

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Toxikologie
der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, eingereicht
über das Institut für Veterinär-Anatomie des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

**KULTIVIERUNG EMBRYONALER
STAMMZELLEN DER MAUS UNTER
SERUMREDUZIERTEN KULTUR-
BEDINGUNGEN MIT UND OHNE
SUPPLEMENTIERUNG EINES
SERUMERSATZES**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

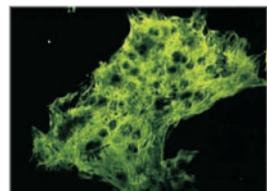
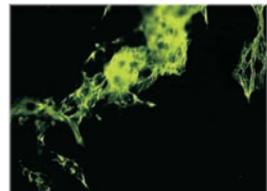
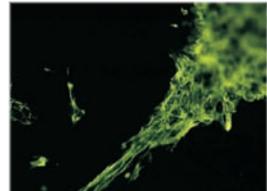
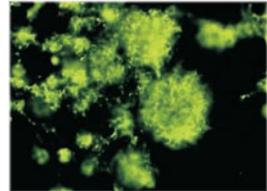
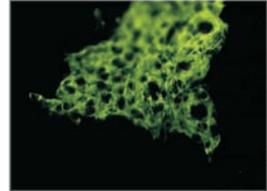
vorgelegt von

PATRICK SCHOLZ

Tierarzt aus Frankfurt (Oder)

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3286



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Toxikologie
der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin**

**eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie des
Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Kultivierung embryonaler Stammzellen der Maus unter serumreduzierten
Kulturbedingungen mit und ohne Supplementierung eines Serumersatzes**

**Inaugural–Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Patrick Scholz
Tierarzt
aus Frankfurt (Oder)**

Berlin 2009

Journal Nr.: 3286

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ralf Stahlmann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg Luy

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): mice, embryonic stem cells, myocardium,
in vitro, cell culture, culture media,
serum-free (MeSH), flow cytometry,
polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 06.04.2009

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht.....	2
2.1 Embryonale Stammzellen der Maus	2
2.2 Kardiogenese	5
2.3 Transkriptionsfaktoren, die die Kardiomyogenese beeinflussen	7
2.4 Zellkulturbedingungen	9
2.4.1 Inhaltsstoffe des Basismediums	9
2.4.2 Fötales Kälberserum und seine Zusammensetzung	11
2.4.3 Fötales Kälberserum und seine Vorteile	12
2.4.4 Fötales Kälberserum und seine Nachteile	14
2.4.5 Serumreduktion mit Supplementierung	16
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Zelllinien	18
3.1.2 Geräte	18
3.1.3 Glas und Plastikware	19
3.1.4 Chemikalien	19
3.1.5 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	21
3.1.6 Sonden und Primer für die Real Time PCR	21
3.1.7 Puffer und Lösungen	22
3.1.7.1 Puffer und Lösungen für den MTT-Test	22
3.1.7.2 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie	22
3.1.7.3 Puffer und Lösungen für die FACS-Analyse	22
3.1.7.4 Puffer und Lösungen für die RNA-Analyse	23
3.1.7.5 Sonstige Lösungen	23
3.1.8 Zellkulturmedien	24
3.1.9 Zusammensetzung des Supplementenmix	25
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Passagieren der Zellen.....	27
3.2.2 Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten in hängenden Tropfen.....	27
3.2.3 Immunzytochemische Untersuchung auf die Expression von <i>Myosin heavy chain</i>	28

3.2.4	MTT-Test zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens embryonaler Stammzellen	30
3.2.5	Durchflusszytometrische Untersuchungen	30
3.2.5.1	<i>Testdurchführung</i>	31
3.2.5.2	<i>Prinzip und Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen</i>	32
3.2.6	Detektierung herzmuskelzellspezifischer Transkripte mittels Real Time Reverse Transkriptase PCR.....	35
3.2.6.1	<i>Isolierung der Gesamt-RNA</i>	35
3.2.6.2	<i>Synthese von cDNA durch Reverse Transkription</i>	35
3.2.6.3	<i>Real Time Polymerasekettenreaktion (Real Time PCR) im Taq Man® Format</i>	36
3.2.6.4	<i>Quantifizierung der Genexpression</i>	37
3.2.7	Studiendesign und Statistik	37
4	Ergebnisse	42
4.1	Kultivierung von embryonalen Stammzellen im hängenden Tropfen (ohne LIF) über 5, 6, 7, 8, 9 und 10 Tage unter Standard-Kulturbedingungen.....	42
4.1.1	Differenzierungstest	43
4.1.1.1	<i>24-Loch Funktionstest</i>	43
4.1.1.2	<i>Immunzytologische Untersuchungen</i>	43
4.1.1.3	<i>FACS-Analyse</i>	46
4.1.1.4	<i>Quantitative RT-PCR</i>	46
4.1.2	Zufallswahrscheinlichkeiten der Ergebnisse des 24-Loch Funktionstests und der FACS-Analyse	47
4.1.3	Beurteilung der angewendeten Untersuchungsmethoden auf Praktikabilität und Redundanz des Informationsgehaltes.....	48
4.1.3.1	<i>Interne Übereinstimmung (Reliabilität) der Messinstrumente</i>	48
4.1.3.2	<i>Externe Übereinstimmung (Validität) der Messinstrumente</i>	50
4.2	Kultivierung von embryonalen Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen ohne Supplementierung eines Serumersatzes	52
4.2.1	Proliferationstest.....	53
4.2.1.1	<i>MTT-Proliferationstest</i>	53
4.2.2	Differenzierungstests.....	53
4.2.2.1	<i>24-Loch Funktionstest</i>	53
4.2.2.2	<i>Immunzytologische Untersuchung</i>	54
4.2.2.3	<i>FACS-Analyse</i>	56
4.2.2.4	<i>Quantitative RT-PCR</i>	57
4.2.3	Zusammenfassende Darstellung.....	58
4.3	Kultivierung von embryonalen Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit Supplementierung eines Serumersatzes.....	59
4.3.1	Proliferationstest.....	59
4.3.1.1	<i>MTT-Proliferationstest</i>	59
4.3.2	Differenzierungstests.....	60
4.3.2.1	<i>24-Loch Funktionstest</i>	60
4.3.2.2	<i>Immunzytologische Untersuchung</i>	63
4.3.2.3	<i>FACS-Analyse</i>	64
4.3.2.4	<i>Quantitative RT-PCR</i>	64

4.3.3	Zufallswahrscheinlichkeiten der Testergebnisse des 24-Loch Funktionstests und der FACS-Analyse	65
4.4	Vergleichende Darstellung der quantifizierbaren Ergebnisse für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit und ohne Supplementierung des Kulturmediums mit einem Serumersatz	66
4.4.1	Proliferationstest.....	68
4.4.1.1	<i>MTT-Proliferationstest</i>	68
4.4.2	Differenzierungstest	69
4.4.2.1	<i>24-Loch Funktionstest</i>	69
4.4.2.2	<i>FACS-Analyse</i>	70
4.4.2.3	<i>Quantitative RT-PCR</i>	71
4.5	Beurteilung der angewendeten Untersuchungsmethoden auf Praktikabilität und Redundanz des Informationsgehaltes.....	73
4.5.1	Interne Übereinstimmung (Reliabilität) der Messinstrumente.....	73
4.5.1.1	<i>Serumreduktion ohne Supplementierung eines Serumersatzes</i>	73
4.5.1.2	<i>Serumreduktion mit Supplementierung eines Serumersatzes</i>	75
4.5.2	Externe Übereinstimmung (Validität) der Messinstrumente	76
4.5.2.1	<i>Serumreduktion ohne Supplementierung eines Serumersatzes</i>	77
4.5.2.2	<i>Serumreduktion mit Supplementierung eines Serumersatzes</i>	78
5.	Diskussion	79
5.1	Etablierung von Endpunkten für die Untersuchung der In-vitro-Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten	80
5.2	Kultivierung embryonaler Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen ohne Supplementierung eines Serumersatzes	84
5.3	Kultivierung embryonaler Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit Supplementierung eines Serumersatzes.....	86
5.4	Vergleich Serumreduktion mit und ohne Supplementierung eines Serumersatzes.....	90
5.5	Ausblick	92
6	Zusammenfassung	94
7	Summary	96
8	Literaturverzeichnis	98
9	Danksagung	108
10	Selbstständigkeitserklärung	109

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Schematische Darstellung der Umbildung der paarigen Anlage des Herzens zum unpaaren Herzschlauch.....	5
Abb. 3.1:	Darstellung des Differenzierungsprotokolls der embryonalen Stammzellen....	28
Abb. 3.2:	Quantifizierung kardialer Proteinexpression mittels FACS-Analyse	34
Abb. 3.3:	Übersicht der Parametereinstellung des FACScan	34
Abb. 4.1:	Einfluss der Kultivierungsdauer auf das Differenzierungsverhalten von embryonalen Stammzellen	43
Abb. 4.2:	Embryoid Bodies charakterisiert mittels Immunfluoreszenz und Nativaufnahme	44
Abb. 4.3:	Darstellung von embryonalen Stammzellen der Maus differenzierten Kardiomyozyten.....	45
Abb. 4.4:	Einfluss der Kultivierungsdauer auf das Differenzierungsverhalten von embryonalen Stammzellen	46
Abb. 4.5:	Einfluss der Kultivierungsdauer auf das Differenzierungsverhalten von embryonalen Stammzellen	47
Abb. 4.6:	Darstellung der Häufigkeitsverteilung der positiven Testresultate bei den verschiedenen Versuchsreihen in der 24-Loch Funktionsanalyse bzw. in der FACS-Analyse.....	48
Abb. 4.7:	Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen auf die Proliferation von embryonalen Stammzellen	53
Abb. 4.8:	Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen	54
Abb. 4.9:	Darstellung von embryonalen Stammzellen der Maus differenzierten Kardiomyozyten unter serumreduzierten Kulturbedingungen am Differenzierungstag Acht.....	55
Abb. 4.10:	Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen	56
Abb. 4.11:	Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen auf die α -MHC Expression von embryonalen Stammzellen.....	57
Abb. 4.12:	Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen mit Supplementierung eines Serumersatzes auf die Proliferation von embryonalen Stammzellen.....	60

Abb. 4.13:	Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen mit Supplementierung eines Serumersatzes auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten.....	61
Abb. 4.14:	Morphologische Darstellung der <i>Embryoid Bodies</i> in den 24-Loch Kulturgefäßen.....	62
Abb. 4.15:	Aus embryonalen Stammzellen der Maus differenzierte Kardiomyozyten unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit Supplementierung eines Serumersatzes.....	63
Abb. 4.16:	Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen mit Supplementierung eines Serumersatzes auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen.....	64
Abb. 4.17:	Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen mit Supplementierung eines Serumersatzes auf die α -MHC Expression von embryonalen Stammzellen.....	65
Abb. 4.18:	Darstellung der Häufigkeitsverteilung der positiven Testresultate bei den verschiedenen Versuchsreihen in der 24-Loch Funktionsanalyse bzw. in der FACS-Analyse.....	66
Abb. 4.19:	Einfluss der verschiedenen Kulturmedien auf die Proliferation von embryonalen Stammzellen.....	68
Abb. 4.20:	Einfluss der verschiedenen Kulturmedien auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen	69
Abb. 4.21:	Einfluss der verschiedenen Kulturmedien auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen	70
Abb. 4.22:	Einfluss der verschiedenen Kulturmedien auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen	71

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Darstellung frühembryonaler Transkripte während der embryonalen Stammzellendifferenzierung <i>in vitro</i>	4
Tab. 2.2:	Darstellung herzmuskelspezifischer Transkripte während der embryonalen Stammzellendifferenzierung <i>in vitro</i>	6
Tab. 3.1:	Darstellung der Hauptversuche und die dabei angewandten Tests.....	41
Tab. 4.1:	Binomialverteilung bei einer Stichprobengröße von $N = 5$	42
Tab. 4.2:	Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der FACS-Analyse.....	49
Tab. 4.3:	Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der sich wiederholenden Versuche.....	49
Tab. 4.4:	Externe Genauigkeit (Validität) der Messinstrumente.....	50
Tab. 4.5:	Externe Genauigkeit (Validität) der Messinstrumente.....	51
Tab. 4.6:	Darstellung der Produktmomentkorrelation nach Spermann.....	60
Tab. 4.7:	Überprüfung der statistischen Bedeutsamkeit aller Arbeitshypothesen für den MTT-Test.....	68
Tab. 4.8:	Überprüfung der statistischen Bedeutsamkeit aller Arbeitshypothesen für die 24-Loch Funktionsanalyse.....	70
Tab. 4.9:	Überprüfung der statistischen Bedeutsamkeit aller Arbeitshypothesen für die FACS-Analyse.....	71
Tab. 4.10:	Überprüfung der statistischen Bedeutsamkeit aller Arbeitshypothesen für die quantitative RT-PCR.....	72
Tab. 4.11:	Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) des MTT-Proliferationstests.....	73
Tab. 4.12:	Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der FACS-Analyse.....	74
Tab. 4.13:	Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der unabhängigen Versuche.....	74
Tab. 4.14:	Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) des MTT-Proliferationstests.....	75
Tab. 4.15:	Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der FACS-Analyse.....	75
Tab. 4.16:	Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der unabhängigen Versuche.....	76
Tab. 4.17:	Externe Messgenauigkeit der drei Messinstrumente in den einzelnen Testreihen.....	77

Tab. 4.18: Externe Messgenauigkeit der Messinstrumente in Form von Kendalls Tau...77

Tab. 4.19: Externe Messgenauigkeit der Messinstrumente in Form von Kendalls Tau...78

Abkürzungsverzeichnis

\$	US-Dollar
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
AMP	Adenosin-3', 5'-Monophosphat
ANF	<i>englisch</i> atrial natriuretic factor
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bFGF	<i>englisch</i> basic Fibroblast Growth Factor
BMP	<i>englisch</i> bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaare
BSA	<i>englisch</i> bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
BSE	Bovine spongiforme encephalopathie
BTV	<i>englisch</i> Blue Tongue Virus, Virus der Blauzungenkrankheit
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	<i>englisch</i> cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate, zyklisches Adenosin-3', 5'-Monophosphat
cDNA	<i>englisch</i> complementary DNA, komplementäre DNA
cGMP	<i>englisch</i> cyclic guanosine-3', 5'-monophosphate, zyklisches Guanosin-3', 5'-Monophosphat
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
DAG	Diazylglyzerin
dd. H ₂ O	Doppeltdestilliertes Wasser
dl	Deziliter
DNA	<i>englisch</i> Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EB	<i>englisch</i> Embryoid body, Embryonalkörperchen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES Zellen	embryonale Stammzellen
ES-D3	embryonale Stammzellen der Linie D3
EU	Europäische Union
FACS	<i>englisch</i> Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fötales Bovines Serum
Fe	Eisen
FGF	<i>englisch</i> fibroblast growth factor
FITC	Flouresceinisothiocyanat
FSC	<i>englisch</i> forward light scatter, gerade gestreutes Licht
fwd	<i>englisch</i> forward, gerade
g	Gramm
G3P	Glukose-3-phosphat

Abkürzungsverzeichnis

GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-Proteine	Guaninnucleotid-bindende Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
IBR	Infektiöse Bovine Rhinotracheitis
IGF	<i>englisch</i> Insulin like Growth Factor
IGFR	IGF- Rezeptor
IP2	Phosphatidylinosindiphosphat
IP3	D-myo-inositoltrisphosphat
IR	Insulinrezeptor
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
KSO	Kolmogoroff-Smirnov-Omnibustest
LIF	<i>englisch</i> Leukemia inhibitory factor
M	Mol
MAP	mitogen aktivierte Proteinkinase
max.	Maximal
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MHC	<i>englisch</i> Myosin heavy chain
min	Minute
ml	Milliliter
MLC-2v	<i>englisch</i> ventricle-specific myosin light chain 2
mM	Millimol
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mRNA	<i>englisch</i> messenger RNA, Boten-RNA
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl gemessener Objekte
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Oct4	<i>englisch</i> Octamer binding transcription factor 4
OD-Werte	Werte der optischen Dichte
P	Wert für die Zufallswahrscheinlichkeit
p.c.	post coitum
PBS	<i>englisch</i> phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
PCR	<i>englisch</i> Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
PDGF	<i>englisch</i> Platelet Derived Growth Factor
PFA	Paraformaldehyd
PI	empirisch ermittelte Zufallsverteilung
PI3	bovine Parainfluenza 3
rec	<i>englisch</i> recombinant
rev	<i>englisch</i> reverse
RNA	<i>englisch</i> ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunden

Abkürzungsverzeichnis

SOP	<i>englisch</i> standard operating procedure, Standardarbeitsanweisung
ss	<i>englisch</i> single stranded, einzelsträngig
SSC	<i>englisch</i> sideways light scatter, seitwärts gestreutes Licht
SSEA-1	<i>englisch</i> stage-specific embryonic antigen-1
TAE	Tris-Azetat
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TGF	<i>englisch</i> Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrosefaktor
U	<i>englisch</i> Unit, Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch

1. Einleitung

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind ein in Forschung und Politik stark diskutiertes Thema. Wissenschaftler erhoffen sich aus der Stammzellforschung unter anderem neue Möglichkeiten in der Krebstherapie oder der Regeneration geschädigter Gewebe, wie zum Beispiel bei Herzinfarkten. Nach dem Embryonenschutzgesetz ist es in Deutschland verboten, menschliche Embryonen zu Forschungszwecken zu zerstören. Daher wird in der Regel auf tierische Stammzellen zurückgegriffen. Murine ES-Zellen stellen ein anerkanntes Modellsystem in der Grundlagen- und medizinischen Forschung dar. Darüber hinaus dienen sie der Analyse von embryotoxischen und pharmakologischen Wirkungen verschiedenster Substanzen. Inzwischen sind ES-Zellen der Maus in der Zellkultur ein wertvolles Werkzeug der biomedizinischen Forschung. Zur Ermittlung reproduzierbarer Daten bietet sich zudem der Einsatz als Ersatz- und Ergänzungsmethode zum herkömmlichen Tierversuch an. Für die Entwicklung der undifferenzierten ES-Zellen zu beispielsweise differenzierten Herzmuskelzellen, ist es bis heute erforderlich, dem Kultivierungsmedium fötales Kälberserum (FBS) zuzusetzen. Als unersetzliches Additiv fördert es die Adhäsion, die Proliferation und die Differenzierung der Zellen. Da Serum in Kulturmedien im Allgemeinen eine unklar definierte Komponente mit hoher Chargenvariabilität darstellt, widerspricht seine Verwendung den Bemühungen um eine Standardisierung von Zellkulturprotokollen im Sinne einer *Good Cell Culture Practice*. Da Bedenken gegenüber der Gewinnung und Produktion von fötalem Kälberserum bestehen, sollte es angestrebt werden das FBS durch definierte Formulierungen zu ersetzen, die eine adäquate Entwicklung zu differenzierten Herzmuskelzellen gewährleisten. Ziel dieser Arbeit ist es daher das Wachstums- und Differenzierungsverhalten muriner Stammzellen in serumreduzierten, bzw. serumfreien Kulturmedien in Kombination mit unterschiedlichen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, sowie definierten Medienadditiven zu testen. Um eine fundierte Diskussion zu ermöglichen, sollen mit den gewonnenen Ergebnissen die Möglichkeiten und Grenzen der Kultivierung von embryonalen Stammzellen der Maus gezeigt werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Embryonale Stammzellen der Maus

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus sind kontinuierlich wachsende Zellen embryonalen Ursprungs, die die Kapazität besitzen, sich selbst zu reproduzieren und sich über Vorläuferzellen in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Weitere Eigenschaften dieser Zellen sind neben der hohen Telomerase-Aktivität, die Expression von Pluripotenzmarkern wie der alkalischen Phosphatase und des keimlinienspezifischen Transkriptionsfaktors Oct-4 (*Octamer binding transcription factor 4*) (Schöler et al., 1989; Resnick et al., 1992; Wobus, 2000). Bei Injektion in eine sich entwickelnde Blastozyste muss die Stammzelle Teil eines chimären Organismus werden (Bongso, 2004).

Zellen mit der Fähigkeit, einen kompletten Organismus aufbauen zu können, nennt man totipotent (aus dem Lateinischen "zu allem fähig"). So besitzt eine befruchtete Eizelle bis zum 8-Zellen-Stadium Totipotenz. Das heißt, jede der acht Zellen hat für sich alleine das Potenzial, sich zu einem kompletten Organismus entwickeln zu können. Im Verlauf der Embryonalentwicklung spezialisieren sich die Zellen immer mehr und ihre Differenzierungsfähigkeit nimmt entsprechend ab. Nach dem 8-Zellen-Stadium sind die einzelnen Zellen pluripotent (aus dem Lateinischen "zu vielem fähig"), ihnen fehlt jedoch die Eigenschaft der Bildung extraembryonalen Gewebes.

Diese pluripotenten Zellen der Maus lassen sich entsprechend ihrer Herkunft unterscheiden und werden derzeit durch die folgenden Methoden isoliert, womit sie als permanente Linien in *in vitro*-Systemen zur Verfügung stehen:

- Primordiale Keimzellen (*embryonic germ cells*), sogenannte Vorläuferzellen von Ei- und Samenzellen werden aus den Genitalleisten neun bis 13 Tage alter Mäuseembryonen isoliert (Resnick et al., 1992; Stewart et al., 1994).
- Embryonale Karzinomazellen werden aus dem Teratokarzinom, einem Tumor in fötalen Gonaden, isoliert (Martin und Evans, 1975).
- Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse von murinen Blastozysten isoliert (Evans und Kaufmann, 1981; Martin, 1981).

Theoretisch besitzen ES-Zellen der Maus die Kapazität, nach über 250 Teilungszyklen unter Beibehaltung ihrer Pluripotenz (Rohdewohld und Wobus, 2002) in Kultur zu proliferieren, ohne ihren euploiden Chromosomensatz zu verlieren. Um die ES-Zellen in ihrem undifferenzierten und pluripotenten Zustand zu halten, müssen sie entweder in einem Zellkulturmedium kultiviert werden, welchem der *Leukemia inhibitory factor* (LIF) supplementiert wird (Gearing et al., 1987; Smith et al., 1988) und/oder auf einem *feeder layer* aus mitotisch inaktiven embryonalen Fibroblasten (Wobus et al., 1984). So behalten sie ihre Eigenschaft, sich an allen Gewebetypen eines Organismus, einschließlich der Keimbahn zu beteiligen. Es zeigte sich in der Arbeit von Kral (2005), dass der Anteil undifferenzierter Stammzellen einer Zellpopulation trotz LIF-Supplementierung mit zunehmender Kultivierung sinkt. Eine verminderte SSEA-1 Expression (*stage-specific embryonic antigen-1*) und Alkalische Phosphatase Aktivität sowie eine reduzierte Differenzierungskapazität in den Differenzierungstests gelten als Indiz dafür, dass die Differenzierung von ES-Zellen trotz LIF zu einem gewissen Prozentsatz stattfindet.

Die Eigenschaft muriner ES-Zellen, sich *in vitro* nach Entfernung des *feeder layers* oder dem Absetzen von LIF (Gough et al., 1989) zu kleinen Zellverbänden (*Embryoid Bodies* = EBs) zu aggregieren und spontan in Derivate der drei primären Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm zu differenzieren, macht sie zu einem hervorragenden Studienobjekt embryonaler Entwicklungsmechanismen bei Säugern. *In vivo* entwickelt sich aus der inneren Zellmasse der Blastozyste das primitive Ektoderm, das sich während der Gastrulation weiter in Ektoderm, Mesoderm und Endoderm differenziert. Wie *in vivo* werden die Markergene der Keimblätter Neuroektoderm, Endoderm und Mesoderm auch *in vitro* während der EB Entwicklung in einem geordneten zeitlichen Ablauf exprimiert (Tab. 2.1). So treten während der ersten zwei Tage der EB Entwicklung *in vitro* die Gene des primitiven Ektoderms *Oct3*, *Fgf-5* und *Nodal* in Erscheinung, welche *in vivo* vorherrschend während der Prägastrulationsphase (4,5-6,5 d *post conceptionem* (*p.c.*)) vor der Implantation des Embryos exprimiert werden (Leahy et al., 1999). Dieser Phase folgt an den Tagen 2 bis 5 der EB Entwicklung die Expression vieler Gene, die für die frühe Postimplantationsphase *in vivo* charakteristisch sind (6,5-7,0 d *p.c.*). Ihnen zugehörig sind die endodermalen Gene *vHNF1*, *HNF3 β* und *HNF4* sowie die frühen mesodermalen Marker *Brachyury*, *Gooseoid* und *BMP-4* (Rowedel et al., 2001). ES-Zellen der Maus durchlaufen in der Zellkultur also weitgehend das natürliche Entwicklungsprogramm eines Zelltyps im Organismus und können somit dazu herangezogen werden, inhibierende oder induzierende Effekte auf die frühen Differenzierungsprozesse embryonaler Stadien zu untersuchen.

