Zellen wurden diese mindestens einen Tag bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Immunzytochemische Untersuchung auf die Expression von SSEA-1

Die Untersuchung der Stammzellen auf die Expression von SSEA-1 erfolgt mittels eines monoklonalen primären Antikörpers (MC-480, Anti-SSEA-1, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa) in Verbindung mit einem Fluorochrom-konjugierten sekundären Antikörper (FITC-konjugated Goat anti-mouse IgG and IgM, Dianova).

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Kammeraufsätze der Culture Slides abgenommen und die Zellen zweimal für 5 min mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ rehydriert. Nach 1:100 Verdünnung des primären Antikörpers mit 3 % BSA (in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) wurden jeweils 50 μl auf die Zellen (außer Negativkontrolle) aufgebracht. Auf die Zellen der Negativkontrolle wurden 50 μl BSA (3 % in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4° C in der feuchten Kammer.

Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen zweimal für 5 min mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Anschließend wurden je 50 μl des sekundären Antikörpers (verdünnt 1:50 mit 3 % BSA in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) auf jedes Feld der Objektträger pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer über 2 h (dunkel). Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal 5 min in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Anschließend wurde auf jedes Feld des Objektträgers ein Tropfen Mounting Medium pipettiert. Nach Abdeckung mit Deckgläschen wurden die Objektträger bis zur mikroskopischen Auswertung (am gleichen Tag) kühl und dunkel aufbewahrt.

Zytochemische Untersuchung auf Alkalische Phosphatase-Aktivität

Für die Untersuchung auf die Alkalische Phosphatase-Aktivität der Zellen wurde das „Alkaline Phosphatase Substrate Kit I“ (Vector) verwendet. Die Aktivität des Enzyms wird dabei durch einen Substratumsatz, welcher mit einem Farbumschlag nach Rot einhergeht, sichtbar gemacht. Diese Rotfärbung der Stammzellen war sowohl unter dem Lichtmikroskop als auch unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellbar.

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Zellen auf den Culture Slides zweimal für 5 min in TrisHCl gewaschen.

Die Arbeitslösung des Alkaline Phosphatase Substrate Kit I wurde direkt vor Gebrauch nach Herstellerangaben angesetzt. Von dieser Arbeitslösung wurden jeweils 300 μl auf die Felder

der Culture Slides pipettiert und die Zellen bei Raumtemperatur für 30 min in der feuchten Kammer (dunkel) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal 5 min mit TrisHCl gewaschen und einmal für 10 sec in Aqua dest. getaucht. Zur Verstärkung der Fluoreszenz wurden in jede Kammer 1,5 ml Ethanol (100 %) pipettiert. Nach 2 min Inkubation (RT) wurde der Ethanol abgegossen, die Kammeraufsätze abgelöst und auf jedes Feld ein Tropfen Mounting Medium pipettiert. Nach Abdeckung mit Deckgläschen wurden die Objektträger bis zur Auswertung (am gleichen Tag) kühl und dunkel aufbewahrt.

Auswertung der immunzytochemischen und zytochemischen Untersuchungen

Die Auswertung erfolgte durch Beurteilung der Zellen und ihrer Färbung mit dem Photomikroskop (Axiophot, Zeiss) bei 400-facher Vergrößerung. Dieses Mikroskop ermöglicht durch die integrierte Fluoreszenzeinrichtung neben der lichtmikroskopischen auch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Zellen.

Für die software-gestützte Auswertung der Zellen wurden mit der an das Mikroskop angeschlossenen CCD Color Camera (Sony) Aufnahmen gemacht und diese mit der Software Scion Image® weiter bearbeitet.

Da bei ES Zellen im Gegensatz zu Gewebeschnitten nicht von einer bestimmten Zelldichte pro Bildausschnitt ausgegangen werden kann, musste für die geplante Quantifizierung der Fluoreszenz zunächst die Fluoreszenz mit der „mit Zellen bewachsenen Fläche“ ins Verhältnis gesetzt werden. Von jedem Bildausschnitt wurde sowohl ein Foto mit dem Fluoreszenzmikroskop als auch unter lichtmikroskopischen Bedingungen aufgenommen. Die lichtmikroskopischen Bilder zeigten dabei alle in dem Bildausschnitt vorhandenen Zellen und erlaubten so eine Beurteilung der „bewachsenen Fläche“ pro Bildausschnitt. Die mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Fotos zeigten hingegen nur die fluoreszierenden und somit SSEA-1- bzw. AP-positiven Zellen.