		Tage der Differenzierung <i>in vitro</i> (d)										<i>In vivo</i> Expression (d.p.c.)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Embryonales Ektoderm	Oct-3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	0,5-8,5 ¹
	Fgf-5	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5,25-7,5 ¹
	Nodal		+	+	+	+	+	+	+	+	+	6,25-7,5 ¹
Embryonales Endoderm	vHNF1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,5 ³
	HNF3 β	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6,5 ³
	HNF4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,5 ³
Frühes Mesoderm	Brachyury	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	6,5-8,5 ¹
	Goosecoid	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	6-6,5 ²
	BMP-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6,5-8,5 ²

Tab. 2.1: Darstellung frühembryonaler Transkripte während der embryonalen Stammzellendifferenzierung *in vitro*

Zusammenstellung der Markergenexpression von embryonalem Ektoderm, Endoderm sowie frühem Mesoderm in *embryoid bodies*. Die Symbole - und + bedeuten entsprechend schwache sowie starke Expression, nd nicht gemessen und leeres Feld keine Expression (modifiziert nach Rohwedel et al., 2001; ¹ Leahy et al., 1999; ² Johannson und Wiles, 1995; ³ Abe et al., 1996)

Die spontane Ausreifung von ES-Zellen in der Zellkultur führt zu einem Gemisch aus diversen Zelltypen. Mit Hilfe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie genetischen Selektionsstrategien ist es in den letzten Jahren gelungen aus diesem Gemisch einzelne Zelltypen anzureichern und zu vermehren (Rohdewohld und Wobus, 2002). So konnte gezeigt werden, dass sich aus *in vitro* kultivierten ES-Zellen multiple Zelltypen einschließlich Herzmuskulatur (Wobus et al., 1991; Miller-Hance et al., 1993; Maltsev et al., 1993; Maltsev et al., 1994; Guan et al., 1999), Skelettmuskulatur (Miller-Hance et al., 1993; Rohwedel et al., 1994), Endothelzellen (Risau et al., 1988), Nervenzellen (Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strübing et al., 1995), hämatopoetische Zellen (Martin, 1981; Schmitt et al., 1991), Epithelzellen (Bagutti et al., 1996), glatte Muskelzellen (Drab et al., 1997) und Fettzellen (Dani et al., 1997) differenzieren. Weiterhin konnten diesen terminal differenzierten Zellen unterschiedliche funktionelle Eigenschaften zugeordnet werden. So wurden Herzmuskelzellen in Vorhof-, Kammer-, Purkinjefaser- und Schrittmacherzellen (Maltsev et al., 1993, 1994; Hescheler et al., 1997) sowie Nervenzellen als inhibitorische und exhibitorische (Strübing et al., 1995; Okabe et al., 1996) charakterisiert.

Obwohl die molekularen Mechanismen, die der Differenzierung in definierte Zelltypen zu Grunde liegen, nicht eindeutig geklärt sind, stellen ES-Zellen der Maus ein wichtiges Modell-

system der Entwicklungsbiologie dar. Da sie die Prozesse der frühen Embryonalentwicklung widerspiegeln, werden sie so zur Untersuchung der Differenzierung (Dushnik-Levinson und Benvenisty, 1995; Desbaillets et al., 2000; Boheler et al., 2002), in Zytotoxizitätstests (Rolletschek et al. 2004) sowie in Gen- und Chromosomenmutationsuntersuchungen (Maltsev et al., 1994; Wobus et al., 1998; Fijnvandrath et al., 2003) eingesetzt und liefern Erkenntnisse über die embryotoxische Wirkung chemischer Substanzen (Laschinski et al., 1991; Spielmann et al., 1997).

2.2 Kardiogenese

Während der murinen Embryogenese ist das Herz das erste Organ, das gebildet wird. Innerhalb des anterolateralen Mesoderms werden Vorläuferzellen bereits kurz nach der Gastrulation durch induzierende Signale des benachbarten Endoderms als plattenförmige Verdickung angelegt (Olson, 2006). Medial von jeder Herzplatte sondert sich aus dem viszeralem Mesoblasten jeweils ein Angiothelrohr (Endokardschlauch) heraus. Durch ventrale Einfaltung verschmelzen diese zum unpaaren Herzschlauch (Abb. 2.1). Bestehend aus dem Endokardschlauch und dem epimyokardialen Mantel, welche durch eine extrazelluläre Matrix (*cardiac jelly*) voneinander getrennt sind, generiert sich dieser im Mäuseembryo zwischen Tag 7,5 und 8 *p.c.* und zeigt erste Kontraktionen zwischen Tag 8,5 und 9 *p.c.* (Fishman und Chien, 1997).

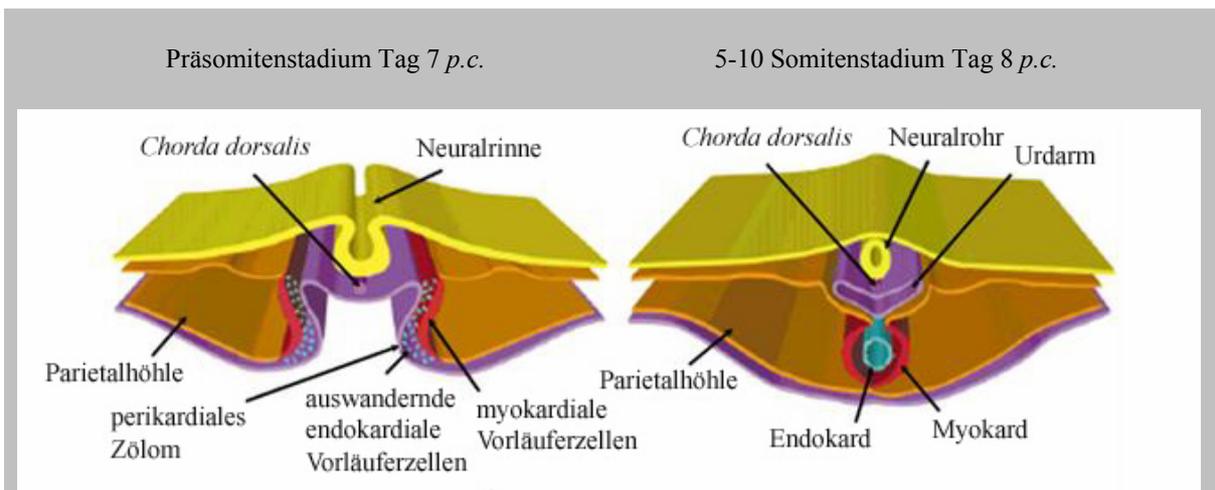


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Umbildung der paarigen Anlage des Herzens zum unpaaren Herzschlauch.

Die Bildung der paarigen Herzplatte mit dem Angiothelrohr (Graphik links) führt durch zunehmende Einfaltung und gegenseitige Näherung zur Vereinigung der beiden Anlagen und Bildung des unpaaren Herzschlauches (Graphik rechts). Modifiziert nach Lough und Sugi (2000).

Zu diesem Zeitpunkt sind alle essentiellen Komponenten, die für die rhythmische kontraktile Aktivität verantwortlich sind, vorzufinden. So sind die ersten Transkripte des sarkomeren Proteins alpha-Aktinin nach 7,5 Tagen *p.c.* nachweisbar (Sassoon et al., 1988; Sanchez et al., 1991). Bei der weiteren Differenzierung der Wand verschwindet die Herzgallerte, der Endokardschlauch wird zum Endokard und der epimyokardiale Mantel zum Epikard und Myokard. Herzspezifische Gene, die während der myokardialen Entwicklung temporär regulierte Expressionsmuster aufweisen, zeigen auch während der ES Zelldifferenzierung ein ähnliches Muster (Maltsev et al., 1993). So kodieren *messenger* Ribonukleinsäuren (mRNAs) herzspezifische Transkriptionsfaktoren bevor für die Myofibrillogenese kodierte mRNAs in Erscheinung treten (Tab. 2.2). *Messenger RNAs* des Homeodomainproteins Nkx2.5 sowie des Zinkfingerproteins GATA-4, die von kardialen Vorläuferzellen *in vivo* gebildet werden, sind die ersten herzspezifischen Gene, die auch während der ES-Zell Entwicklung exprimiert werden.

	Tage der Differenzierung (d)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nkx2.5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GATA-4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
α-MHC					-	+	+	+	+	+
β-MHC				-	-	+	+	+	+	+
SM-α Aktinin					-	-	+	+	+	+
ANF							+	+	+	+
MLC-2v					-	-	+	+	+	+
MLC-2A					-	+	+	+	+	+
SERCA 2						-	+	+	+	+
RyR2						-	+	+	+	+
Ncx1					-	-	+	+	+	+

Tab. 2.2: Darstellung herzmuskelspezifischer Transkripte während der embryonalen Stammzelldifferenzierung *in vitro*

Zusammenstellung herzspezifischer Gentranskripte an verschiedenen Differenzierungstagen während der ES-Zelldifferenzierung zu Kardiomyozyten. Untersuchte Transkripte beinhalteten die Transkriptionsfaktoren Nkx2,5 und Gata-4 sowie Marker des kontraktile Apparates α -, β -MHC-Myosin heavy chain, myosin light chain (MLC)2v und 2A, sarkomerisches alpha Aktinin sowie herzzellspezifische Marker wie den atrial natriuretic factor (ANF), die sarkomerische Ca²⁺-ATPase 2 (SERCA 2), den Typ 2 Ryanodin Rezeptor (RyR2) sowie den Natrium/Calcium Austauscher 1 (Ncx1). Die Symbole - bzw. + bedeuten entsprechend schwache sowie starke Expression und leeres Feld keine Expression. (modifiziert nach Boheler et al., 2002; Wei et al., 2005)

Die Expression des kardialen *Myosin heavy chain* (MHC) Gens *in vitro* tritt erstmalig am Differenzierungstag Vier in Erscheinung (Wobus und Guan, 1998). Das MHC ist das Hauptprotein des kontraktiven Apparates und wird bei Vertebraten von einer Multigenfamilie kodiert. Im Säugerherzen werden zwei Isoformen, das α - und das β -MHC exprimiert, deren Koexpression *in vivo* charakteristisch für ventrikuläre und atriale Zellen während der frühen embryonalen Herzentwicklung ist (Lompre et al., 1984; Mahdavi et al., 1984). Gene des ANF (*atrial natriuretic factor*) und des MLC-2v (*ventricle-specific myosin light chain 2*), die erst in spezialisierten Atrium- oder Ventrikelzellen exprimiert werden (O'Brien et al., 1993), zeigen in den ES-Zellen ihr verstärktes Expressionsmuster in der terminalen Differenzierungsphase *in vitro* (Fässler et al., 1996). Wie der kontrollierten Genexpression unterliegt die Anordnung sarkomerischer Proteine während der Myofibrillogenese einer zeitlichen Organisation und reflektiert somit die Ereignisse *in vivo* (Guan et al., 1999). Die „Kardiogenese“ embryonaler Stammzellen *in vitro* spiegelt somit die Prozesse der *in vivo* Kardiogenese wider. Aus embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten können wegen ihrer rhythmischen kontraktiven Aktivität leicht identifiziert und mikroskopisch betrachtet werden. Die Kardiomyogenese inhibierende bzw. induzierende Effekte sind somit durch diese Funktionalitätsüberprüfung einfach detektierbar und können zusätzlich auf molekularer Ebene untersucht werden.

2.3 Transkriptionsfaktoren, die die Kardiomyogenese beeinflussen

Über die Rolle von den Faktoren, die in die Kardiogenese eingreifen, ist bis heute nicht sehr viel bekannt. Der Wachstumsfaktor IGF-1 (*Insulin like Growth Factor-1*) und die Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und MEF2C scheinen für die Ausbildung eines funktionstüchtigen Herzens essentiell zu sein (Fishman und Chien, 1997). Zur Entwicklung des präkardialen Mesoderms bei Primaten tragen unter anderem bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), Insulin und IGFs bei, wobei eine Kombination aus BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein-2*) und FGF-4 (*Fibroblast Growth Factor-4*) die Kardiogenese im nicht präkardialen Mesoderm induziert (Antin et al., 1996; Lough und Sugi, 2000). TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor- β 1*) stimuliert die Bildung des kardialen Mesoderms und bFGF ist in die autoregulatorischen Proliferations- und Differenzierungsprozesse der Kardiomyozyten involviert (Muslin und Williams, 1991; Consigli und Joseph-Silverstein, 1991). Als Faktoren für die Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten *in vitro* konnten in unterschiedlichen Studien folgende Substanzen identifiziert werden:

Eine entscheidende Rolle für die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Herzmuskelzellen spielt der *Platelet Derived Growth Factor* – (PDGF) (Sachinidis et al., 2003a). Dabei ist seine biologisch aktive Form davon abhängig, welches Dimer die A und B Kette bildet (AA, AB, BB). Beim PDGF Rezeptor (PDGFR) handelt es sich ebenfalls um ein Dimer, jedoch wird die Komposition A-A, A-B, B-B erst nach Bindung des Liganden erreicht, ist also abhängig vom entsprechend vorliegenden Liganden. So konnte gezeigt werden, dass die PDGF-BB Formation eine Autophosphorylierung des PDGFR induziert, die eine Aktivierungskaskade an verschiedenen Proteinen auslöst, welche als Untergruppe zu den mitogen aktivierenden Proteinkinasen gehört (Ronnstrand et al., 1992).

Die Aktivierung von IR (Insulinrezeptoren) bzw. IGFR (*Insulin like Growth Factor Receptor*) durch Insulin oder IGF führt zu einer Tyrosinphosphorylierung an einer Vielzahl intrazellulärer Insulinrezeptorsubstrate, welche wiederum über diverse Signalkaskaden die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu frühen Kardiomyozyten stimulieren (Siddle et al., 2001; Sachinidis et al., 2003a).

Als ein weiterer auslösender Faktor für die kardiomyogene Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus erwies sich der *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) (Befahr et al., 2002). Sein entsprechender Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten und interagiert über die SMAD Familie als Transkriptionsfaktor (Miyazono, 2000). Als weiteres Mitglied der TGF- β Superfamilie fungiert das *Bone Morphogenic Protein 2* (BMP-2) als Richtungsgeber der kardialen Differenzierung (Monzen et al., 1999). So erhöhen TGF- β und BMP-2 neben der Expression mesodermaler Transkriptionsfaktoren, wie Brachyury, auch die der Marker der frühen und späten Kardiogenese wie Nkx2.5, GATA-4 und MEF2c durch Aktivierung der mitogen aktivierenden Protein (MAP) Kinase-Kaskade (Behfar et al., 2002). Innerhalb der EBs führen sie zur Bildung größerer Aggregate kardialen Ursprungs mit herkömmlicher sarkomerer Struktur.

Der *Fibroblast Growth Factor-beta* (FGF- β), auch bekannt als FGF-2, ist ein heparinbindender Wachstumsfaktor, welcher die Proliferation von Zellen mesodermalen Ursprungs und die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen unterstützt (Kawai et al., 2004). Die Bindung am Rezeptor führt zu Aktivierung von Protein-Tyrosinkinasen, die wiederum die Signale über die Aktivierung eines ras-G-Proteins und der MAP-Kinase-Kaskade weiterleiten (Ornitz und Itoh, 2001).

Wie die oben genannten Wachstumsfaktoren induziert auch das wasserlösliche Vitamin Ascorbinsäure die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten, welche mit einer deutlichen Expressionszunahme kardialer Markergene verbunden ist (Takahashi et al., 2003). Zwar ist der vollständige Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt, die oxidierenden Eigenschaften des Vitamins können in diesem Zusammenhang jedoch vernachlässigt werden (Takahashi et al., 2003).

2.4 Zellkulturbedingungen

Das physiologische Milieu einer Zelle in Kultur muss durch das Kulturmedium gewährleistet werden. Somit wird versucht dieselben Bedingungen *in vitro* zu reproduzieren, die *in vivo* gegeben sind. Hauptbestandteil des Zellkulturmediums ist das Basismedium, eine definierte Formulierung aus Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Salzen, Glukose und organischen Supplementen. Neben seiner Funktion als Nährstoffquelle dient es der Aufrechterhaltung der physikalisch-chemischen Konstanz, wie Osmolalität und pH.

2.4.1 Inhaltsstoffe des Basismediums

Aminosäuren sind die Grundlage der Proteinbiosynthese. Essentielle Aminosäuren kann die Zelle nicht selbst synthetisieren, sie müssen deshalb mit dem Medium zur Verfügung gestellt werden. Nicht-essentielle Aminosäuren werden zugesetzt, um die fehlende Synthesekapazität bestimmter Zellen auszugleichen. Diese entscheidende Entlastung des Zellstoffwechsels resultiert in einem besseren Wachstum der Zelle.

L-Glutamin spielt eine besondere Rolle und wird dem Basismedium zusätzlich zugeführt. Es unterstützt das Wachstum von Zellen die hohe Energieansprüche haben und große Mengen an Proteinen und Nukleinsäuren synthetisieren (Kovacevic und McGiven, 1983). Zellen, die sich schnell teilen oder Glukose ineffizient nutzen, dient es als alternative Energiequelle (News-holme et al., 1985). Um Nukleotide, Aminosäuren, Aminosucker und Vitamine bilden zu können, benötigen Zellen Stickstoff. Ammoniak ist eine anorganische Stickstoffquelle, welche primär als positiv geladenes Kation bei physiologischem pH-Wert vorliegt (Neu et al., 1996). Von Zellen benutzter Ammoniumstickstoff wird als Amin von Glutamat oder als Amid von Glutamin bereitgestellt. Diese beiden Aminosäuren bilden die Stickstoffreservoir. Reaktionen welche Stickstoff in Glutamat bzw. Glutamin einfügen benötigen Energie. Glutamat

wird aus Ammoniak und α -Ketoglutarat unter Verwendung von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) oder Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) synthetisiert. Glutamin wird mit Hilfe von Adenosintriphosphat (ATP) aus Glutamat und Ammoniak hergestellt. Glutamin Synthetase, das Enzym, das für die Glutamin Synthese verantwortlich ist, unterliegt starken Regulationen, um die Glutaminproduktion in den Zellen zu begrenzen. Glutamin enthält ein Stickstoffatom als Amid und ein Stickstoffatom als Amin und führt den Zellen Stickstoff in den Mengen zu, welche als freies Ammoniak toxisch wären. Glutaminamidstickstoff wird in der Synthese von NAD und NADP, Purinbasen und CTP von UTP verwendet. Ferner kann es zur Produktion von Carbamylphosphaten zur Synthese von Pyrimidinbasen verwendet werden. Als Vorläufer von Glutamat kann es zur Transaminierung zu α -Ketosäuren verwendet werden und andere Aminosäuren bilden. Wenn der Glukose Spiegel niedrig ist und Energie benötigt wird, können Zellen Aminosäuren zur Energiegewinnung verwenden. Dabei spielt Glutamin eine wichtige Rolle. Durch Glutaminasen wird es in Ammoniak und Glutamat gespalten. Das entstandene Glutamat wird durch Aspartat-Aminotransferasen zu α -Ketoglutarat katabolisiert und dem Zitronensäurezyklus zugesetzt.

Die Hauptenergiequelle des zellulären Stoffwechsels von Säugetieren ist Glukose. Während ihrer Verstoffwechslung werden entstehende Äquivalente zum Schutz der Zelle verwendet. In Abhängigkeit von Stresssignalen, wie die schnelle Oxidation von NADPH zu NADP, schleust die Glukose-6-phosphat Dehydrogenase Glukose Metabolite in den Pentosephosphatzyklus, welcher von NADP angetrieben wird (Stryer, 1988). Bei ausreichender bzw. übermäßiger Glukosezufuhr, wird sowohl durch Glykolyse als auch durch den Pentosephosphatweg Glukose zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) abgebaut. Mittels Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase wird das Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Pyruvat umgewandelt, wenn ausreichend oxidiertes zytoplasmatisches NAD vorliegt. Nach Reduktion des NAD zu NADH kann es nun über verschiedene Shuttlesysteme in die Mitochondrien verbracht werden. Einen der wichtigsten Shuttles stellt der Aspartat-Malat Shuttle dar, welcher durch die Umwandlung von Glutamin zu Glutamat in den Mitochondrien angetrieben wird. Dieser Aspartat-Malat-Shuttle arbeitet effizient und liefert reduzierende Äquivalente direkt zur Elektronentransportkette für die ATP Produktion. Die Umwandlung von G3P zu Pyruvat produziert ATP. Pyruvat kann in die Mitochondrien eintreten und wird so dem Zitronensäurezyklus zur Verfügung gestellt, kann aber auch dazu benutzt werden, um zytoplasmatisches NADH zu oxidieren oder Hydrogen Peroxide zu inaktivieren. Eine der Schwierigkeiten in der Zellkultur liegt darin den Glukoselevel so zu halten, dass es den Zellen erlaubt sich selbst zu verteidigen und metabolische Energie effizient, ohne die Anhäufung toxischer Metabolite wie Milchsäure

zu nutzen. Um dieses Problem zu lösen, sollte das Zellkulturmedium kontinuierlich erneuert und gewechselt werden (Hu und Europa, 2000).

Anorganische Salze sind unerlässlich für Wachstum und Stoffwechsel, aber auch für die Stabilität der Zellmembran gegenüber osmotischen Änderungen. Zusätzlich puffern die Phosphate und Hydrogenkarbonatkonformationen Schwankungen des pH-Wertes in der Umgebung ab, welche durch Stoffwechsel-Endprodukte entstehen können. Um mögliche pH-Veränderungen sofort visuell erkennen zu können, wird dem Medium Phenolrot als pH-Indikator zugesetzt.

Vitamine, vor allem die des B-Komplexes, dienen als vielseitige Katalysatoren des zellulären Stoffwechsels und werden dem Kulturmedium entsprechend der Empfehlungen der *Tissue Culture Association* (Morten, 1970) zugeführt, um den speziellen Bedarf der Zellen abzudecken.

Das Basismedium unterstützt jedoch das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung nicht allein, sondern wird in der Regel mit tierischem Serum, gewöhnlich Fötale Bovines Serum (FBS) in einer Konzentration von 5-20 % supplementiert. Aufgrund der hohen Sensibilität embryonaler Stammzellen gegenüber kargen Kulturbedingungen (Roach und McNeish, 2002), müssen neben der Substitution von Serum, auch Aminosäuren sowie Antioxidantien zugeführt werden.

2.4.2 Fötale Kälberserum und seine Zusammensetzung

Fötale Bovines Serum (FBS) stellt bis heute ein häufig verwendetes Supplement in Zellkultursystemen dar. Über 1000 verschiedenen Komponenten wurden im Serum nachgewiesen, darunter Proteine, Elektrolyte, Lipide, Kohlenhydrate, Hormone und Enzyme. Serum beinhaltet weiterhin Wachstumsfaktoren, Nutritiva für Proliferation und Differenzierung, Faktoren zum Binden und Inaktivieren toxischer Substanzen wie Proteasen und freie Radikale, sowie Anheftungsfaktoren (Lambert und Birch, 1985). Zusätzlich dient es der Aufrechterhaltung der Membranpermeabilität und fungiert als Carrier für Lipide, Enzyme, Mikronährstoffe und Spurenelemente in die Zelle. Schließlich minimieren die im Serum enthaltenen Proteine die nicht spezifische Absorption an Kulturgefäße und haben Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften des Kultursystems, wie pH, Scherstress, Viskosität und Osmolarität (Jayme et al., 1988). Für die Entwicklung der undifferenzierten ES-Zellen zu differenzierten Herzmuskel-

zellen ist es bis heute erforderlich, dem Kulturmedium fötales Kälberserum zuzugeben. Als unersetzliches Additiv fördert es neben der Adhäsion, die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen. Da Serum im Allgemeinen eine unklar definierte Komponente mit hoher Chargenvariabilität im Kulturmedien darstellt, widerspricht seine Verwendung den Bemühungen um eine Standardisierung von Zellkulturprotokollen im Sinne einer *Good Cell Culture Practice* (Hartung et al., 2002).

2.4.3 Fötales Kälberserum und seine Vorteile

Als Hauptbestandteile des Serums werden die Proteine der Albumin- und Globulinklasse angesehen. Albumin gilt als Haupttransportprotein von hydrophoben Substanzen und Kationen und ist durch seine Puffereigenschaften ein der Zellkultur förderliches Protein (Iscove und Melchers, 1978). Das zur Globulinklasse gehörende Fibronectin dient als universelles Adhäsionsmolekül, das Zellen an Kollagen oder Proteoglykan bindet. Darüber hinaus ist es verantwortlich für die Integration der Zellen in die extrazelluläre Matrix, indem es deren Bestandteile mit membranständigen Fibronectin-Rezeptoren auf der Zellmembran verknüpft (Johansson et al., 1997). Das zu 40-50 % im Kälberserum vorkommende α 1-Globulin Fetuin bewirkt neben der verbesserten Anhaftung von Zellkulturen an die Oberfläche auch eine effektive Trypsininhibition durch irreversible Bindung (Galembeck und Cann, 1974). Des Weiteren konnte ein positiver Effekt auf Zellen der glatten Muskulatur von Gefäßen nachgewiesen werden. So sterben sie den programmierten Zelltod, wenn sie in Nährlösung mit leicht erhöhtem Kalzium- und Phosphatgehalt gehalten werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Zellen durch regen Vesikeltransport das kalzium- und phosphathaltige Medium rezyklieren. Fetuin im Medium verhindert, dass bei diesem zellulären Recycling Kalziumphosphate ausfallen und aus den Vesikeln austretendes Kalzium eine Stressantwort einleitet, die zur Apoptose führt (Reynolds et al., 2005). Das hämfreie, eisenbindende, einkettige Glykoprotein Transferrin bindet an extrazellulär gelegene Rezeptoren, und wird mittels rezeptormedierter Endozytose aufgenommen und vesikulär zu den Endosomen transportiert, wo es im sauren Milieu Fe(III)Ionen abgibt und wiederum rezykliert wird (Dautry-Varsat et al., 1983). Auch wirkt Transferrin auf das mikrobielle Wachstum hemmend, weil es durch seine hohe Affinität zu Fe(III) (Chelatbildung), dessen freie Konzentration die für Mikroorganismen lebenswichtig ist, so stark verringert, dass diese nicht mehr wachsen können (Goodsell, 2002).

Die größte Menge unter den im Serum transportierten Nährstoffen stellen die Lipide. Etwa 80 % der Lipide liegen als Glyzeride, Phospholipide und Cholesterinester an Globulin gebunden vor (Lipoproteine), während die unveresterten Fettsäuren überwiegend Albuminkomplexe bilden. Als langkettige aliphatische Monocarbonsäuren sind Fettsäuren für die Speicherung von Energie, die Zellregulation und die strukturelle Integrität von Zellen verantwortlich. Verestert an Prostaglandinen, Prostazyklinen, Thromboxanen, Phospho- und Glykolipiden stellen sie wichtige Gerüste dieser Moleküle dar. In tierischen Zellen gehören die meisten der Fettsäuren mit 16 oder mehr Kohlenstoffatomen zu einer der drei Hauptfamilien der Fettsäuren. Alle ungesättigten Fettsäuren sind vom n-3, n-6 oder n-9 Typ.

Substanzen, die die Zytokinese beeinflussen, werden im Allgemeinen als Zytokine bezeichnet. Darunter fallen neben Interleukinen und Interferonen auch die Wachstums- und Koloniebildungsfördernden- sowie die Tumornekrose-Faktoren. Diese zuckerhaltigen Polypeptide wirken, indem sie von einem Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle erkannt werden. Nur Zellen, die den spezifischen Rezeptor für den jeweiligen Liganden tragen, können auf das Signal reagieren. Dieser Rezeptor erzeugt bei Bindung an seinen Liganden durch Konformationsänderung im Inneren der Zelle ein Signal, das über weitere Signalübertragungen zur Aktivierung oder Abschaltung von Genen führt (Jans und Hassan, 1998). Viele der Wachstumsfaktoren binden an Rezeptoren, die über Guaninnucleotid-bindende Proteine (G-Proteine) die Phospholipase C in der Zellmembran aktivieren und Phosphatidylinosindiphosphat (IP₂) zu Diazylglycerin (DAG) und D-myo-inositoltrisphosphat (IP₃) spalten. IP₃ diffundiert dabei ins Zytoplasma, bindet an Kanälen des endoplasmatischen Retikulums und setzt Ca²⁺ frei, was wiederum Calmodulin aktiviert. Zusammen mit Diazylglycerin aktiviert Kalzium/Calmodulin eine Protein Kinase C, welche eine Protein Kinase Kaskade in Gang setzt, die viele Aspekte der Zellfunktion und Gentranskription reguliert. Durch die Kalziumfreisetzung wird ebenfalls die Calmodulin Kinase II aktiviert, welche direkt Transkriptionsfaktoren entstehen lässt. Andere Faktoren vermitteln ihre Aktionen über Tyrosinkinasen, Serin-Threonin-Kinasen oder zyklisches Adenosinmonophosphat (AMP), was wiederum zur Phosphorylierung von Funktionsproteinen führt und den steuernden Effekt anstößt.

2.4.4 Fötales Kälberserum und seine Nachteile

Das Kultivieren von Zellen hat sich seit der Arbeit von Henry Eagle seit über 50 Jahren nicht verändert (Eagle, 1955). Typischerweise wird ein synthetisches Basalmedium ausgewählt, um extrazelluläre und nutritive Bedürfnisse der Zellen zu stillen. Gewöhnlicherweise findet man in den Formulierungen der Basalmedien Vitamine, Aminosäuren, anorganische Salze und Kohlenhydrate. Für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen *in vitro* ist die Substitution von Serum zur klassischen Medienformulierung unerlässlich (Barnes und Sato, 1980; Gstraunthaler, 2003). Als eines der am meist eingesetzten Seren, wird die Verwendung von fötalem Kälberserum aufgrund wissenschaftlicher und ethischer Bedenken als kritisch angesehen (van der Valk et al., 2004). Als ein Nebenprodukt der Fleischindustrie, kann fötales Kälberserum nur dort in genügenden Mengen gewonnen werden, wo bei der Schlachtung trächtige Kühe anfallen. So können durch Epidemien in den großen Rinderweidegebieten, Trockenheit oder aus politischen sowie ökonomischen Gründen Engpässe beim Nachschub entstehen. Diese periodischen Fluktuationen auf dem Weltmarkt wirken sich neben der immer größeren Nachfrage bei limitierter Chargenverfügung bestimmend auf den Preis aus (Even et al., 2006). Nach einer Recherche schwankten die Kosten im Jahre 2007 zwischen \$35 und \$75 pro Liter FBS unter amerikanischen Anbietern (http://www.ams.usda.gov/LSMNpubs/pdf_monthly/pharm.pdf Oktober 2007). Da in den letzten Jahren ethische Bedenken gegenüber der Gewinnung und Produktion von fötalem Kälberserum geäußert worden sind, sollten im Sinne der 3Rs (*reduce, refine, replace*- Russel und Burch, 1959) die jährlichen Verbrauchszahlen von Rinderföten durch eine Reduktion im Verbrauch bzw. dem Ersatz von Serum gesenkt werden. Die Gewinnung des fötalen Kälberserums beginnt nach Eviszation des Tierkörpers an einem Ort mit keimfreier Umgebung. Nach Entnahme des Fötus aus dem Uterus und dem Abbinden der Umbilikalgefäße, folgt dessen Reinigung und Desinfektion. Durch kardiale Punktion (12-16 gauge Kanüle) wird mittels Vakuumpumpe oder Gravitationskraft das Blut der Föten aus dem schlagenden Herz gesammelt und gekühlt, um eine langsame Gerinnung zu erzielen (van der Valk et al., 2002). Ethisch bedenklich macht diese Prozedur, dass die Kälber keinerlei Form von Betäubung erhalten, bevor sie der Herzpunktion ausgesetzt sind (van der Valk et al., 2002). Jeder Fötus, in Abhängigkeit von seinem Alter, liefert 0,2 - 0,5 Liter Blut, wovon die Hälfte Serum ist. Der Annahme einer jährlichen Produktion von 500.000 Liter FBS zufolge werden über 1 Million Kälber in dieser Form geschlachtet (Jochems et al., 2002). Nach der Zentrifugation und Entfernung des Koagels wird das Serum einer Qualitätskontrolle unterzogen, bevor es in den Verkehr kommt. Die Einfuhr des Rohserums in die Europäische Region kann unbehandelt erfolgen, wenn es aus Regionen stammt,

deren Freiheit von den nachfolgend genannten Viren veterinärbehördlich attestiert wird, bzw. in denen keine Impfung gegen diese Virenformen erfolgt ist. Nähere EU-Importvoraussetzungen regelt die Verordnung (EG) Nr. 1174/2002. Wenigstens 17 verschiedene Virustypen können die Rinderplazenta passieren und sich damit im fetalen Blut wieder finden. Die bekanntesten dieser Viren sind das Bovine Herpesvirus 1 und 4, das Parvovirus, das Bovine Virusdiarrhoevirus sowie das Bovine Enterovirus. Hinzu kommt, sofern das Serum in der entsprechenden Weltgegend gewonnen wurde, die mögliche Kontamination mit dem Blue-Tongue-Virus, dem Akabanevirus, dem Riftvalley Fiebervirus sowie die mögliche Infektion der Mutterkühe mit Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE), welche mit der menschlichen Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung in Verbindung gebracht wird (*European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General*, 2000). Dies hat dazu geführt, dass alle Länder, in denen Serum gewonnen wird, die BSE-Freiheit ihrer Rinderbestände veterinärbehördlich zertifizieren müssen. Weiterhin kann es während des Gewinnungsprozesses und der Zentrifugation des fetalen Blutes zur Kontamination mit Bakterien und Mykoplasmen kommen. Die Sterilfiltration und die sorgfältige Kontrolle auf Sterilität des filtrierten Serums sind aus diesem Grunde ein wesentlicher Punkt in der Verantwortung des Herstellers. So muss Serum, welches nicht in der beschriebenen Weise zertifiziert ist, vorbehandelt werden. Derzeit stehen neben der Gamma-Bestrahlung von mindestens 30 kGray, alternativ eine Wärmebehandlung von 3 Stunden bei + 65 °C bzw. eine 3-stündige pH-Wert-Absenkung auf pH 5 zur Verfügung ((EG) Nr. 1774/2002). Eine mögliche Endotoxinbelastung des Serums ist im Zusammenhang mit der möglichen Kontamination des Rohserums mit gramnegativen Bakterien zu sehen. Nachlässigkeiten während der Gewinnung und Aufarbeitung des Serums resultieren oftmals in höheren Konzentrationen an Endotoxinen in den Serumchargen. Endotoxine stellen die Überreste der bakteriellen Zellwand dar und lassen sich auch über Filtration kaum aus dem Serum entfernen. Endotoxine, die zur Gruppe der Pyrogene gehören, können zum einen das Wachstum von Zellen negativ beeinflussen, zum anderen können sie bei der Herstellung therapeutischer Proteine ins Endprodukt gelangen und diese so für die arzneiliche Verwendung unbrauchbar machen (Even et al., 2006).

Alle Seren repräsentieren einen undefinierten Mix, in welchem die Zusammensetzung zwischen den einzelnen Chargen stark variiert (Price und Gregory, 1982; Barnes et al., 1987). So können sensitive Zellkulturmethoden, welche zur Gewinnung von quantitativen experimentellen Daten entworfen worden sind, zum Teil stark durch die Unterschiede der Serumbestandteile betroffen sein. 1975 evaluierten Honn et al. vier Serummetabolite in Bezug auf Variabilität und mögliche toxische Effekte in Zellkulturen. So zeigte die Analyse von Harnsäure,

Harnstoff, Bilirubin und Kreatinin 2-6fach unterschiedliche Konzentrationen in den untersuchten FBS Chargen. Als zweites Beispiel sei die Rolle von Cholesterol als wichtiger Adhäsionsfaktor für eine verbesserte Plattierungseffizienz aufgeführt. So schwankten die Cholesterolwerte zwischen 12 und 63 mg/dl bei 43 getesteten Chargen (Price und Gregory, 1982), was das Vertrauen auf eine gleich bleibende Plattierungseffizienz bei den unterschiedlichen Chargen in Frage stellt. Die Folge der sowohl quantitativ als auch qualitativen Unterschiede zwischen den Chargen macht die Standardisierung von Experimenten schwierig und fordert bei Chargenwechsel umfangreiche Testungen, um zu sichern, dass die neue Charge der vorangegangenen gleicht.

2.4.5 Serumreduktion mit Supplementierung

Die Fähigkeit pluripotenter embryonaler Stammzellen der Maus sich unter bestimmten Kulturbedingungen in somatische Zellen aller drei Keimblätter, unter anderem auch in kontrahierende Kardiomyozyten zu differenzieren (Doetschman et al., 1985; Wobus et al., 1991), ermöglichte es, sie für ein inzwischen anerkanntes *In-vitro*-Testmodell einzusetzen (Genschow et al., 2002). Als validierter Embryotoxizitätsassay benutzt der embryonale Stammzelltest (EST) neben der pluripotenten ES-Zelllinie D3 die permanente differenzierte Fibroblasten Zelllinie 3T3 Klon A31 und kann somit als tierversuchsfreies *In-vitro*-Testmodell angesehen werden (Spielmann et al., 1997). Um das embryotoxische Potential von Chemikalien in die drei Klassen der *In-Vivo*-Toxizität (nicht, schwach bzw. stark embryotoxisch) einzuordnen, werden sowohl die Hemmung des Wachstums als auch die Störung der Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten analysiert. Konzentrations-Wirkungsbeziehungen werden mittels Halbhemmkonzentrationen (IC_{50}) für die Endpunkte bestimmt und über ein biostatistisches, auf Diskriminanzanalyse beruhendes Prädiktionsmodell, das bei der ZEBET (Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) entwickelt wurde, ausgewertet (Genschow et al., 2002). In Anlehnung an das INVIT-TOX Protokoll Nr. 113 (Spielmann und Scholz, 1999), welches für den EST verwendet wird, wird dem Kulturmedium für eine effiziente kardiale Differenzierung und ein optimales Wachstum der ES-Zellen 20 % fötales Kälberserum zugesetzt. Diese Serumsubstitution wird ebenfalls von anderen Autoren beschrieben (Wobus et al., 2002). Da es sich bei Serum um eine komplexe Mischung mit zum Teil undefinierter Zusammensetzung und hoher Chargenvariabilität handelt, fällt es schwer solche Testsysteme zu standardisieren. Der Ersatz undefinierter Komponenten durch definierte Supplemente würde somit die Reproduzierbarkeit sol-

cher Tests verbessern, was zugleich den Protokollstransfer zu anderen Laboren erleichtern würde.

Derzeit gestaltet es sich schwierig Rückschlüsse aus den gewonnenen Ergebnissen *in vitro* auf erwartete Effekte *in vivo* zu ziehen (Verwei et al., 2006). Für eine Extrapolation der Daten ist es wichtig, die Konzentration ungebundener Testsubstanzen im Kulturmedium mit denen im Plasma in Korrelation zu setzen. In einer Studie von Gülden et al. (2003) wurde der Einfluss der Albuminkonzentration im Kulturmedium auf die Zytotoxizität bestimmter Testsubstanzen hin untersucht. So zeigte sich in 12 von 26 zu untersuchenden Substanzen eine Abnahme der zytotoxischen Effekte bei zunehmender Albuminkonzentration, während bei den anderen Fällen keine Beeinflussung zu detektieren war. Der Vorteil serumfreier Formulierungen liegt in der bekannten Zusammensetzung und der damit verbundenen gleichbleibenden Qualität und erübrigt somit die Testung unterschiedlicher Serumchargen vor dem Einsatz auf ihre Eignung. Ein Wegfall der Interferenz zwischen Testsubstanz und undefinierten Serumkomponenten würde zu einer verbesserten reproduzierenden Bioverfügbarkeit der Testsubstanz führen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie D3 wurden bei American Type Culture Collection (ATCC-LGC Promochem; Cat. No. CRL-1934; Wesel) kommerziell erworben.

3.1.2 Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Analysenwaage	A200S	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Tuttnauer 3870 ELV PV	Systemec, Wetzlar
CO ₂ Inkubator	TL-2448	Heraeus, Osterode
Durchflusszytometer	FACScan	Becton-Dickenson, Heidelberg
Elektrophoresesystem	Minitub Subcell GT	Bio Rad, Hercules, USA
Elektrophorese PowerSupply	ST 606 T	Gibco BRL, Karlsruhe
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Kamera	CCD Camera	Sony, Köln
Laborrührwerk	IKA – RW 15	Junke & Kunkel, Staufen
Mehrkanalpipette	Octapette	Costar, New York, USA
Neubauer Zählkammer	631-1130	VWR international, Darmstadt
PCR Thermocycler	mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Photomikroskop	Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Pipetten	Reference, variabel	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf, Hamburg
Plattenphotometer	OpsysMR	Dynex, Chantilly, USA
Reine Werkbank	LaminAir [®] TL 2448	Heraeus, Osterode
Schüttler	Mikrotiter Shaker	Dynatech, Denkendorf
Standzentrifuge	Minifuge RF	Heraeus, Osterode
Stoppuhr	TR118	Oregon Scientific, Neu-Isenburg
Tischzentrifuge	MIKRO 22R	Hettich, Tuttlingen
Transilluminator	2070	Kaiser Fototechnik, Buchen
Umkehrmikroskop	4730 12-9902	Zeiss, Oberkochen
UV-Spektrometer	UV-VIS 1202	Shimadzu, Duisburg
Vortex	VF2	Janke&Kunkel, Staufen
Wasserbad	Modell 1083	GFL, Burgwedel

3.1.3 Glas und Plastikware

Alle Instrumente und Materialien wurden steril eingesetzt. Unsterile Materialien bzw. wieder zu verwendende Instrumente wurden für 30 min bei 135 °C und 100 kPa autoklaviert (Standautoklav, Tuttnauer 3870 ELV PV, Systec, Wetzlar).

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Bakteriol. Petrischalen	Ø 10 cm	Greiner, Frickenhausen
Bakteriol. Petrischalen	Ø 6 cm	Greiner, Frickenhausen
Culture Slides	Falcon	Beckton-Dickenson, Heidelberg
Deckgläser	24x60 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmal-Schutzhandschuhe	TNT ®Blue large	Ansell, Red Bank, NJ, USA
FACS-Röhrchen	6 ml Falcon	Beckton-Dickenson, Heidelberg
Färbesystem	631-9321/28/29	VWR international, Darmstadt
Magnetrührstab	zylindrisch, 0,5/ 5 cm	Merck Eurolab, Darmstadt
Messkolben	Duran 5 l	Schott, Mainz
Messzylinder	Duran 1 l	Schott, Mainz
MicroAmp™	<i>Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode and Optical Adhesive Films</i>	AP Applied Biosystems CA, USA
Pasteurpipetten	15 cm, Glas	Brand, Wertheim
PCR Gefäße	0,2 ml, 8-er Strips	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	gestopft 10/ 100/ 100 µl	MBP, San Diego, CA, USA
Pipettenspitzen	Standartips, 20/ 100/ 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswischtücher	10 x 10 cm	Kimberly Clark, Koblenz
Reaktionsgefäße	<i>Safe Lock</i> , 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Wägeschälchen	44x44 mm	VWR international, Darmstadt
Zellkulturflaschen	25 cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturpetrischalen	Ø 6 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten	24-Loch	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten	96-Loch	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen	15 ml und 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Aceton	<i>Baker Analyzed ACS</i>	Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Agarose	<i>for routine use</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ascorbinsäure	l-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
bFGF	<i>rec. human FGF basic</i>	Strathmann, Bovenau
BMP-2	<i>rec. human BMP-2</i>	Strathmann, Bovenau

Material und Methoden

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Bovines Fibronectin	1 mg	Biochrom, Berlin
Bovines Serumalbumin	<i>Fraction V</i>	PAA, Pasching, Österreich
Bovines Transferrin	<i>Ig iron saturated</i>	Serologicals, Kankakee, IL, USA
<i>Chemical defined Lipid Concentration</i>	Liquid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Cellwash</i>	BD CellWASH™	Becton Dickenson, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat	DEPC ≤97%	Roth, Karlsruhe
DNase		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eisessig	≤ 99 %, zur Synthese	Roth, Karlsruhe
EDTA	59c-0633	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	<i>Baker absolut</i>	Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Estradiol	<i>powder, cell culture tested</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	500 µg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ExCyte®	<i>Growth Enhancement Media Supplement</i>	Serologicals, Kankakee, IL, USA
FBS	FBS 149ff. S0115	Biochrom, Berlin
Fetuin	<i>from fetal calf serum</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gelatine	<i>from porcine skin</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Gel loading buffer</i>		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gentamicin	10 mg/ml	Biochrom, Berlin
Insulin	<i>from bovine pancreas</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Iscove's Medium	F0465	Biochrom, Berlin
iScript™	<i>cDNA Synthesis Kit</i> <i>5x iScript Reaction Mix</i> Reverse Transkriptase Nuklease-freies Wasser	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Isopropanol	<i>2-Propanol Baker absoulout</i>	Baker, Phillipsburg, NJ, USA
L-Glutamin	200 mM	Biochrom, Berlin
LIF Esgro	<i>murine pure</i>	Chemicon, Billerica, MA, USA
Mercaptoethanol	<i>cell culture tested, liquid</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	<i>Baker absolut</i>	Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Mounting Medium	Vectashield	Vector, Burlingame, CA, USA
MTT	<i>powder, cell culture tested</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Non essential amino acid</i>	100-fach	Biochrom, Berlin
PBS	mit Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
PBS	ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
PDGF-BB	<i>rec. hum. PDGF-BB</i>	Strathmann, Bovenau
Penicillin/ Streptomycin	10000E/10000µg/ml	Biochrom, Berlin
PFA	<i>reagent grade crystalline</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNeasy Mini Kit	<i>Puffer RLT, RW1, RPE</i> <i>Rneasy Mini Spin Columns</i> <i>Collection Tubes</i>	Qiagen, Hilden
Salzsäure	1N (1mol/l)	Merck, Darmstadt

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Saponin (Quillaya Bark) SES A	<i>Sapogenin content</i> ≤ 10 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Biochrom, Berlin
<i>TaqMan</i> ® Universal PCR Master Mix	P/N 4324020	AP Applied Biosystems, CA, USA
TGF-α	<i>rec. hum. TGF-α</i>	Strathmann, Bovenau
TGF-β	<i>rec. hum. TGF-β</i>	Strathmann, Bovenau
Tris	PUFFERAN® ≥99,9 %,	Roth, Karlsruhe
Trypsin/ EDTA	0,05%/0,02%	Biochrom, Berlin
Ziegenerum	<i>Goat Serum Donor Herd USA Origin, sterile-filtered</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.5 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Spezifität	Isotyp	Hersteller
Monoklonal Anti-Maus sarcomeric MHC (MF 20)	Maus IgG2b kappa light chain	Hybridoma Zellbank IowaCity IA, USA
Polyklonal Biotin-SP-Anti- Maus IgG, FC Fragment	Ziege IgG,	Dianova, Hamburg
Polyklonal FITC konj. Anti Maus IgG + IgM (H+L) F(ab)2-Fragment	Ziege, IgG, F(ab)2-Fragment	Dianova, Hamburg
R- Phycoerythrin konj. Streptavidin		Dianova, Hamburg

3.1.6 Sonden und Primer für die Real Time PCR

Die Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden aus einer Internet Datenbank gewonnen (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Nucleotide, Genbank). Die Oligonukleotidsequenzen wurden mit dem Programm Primer Express 2.0 (AP Applied Biosystems, Weiterstadt) erstellt und die entsprechenden Primer und Sonden über TIB®MOLBIOL (Berlin) bzw. AP Applied Biosystems (Weiterstadt) bezogen. Die GAPDH Sonde war am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit dem Quencher TAMRA markiert. Die Wahl der Sonde für das α-MHC Gen fiel auf eine 3'-MGB Sonde (*minor groove binder*). Der Vorteil dieser Sonden zeichnet sich durch eine erhöhte Sequenzspezifität mit erhöhter Bindungsstabilität gegenüber einsträngigen *DNA-Targets* aus. Im Gegensatz zu herkömmlichen Sonden zeigen die kürzeren MGB-Sonden einen geringeren fluoreszierenden Hintergrund und sind sensitiver gegenüber Basenfehlpaarungen (Kutyavin et al., 1999). Das Sonden- und Primerdesign erfolgte aus-

schließlich nach den Richtlinien des *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix Protocol* (Applied Biosystems).