Um Unterschiede in den Färbungen objektiv beurteilen zu können, wurde mit einer software-gestützten Auswertungsmethode anhand des lichtmikroskopischen Fotos ein Zahlenwert entsprechend der bewachsenen Fläche ermittelt.

Der ebenfalls mit dieser Software anhand des mit dem Fluoreszenzmikroskops aufgenommenen Bildes berechnete Zahlenwert für die Fluoreszenz konnte nun zur „bewachsenen Fläche“ des Bildausschnittes ins Verhältnis gesetzt werden.

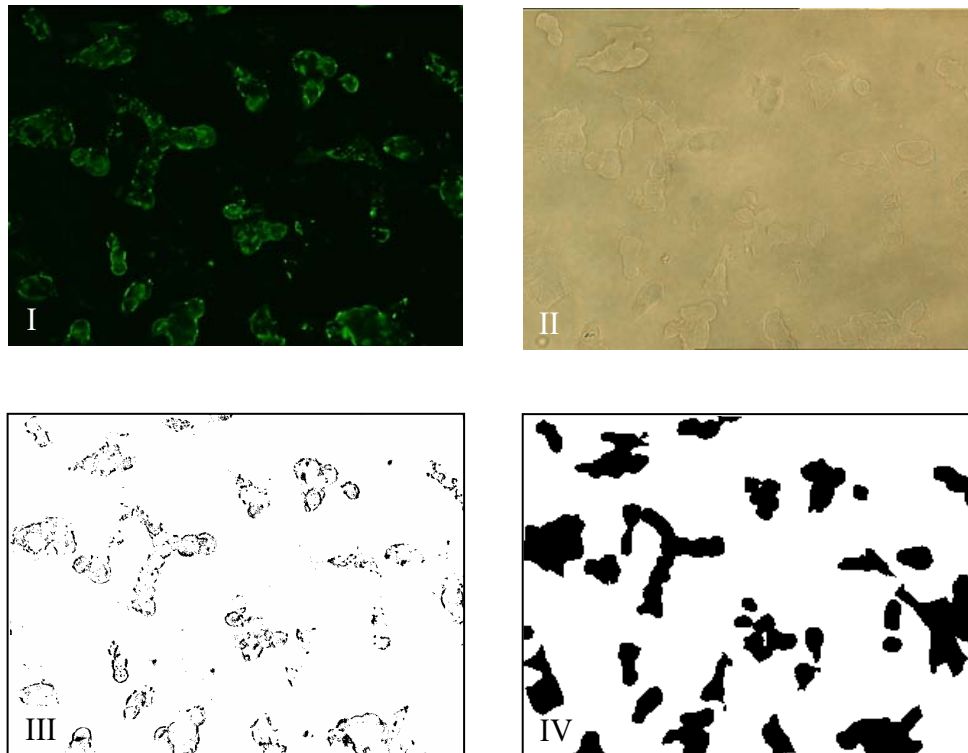


Abb. 3: Auswertung der immunzytochemischen bzw. zytochemischen Untersuchungen

Beispiel für die Auswertung der embryonalen Stammzellen (ES Zellen) nach immunzytochemischer Färbung gegen SSEA-1 mit der Software ScionImage®.

I: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der ES Zellen nach Inkubation mit Anti-SSEA-1 und FITC-gekoppeltem sekundären Antikörper;

II: Lichtmikroskopische Aufnahme des in Abb. I gezeigten Bildausschnitts;

III: Entspricht der Abb. I nach Umwandlung in ein Schwarz-Weiß-Bild

IV: Allen auf dem lichtmikroskopischen Bild (II) sichtbaren Zellen wurde der Wert „schwarz“ zugeordnet.