Gen	Sonde	Primer
MHC- α	TCTTGCCTCCTTTGCCT-MGB	GCTGATACCGGTGACAGTGGTA-fwd CCCGGTGGAGAGCAGACA-rev
GAPDH	TGCCAGCCTCGTCCCGTAGACAA	CGGCCGCATCTTCTTGTG-fwd TGACCAGGCGCCCAATAC-rev

3.1.7 Puffer und Lösungen

3.1.7.1 Puffer und Lösungen für den MTT-Test

MTT Lösung (5 mg/ml)	5 mg MTT gelöst in 1ml PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Lagerung bei -20 °C
MTT-Desorb Lösung	480 ml Isopropanol + 20 ml HCl(1N) Lagerung bei Raumtemperatur

3.1.7.2 Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie

Blocklösung	0,5 % Bovines Serumalbumin gelöst in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Lagerung bei 4 °C
Fibronectin	1 % Fibronectin gelöst in Reinstwasser Lagerung bei -20 °C
Methanol-Aceton-Lösung	6 ml Aceton gelöst in 14 ml Methanol Lagerung bei -20 °C

3.1.7.3 Puffer und Lösungen für die FACS-Analyse

Blocklösung	10 % Ziegen Serum gelöst in Waschlösung II Lagerung bei 4 °C
-------------	---

Material und Methoden

EDTA-Lösung	374 mg EDTA gelöst in 1 l PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Lagerung bei 4 °C
FBS-Lösung	5 % FBS gelöst in EDTA-Lösung Lagerung bei 4 °C
Paraformaldehydlösung	4 g Paraformaldehyd gelöst für 1 h bei 60 °C in 25 ml PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Lagerung bei -20 °C
Trypsininhibitionslösung	10 % FBS gelöst in EDTA-Lösung Lagerung bei 4 °C
Trypsinlösung	2 µl DNase gelöst in 1 ml Trypsin/EDTA Lagerung bei 4 °C
Waschlösung I	1 % Bovines Serumalbumin gelöst in EDTA-Lösung Lagerung bei 4 °C
Waschlösung II	1 % Bovines Serumalbumin + 0,15 % Saponin gelöst in EDTA-Lösung Lagerung bei 4 °C

3.1.7.4 Puffer und Lösungen für die RNA-Analyse

TAE Puffer	484 g Tris + 114 ml Eisessig + 200 ml EDTA (0,5 M) mit dd.H ₂ O auf 2 l aufgefüllt Lagerung bei RT
Agarose-Gel	0,08 % Ethidiumbromid + 1,5 % Agarose gelöst in TAE Puffer

3.1.7.5 Sonstige Lösungen

Gelatine	1 % Gelatine gelöst in Reinstwasser Autoklaviert bei 135 °C und 100 kPa für 30 min. Lagerung bei 4 °C
----------	---

3.1.8 Zellkulturmedien

Für die Subkultivierung und Differenzierung der embryonalen Stammzellen D3 zu Kardiomyozyten wurden folgende Kulturmedien verwendet. Die Medien wurden vor jedem Versuch unter der Reinraumbank hergestellt, in sterilen Glasflaschen bei 4 °C gelagert und vor ihrem Einsatz im Wasserbad auf 38 °C erhitzt. Der Einsatz von Penicillin und Streptomycin im ES-D3 Medium und ES Differenzierungsmedium ohne Supplementierung beruht auf das INVITTOX Protokoll Nr. 113 (Spielmann und Scholz, 1999). Laborinterne Versuche bezüglich geringerer Toxizität und geringerem Penetrationsvermögen in die Zellen begründen den Einsatz von Gentamicin im ES Differenzierungsmedium mit Supplementierung. Die verwendete Serumcharge wurde laborintern vor ihrer Verwendung auf ihre Eignung überprüft. Dafür wurde das zu testende Serum dem Kulturmedium in Konzentrationen bis zu 30% zugesetzt (Tessarollo, 2001).

ES-D3 Medium

15 % FBS
1 % nicht-essentielle Aminosäuren
50 U/ml Penicillin
50 µg/ml Streptomycin
0,1 mM β-Mercaptoethanol
2 nM Glutamin
1000 U/ml LIF
mit Iscove's Medium auf 100 %

ES Differenzierungsmedium ohne Supplementierung

FBS*
1 % nicht-essentielle Aminosäuren
50 U/ml Penicillin
50 µg/ml Streptomycin
0,1 mM β-Mercaptoethanol
2 nM Glutamin
mit Iscove's Medium auf 100 %

* FBS wurde je nach Testansatz zu 20 %, 15 %, 10 %, 5 % bzw. 2,5 % zugegeben

ES Differenzierungsmedium mit Supplementierung

FBS*
1 % nicht-essentielle Aminosäuren
50 U/ml Gentamicin
0,1 mM β-Mercaptoethanol
2 nM Glutamin
12,9 % Supplementenmix
mit Iscove's Medium auf 100 %

* FBS wurde je nach Testansatz zu 1 %, 0,5 % bzw. 0,25 % zugegeben

3.1.9 Zusammensetzung des Supplementenmix

Sämtliche Medienadditive wurden wie folgt unter der Reinraumbank hergestellt und in Aliquots bei entsprechender Temperatur gelagert.

Bezeichnung	Konzentration	Stammlösung	Zielkonzentration
Bovines Serumalbumin	100 mg/ml	gelöst in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Lagerung bei 4 °C	160 µg/ml
Fetuin	75 mg/ml	1000 mg gelöst in 13,33 ml dd.H ₂ O für 5 min bei 38,5 °C erwärmt Lagerung bei -20 °C	200 µg/ml
Chemical defined Lipid concentration	100fach	als Emulsion vorliegend Lagerung bei 4 °C	0,1fach
ExCyte®	100fach	als Emulsion vorliegend Lagerung bei 4 °C	1:1900
SES A	1000fach	gelöst in PBS Lagerung bei 4°C	1 fach
Bovines Tansferrin	1,5 mg/ml	179,4 mg gelöst in 119,6 ml Iscove´s Medium sterilfiltriert Lagerung bei 4 °C	150 µg/ml
TGF-β 1-5	2 µg/ml	5 µg gelöst in 100 µl Reinstwasser +2,4 ml Bovines Serumalbumin Lagerung bei -20 °C	2 ng/ml
Bovines Insulin	10 mg/ml	gelöst in Reinstwasser Lagerung bei -20 °C	500 ng/ml
BMP-2	4 µg/ml	25 µg gelöst in 100 µl Reinstwasser +6,15 ml Bovines Serumalbumin Lagerung bei -20 °C	4 ng/ml
bFGF	4 µg/ml	50 µg gelöst in 100 µl dd.H ₂ O +12,4 ml Bovines Serumalbumin Lagerung bei -20 °C	4 ng/ml

Material und Methoden

TGF- α	5 $\mu\text{g/ml}$	10 μg gelöst in 100 μl Reinstwasser +1,9 ml Bovines Serumalbumin Lagerung bei -20 °C	10 ng/ml
Estradiol	2 $\mu\text{g/ml}$	1 mg gelöst in 1 ml Ethanol + 49 ml Iscove's Medium sterilfiltriert und davon 200 μl +1800 μl Bovinem Serumalbumin Lagerung bei -20°C	20 pg/ml
L-Ascorbinsäure	50 mg/ml	503,6 mg gelöst in 10,1 ml Reinstwasser sterilfiltriert Lagerung bei -20 °C	50 $\mu\text{g/ml}$
PDGF-BB	5 $\mu\text{g/ml}$	10 μg gelöst in 100 μl Reinstwasser +1,9 ml Bovines Serumalbumin Lagerung bei -20 °C	5 ng/ml

3.2 Methoden

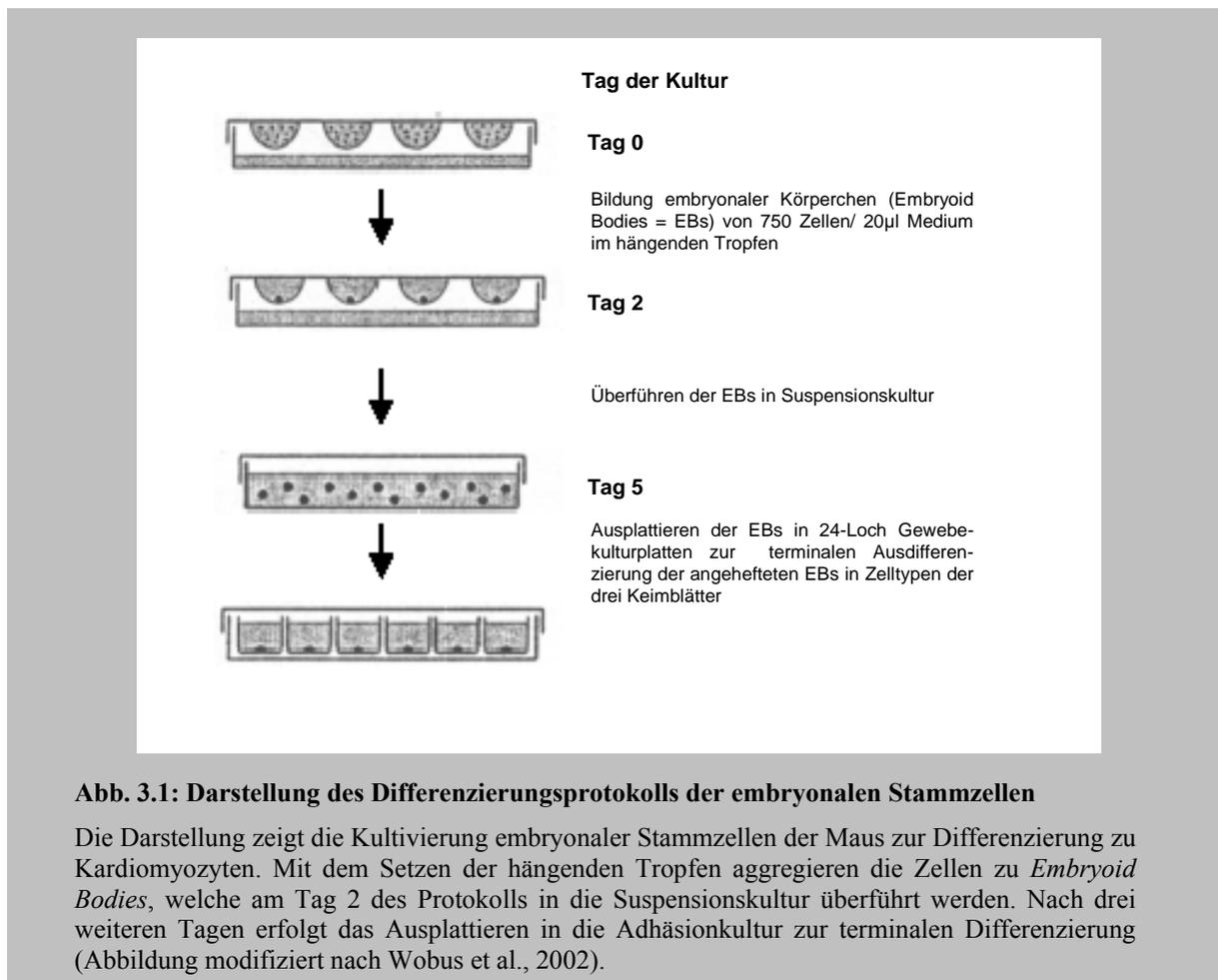
3.2.1 Passagieren der Zellen

ES-D3 Zellen wurden routinemäßig in 25 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % im Brutschrank kultiviert. Alle 2 -3 Tage wurden sie trypsiniert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Dazu wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, die Kulturen mit 5 ml PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und mit vorgewärmter 0,05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet. Nach zweiminütiger Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen gesammelt und in eine Einzelzellsuspension überführt. Nach Zentrifugation in einer Zentrifuge 900 RPM (Minifuge Heraeus, Rotor Cat.No.2150) für 10 min bei 4 °C wurde das Zellpellet in neuem Medium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl entweder in einem Versuchsansatz eingesetzt oder subkultiviert. Die ES-Zellen wurden in einer Zelldichte von 1x10⁶ Zellen/ Zellkulturflasche passagiert.

3.2.2 Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten in hängenden Tropfen

Die Kultivierung pluripotenter embryonaler Stammzellen ohne den Zusatz des *Leukemia inhibitory factor* (LIF) fördert die spontane Differenzierung und die Bildung von Zellaggregaten. Durch die Anwendung eines Kultursystems, in dem eine definierte Anzahl von Zellen in hängenden Tropfen aggregiert, entstehen *Embryoid Bodies* (EBs) mit gleicher Größe. Die ES-Zellen wurden wie in 3.2.1 beschrieben trypsiniert und eine Einzelzellsuspension in Differenzierungsmedium (ES Medium ohne LIF) hergestellt. Mittels Mehrkanalpipette wurden je 20 µl der Stammzellsuspension auf die innere Seite des Deckels einer bakteriologischen Petrischale (Ø100 mm), die 20 ml Reinstwasser enthielt, pipettiert. Nach Transfer des Deckels in seine richtige Position, wurden die Schalen bei 37 °C in einer 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre für drei Tage inkubiert. Die Zellsuspensionen hatten eine Dichte von 3,75 x 10⁴ Zellen/ml, was 750 Zellen/Tropfen entspricht. Am dritten Tag der Kultur wurden die Zellaggregate die sich am unteren Ende der hängenden Tropfen gebildet hatten, mittels 5 ml des ES-Mediums abgespült und in eine Suspensionskultur in bakteriologischen Petrischalen (Ø60 mm) transferiert. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37 °C in einer 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre für 48 Stunden im Brutschrank. Nach dieser Zeit erfolgte das Überführen der Suspensionkultur in die Adhäsionskultur. Dabei wurden die EBs vereinzelt mit 1 ml Kulturmedium auf die 24-

Loch Gewebekulturplatten aufgebracht, wo sie sich unter den zuvor beschriebenen Brutschrankbedingungen anhefteten und terminal differenzierten. Die Auswertung der ES-Zelldifferenzierung erfolgte täglich ab Differenzierungstag 7 unter dem Umkehrmikroskop. Der Prozentsatz der Plattenvertiefungen jeder Platte, in denen sich spontan kontrahierende Myokardzellen gebildet hatten, wurde bestimmt und mit dem Prozentsatz verglichen, der für die Kontrollgruppe gefunden wurde. Ein Experiment galt nur dann als auswertbar, wenn sich in den Kontrollen in mindestens 21 von 24 Plattenvertiefungen spontane Kontraktionen der EBs zeigten (INVITTOX Nr. 113, Spielmann und Scholz, 1999).



3.2.3 Immunzytochemische Untersuchung auf die Expression von *Myosin heavy chain*

Die Untersuchung der EBs der unterschiedlichen Testansätze auf die Expression von *Myosin heavy chain* (MHC) Proteinen erfolgt mittels indirekter Immunfluoreszenz. Als primärer Antikörper fungierte der monoklonale anti-MHC Antikörper MF20 (Hybridoma Zellbank, Iowa City, IA, USA), welcher mit dem FITC-konjugierten Antikörper (FITC-conj. Goat anti

mouse IgG and IgM, Dianova) reagierte. Für die morphologische Untersuchung der EBs wurden die ES-Zellen, wie in 3.2.2 beschrieben, mit der Methode der hängenden Tropfen kultiviert und am Differenzierungstag 3 in die Suspensionskultur überführt. Am fünften Tag wurden die EBs jeweils in die mit Fibronectin beschichteten Kammern der *Culture Slides* gebracht, in welche zuvor 1 ml Kulturmedium vorgelegt wurde. Zur Adhäsion und terminalen Differenzierung verblieben sie bei 37 °C in einer 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre bis zum immunzytochemischen Analysetag im Brutschrank. Das 5-minütige Waschen in PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ sowie das 10-minütige Fixieren in Methanol-Aceton-Lösung bei -20 °C diente als Vorbereitung und wurde durch anschließende Lufttrocknung unter der Reinraumbank vervollständigt. Nach dem Ablösen der Kammeraufsätze wurden die Zellen für 10 Minuten in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ rehydriert. Die Inkubation in einer Blocklösung für 15 Minuten diente dem Besetzen unspezifischer Bindungen. Dem kurzen Eintauchen in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ folgte das zweimalige Waschen in selbiger Lösung für jeweils 10 Minuten. Nach 1:20 Verdünnung des primären Antikörpers mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ wurden jeweils 10 µl auf die Zellen mit Ausnahme der Negativkontrolle aufgebracht. Diese wurde mit 10 µl PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ beschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen kurz in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ eingetaucht und anschließend zweimal für 10 Minuten in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. Nach Verdünnung des sekundären Antikörpers (Verdünnung 1:20) mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ wurde dieser in jeden Kammerbereich pipettiert. Die Antikörperreaktionszeit betrug 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Nach der Inkubation wurden die Zellen kurz in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ eingetaucht und in PBS-Lösung zweimal für 10 Minuten gewaschen. Vor der Abdeckung mit einem Glasplättchen wurde auf jedes Feld ein Tropfen Mounting Medium zum Zwecke der Intensivierung der Fluoreszenz und der Verhinderung der Austrocknung pipettiert. Bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Objektträger unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

Die Auswertung erfolgte durch Beurteilung der differenzierten Stammzellen und ihrer Färbung mit dem Photomikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen) bei 200-facher Vergrößerung. Mit Hilfe einer integrierten Fluoreszenzeinrichtung konnten die Fluoresceinkonjugate entsprechend ihrer grünen Fluoreszenz mit einer Anregungswelle von 450 nm und einer Emissionswellenlänge von 490 nm sichtbar gemacht werden. Mit der an das Mikroskop angeschlossenen CCD Camera (Sony) wurden Aufnahmen gemacht und diese mit der Software Scion Image[®] weiter bearbeitet und archiviert. Es wurden neben der Negativkontrolle 10 Aufnahmen von den Positivkontrollen angefertigt.

3.2.4 MTT-Test zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens embryonaler Stammzellen

Mit dem MTT-Test wird die Anzahl lebender Zellen durch die photometrische Messung ihrer Enzymaktivität bestimmt. Er beruht auf einer intrazellulären Reduktion durch mitochondriale Dehydrogenase-Enzyme, welche eine wasserlösliche, gelbe Tetrazoliumverbindung zu einem wasserunlöslichen blauvioletten Formazanprodukt konvertieren.

Dazu wurden jeweils 500 ES-Zellen in jede Vertiefung einer gelatinebeschichteten 96-Loch Zellkulturplatte gesät, mit 200 µl des entsprechenden ES-Kulturmediums überschichtet und je nach FBS Konzentration für 10 Tage (Serumreduktion ohne Supplementierung) bzw. 12 Tage (Serumreduktion mit Supplementierung) in Kultur bei 37 °C in einer 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre gehalten. Das Medium wurde an den Differenzierungstagen 3 und 5 der Kultur erneuert. An den Auswertungstagen wurde das Wachstumsverhalten der Zellen mit dem MTT-Test ermittelt. Dabei wurden jeweils 20 µl MTT Lösung (5 mg/ml) in die Vertiefungen der 96-Loch Zellkulturplatten pipettiert und diese für 5 Minuten geschüttelt (Mikrotiter Shaker, Dynatech, Denkendorf). Nach einer anschließenden Inkubationszeit von drei Stunden im Brutschrank wurde das MTT-haltige Kulturmedium entfernt, jeweils 100 µl MTT-Desorb Lösung in die Vertiefungen der 96-Loch Zellkulturplatten zugegeben und für 10 weitere Minuten geschüttelt.

Die Absorption des Formazans wurde in einem Plattenphotometer (OpsysMR, Dynex, Chantilly, USA) bei 570 nm gemessen. Die Menge an entstandenem, blauem Formazan ist ein Maß für die intakte Zellfunktion und verhält sich direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen. Unter Verwendung der Software *Revelation Quick Link* (Dynex, Chantilly, USA) konnte somit die optische Dichte (OD-Werte) ausgewertet werden. Für die unbehandelte Kontrolle des Proliferationstests werden für embryonale Stammzellen D3, bezogen von der ATCC, Referenzbereiche der optischen Dichte von 0,9 - 1,6 (Spielmann und Scholz, 1999) bzw. 0,50 – 1,6 (Seiler et al. 2004) angegeben.

3.2.5 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die FACS-Analyse bietet die Möglichkeit, die Expression von Proteinen quantitativ und schnell zu bestimmen. Dazu werden die Zellen mittels spezifischer Antikörper gegen intrazelluläre Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die Zellen senden, da sie fluoreszenzmarkiert sind, charakteristische Lichtsignale

aus. Mit Hilfe von Photodetektoren werden die Lichtstreuung und die Fluoreszenzintensität der Zellen detektiert und zur quantitativen Analyse in elektrische Signale umgewandelt.

Zur Etablierung des Protokolls für die Durchführung der Durchflusszytometrie von aus ES-Zellen differenzierten Kardiomyozyten, wurde die *Standard operating procedure* (SOP) der ZEBET (Seiler et al., 2006) übernommen und nach zahlreichen Vorversuchen modifiziert. So konnten durch eine Reduzierung der Waschvorgänge von 3 auf 1, bei gleichzeitiger Volumenerhöhung der Waschlösung von 1 ml auf 4 ml, Zellverluste sowie Zelldetritus minimiert werden. Konzentrationsfindungsversuche der Antikörper, sowie das Austesten verschiedener Antikörperverdünnungslösungen optimierten die Ergebnisse in den Vorversuchen. Die Geräteeigenschaften und das gesamte Testsystem in unserem Labor konnten mit freundlicher Unterstützung der ZEBET auf ihre Richtigkeit überprüft werden. So wurden laboreigene differenzierte embryonale Stammzellen sowohl im institutseigenen als auch im Durchflusszytometer der ZEBET getestet. Die parallele Kultivierung der gleichen Stammzellpassage durch die ZEBET und die anschließende FACS-Analyse, bestätigten die korrekte Durchführung des Protokolls und somit des gesamten Versuchsystems.

3.2.5.1 Testdurchführung

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die ES-Zellen, wie in 3.2.2 beschrieben, mit der Methode der hängenden Tropfen kultiviert und am Differenzierungstag 3 in die Suspensionskultur überführt. Am Differenzierungstag 5 wurden die EBs in die Zellkulturpetrischalen (Ø60mm) gebracht, in welche zuvor 5 ml frisches Medium vorgelegt wurde. Zur Adhäsion und terminalen Differenzierung verblieben sie bei 37 °C in einer 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre bis zum durchflusszytometrischen Analysetag im Brutschrank.

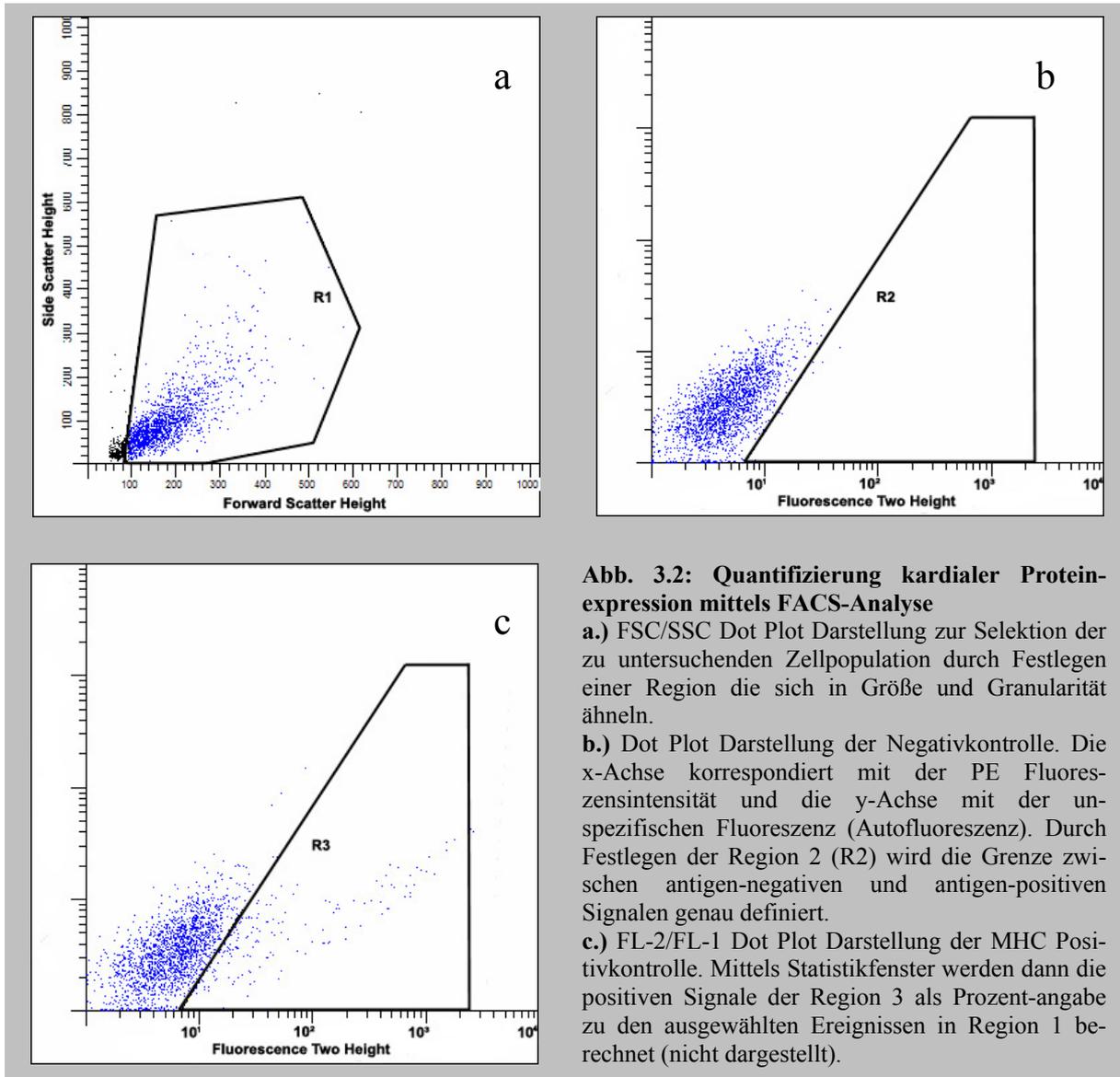
Die ES-Zellen wurden vom Medium in den Zellkulturpetrischalen befreit und in 10 ml PBS/EDTA gewaschen. Dem Absaugen der Flüssigkeit (Vakuumpumpe) folgten die Zugabe von 2 ml Trypsinlösung (inkl. DNase) und die Inkubation im Brutschrank für 30 Minuten. Die Inaktivierung der proteolytischen Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von 10 ml kalter (4 °C) Trypsininhibitionslösung erreicht. Mit einer Pipette wurden dann die Zellen von den Zellkulturpetrischalen abgesaugt und in die Zentrifugenröhrchen transferiert und vereinzelt. Dem Zentrifugieren in der Minifuge RF (200 g/5 min/4 °C) folgte, nach Verwerfen des Überstandes, ein Resuspendieren in 5 ml kalter FBS-Lösung für 30 Minuten auf Eis, um die Integrität der Zellmembranen wiederherzustellen. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 1400 g

und 4 °C in der Minifuge RF und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen zur Fixation in 500 µl Waschlösung I mit 500 µl Paraformaldehydlösung (4 %) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation für 25 Minuten auf Eis. Nach wiederholter Zentrifugation (Minifuge RF, 1400 g/5 min/4 °C) und Verwerfen des Überstandes, wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis in Blocklösung inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Während des Blockvorganges wurde die Zellsuspension mit der Neubauer Zählkammer gezählt, auf 3×10^5 Zellen eingestellt und jeweils auf vier FACS-Röhrchen (6 ml Falcon, BD, Heidelberg) verteilt, welche dann zentrifugiert (Minifuge RF, 1400 g/5 min/4 °C) und abschließend von der Blocklösung befreit wurden. Eine Verdünnung des primären anti-MHC Antikörper MF20 (Hybridoma Zellbank, Iowa City, IA, USA) 1:800 in Waschlösung II erfolgte kurz vor dessen Einsatz auf Eis. Für jeden Ansatz wurden in je drei FACS-Röhrchen (Dreifachbestimmung) 100 µl der Antikörperlösung vorgelegt und mittels Schüttler kurz (max. 5 sec.) vermischt. Für die Negativkontrolle wurde in einem FACS-Röhrchen 100 µl Waschlösung II pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde auf Eis. Dem Abzentrifugieren (1400 g/5 min/4 °C in der Minifuge) und dem Absaugen des Überstandes folgte ein Waschen in 4 ml Waschlösung II. Eine Durchmischung fand mittels Schüttler statt (leichter Druck max. 5 sec). An das wiederholte Zentrifugieren in der Minifuge (1400 g/ 5 min/ 4°C) und dem Absaugen mittels Vakuumpumpe schloß sich das Aufbringen des Biotin-SP-konj. Anti Maus Antikörper (100 µl, Verdünnung 1:1000, Dianova) und die Inkubation von 30 Minuten auf Eis an. Auch hier wurde die Durchmischung von Zellpellet und Antikörperlösung durch den Vortex erreicht. Dem wiederholten Waschvorgang folgte das Aufbringen des fluoreszierenden R-Phyco-erythrin konj. Streptavidin (100 µl, Verdünnung 1:600, Dianova), sowie das Inkubieren für 15 Minuten auf Eis bei Dunkelheit. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (Minifuge 1400 g/5 min/4 °C) und in 4 ml Waschlösung II gewaschen, nochmals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann folgte die Resuspendierung in 250 µl Waschlösung I und 250 µl Cell-WASH™. Zum Abschluss wurde die Messung von jeweils 30000 Zellen im FACScan (Becton Dickenson) zur Ermittlung des Anteils MF 20 positiver Zellen durchgeführt.

3.2.5.2 Prinzip und Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen

Das Durchflusszytometer (FACS-Gerät) ermöglicht die Analyse mehrerer Zellparameter einzelner Zellen in Suspension. Durch die Kombination von Laser und Photodetektoren für Streulicht und Fluoreszenz, erhält man Aussagen über morphologische und fluoreszierende Eigenschaften von Zellen. Über die Vernetzung mit einem Computer mit entsprechender

Auswertungssoftware (WinList Software, Verity Software House Inc., Topsham, USA) können die Daten in Form von Punktdiagrammen aufgetragen werden und die Häufigkeit der Ereignisse einer bestimmten Fluoreszenzintensität mittels Histogrammen ermittelt werden. Die Zellen werden nach dem Einbringen des Proberöhrchens über eine Stahlkapillare in die Meßküvette gesogen und passieren mit dem Flüssigkeitsstrom der Trägerlösung nacheinander den Analysepunkt. Am Analysepunkt kreuzt der Lichtstrahl des Lasers den Flüssigkeitsstrahl in einem Winkel von 90°. Das vorwärts (*forward light scatter* = FSC) und seitwärts (*sideward light scatter* = SSC) gestreute Licht wird von Photodetektoren gemessen. Der FSC-Detektor steht in gerader Linie zum Lichtstrahl, während der SSC-Detektor im rechten Winkel zum Laser angebracht ist. Die Signale des Vorwärtsstreulichtes geben Informationen über die Zellgröße. Durch das im rechten Winkel abgestreute Licht hingegen kann die Zelle bezüglich ihrer Granularität, Dichte und Oberflächenbeschaffenheit beurteilt werden. Das optische Signal der Fluoreszenz, angeregt mit Hilfe eines 488 nm Argon-Lasers, wird von Photodetektoren, die ebenfalls rechtwinklig zum Laserstrahl angeordnet sind, verarbeitet. Das Ergebnis der Durchflusszytometrie ist die Abgrenzung von Zellpopulationen, die durch verschiedene Werte des SSC und des FSC differenziert werden können (Abb. 3.2). Außerdem kann in diesen Zellpopulationen der prozentuale Anteil gezeigt werden, der das fluoreszenzmarkierte Antigen aufweist. Beim Erstellen von korrelierten Zweiparameterdarstellungen trägt man in einem Diagramm FSC gegen SSC auf, wodurch sich einzelne Populationen darstellen. Mit Hilfe der Negativkontrolle muss man die Population im FSC/SSC-Diagramm als gut abgrenzbare Wolke einstellen. Sehr kleine Partikel, z.B. Zelltrümmer kann man mit Einstellung der „*Threshold*“, mit der die Schwelle der Größe der zu erfassenden Partikel eingestellt wird, aus der Bearbeitung entfernen (Abb. 3.3). Im Weiteren stellt man die Fluoreszenz der Negativkontrolle ein. Da diese Negativkontrolle Zellen enthält, die nur mit dem Phycoerythin konjugiertem Streptavidin (PE) gefärbt sind, also nur unspezifische Bindungen des PE und die Eigenfluoreszenz zeigen, können die Anteile der Fluoreszenzen so eingestellt werden, dass die Negativkontrolle als Punktwolke (= „*Dot Blot*“) in der linken unteren Ecke und im Histogramm möglichst nahe an der y-Achse liegt. Misst man nun die Probe, sollte sich die Punktwolke, je nach Stärke der Fluoreszenz, in den roten Bereich (entlang der x-Achse) bewegen. Bei der quantitativen Auswertung kann man Eingrenzungen (= *Gates*) um bestimmte Anteile der Punktwolke legen. Der Computer errechnet dann über die Gesamtzahl der gemessenen Zellen den Anteil der rot-fluoreszierenden Zellen, die durch einen Antikörper gegen ein MHC-Sarkomer in den Zellen verursacht wird. Zur Auswertung werden jeweils 30000 Zellen in drei Ansätzen gezählt.



		FACScan Control Page				
		FCS	SSC	FL1	FL2	FL3
Detector		E00	324	624	550	553
Amplifier Gain		1.00	1.00			
Data Mode		LINEAR	LINEAR	LOG	LOG	LOG
Threshold Level		52				
Threshold Parameter		FCS				
Compensation		FL1-%FL2	FL2-%FL1	FL2-%FL3	FL3-%FL2	
		0.0	0.0	0.0	0.0	
Laser Power		15.2mW		Current	5.7amps	
Sheath Voltage		10.23volts				
Fluidics	Sheath Empty		NO	Waste Full	NO	
FACSMate	Present		YES			

Abb. 3.3: Übersicht der Parametereinstellung des FACScan

Zusammenfassung aller wichtigen Einstellungen des FACScan während der durchflusszytometrischen Analyse. FCS und SSC entsprechend *forward* und *side scatter*; FL1 Fluoreszenz für FITC; FL2 Fluoreszenz für PE; FL3 Fluoreszenz für PI; *Threshold Level* Einstellung der Größe der zu erfassenden Partikel

3.2.6 Detektierung herzmuskelzellspezifischer Transkripte mittels Real Time Reverse Transkriptase PCR

3.2.6.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert. Dabei wurden zunächst jeweils ca. 1×10^6 Zellen mittels 350 μ l eines Guanidiniumthiocyanat haltigen Puffers (Buffer RLT, Qiagen) aufgeschlossen, über eine QIAshredder Spinsäule homogenisiert und mit 350 μ l 70 %igem Ethanol zur Dehydratisierung vermischt. Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden die Proben in eine spezielle Zentrifugationssäule (RNeasy Mini Säule, Qiagen) überführt. Durch wiederholende Zentrifugationen (15 s bei 8000g) mit Zugabe entsprechender Puffer des Herstellers (Buffer RW1, Buffer RPE, Qiagen) wurde die RNA an einer hydratisierten Silicagelmembran adsorbiert und durch die Zugabe von 30 μ l DEPC-Wasser aufgelöst.

Die quantitative Analyse der totalen RNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers (UV-VIS 1202, Shimadzu) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf dem UV-Absorptionsmaximum der RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Mittels des Quotienten der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm wurden die Proben auf Verunreinigungen überprüft um diese gegebenenfalls von weiteren Analysen auszuschließen. Um die Integrität der gewonnenen RNA qualitativ zu beurteilen, wurden jeweils 1 μ g RNA mit 20 Vol % DNA-Ladepuffer ergänzt und gelelektrophoretisch in einem 1,5 %igem Agarose-Gel, unter Zusatz von 0,08 % Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte 20 Minuten bei 90 V in 1 x TAE-Elektrophoresepuffer; die 18s bzw. 28s Banden wurden anschließend bei 254 nm auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.2.6.2 Synthese von cDNA durch Reverse Transkription

Die Synthese komplementärer DNA-Kopien (engl.: complementary DNA= cDNA) aus der isolierten Gesamt-RNA der differenzierten Kardiomyozyten erfolgte mittels iScript™cDNA Synthesis Kit (BIO RAD, Hercules, CA, USA) laut Angaben des Herstellers. Dabei wurde pro Reaktion 1 μ g Gesamt-RNA mit 4 μ l des *iScript Reaction Mix*, 1 μ l *iScript Reverse Transkriptase* und Nuklease-Freies-Wasser auf ein Volumen von 20 μ l versetzt. Im PCR Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf) erfolgte die Aktivierung der Reaktion für 5 Minuten bei 25°C durch die Anlagerung der Hexamere, gefolgt von der Transkription durch die Reverse

Transkriptase für 30 min bei 42°C. Die Denaturierung der Doppelstränge für 5 Minuten bei 85°C beendete die Synthese.

3.2.6.3 Real Time Polymerasekettenreaktion (Real Time PCR) im Taq Man® Format

Die *Real-Time-quantitative-PCR* (RTQ-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die die zusätzliche Möglichkeit einer genauen Quantifizierung bietet. Wie in der herkömmlichen PCR wird dabei die vorgelegte cDNA durch vielfach wiederholte Denaturierung und Gegenstrangsynthese vervielfältigt. Die Spezifität einer klassischen PCR wird durch ein für das jeweilige Produkt ausgewähltes Primerpaar erreicht, wovon sich jeweils ein Primer an den zu ihm komplementären Template-Strang anlagert und durch die Polymerase verlängert wird. In der TaqMan-PCR kann bei Verwendung von Sonden die Spezifität der PCR durch die spezifische Sondenfrequenz noch einmal deutlich erhöht werden. Die Quantifizierung erreicht sie mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Eine Sonde, die an ihrem 5' Ende mit dem *reporter*-Fluoreszenzfarbstoff FAM (z.B. 6-carboxyfluorescein) und an ihrem 3' Ende mit dem *quencher*-Fluoreszenzfarbstoff TAMRA (z.B. 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) markiert ist, hybridisiert während eines PCR-Zyklus mit dem komplementären DNA-Strang zwischen den Primern. Dabei wird die Fluoreszenz des Reporterfluoreszenzfarbstoffes bei Anregung durch den *Quencher* nach dem Prinzip des *Förster resonance energy transfer (FRET)* unterdrückt. Die Taq-Polymerase, die zusätzlich zu ihrer Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, baut dann während der Synthese des Gegenstranges die Sonde am 5'-Ende ab, so dass sich dadurch Quencher und Reporter voneinander entfernen. Dieser größer werdende Abstand ermöglicht keinen strahlungsfreien Energietransfer mehr, womit nun eine Fluoreszenz ausgehend vom Reporter gemessen werden kann. Da die Fluoreszenz mit der Anzahl der entstehenden PCR-Produkte proportional zunimmt, kann somit am Ende eines Laufs die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen werden.

Für die quantitative PCR Analyse im TaqMan wurden für alle zu untersuchenden Proben die TaqMan® Universal PCR Master Mix Reagenzien benutzt (AP Applied Biosystems, Weiterstadt). Die PCR Reaktionsprodukte wurden während des Reaktionsverlaufs über die direkte Detektion der Erhöhung der Fluoreszenz in einem ABI PRISM® 7700 Sequenz Detektor (AP Applied Biosystems) gemessen. In jedem TaqMan Lauf wurden für alle Proben in Dreifachbestimmung sowohl die Expression des spezifischen Zielgens, die Expression der internen

Referenz GAPDH, die Standard-DNA-Kurven wie auch die Negativkontrollen (ohne DNA Template) ermittelt. Für einen Ansatz mit 23 μ l wurden folgende Komponenten pipettiert: 12.5 μ l 2x TaqMan® Universal PCR Master Mix (AP Applied Biosystems), 0.45 μ l Zielgen-Primer *fw* und *rev* (900nM), 0.0375 μ l Zielgen-Sonde (150 nM), 9.5625 μ l H₂O und 2 μ l cDNA. Die Reaktionen erfolgten in geschlossenen 96-Loch Reaktionsgefäßen (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, AP Applied Biosystems).

3.2.6.4 Quantifizierung der Genexpression

Die Genexpression des α -MHC und der internen Referenz GAPDH wurden nach Durchführung der RT-TaqMan PCR mittels ABI PRISM® *Sequence detection software*, Version 1.6.3. (AP Applied Biosystems, Weiterstadt) bestimmt. Zur Auswertung wurden die gemessenen C_T-Werte (Threshold-Cycle) jedes Gens mithilfe der Steigung der Standardkurve in relative Einheiten umgerechnet. Der C_T-Wert ist der PCR Zyklus, an dem die Amplifikationskurven das Detektionslimit überschreiten. Im nächsten Schritt wurde mit den Proben einer Platte eine Normierung zur endogenen Referenz GAPDH durchgeführt um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Da bei der Dreifachbestimmung von α -MHC und GAPDH die Proben in getrennten Reaktionsgefäßen amplifiziert wurden, wurden die Durchschnittswerte aus den Wiederholungen jeder Probe zunächst separat berechnet. Dann wurde für jede Probe ein normalisierter Wert gebildet, indem der Durchschnittswert von α -MHC durch den für GAPDH dividiert wurde. Um Unterschiede zwischen den einzelnen Platten auszuschließen wurden cDNA Proben von ES-Zellen (Differenzierungstag 12) als Kalibrator definiert und ebenfalls zur endogenen Referenz normalisiert. Schließlich wurden die normalisierten α -MHC Werte noch durch die normalisierten α -MHC Werte des Kalibrators dividiert.

3.2.7 Studiendesign und Statistik

Thema dieser Arbeit war es, die Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen der Linie D3 zu Kardiomyozyten unter serumreduzierten Kulturbedingungen zu charakterisieren. Die Etablierung neuer Endpunkte für die Untersuchung der *in-vitro*-Differenzierung stand im ersten Teilabschnitt im Vordergrund. Dazu wurde zunächst in fünf unabhängigen Versuchen das Differenzierungsverhalten der ES-Zellen unter 15 % FBS im Kulturmedium an den Differenzierungstagen 5 bis 10 mittels verschiedener Testsysteme untersucht. Im 24-Loch Funk-

tionstest wurden die Zellen im Umkehrmikroskop morphologisch ausgewertet und auf spontane Kontraktion untersucht. Die immunzytologische Markierung des kontraktilen Proteins *Myosin heavy chain* diente die Veränderungen in diesem Zeitfenster zu visualisieren und hatte einen rein deskriptiven Charakter. Um eine Quantifizierung der Differenzierung zu Kardiomyozyten zu erhalten, wurden die ES-Zellen immunfluoreszent gegen sarkomeres *Myosin heavy chain* markiert und durchflusszytometrisch in der FACS-Analyse untersucht. Als letzter Endpunkt wurde eine Analyse der α -MHC Expression mittels RT-PCR im TaqMan Format in dem Differenzierungszeitraum der Tage 5 bis 10 durchgeführt, um die Differenzierung auf RNA-Ebene zu analysieren. Für die Anwendung der neuen etablierten Endpunkte im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde statistisch versucht, den Differenzierungstag zu definieren, an dem diese Testsysteme zur Anwendung kommen. Aufgrund der geringen Stichprobengröße von $N = 5$ wurde die statistische Signifikanz mit Hilfe eines nichtparametrischen Tests überprüft, welcher keine Annahmen über die genaue Form der Verteilung der geprüften Merkmale macht. Mittels Binomialtest wurden die Ergebnisse der jeweiligen redundanten Messungen in Alternativdaten bei Überschreiten des Schwellenwertes überführt und somit die Nullhypothese gegen die Alternativhypothese getestet (Bortz und Lienert, 2003). Die Schwellenwerte in der 24-Loch Funktionsanalyse wurden entsprechend dem INVITTOX Protokoll Nr.113 (Spielmann und Scholz, 1999) entnommen (kontrahierende Areale innerhalb der EBs in mindestens 21 von 24 *wells*), die der FACS-Analyse der Studie von Seiler et al. (2006) (mindestens 5 % MF 20 positiv detektierte Zellen). Zur Beurteilung der etablierten Endpunkte auf Praktikabilität und Redundanz des Informationsgehaltes wurden die Messmethoden auf ihre Reliabilität bzw. auf ihre Validität überprüft. Die Reliabilität bezeichnet die formale Genauigkeit wissenschaftlicher Messungen. Reliable wissenschaftliche Ergebnisse sind frei von Zufallsfehlern, beispielsweise würde bei Wiederholung eines Experimentes unter gleichen Rahmenbedingungen das gleiche Messergebnis erzielt. Diese so genannte Retest-Reliabilität ist also ein Maß für die Replizierbarkeit der Ergebnisse unter gleichen Bedingungen. Neben der internen Übereinstimmung der verschiedenen Messmethoden (Reliabilität) lässt sich auch deren externe Übereinstimmung einschätzen. Wenn die Messdaten verschiedener Tests miteinander hoch korrelieren, so spricht man von konvergenter Validität. Alle betrachteten Messinstrumente messen dann in diesem Fall das gleiche Konstrukt bzw. Objekt. Für die interne und externe Übereinstimmung der Messmethoden wurden entsprechend der Anzahl der Messungen bzw. der Anzahl der Messmethoden die Daten in Rangfolgen geordnet und mittels Konkordanz-Koeffizient von Kendall bzw. die Rangkorrelation von Kendall auf deren Konkordanz bzw. Diskordanz bestimmt (Bortz und Lienert; 2003). Dabei werden bei der Betrachtung

tung von mehr als zwei Objekten Rangreihen gebildet, deren Rangplätze summiert und mittels Kendalls-Konkordanzkoeffizienten W auf deren Konkordanz überprüft. Bei der Betrachtung von zwei Objekten wurde eine der beiden Rangreihen in die natürliche Ordnung gebracht (1, 2, 3 ...) und an der zweiten eine Größe S bestimmt, welche angibt, wie viele von allen möglichen Paaren von Rängen der zweiten Reihe in der richtigen Ordnung zueinander stehen, d. h. die niedrigere Rangziffer über der höheren. Dieser Wert S wurde dem Maximalwert S_{max} gegenübergestellt, der bei vollkommener Übereinstimmung der Reihen erreicht werden konnte und somit die Rangkorrelation mittels Kendalls Tau berechnet.

Im zweiten Teilabschnitt dieser Arbeit wurden die neuen etablierten Endpunkte zur Charakterisierung der Differenzierung von mES-Zellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen angewendet und ein zuvor etabliertes Gemisch von Supplementen als Serumersatz beurteilt. Um die Effekte und die Grenzen der Serumreduktion zu demonstrieren, wurden in sieben unabhängigen Versuchen ES-Zellen in Konzentrationen von 20 %, 15 %, 10 %, 5 % und 2,5 % FBS kultiviert. Neben der Bestimmung des Proliferationsverhaltens mittels MTT-Test am Differenzierungstag Zehn, wurde das Differenzierungsverhalten der ES-Zellen zu Kardiomyozyten in einem Zeitfenster der Differenzierungstage 8 bis 10 mittels 24-Loch Funktionsanalyse beobachtet. Die indirekte Immunfluoreszenz am Differenzierungstag Acht sollte auch hier das Vorhandensein herzmuskelzellspezifischer Filamente visuell deutlich machen und somit den Nachweis für eventuelle Differenzierungsunterschiede erbringen. Mittels FACS-Analyse wurde am Differenzierungstag Acht eine Quantifizierung der Expression herzmuskelzellspezifischer Proteine vorgenommen. Die Durchführung der TaqMan PCR wurde zur Detektierung der α -MHC-Expression auf RNA-Ebene an den Differenzierungstagen 8 und 10 durchgeführt und sollte auch hier gewisse Unterschiede in der Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten unter serumreduzierten Kulturbedingungen aufzeigen. Lineare Zusammenhänge zwischen den FBS-Konzentrationen und den jeweiligen Ergebnissen der einzelnen Tests wurden anhand ihrer Produktmomentkorrelation nach Spearman auf ihre Signifikanz getestet und wurden zur besseren Veranschaulichung eingebracht.

In der letzten Testreihe sollte anhand 5 unabhängiger Versuche das Proliferations- und Differenzierungsverhalten embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten unter serumreduzierten Kulturbedingungen bei gleichzeitiger Supplementierung definierter Medienbestandteile gezeigt werden. Dem klassischen Kulturmedium wurde ein definierter Anteil Supplementenmix hinzugegeben und mit Serumkonzentrationen von 1 %, 0,5 %, 0,25 % sowie 0 % FBS substi-

tuiert. Als Positivkontrolle fungierte jeweils ein Standard-Kulturmedium mit 15 % FBS. Die in Kultur gehaltenen ES-Zellen wurden am Differenzierungstag Zwölf dem MTT-Proliferationstest unterzogen. Die Differenzierung wurde an den Tagen 8 bis 12 im 24-Loch Funktionstest morphologisch auf spontane Kontraktion ausgewertet. Die mikroskopische Darstellung kontraktiler Filamente wurde am Differenzierungstag Neun durchgeführt und hatte auch hier einen rein deskriptiven Charakter. Mit der FACS-Analyse am Differenzierungstag Neun sowie der Expressionsanalyse mittels TaqMan-PCR an den Differenzierungstagen 8, 10, 11 und 13 wurde das Differenzierungsverhalten der ES-Zellen auf die Expression herzmuskelzellspezifischer Strukturen sowohl auf Protein als auch auf RNA-Ebene quantifiziert. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse des 24-Loch Funktionstest und der FACS-Analyse wurde auch hier konservativ mittels Binomialtest überprüft. Dabei wurden wiederum die gewonnen Mittelwerte nach den Schwellenwerten dichotomisiert und ausgewertet.