2.3.4.3 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Vorversuche

Zur Etablierung des Protokolls für die Durchführung der immunzytochemischen Untersuchung der Zellen auf SSEA-1 wurden verschiedene Verdünnungsstufen und Inkubationszeiten des primären (MC-480, Anti-SSEA-1) und sekundären Antikörpers (FITC-conjugated Goat Anti-Mouse) untersucht. Darüber hinaus wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen die Stammzellen nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden, um eine unspezifische Bindung dieses Antikörpers auszuschließen.

In weiteren Vorversuchen wurde die Möglichkeit der Verkürzung des Protokolls durch die direkte Markierung des monoklonalen primären Antikörpers (MC-480) mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) untersucht. Nachdem die Eignung dieses FITC-gekoppelten SSEA-1-Antikörpers nachgewiesen werden konnte, wurde dieser in den durchflusszytometrischen Untersuchungen während der Hauptstudie verwendet.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen auf Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) wurde mit dem auch für die zytochemischen Untersuchungen verwendeten Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Vector) durchgeführt. Für die Etablierung des Protokolls zur FACScan-Analyse der Zellen auf AP-Aktivität wurden in Vorversuchen verschiedene Inkubationszeiten (1 x bzw. 2 x 30 min) und Mengen der Substratlösung und die Möglichkeit der Verstärkung der Fluoreszenz durch Ethanol untersucht. Die zweifache Inkubation der Zellen mit Substratlösung mit anschließender kurzer Inkubation mit Ethanol erwies sich als am besten geeignete Methode und wurde daher durchgeführt.

Untersuchung der ES Zellen auf die Expression von SSEA-1

Für die Durchführung der FACScan-Analyse auf die Expression von SSEA-1 der Stammzellen wurden von jedem Ansatz 3×10^6 Zellen zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in jeweils 1,5 ml HF (Hank's Balanced Salt Solution mit 2 % FBS) resuspendiert. Für jeden Ansatz wurden in je drei FACS-Röhrchen (Dreifach-Bestimmung) 10 µl des FITC-markierten SSEA-1-Antikörpers (verdünnt mit Cellwash auf einen IgG-Gehalt von ca. 4 µg/ml) vorgelegt. Von den Zellsuspensionen der verschiedenen Ansätze wurden nun je 100 µl in die FACS-Röhrchen pipettiert. Für die Negativkontrollen

wurden von jeder Zellsuspension 100 µl in je ein FACS-Röhrchen ohne Antikörper pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 4° C im Dunkeln über 1h.

Nach dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit 2 ml PBS Azid (0,05 %) gewaschen und nach dem Zentrifugieren in 500 µl PBS Azid resuspendiert. Anschließend erfolgte die Messung von jeweils 30000 Zellen im FACScan (Becton Dickinson) zur Ermittlung des Anteils der SSEA-1-positiven Zellen.

Untersuchung der ES Zellen auf Alkalische Phosphatase-Aktivität

Für die Durchführung der FACScan Analyse auf die Alkalische Phosphatase-Aktivität wurden von jedem Ansatz 2 x 10⁶ Zellen zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in jeweils 4 ml HF (Hank's Balanced Salt Solution + 2 % FBS) resuspendiert.

Für jeden Ansatz wurden in vier FACS-Röhrchen (Dreifach-Bestimmung und Negativkontrolle) je 500 µl Zellsuspension pipettiert und die Zellen anschließend zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden die Zellen in jeweils 700 µl frisch angesetzter Substratlösung (Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit, nach Herstellerangaben) bzw. die Zellen der Negativkontrollen in 700 µl HF resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen über 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal zentrifugiert und erneut in je 700 µl frisch angesetzter Substratlösung (bzw. die Negativkontrollen in je 700 µl HF) resuspendiert. Nach der zweiten Inkubation (30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur) wurden die Zellen zentrifugiert und zur Verstärkung der Fluoreszenz in je 300 µl Ethanol (100 %) resuspendiert. Nach 2 min wurden die Zellen mit jeweils 4 ml HF gewaschen und nach dem Zentrifugieren in jeweils 500 µl HF resuspendiert.

Die Messung von jeweils 30000 Zellen erfolgte im FACScan zur Ermittlung des Anteils der Zellen mit alkalischer Phosphatase-Aktivität.

Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen

Die Auswertung der FACScan-Analysen wurde mithilfe der WinList®-Software (Verity Software House Inc., Topsham, Me, USA) durchgeführt. Dafür wurden die Fluoreszenzintensitäten auf der Abzisse gegen die Zellzahlen auf der Ordinate in Histogrammen aufgetragen. Eine „Region“ als definierter Ausschnitt eines Histogramms dient

zur Zählung der Population innerhalb dieser Region. Die Bestimmung der Anteile der SSEA-1- bzw. AP-positiven Zellen eines Ansatzes erfolgte stets im Vergleich zu der Negativkontrolle des entsprechenden Ansatzes. Die Regionen wurden dabei so gewählt, dass 99 % der Zellen der jeweiligen Negativkontrolle ausgeschlossen waren. Der Anteil der Zellen eines Ansatzes, der innerhalb der entsprechenden Region lag, wurde als SSEA-1-positiv bzw. AP-positiv bewertet.

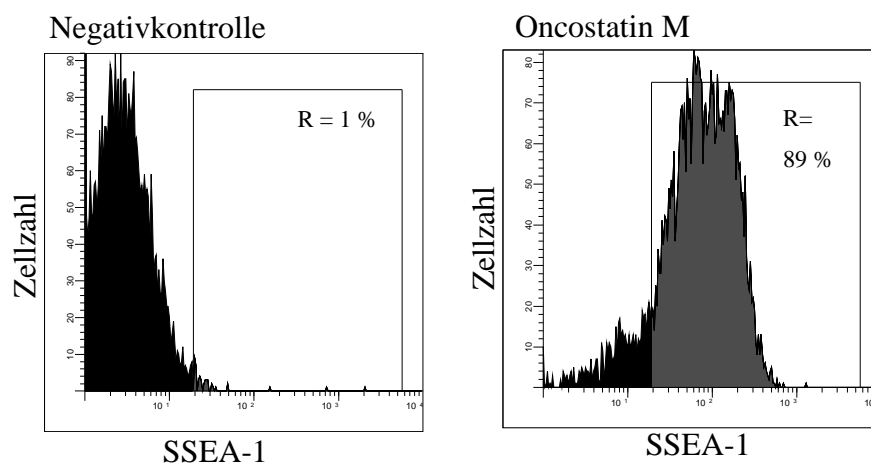


Abb. 4: Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen

Beispiel einer Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen, hier am Beispiel der im Rahmen der Hauptstudie mit Oncostatin M kultivierten ES Zellen nach 32 Passagen. Als Negativkontrolle wurden die ohne Antikörper inkubierten ES Zellen des gleichen Ansatzes verwendet.

2.3.4.4 Enzym-Aktivitätstest auf Alkalische Phosphatase-Aktivität

Diese Untersuchung wurde in Anlehnung an die von Zandstra (Zandstra et al., 2000) beschriebene Methode zur photometrischen Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität durchgeführt.

Nach einmaligem Waschen der Zellen mit 7 ml HF (Hank's Balanced Salt Solution + 2 % FBS) wurden für jeden Ansatz 2×10^6 Zellen zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes die Zellpellets in je 200 μ l HF resuspendiert. Nach Überführen der Zellsuspensionen in Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden die Zellen für 2 min mit 2000 rpm (Biofuge, Heraeus, Rotor Cat. No. 1378) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand

abgenommen und die Zellpellets in je 12 μl HF resuspendiert. Nach dem Vorlegen von 10 μl Triton-X (0,05 % in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) pro Well in die Wells einer 96-Well-Zellkulturplatte wurden für die Dreifachbestimmung der Ansätze je 2 μl der Zellsuspensionen in jeweils 3 Wells eingebracht und die Platte anschließend 5 min mit dem Schüttler für Mikrotiterplatten geschüttelt.

Nun wurden von der Substratlösung (Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid for ELISA, Sigma) jeweils 138 μl in die mit Triton-X und Zellen bestückten Wells pipettiert. Zur Messung der Leerwerte (Blanks) wurden in 3 Wells jeweils 10 μl Triton-X und 140 μl Substratlösung eingebracht.