Der Vergleich zwischen Serumreduktion mit und ohne Supplementierung wurde anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem *Post hoc Bonferroni* Test durchgeführt (Bortz, 1999). Zur korrekten Durchführung einer ANOVA wurde die Grundvoraussetzung auf Normalverteilung geprüft. Mittelwertsunterschiede des MTT-Proliferationstests, der 24-Loch Funktionsanalyse und der FACS-Analyse wurden so auf ihre Signifikanz getestet. Die Ergebnisse der TaqMan-PCR wurden aufgrund ihrer großen Streuung konservativ mittels Kolmogoroff-Smirnov-Omnibustest verglichen (Bortz und Lienert, 2003). Dabei wurden die Einzelwerte der zu untersuchenden Stichproben in Rangreihen geordnet und deren kumulierte relative Häufigkeiten bestimmt. Die im zweiten Abschnitt dieser Arbeit angewandten Untersuchungsmethoden sowie die Anzahl der Messungen, wurden auch hier auf ihre interne und externe Übereinstimmung überprüft. Dabei wurden die Messdaten wiederum in Rangfolgen geordnet und mittels Konkordanz Koeffizient von Kendall bzw. die Rangkorrelationen von Kendall auf deren Konkordanz bzw. Diskordanz bestimmt (Bortz und Lienert, 2003).

Die Auswertung der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten erfolgte mithilfe der Statistik Software SPSS® Version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) sowie dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel 2002 (Microsoft, Unterschleißheim).

Testreihe	Nr.	Test	Tag der Analyse	Anzahl wdh. Messungen	N gesamt
Differenzierungsverhalten Tag 5-10 bei 15 % FBS	Block 00	24-Loch Funktionstest	5-10	1	5
	Block 01.1/2	FACS Analyse	5-10	3	5
	Block 03.1/2	Real Time PCR	5-10	3	4
		Immunzytochemie	5-10		
Serumreduktion ohne Supplementierung	Block 02	24-Loch Funktionstest	8-10	1	7
	Block 04	FACS Analyse	8	3	7
	Block 07	MTT-Test	10	20	7
	Block 11	Real Time PCR	8, 10	3	7
	Block 14				
	Block 15	Immunzytochemie	8		
Serumreduktion mit Supplementierung		24-Loch Funktionstest	8-12	1	5
	Block 05	FACS Analyse	9	3	5
	Block 06	MTT-Test	12	20	5
	Block 10	Real Time PCR	8,10,11, 13	3	5
	Block 12	Immunzytochemie	9		

Tab. 3.1: Darstellung der Hauptversuche und die dabei angewandten Tests

Aufgelistet sind die drei verschiedenen Testreihen und deren Blocknummer. Eine Blocknummer bedeutet jeweils eine gesamte Versuchsdurchführung in den einzelnen Testreihen mit den entsprechend angewandten Tests an den entsprechenden Differenzierungstagen. Die Anzahl der Messungen beinhaltet die sich wiederholende Messredundanz innerhalb eines Messsystems an einem Untersuchungstag. Die Gesamtzahl N bezieht sich auf die Anzahl der sich wiederholenden unabhängigen Versuche

4 Ergebnisse

4.1 Kultivierung von embryonalen Stammzellen im hängenden Tropfen (ohne LIF) über 5, 6, 7, 8, 9 und 10 Tage unter Standard-Kulturbedingungen

In dieser Studie wurde die Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus unter Standard-Kulturbedingungen (15% FBS) charakterisiert. Der Verlust ihrer Pluripotenz aufgrund des sie kontrollierenden *Leukemia inhibitory factor* (LIF), ließ die ES-Zellen spontan in die verschiedensten Zelltypen differenzieren. Um die Differenzierung von murinen ES-Zellen in Kardiomyozyten zu untersuchen, sollten im ersten Abschnitt Endpunkte etabliert werden, die die Differenzierung zu Kardiomyozyten belegen. Im Hinblick auf die Anwendung der etablierten Endpunkte im zweiten Abschnitt dieser Arbeit, wurde mit statistischen Methoden versucht den Differenzierungstag zu identifizieren, an welchem die Expression kardialer Strukturproteine optimal nachzuweisen ist. Da sowohl Mittelwert als auch Streuung bei einer Stichprobengröße von $N = 5$ als statistische Maße stark anfällig gegenüber Ausreißern sind, schien eine Betrachtung auf einem dichotomen Datenniveau angebracht. Dabei verzichtet man auf die Information der konkreten Messwerte und prüft, ob der Messwert über oder unter dem Schwellenwert liegt. Da nur die Schwellenwerte für die 24-Loch Funktionsanalyse und für die FACS-Analyse aus der Literatur bekannt sind, wurden diese beiden Endpunkte als Entscheidungsgrundlage verwendet. In einem nächsten Schritt zählt man alle positiven und negativen Ergebnisse zusammen. Um die Zufallswahrscheinlichkeiten der ermittelten Häufigkeiten ($N = 5$) einzuschätzen, wird eine Binomialverteilung mit einer theoretischen Verteilung von 50/50 berechnet (Tab. 4.1).

Anzahl negativer Tests	Zufallswahrscheinlichkeit
0	3,1 %
1	15,6 %
2	31,3 %
3	31,3 %
4	15,6 %
5	3,1 %

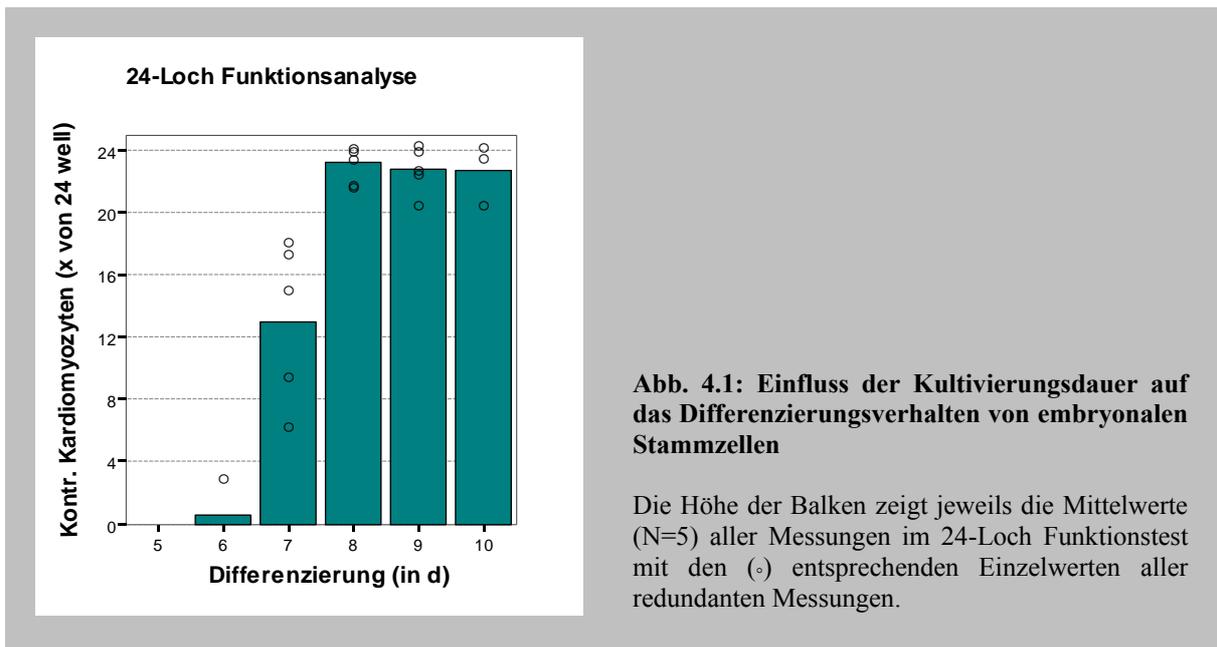
Tab. 4.1: Binomialverteilung bei einer Stichprobengröße von $N = 5$.

Die ermittelten Zufallswahrscheinlichkeiten beziehen sich auf eine theoretische Verteilung von 50/50. Negativ bedeutet der Schwellenwert wurde nicht erreicht. Die Schwellenwerte wurden entsprechend dem INVITTOX Protokoll Nr.113 (Spielmann und Scholz, 1999) entnommen (kontrahierende Areale innerhalb der EBs in mindestens 21 von 24 wells), die der FACS Analyse der Studie von Seiler et al. (2006) (mindestens 5 % MF 20 positiv detektierte Zellen).

4.1.1 Differenzierungstest

4.1.1.1 24-Loch Funktionstest

Nach Verlust ihrer Pluripotenz aufgrund des Entzugs des sie kontrollierenden Faktors LIF differenzierten die ES-Zellen spontan in die morphologisch verschiedensten Zelltypen. Die sich entwickelnden Kardiomyozyten wiesen rhythmische Kontraktionen auf und waren deshalb leicht zu identifizieren. Entsprechend der Aufgabenstellung sollte anhand der Funktionsfähigkeitsüberprüfung in den 24-Loch Platten ein Profil erstellt werden, welches das Differenzierungsvermögen der Stammzellen im Verlauf der Differenzierungstage 5 bis 10 unter 15 % FBS-Zusatz zeigt (Abb. 4.1). Spontan kontrahierende Areale innerhalb der EBs konnten erstmals am Differenzierungstag Sechs in der 24-Loch-Funktionsanalyse mikroskopisch detektiert werden. Bereits am folgenden Tag befanden sich im Mittel in über der Hälfte der 24-Loch-Platten kontrahierende Kardiomyozyten. Der Schwellenwert von 21 wurde am Differenzierungstag Acht erreicht und zeigte sich bis zum Differenzierungstag Zehn konstant.



4.1.1.2 Immunzytologische Untersuchungen

Die hier angewendete indirekte Immunzytochemie diente dem Ziel, exemplarisch die Entwicklung sarkomerer Strukturen der differenzierten Kardiomyozyten an den Differenzierungstagen 5 bis 10 unter 15 % Serumzusatz darzustellen. Darüber hinaus sollte die Spezifität des in der FACS-Analyse verwendeten Antikörpers geprüft werden. So wurden in den

einzelnen Versuchen jeweils fünf EBs pro Differenzierungstag auf acht Kammern der *Culture Slides* aufgebracht und an den Analysetagen untersucht. Als Erstantikörper wurde der monoklonale anti-MHC Antikörper MF20 Isotyp IgG2b (Hybridoma Zellbank, Iowa City, IA, USA) verwendet. Als Zweitantikörper wurde der mit FITC-konjugierte Anti Maus Antikörper (*FITC-conj. Goat anti mouse IgG and IgM*, Dianova.) eingesetzt. Unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers wurden durch Analysen von Negativkontrollen ohne primären Antikörper ausgeschlossen (Abb. 4.2 a und b). Dabei wurde in jeweils einer Kammer ohne primären Antikörper gearbeitet. Die differenzierten Kardiomyozyten wurden vor ihrer Fixation auf spontane Kontraktionen innerhalb der EBs mikroskopisch untersucht und zeigten alle ab Differenzierungstag Sieben spontan kontrahierende Areale. Die Anfärbung der Zellen bestätigte, dass lediglich in diesen Arealen sarkomere Strukturen nachzuweisen waren, womit der Anteil kontrahierender Zellen mit dem Anteil durch die Antikörper identifizierten Kardiomyozyten korrespondiert (Abb. 4.2 c und d).

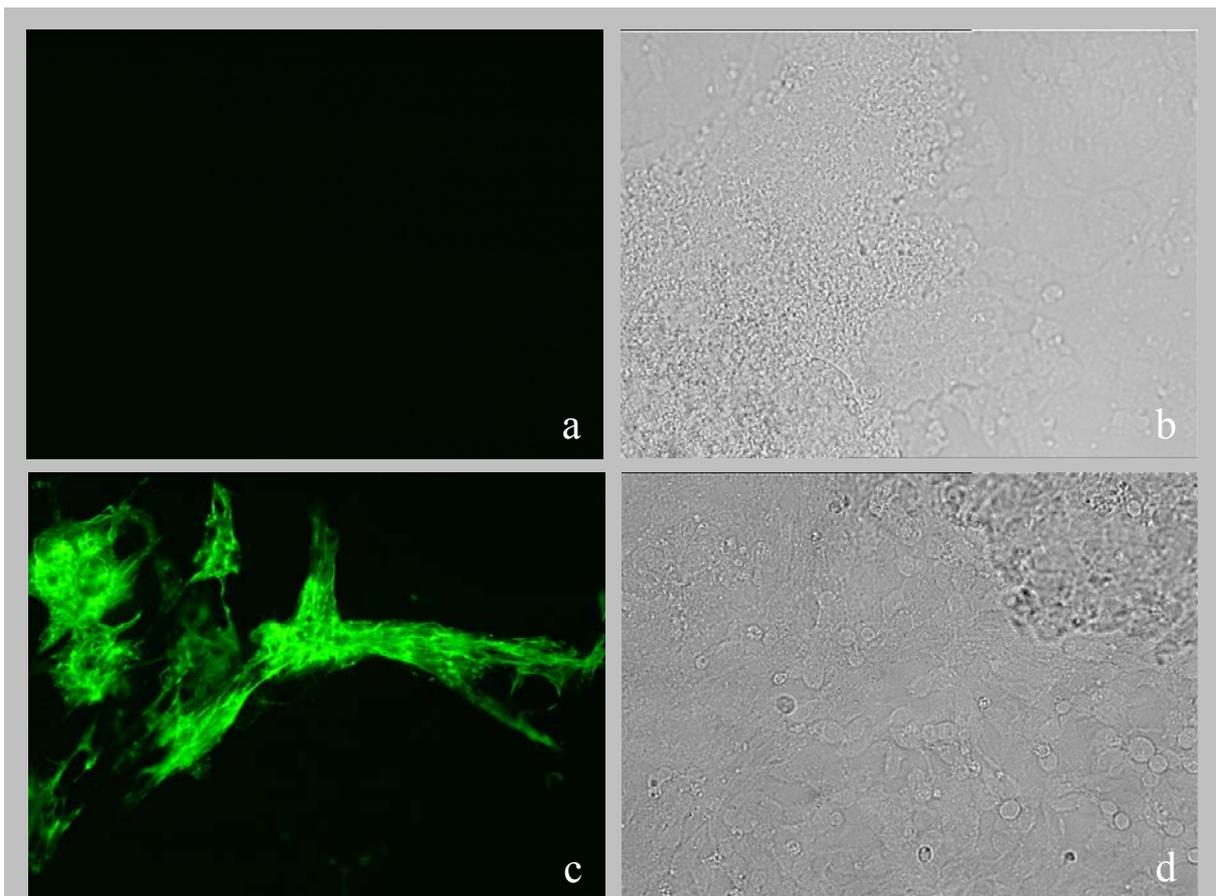


Abb. 4.2 a-d: Embryoid Bodies charakterisiert mittels Immunfluoreszenz und Nativaufnahme

Indirekte Immunfluoreszenz von *Myosin Heavy Chain* über Anti Maus IgG FITC konjugiert (Abb. 4.2 c). Vergrößerung: 200x Unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers wurden durch Analysen von Negativkontrollen ohne primären Antikörper ausgeschlossen (Abb 4.2 a). Die dazugehörigen Nativaufnahmen (Abb. 4.2 b und d) dienen dem Nachweis des Kardiomyozytenanteils innerhalb der EBs.

Nach dem Überführen der EBs von der Suspensionskultur in die Adhäsionskultur am Differenzierungstag Fünf (Abb. 4.3 a), sowie einen Tag später (Abb. 4.3 b) kann lediglich ein diffuses Leuchten im Zytoplasma der Zellen detektiert werden. Erstmals am Differenzierungstag Sieben sind dünne filamentäre Strukturen zwischen den Zellanhäufungen sichtbar (Abb.4.3 c). Ihre radialen Ausstrahlungen vernetzen sich zunehmend und zeigen am Differenzierungstag

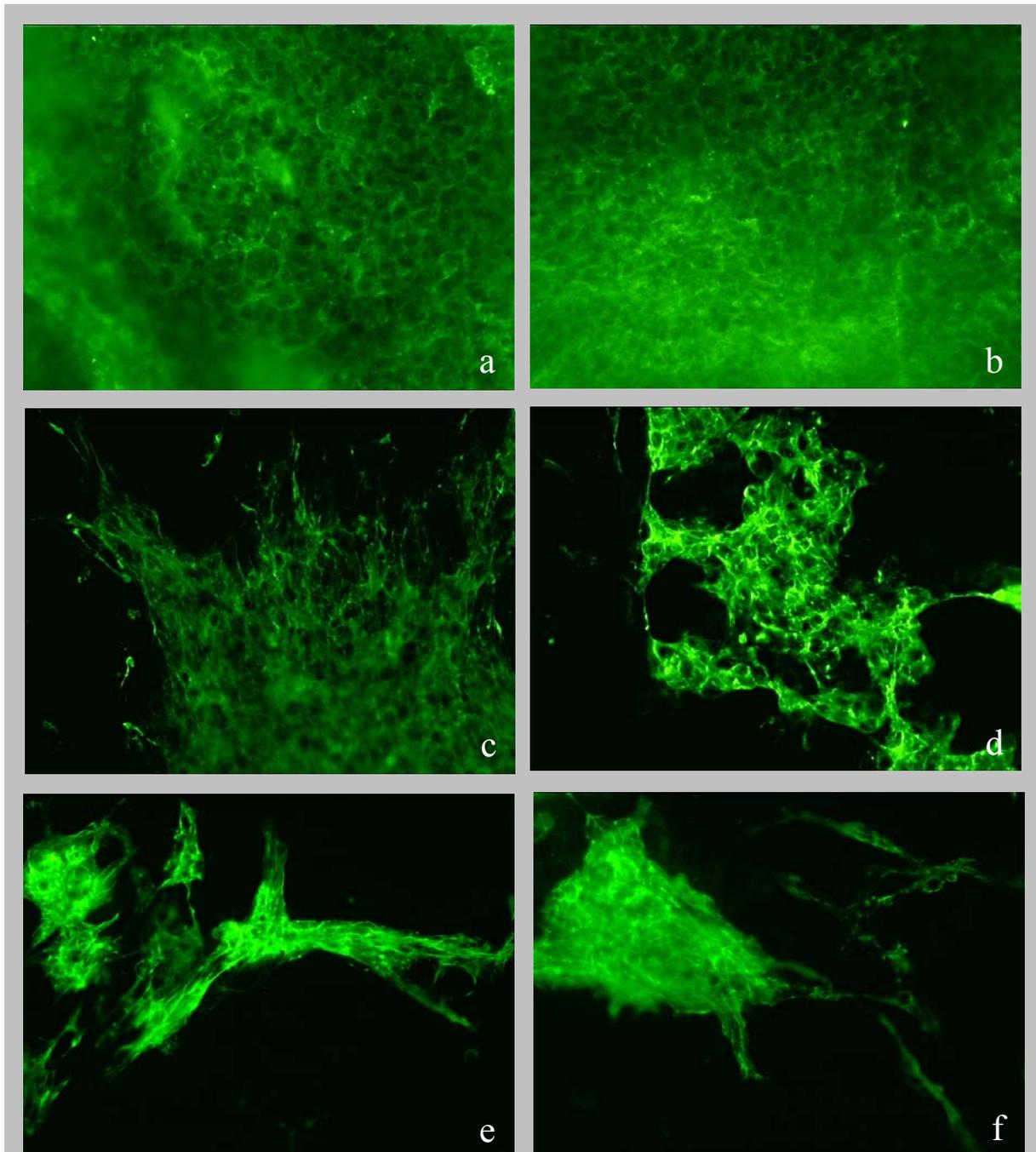


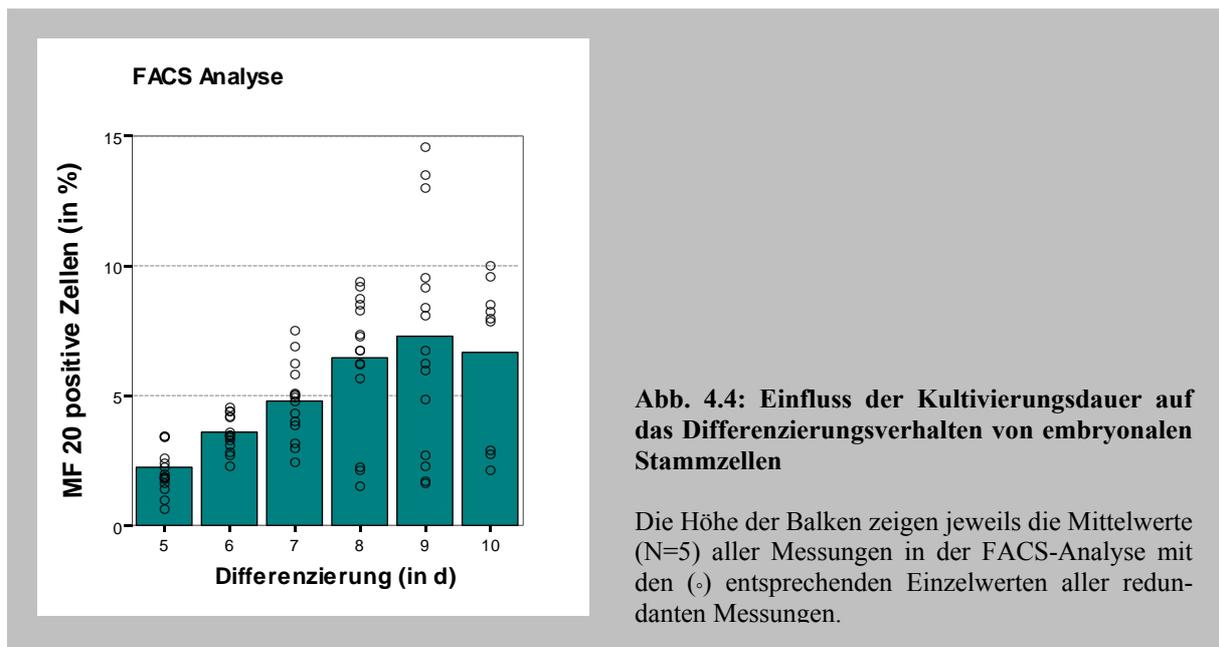
Abb. 4.3 a-f: Darstellung von embryonalen Stammzellen der Maus differenzierten Kardiomyozyten

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von *Myosin Heavy Chain* (1:20) über Anti Maus IgG FITC konjugiert (1:20). Vergrößerung: 200x. a-f. entsprechend der Differenzierungstage Fünf (a), Sechs (b), Sieben (c), Acht (d), Neun (e) und Zehn (f).

Acht eine deutliche Dickenzunahme mit einer stärker zunehmenden Intensität (Abb. 4.3 d). Eine strangartige Ausbildung filamentärer Strukturen ist ab Differenzierungstag Neun erkennbar (Abb. 4.3 e), was sich in der terminalen Phase am Differenzierungstag Zehn bei gleich bleibender Intensität fortsetzt und den Anschein einer parallel gerichteten Lagerung erweckt (Abb. 4.3 f).

4.1.1.3 FACS-Analyse

In der durchflusszytometrischen Analyse konnte mit zunehmender Differenzierungsdauer (Differenzierungstag Fünf bis Neun) eine Zunahme MF20 positiver Zellen ermittelt werden, die erstmals am Differenzierungstag Acht den Schwellenwert von 5 % erreichten und ihr Maximum am Tag Neun zeigten (Abb. 4.4).



4.1.1.4 Quantitative RT-PCR

Der Verlauf der α -MHC Expression innerhalb der EBs wurde zwischen den Differenzierungstagen Vier und Zehn mittels PCR-Analyse im TaqMan Format untersucht. Sich formierende EBs wurden an den entsprechenden Untersuchungstagen lysiert und die in ihnen enthaltene mRNA isoliert, quantifiziert und in cDNA umgeschrieben, welche nachfolgend mit den jeweilig spezifischen Sonden und Primern in einer TaqMan PCR eingesetzt wurde. Normiert zur

GAPDH-Expression zeigte sich beginnend am Differenzierungstag Fünf ein Anstieg der MHC Expression, welcher am Differenzierungstag Sieben sein Plateau erreichte (Abb. 4.5).