Die Messungen der optischen Dichten des gelben Reaktionsproduktes p-Nitrophenol erfolgten direkt im Anschluß im Plattenphotometer (Dynex) bei einer Wellenlänge von 405 nm über 20 min im Abstand von 1 min.

2.3.5 Hauptstudie

Embryonale Stammzellen der Zelllinie D3 wurden mit verschiedenen Methoden zur Differenzierungshemmung über einen Zeitraum von 50 Passagen kultiviert. Dazu wurden die folgenden Ansätze gewählt:

A: 1000 U/ml LIF (Leukemia Inhibitory Factor)

B: 2000 U/ml LIF

C: 20 ng/ml OsM (Oncostatin M)

D: ohne differenzierungshemmenden Zusatz (= Positivkontrolle)

E: auf STO-Feeder Layer

F: auf STO-Feeder Layer + 1000 U/ml LIF

Über den Versuchszeitraum wurden die Zellen nach jeder fünften Passage auf ihre Alkalische Phosphatase-Aktivität und die Expression von SSEA-1 untersucht. Die Untersuchungen umfassten die FACScan-Analysen, zytochemische und immunzytochemische Untersuchungen der Zellen und den photometrisch ausgewerteten Enzym-Aktivitätstest. Die Untersuchung des Proliferations- und Differenzierungspotentials der Zellen wurde unter Kontrollbedingungen (unbehandelte Kontrolle, UK) und unter dem Einfluss von 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Penicillin G (Pen) als Negativkontrolle bzw. 0,025 µg/ml 5-Fluorouracil (FU) als Positivkontrolle vorgenommen. Aufgrund der Praktikabilität wurden die verschiedenen Auswertungsmethoden zeitversetzt (bei verschiedenen Passagen) durchgeführt, jedoch stets im Abstand von fünf Passagen.

2.3.5.1 Vorbereitung der ES Zellen

Für diese Versuchsreihe wurden ES Zellen aus der laboreigenen Reserve aufgetaut, die bereits neun Mal passagiert worden waren. Diese Stammzellen wurden nach dem Auftauen und Subkultivieren über zwei Passagen (unter Supplementierung des Standard-Kulturmediums mit 1000 U/ml Leukemia Inhibitory Factor) in einer Qualitätskontrolle auf ihre Eignung zur Durchführung der Versuchsreihe überprüft. Dafür wurden das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der ES Zellen (Durchführung s. Proliferations- und Differenzierungstest Kapitel 2.3.2) unter dem Einfluss steigender Konzentrationen 5-Fluorouracil untersucht.

Während dieser Qualitätskontrolle wurden die Zellen in der Zellkulturflasche über weitere vier Passagen kultiviert. Die ES Zellen waren demnach bei Beginn der Hauptstudie schon in Passage 16.

Am Versuchstag 0 der Hauptstudie wurden die Zellen zur Ermittlung der Ausgangssituation mit den beschriebenen Methoden untersucht. Ab diesem Tag wurden die aus einer Population stammenden embryonalen Stammzellen unter den verschiedenen Kulturbedingungen (Ansätze A-F) kultiviert. Die im Folgenden angegebenen Bezeichnungen der Passagen der Hauptstudie gelten ab dem ersten Tag der Auswertung und beginnen als Passage 0.

2.3.5.2 Subkultivierung der ES Zellen

Die Kultivierung der Zellen der Hauptstudie erfolgte in Routine-Kulturmedium für Stammzellen, dem entsprechend für die verschiedenen Ansätze 1000 bzw. 2000 U/ml LIF (Ansatz A, F bzw. B) bzw. 20 ng/ml Oncostatin M (Ansatz C) zugesetzt wurden.

Über den Zeitraum der Studie wurden die Zellen der verschiedenen Ansätze jeden zweiten Tag passagiert. Das Passagieren erfolgte grundsätzlich nach der bereits beschriebenen Methode (s. Kapitel 2.3.1.3). Abweichungen von diesem Protokoll bei den für die Hauptstudie subkultivierten Zellen sind im Folgenden kurz dargestellt.

Ansätze ohne *Feeder Layer* (A-D):

Für die neuen 25-cm²-Zellkulturflaschen wurden von jedem Ansatz 4 x 10⁶ ES Zellen zentrifugiert und in jeweils 10 ml des entsprechenden Mediums (mit LIF bzw. OsM bzw. ohne differenzierungshemmenden Zusatz) resuspendiert.