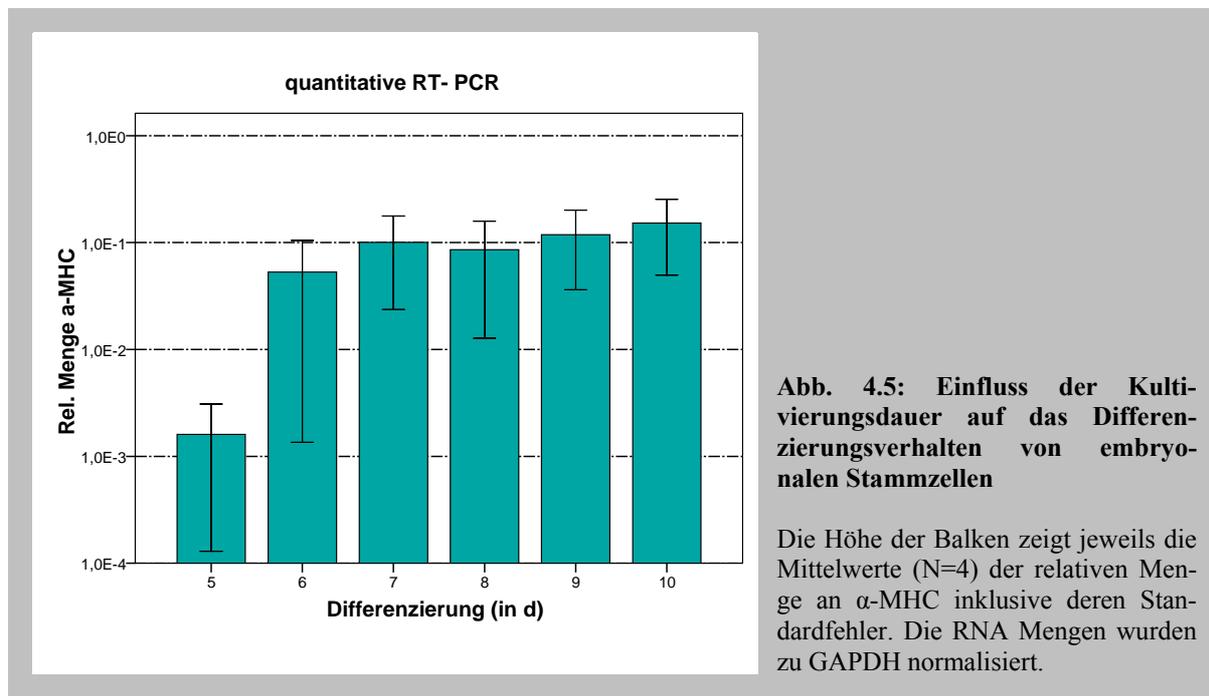


Abb. 4.5: Einfluss der Kultivierungsdauer auf das Differenzierungsverhalten von embryonalen Stammzellen

Die Höhe der Balken zeigt jeweils die Mittelwerte (N=4) der relativen Menge an α -MHC inklusive deren Standardfehler. Die RNA Mengen wurden zu GAPDH normalisiert.

4.1.2 Zufallswahrscheinlichkeiten der Ergebnisse des 24-Loch Funktionsstests und der FACS-Analyse

Mittels Binomialtest sollte der Differenzierungstag identifiziert werden, an dem die etablierten Messmethoden für die nachfolgenden Versuche zum Einsatz kommen sollten. Dabei werden die Testergebnisse durch Erreichen des Schwellenwertes dichotomisiert und deren Zufall anhand der Verteilung bestimmt (Tab. 4.1). So liegt bei der Berechnung der Binomialverteilung die Zufallswahrscheinlichkeit für die fünf positiven 24-Loch Funktionstests am Tag Acht bei lediglich 3,1 %. Zudem liegt die Zufallswahrscheinlichkeit für das Auftreten von fünf negativen Tests am Tag Sieben bei ebenfalls 3,1 %. Somit basiert die Identifikation des Tags Acht als optimaler Tag zur Analyse auf Beobachtungen, welche nur zu einem geringen Teil durch den Zufall erklärbar sind. Nach der Transformierung der Messdaten der FACS-Analyse auf ein dichotomes Datenniveau konnte am Differenzierungstag Acht eine Häufigkeit von positiven Testergebnissen beobachtet werden, welche zu 15,6 % mit dem Zufall vereinbar sind. Am Tag Sieben beobachtet man eine Zufallswahrscheinlichkeit von 31,3 % für das Auftreten von negativen Ergebnissen, an den Tagen Fünf und Sechs eine von 3,1 %. Da der Tag Neun keine besseren Ergebnisse als Tag Acht liefert, kann auch für die FACS-Analyse der Tag Acht als optimal identifiziert werden.

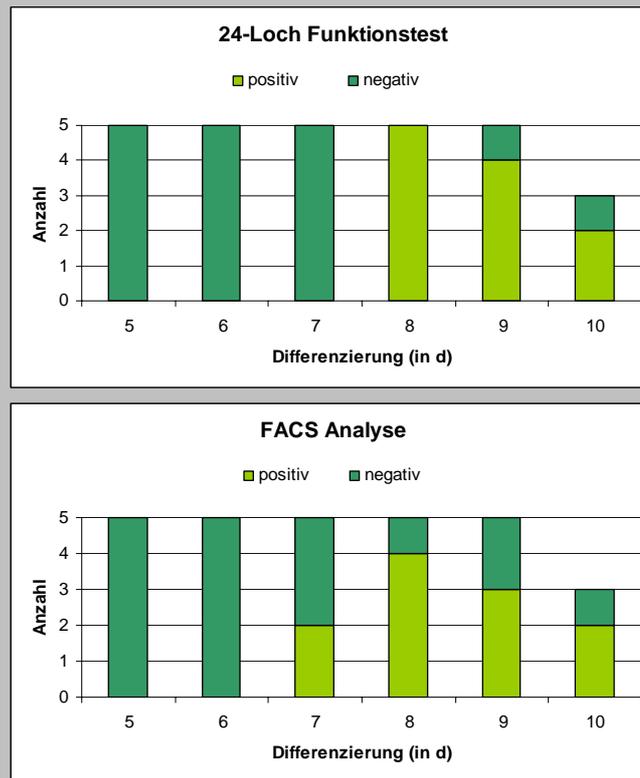


Abb. 4.6: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der positiven Testresultate bei den verschiedenen Versuchsreihen in der 24-Loch Funktionsanalyse bzw. in der FACS-Analyse.

Die Messergebnisse der 24-Loch Funktionsanalyse sowie der FACS-Analyse wurden anhand des Schwellenwertes auf ein dichotomes Datenniveau transformiert. Positiv bedeutet in diesem Fall den Schwellenwert von 21 von 24 in der 24-Loch Funktionsanalyse bzw. >5 % MF20 positive Zellen in der FACS-Analyse erreicht. Negativ bedeutet, dass der Schwellenwert nicht erreicht wurde.

4.1.3 Beurteilung der angewendeten Untersuchungsmethoden auf Praktikabilität und Redundanz des Informationsgehaltes

4.1.3.1 Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der Messinstrumente

Bei der Etablierung der Messmethoden wurden unterschiedlich viele redundante Messungen pro Untersuchungsobjekt durchgeführt. Anhand dieser Messredundanz lässt sich sowohl ein Maß für die Genauigkeit der Messinstrumente bei der Durchführung innerhalb eines unabhängigen Versuchs, als auch der sich wiederholenden unabhängigen Versuche innerhalb einer Testmethode bestimmen. Innerhalb eines unabhängigen Versuches wurden im Falle der FACS-Analyse drei Messungen pro Untersuchungsobjekt durchgeführt. Die Gesamtzahl der sich jeweils wiederholenden unabhängigen Versuche in diesen Testreihen betrug $N=5$. Dazu wird die Übereinstimmung von mehr als zwei redundanten sowie zwei sich wiederholenden

unabhängige Messungen anhand des Kendalls Konkordanz-Koeffizienten W abgebildet. Dabei entspricht ein Wert von Null einer hohen Widersprüchlichkeit (perfekte Diskordanz), ein Wert von Eins der perfekten Übereinstimmung (perfekte Konkordanz) zwischen den Messungen.

Der Mittelwert aller Konkordanzkoeffizienten der FACS-Analysen weist mit 0,78 auf eine mittelhohe Übereinstimmung hin. In vier von fünf Fällen liegt deren Konkordanzkoeffizient W über 0,8. Für alle der einzelnen Konkordanztests liegt deren Zufallswahrscheinlichkeit unter 5 % (Tab. 4.2).

Block Nr	Konkordanz W	Signifikant auf 5% Niveau?
Block 0	1,00	ja
Block 1.1	0,39	ja
Block 1.2	0,89	ja
Block 3.1	0,84	ja
Block 3.2	0,82	ja

Tab. 4.2: Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der FACS Analyse

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Konkordanzkoeffizient W der drei wiederholenden Messungen der FACS-Analyse. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Übereinstimmung, ein Wert von Null von keiner Übereinstimmung. Gestestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5%.

Bei der Betrachtung der unabhängigen Versuche im Differenzierungsverhalten während der Tage Fünf bis Zehn zeigt der 24-Loch Funktionstest eine mittelhohe, die FACS- Analyse eine schwache und die quantitative RT-PCR eine sehr starke Übereinstimmung, deren Zufallswahrscheinlichkeit ebenfalls unter 5 % liegt (Tab. 4.3).

Test	Anzahl der Versuche	Konkordanz W	Signifikanz auf 5% Niveau?
24-Loch Funktionstest	N=5	0,79	ja
FACS Analyse		0,39	ja
Real Time PCR		0,92	ja

Tab. 4.3: Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der sich wiederholenden Versuche

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Konkordanzkoeffizient W der fünf unabhängigen Versuche des 24-Loch Funktionstests, der FACS-Analyse sowie der quantitativen RT-PCR. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Übereinstimmung, ein Wert von Null von keiner Übereinstimmung. Gestestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5 %.

4.1.3.2 Externe Messgenauigkeit (Validität) der Messinstrumente

Neben der internen Messgenauigkeit der Messinstrumente lässt sich auch deren externe Genauigkeit bestimmen. Die in dieser Teilstudie angewandten Messinstrumente messen das Differenzierungsverhalten der ES-Zellen auf verschiedenen Ebenen. Die Detektierung kontraktiler Areale innerhalb der EBs erfolgte in der 24-Loch Funktionsanalyse. Durchflusszytometrisch wurde die Differenzierung auf Proteinebene bestimmt und mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde die Expression herzzellspezifischer Gene auf RNA-Ebene analysiert. Es handelt sich um drei verschiedene Messmethoden, die jedoch auf drei verschiedenen Ebenen das gleiche Konstrukt messen. Eine Zusammenhangsbetrachtung aller drei Messmethoden lässt sich auch hier über den Kendalls Konkordanz-Koeffizienten W bestimmen. Bei der paarweisen Betrachtung der Messmethoden wird deren Validität mittels Rangkorrelation nach Kendalls Tau überprüft. In beiden Rangkorrelationen bedeutet ein Wert von 1 eine perfekte Übereinstimmung, ein Wert von 0 hingegen keine Übereinstimmung.

Die Kombination der drei Messmethoden 24-Loch Funktionstest, FACS-Analyse und quantitative RT-PCR zur Bestimmung des Differenzierungsverhaltens an den Tagen Fünf bis Zehn zeigt eine mittelhohe bis starke Übereinstimmung, deren Zufallswahrscheinlichkeiten unter 5 % liegen (Tab. 4.4.). Die paarweise Zusammenhangsbetrachtung liefert durch die Rangkorrelation von Kendalls Tau eine mittelhohe bis starke Übereinstimmung (Abb. 4.5). Dabei ergibt sich bei der Kombination aus 24-Loch Funktionstest und FACS-Analyse eine Übereinstimmung von 0,87, bei der Kombination 24-Loch Funktionstest und RT-PCR eine Übereinstimmung von 0,74 und bei der quantitativen RT-PCR und der FACS-Analyse nur eine von 0,6. Bei allen drei Kombinationen liegt deren Zufallswahrscheinlichkeit unter 5 %.

Messinstrumente	Block Nr.	Konkordanz W	Signifikanz auf 5% Niveau?
24-Loch Funktionstest FACS Analyse Real Time PCR	Block 0	0,88	ja
	Block 1.1/ 1.2	0,71	ja
	Block 3.1/ 3.2	0,61	ja

Tab. 4.4: Externe Genauigkeit (Validität) der Messinstrumente

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Konkordanzkoeffizienten W zur Überprüfung der Validität aller drei Messinstrumente. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Übereinstimmung, ein Wert von Null von keiner Übereinstimmung. Getestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5%.

Messinstrumente	Anzahl der Versuche	Kendalls Tau (x)	Signifikanz auf 5% Niveau?
24-Loch/FACS	N=5	0,87	ja
24-Loch/Real Time PCR		0,74	ja
Real Time PCR/FACS		0,60	ja

Tab. 4.5: Externe Genauigkeit (Validität) der Messinstrumente

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Tau zur paarweisen Überprüfung der Validität der Messinstrumente. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Übereinstimmung, ein Wert von Null von keiner Übereinstimmung. Getestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5%.

4.2 Kultivierung von embryonalen Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen ohne Supplementierung eines Serumersatzes

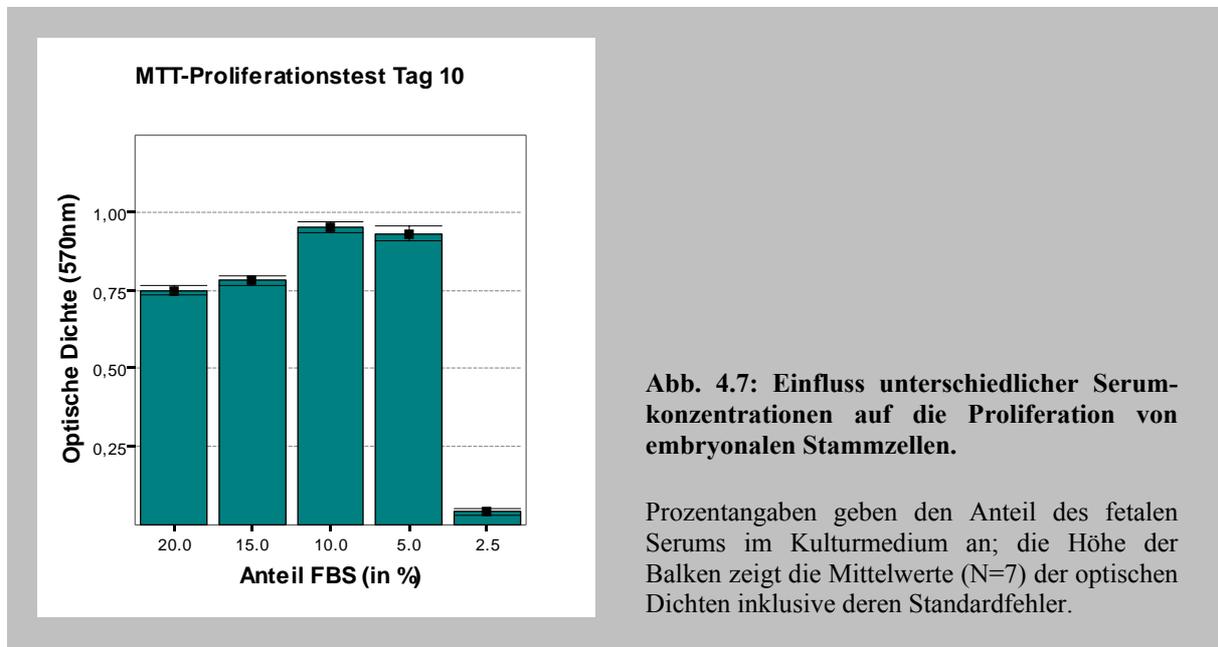
Um die Notwendigkeit der Serumsubstitution zu veranschaulichen und deren Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von ES-Zellen zu Kardiomyozyten zu zeigen, wurden unterschiedliche Serumkonzentrationen getestet. In sieben unabhängigen Versuchen wurden die ES-Zellen in 20 %, 15 %, 10 %, 5 % und 2,5 % FBS im Basismedium in Kultur gehalten. Entsprechend dem INVITOX Protokoll Nr. 113 (Spielmann und Scholz, 1999) wurde das Proliferationsverhalten der ES-Zellen mittels MTT-Test am Tag Zehn bestimmt. Für die Untersuchung der *in-vitro*-Differenzierung der ES-Zellen zu Kardiomyozyten kamen die etablierten Endpunkte aus 4.1 zum Einsatz. So wurde das Differenzierungsverhalten der embryonalen Stammzellen in den 24-Loch Platten mikroskopisch an den Differenzierungstagen Acht bis Zehn überprüft. Die Anwendung der indirekten Immunzytologie am Differenzierungstag Acht sollte eventuelle serumabhängige Unterschiede in der Morphologie der filamentären Strukturen visualisieren. Eine Quantifizierung des Differenzierungsverhaltens wurde sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene durchgeführt. Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen im Kapitel 4.1.2 wurde die FACS-Analyse als ein weiterer Endpunkt zur Untersuchung der Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten am Differenzierungstag Acht angewandt. Abschließend wurde mittels quantitativer RT-PCR die Differenzierung der ES-Zellen auf die Expression von kardialem α -MHC hin untersucht. Diese Untersuchungen wurden an den Differenzierungstagen Acht und Zehn durchgeführt.

Bei der in den nächsten Kapiteln durchgeführten deskriptiven Statistik wurden zur Verdeutlichung Korrelationen nach Spearman berechnet. Eine solche Korrelation veranschaulicht den linearen Zusammenhang zwischen zwei intervallskalierten Merkmalen. Die FBS Konzentrationen wurden gegen die gewonnenen Mittelwerte des MTT-Proliferationstests, des 24-Loch Funktionstests, der FACS-Analyse sowie der quantitativen RT-PCR aufgetragen, um die jeweilige Produkt-Moment-Korrelation zu bestimmen. Bei Werten von +1 (bzw.-1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Werte von 0 lassen keinen Zusammenhang erkennen.

4.2.1 Proliferationstest

4.2.1.1 MTT-Proliferationstest

Bei der Auswertung des Proliferationsverhaltens der ES-Zellen nach zehn Tagen in Kultur konnten die höchsten Wachstumsraten bei einer FBS-Konzentration von 10 % ermittelt werden. Mit zunehmendem FBS Anteil im Zellkulturmedium verringerte sich das Wachstum, was die Werte der optischen Dichte (OD) um 0,8 zeigen. Kaum Wachstum zeigte sich hingegen bei einer FBS Konzentration von 2,5 % (Abb. 4.7). Eine statistisch signifikante lineare Abhängigkeit konnte zwischen den MTT-Werten und den FBS-Konzentrationen nicht gefunden werden.

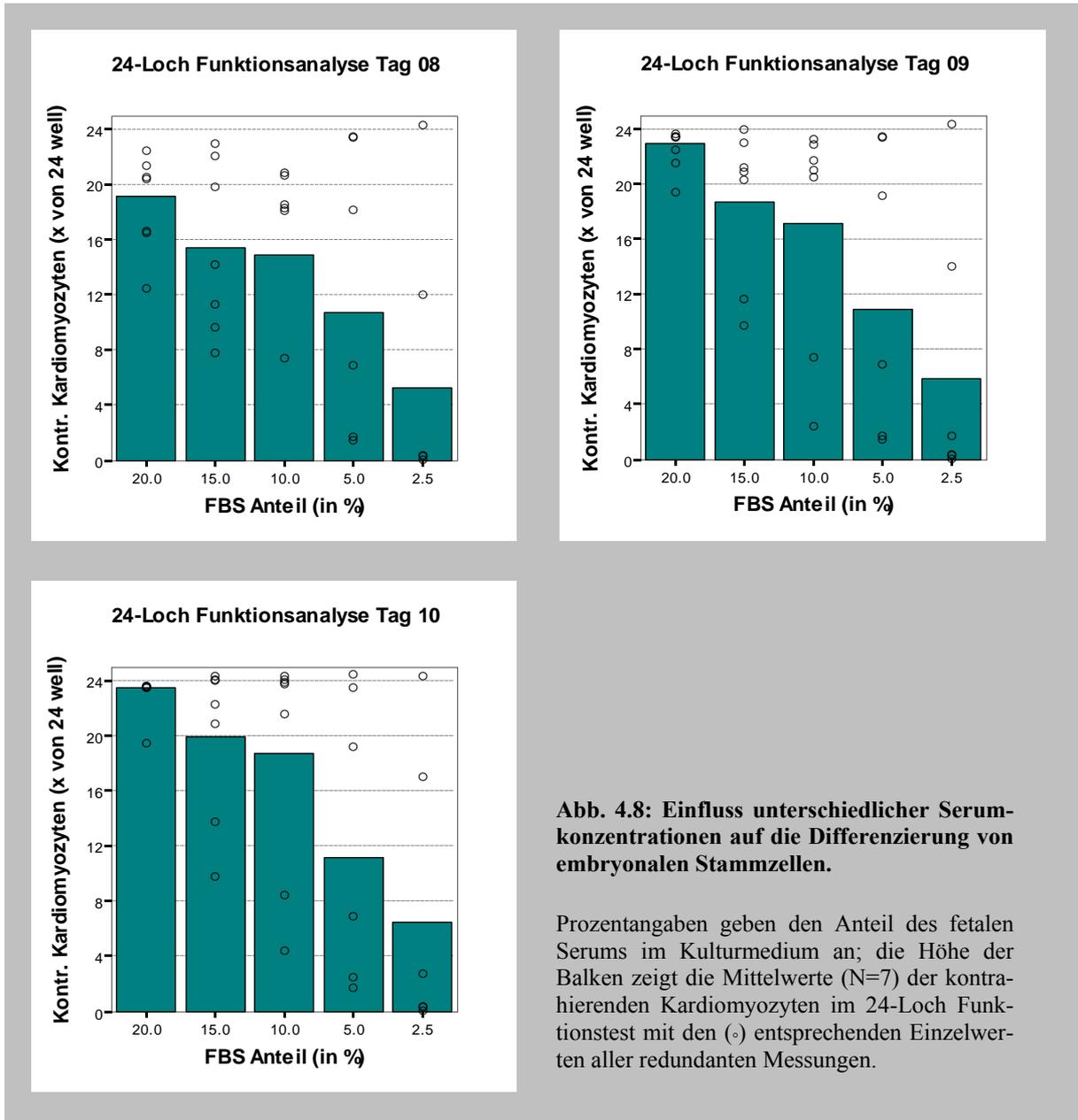


4.2.2 Differenzierungstests

4.2.2.1 24-Loch Funktionstest

Die Überprüfung des Differenzierungsverhaltens im 24-Loch Funktionstest zeigte mit abnehmender Serumkonzentration eine Abnahme kontrahierender Kardiomyozyten in den *wells*. Dieser Zusammenhang spiegelt sich in einer signifikanten Spearman-Korrelation von $r=0,44^{**}$, $r=0,59^{**}$ und $r=0,60^{**}$ an den Differenzierungstagen Acht, Neun und Zehn wieder. Lagen die Mittelwerte am Tag Acht alle unter dem Schwellenwert von 21, konnten bei einer FBS-Konzentration von 20 % bereits am Tag Neun in mehr als 21 *wells* kontrahierende Area-

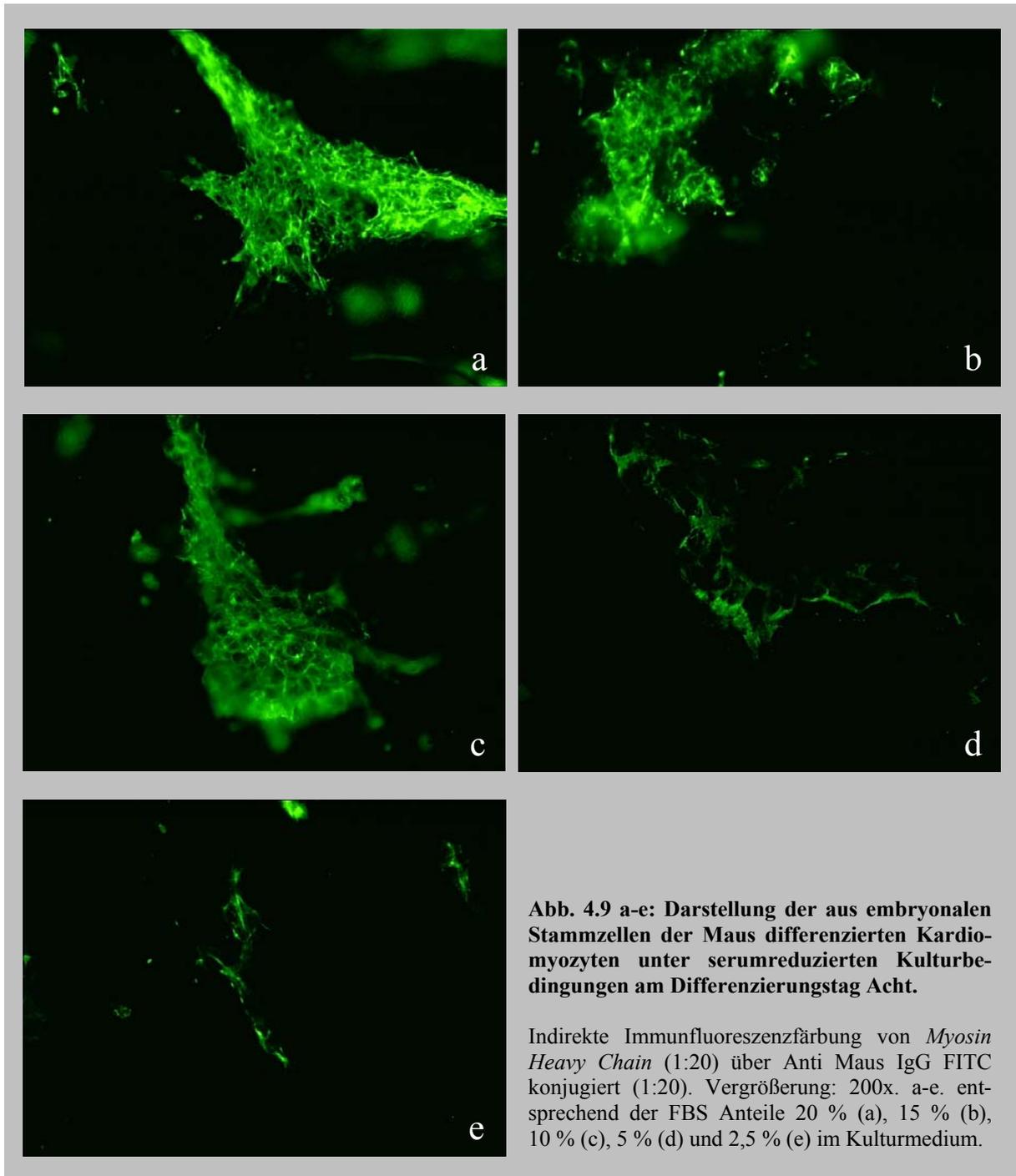
le vorgefunden werden. Eine Zunahme kontraktile Areale war bei den Konzentrationen von 15 bzw. 10 % FBS innerhalb der Differenzierungstage Acht bis Zehn zu verzeichnen, erreichen aufgrund zweier Ausreißer jedoch im Mittel nicht den Schwellenwert von 21. Bei den Konzentrationen von 5 bzw. 2,5 % FBS lagen die spontan kontrahierenden Areale innerhalb der EBs im Mittel auf niedrigerem Niveau (Abb. 4.8).