Für die Durchführung der Auswertungen wurde die für die jeweilige Auswertungsmethode benötigte Anzahl der Zellen zentrifugiert.

Ansätze auf *Feeder Layer* (E-F):

Für die Trennung der Stammzellen von den inaktivierten STO-Fibroblasten wurde das im Kapitel 2.3.1.3 beschriebene Trennverfahren durchgeführt, bevor die Stammzellen auf die neuen *Feeder Layer* gesetzt bzw. für die Auswertungen verwendet wurden.

Für die weitere Kultivierung wurden nach dem ersten Trennungsschritt (5 min im Zentrifugenröhrchen) jeweils 4 x 10⁶ ES Zellen zentrifugiert und anschließend in 10 ml des entsprechenden Kulturmediums (Ansatz E: ohne differenzierungshemmenden Zusatz bzw. Ansatz F: mit 1000 U/ml LIF) resuspendiert. Nach Vorbereitung der frischen *Feeder Layer* (Absaugen des Kulturmediums und Waschen der Zellen mit PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺) wurden die Stammzellsuspensionen vorsichtig in diese Zellkulturflaschen eingebracht.

Für die Auswertungen wurden die Zellen aus den Überständen nach der Anhaftphase im Brutschrank (20 min in gelatinebeschichteten Zellkulturflaschen) verwendet. Je nach Auswertungsmethode wurde die benötigte Anzahl der Zellen zentrifugiert.

Die weiteren Arbeitsschritte wurden je nach Auswertungsmethode wie dort beschrieben durchgeführt.

2.3.6 Statistische Verfahren

Die Auswertung der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten erfolgte mithilfe der Software SPSS® Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago).

In der Arbeit wurden die Variablen optische Dichte, sowohl absolut als auch relativ, Zellzahlen, Anteil der Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten und Anteil von SSEA-1 bzw. AP-positiven Zellen ausgewertet.

Für die Proliferationstests wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und 95%-Konfidenzintervalle der Variablen optische Dichte in den Untersuchungsgruppen bestimmt. Beim Vergleich von zwei Versuchsansätzen wurde der t-Test durchgeführt. Mehrfachvergleiche (mehrere Behandlungsgruppen) erfolgten mittels ANOVA mit nachfolgendem Test nach Tamhane (da Varianzgleichheit nicht vorausgesetzt werden konnte). Als Signifikanzniveau für alle Analysen wurden 5 % festgelegt.

Um die Ergebnisse unabhängig voneinander durchgeführter Proliferationstests trotz der in biologischen Systemen auftretenden Schwankungen (des Wachstums der Zellen und damit der optischen Dichten) zusammenfassen oder vergleichen zu können, wurde in Abb. 8 die relative Darstellungsform gewählt. Bei der relativen Darstellung der optischen Dichten wurde jeweils der Mittelwert der absoluten Werte der optischen Dichte für die unbehandelten Kontrolle als 100 % festgesetzt und die absoluten Werte der Penicillin- und Fluorouracil-Kontrollen dazu ins Verhältnis gesetzt.

Die Auswertung der auf dichotomen Variablen (ja-nein-Antworten) basierenden Differenzierungstests erfolgte durch χ^2 -Tests (bzw. durch den exakten Test nach Fisher, wenn in den 2x2-Tabellen eine Zelle eine Häufigkeit < 5 enthielt).

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden für die statistische Analyse auch als dichotome Variablen interpretiert. Im Versuchsansatz ist von 3 Wiederholungen ausgegangen worden. Daher ergibt sich ein Stichprobenumfang in jeder Gruppe von 90000 Zellen (3x 30000), der jeweils in den χ^2 -Test einging.

Bei der photometrischen Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. In die Darstellung ging jeweils der mittlere gemessene Wert (Median) ein. Da ein statistischer Test auf der Basis n=3 nicht sinnvoll ist, wurde an dieser Stelle darauf verzichtet. Gleiches gilt auch für die immunzytochemische bzw. zytochemische Auswertung der SSEA-1-Expression und AP-Aktivität.