4.2.2.2 Immunzytologische Untersuchung

Mittels immunzytologischer Untersuchung sollte die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten unter serumreduzierten Kulturbedingungen am Differenzierungstag Acht exemplarisch dargestellt werden (Abb. 4.9 a-e). Wie schon in 4.1.1.2 beschrieben, wur-

den die differenzierten Kardiomyozyten vor ihrer Fixation auf spontane Kontraktionen innerhalb der EBs mikroskopisch untersucht und zeigten innerhalb der Gruppen mit 20 %, 15 % und 10 % FBS spontan kontrahierende Areale. Die Testreihen der Konzentrationen mit 5 und 2,5 % FBS wiesen hingegen keine Kontraktionen auf. Unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers wurden durch Analysen von Negativkontrollen ohne primären Antikörper ausgeschlossen (nicht dargestellt).



Die Expression des Hauptproteins des kontraktiles Apparates, *Myosin Heavy Chain*, sinkt mit abnehmendem FBS Anteil im Kulturmedium innerhalb der Zellanhäufungen, was die Nativ-aufnahmen bestätigten. So sind bei 20 % (Abb. 4.9 a) und 15 % (Abb. 4.9 b) FBS im Kulturmedium deutlich strangartig vernetzte filamentäre Strukturen erkennbar, welche bei einem FBS Anteil von 10 % (Abb. 4.9 c) weniger verzweigt und mit einer geringeren Intensität erscheinen. Bei einem FBS Anteil von 5 % (Abb. 4.9 d) können hingegen nur noch wenige dünne sarkomere Strukturen detektiert werden, die in ihrer Intensität nur noch schwach leuchten. Mit der Substitution von 2,5 % FBS (Abb. 4.9 e) setzt sich die Abnahme kontraktiles Strukturproteine, die in ihrem Aussehen filigran erscheinen, weiter fort.

4.2.2.3 FACS-Analyse

Analog zum 24-Loch Funktionstest zeigte sich in der FACS-Analyse am Versuchstag Acht ein positiver Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsverhalten der ES Zellen (FACS-Werte) zur Serumkonzentration von $r = 0,35^{**}$ (Spearman-Korrelation). Je weniger Serum im Kulturmedium vorhanden ist, desto geringer ist der Anteil mit MF 20 markierten Kardiomyozyten. Jedoch steigt der Anteil bei einer Konzentration von 2,5 % FBS im Kulturmedium wieder an (Abb. 4.10).

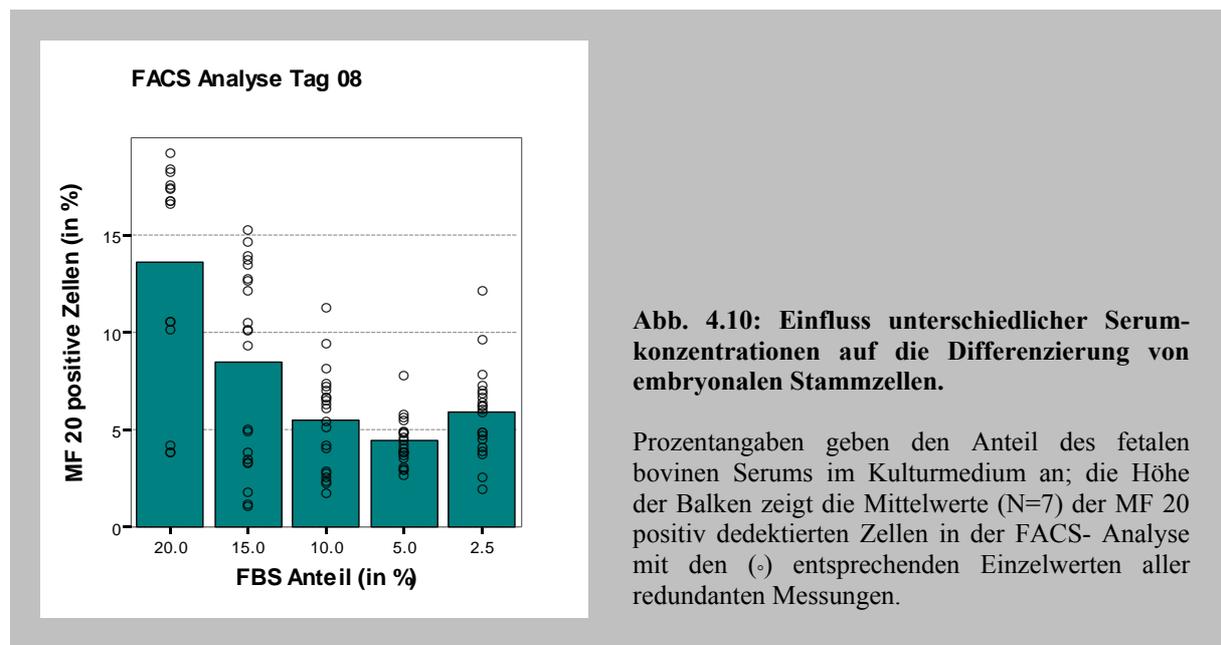
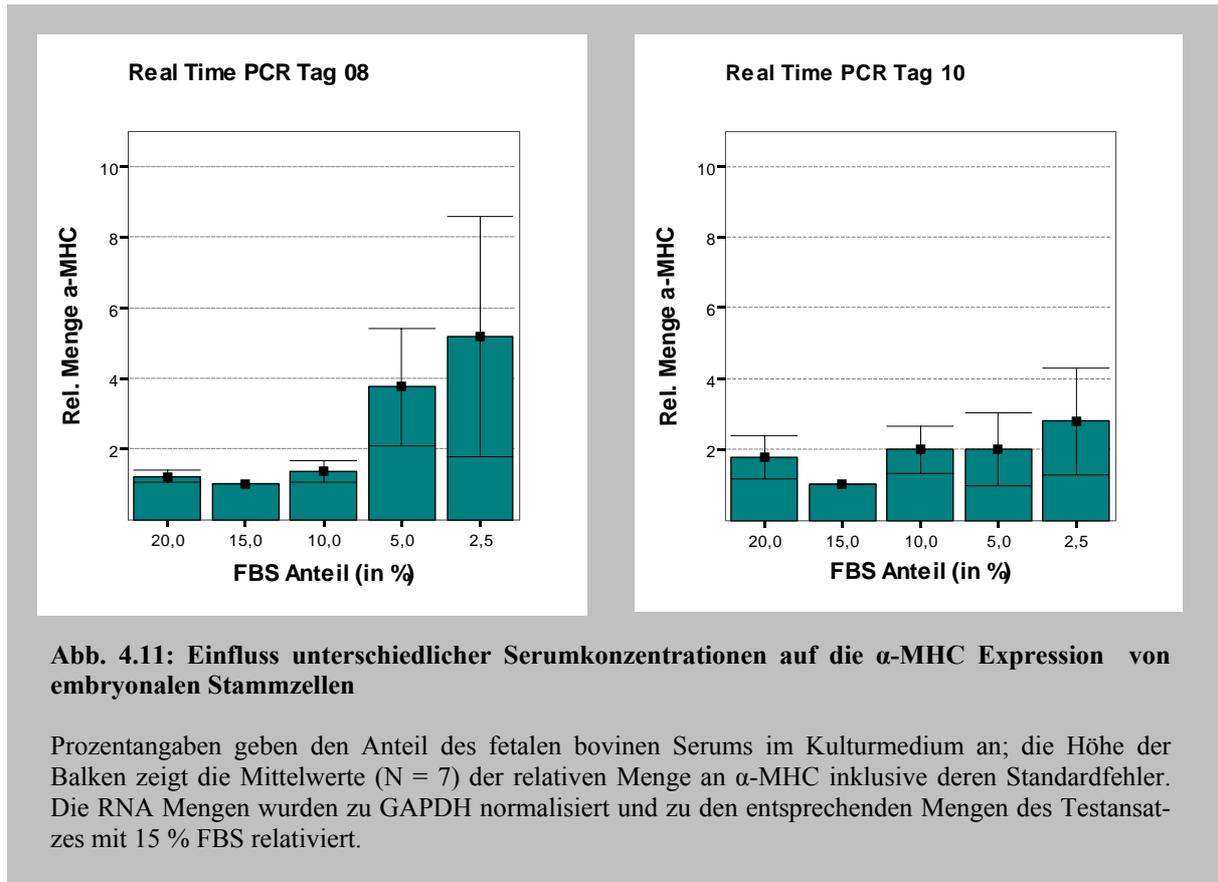


Abb. 4.10: Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen.

Prozentangaben geben den Anteil des fetalen bovines Serums im Kulturmedium an; die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte (N=7) der MF 20 positiv detektierten Zellen in der FACS-Analyse mit den (○) entsprechenden Einzelwerten aller redundanten Messungen.

4.2.2.4 Quantitative RT-PCR

Der Einfluss verschiedener Serumkonzentrationen auf die Expression von α -MHC wurde an den Differenzierungstagen Acht und Zehn mittels TaqMan-PCR-Analyse untersucht. Dabei wurden die RNA Mengen zu GAPDH normalisiert und zu den entsprechenden Mengen des Testansatzes mit 15 % FBS Substitution relativiert. Als Kalibrator fungierte eine Probe von cDNA differenzierter embryonaler Stammzellen des Differenzierungstages Zwölf.



Die Proben der Ansätze mit 20 und 10 % FBS Substitution zeigen sowohl am Differenzierungstag Acht als auch Zehn einen vergleichbaren Expressionslevel zum Standardansatz mit 15 % FBS. Mit zunehmender Serumreduktion hingegen kann ein Anstieg der RNA Mengen detektiert werden. So exprimieren die EBs am Differenzierungstag Acht bei den Serumkonzentrationen von 5 und 2,5 % FBS 4 bis 5-fach höhere Mengen an α -MHC im Vergleich zum Testansatz mit 15 % FBS, was sich zum Differenzierungstag Zehn hingegen wieder relativiert. Des Weiteren kann mit abnehmender Serumreduktion eine Zunahme der Streuung aller Einzelwerte beobachtet werden, wie es sich anhand der dargestellten Standardfehler zeigt (Abb. 4.11). Statistisch signifikante lineare Abhängigkeiten in Form einer Spearman Korrelation konnten weder am Differenzierungstag Acht noch Zehn gefunden werden.

4.2.3 Zusammenfassende Darstellung

Das Ziel dieser Teilstudie war es, die Wirkung unterschiedlicher FBS-Konzentrationen auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten muriner embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten zu untersuchen. Die photometrische Bestimmung der Viabilität der Zellen nach MTT-Inkubation am Differenzierungstag Zehn ließ kein serumabhängiges Wachstumsverhalten erkennen. Die höchsten Wachstumsraten zeigten sich bei einer FBS Konzentration von 10 %. Mit zunehmendem FBS Anteil im Kulturmedium konnte ein leichter Rückgang der Proliferation detektiert werden. Die Kultivierung der ES-Zellen mit 2,5 % FBS im Zellkulturmedium hatte kaum Wachstum zur Folge. Anders zeigte sich das Bild bei der Untersuchung der Differenzierung der ES-Zellen zu Kardiomyozyten. Bei der morphologisch funktionellen Betrachtung auf Kontraktionen im 24-Loch Funktionstest konnte mit zunehmender FBS Konzentration im Zellkulturmedium eine Zunahme kontraktiler Areale in den EBs detektiert werden. Die Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz zur mikroskopischen Darstellung sarkomerer Strukturen zeigte nur wenige Unterschiede in den Serumkonzentrationen von 20, 15 und 10 % FBS. Eine deutliche Abnahme filamentärer Strukturen konnte jedoch bei den Serumkonzentrationen von 5 und 2,5 % FBS im Kulturmedium beobachtet werden. Die Quantifizierung mittels FACS-Analyse zeigte mit abnehmender Serumkonzentration auch eine Abnahme MF20 positiver Zellen, es konnte jedoch bei der 2,5 % FBS Konzentration ein Anstieg detektiert werden, der sich ebenfalls in der quantitativen PCR zeigte. Entgegen den bisherigen Tests zeigte sich dort am Differenzierungstag Acht mit abnehmender FBS Konzentration im Zellkulturmedium eine erhöhte Expression des kardialen α -MHC, die sich jedoch zum Differenzierungstag Zehn relativierte.

4.3 Kultivierung von embryonalen Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit Supplementierung eines Serumersatzes

In dieser Testreihe sollte das Proliferations- und Differenzierungsverhalten embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten unter serumreduzierten Kulturbedingungen bei gleichzeitiger Supplementierung definierter Mediumbestandteile charakterisiert werden. Dem klassischen Basalmedium wurde ein definierter Anteil eines zuvor etablierten Supplementenmixes (Kap. 3.1.8 und 3.1.9) hinzugegeben und mit einer Serumkonzentration von jeweils 1 %, 0,5 %, 0,25 % oder 0 % FBS substituiert. Zur Beurteilung des als Serumersatz geltenden Gemisches von Supplementen wurde zum Vergleich in jedem Versuch eine Positivkontrolle mit 15 % FBS Standardkulturmedium durchgeführt. Zahlreiche Vorversuche ergaben, dass es unter Serumersatz zu einem verzögerten Wachstums- und Differenzierungsverhalten kommt. Daher wurde der MTT-Proliferationstest nach Absprache mit dem Betreuer, um zwei Tage verschoben, am Differenzierungstag Zwölf durchgeführt. Die Differenzierung der ES-Zellen zu Kardiomyozyten wurde mittels 24-Loch Funktionsanalyse im Differenzierungszeitraum der Tage Acht bis Zwölf beobachtet, am Differenzierungstag Neun immunfluoreszent mikroskopisch untersucht und mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die quantitative TaqMan PCR Analyse wurde an den Tagen Acht, Zehn, Elf und Dreizehn durchgeführt.

Die im Kapitel 4.3.2.1 berechneten Produkt-Momentkorrelationen nach Spearman dienen dazu den linearen Zusammenhang zwischen Differenzierungsdauer und Zunahme kontraktiler Areale im 24-Loch Funktionstest zu veranschaulichen und haben rein deskriptiven Charakter. Die Binomialisierung der Ergebnisse des 24-Loch Funktionstests und der FACS-Analyse wurden entsprechend der Beschreibung im Kapitel 4.1.2 durchgeführt, um deren Zufallswahrscheinlichkeit zu berechnen.

4.3.1 Proliferationstest

4.3.1.1 MTT-Proliferationstest

Die Auswertung des Proliferationsverhaltens der ES-Zellen mittels MTT-Proliferationstest am Differenzierungstag Zwölf zeigte innerhalb der supplementierten Gruppen ein Wachstum, welches im Bereich von 0,5 und 0,6 der optischen Dichte lag. Somit befanden sie sich unterhalb den Werten der Positivkontrolle, doch zeigten die mit Serumersatz supplementierten Testansätze alle ein konstantes Wachstumsverhalten auf dem gleichen Niveau (Abb. 4.12).

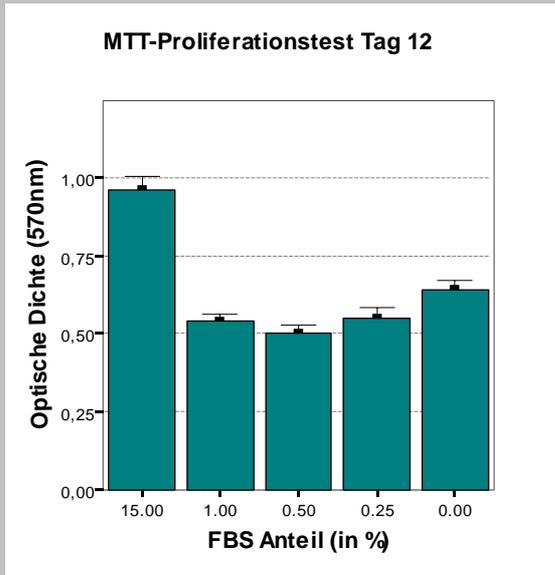


Abb. 4.12: Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen mit Supplementierung eines Serumersatzes auf die Proliferation von embryonalen Stammzellen.

Prozentangaben geben den Anteil des fetalen bovinen Serums mit Supplementierung im Kulturmedium an; die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte (N=7) der optischen Dichten inklusive deren Standardfehler.

4.3.2 Differenzierungstests

4.3.2.1 24-Loch Funktionstest

Die Beobachtung des Differenzierungsverhaltens mittels 24-Loch Funktionsanalyse wurde an den Differenzierungstagen Acht bis Zwölf durchgeführt. Am Tag Acht lagen die Werte für alle Serumkonzentrationen noch weit unter dem Schwellenwert von 21. Für alle Testreihen nahmen diese jedoch bis zum Differenzierungstag Zwölf stetig zu. Bei drei der vier Testreihen wurde dieser Zusammenhang statistisch signifikant (Tab. 4.6). Am Tag Zwölf lagen die Mittelwerte der Testreihen mit 0,5 und 0,25 % FBS über dem Schwellenwert. Die Testreihe mit 1 % FBS Anteil lag mit einem Mittelwert von 19,8 kontrahierenden Kardiomyozyten nur dicht unter dem Schwellenwert von 21. Lediglich die Testreihe mit 0 % FBS Anteil zeigte bis zu diesem Tag immer noch nicht genügend kontrahierende Zellen (Abb. 4.13).

Serumkonzentration mit Supplementierung	1 %	0,50 %	0,25 %	0 %	Gesamt
Produktmomentkorrelation mit Anzahl der Tage	0,30	0,51**	0,70**	0,62**	0,57**

Tab. 4.6: Darstellung der Produktmomentkorrelation nach Spearman

Korrelativer Zusammenhang zwischen der Zunahme kontrahierender Kardiomyozyten und den Differenzierungstagen in der 24-Loch Funktionsanalyse mit dem (**) entsprechenden Signifikanzniveau von 0,01.

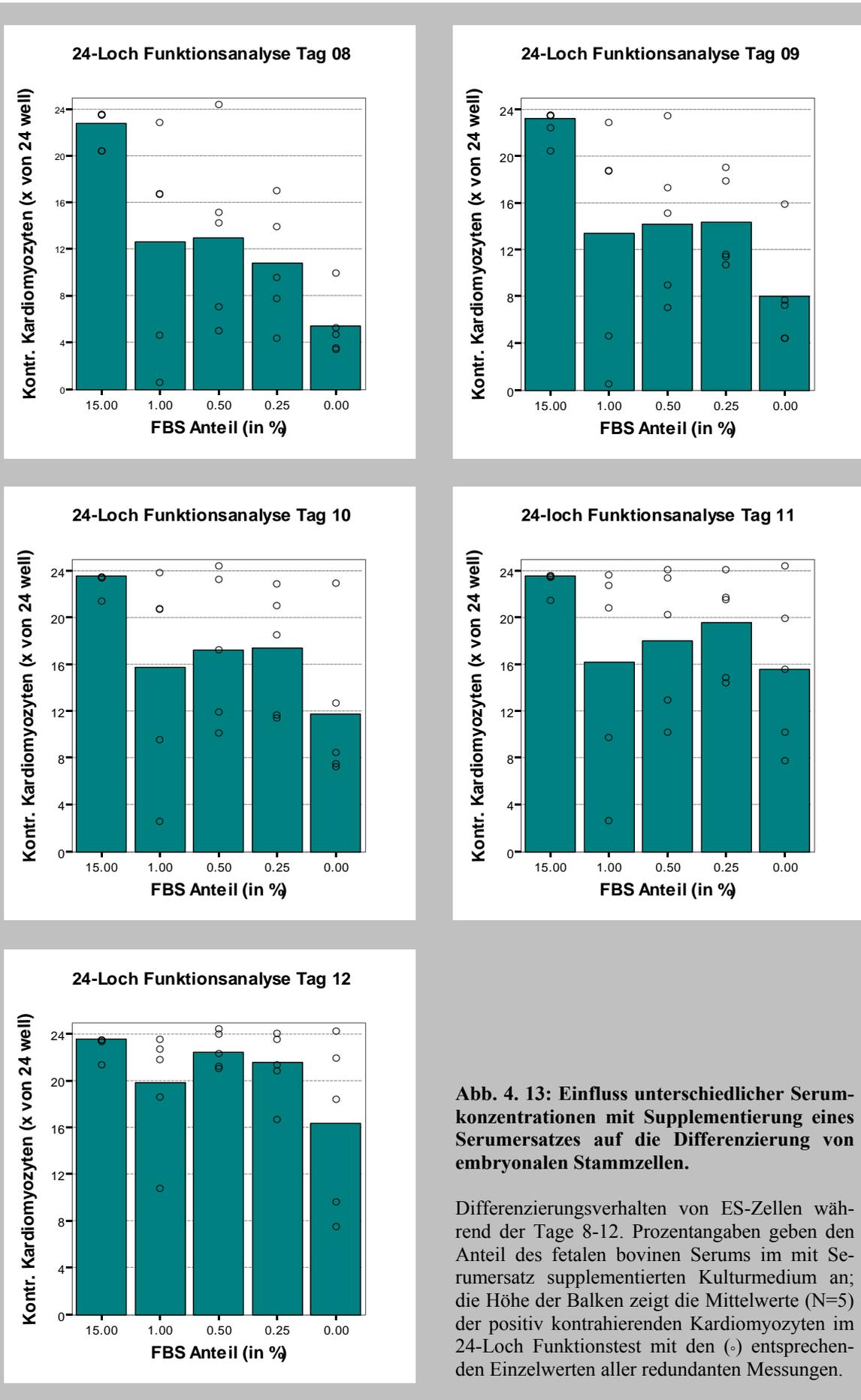


Abb. 4. 13: Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen mit Supplementierung eines Serumersatzes auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen.

Differenzierungsverhalten von ES-Zellen während der Tage 8-12. Prozentangaben geben den Anteil des fetalen bovines Serums im mit Serumersatz supplementierten Kulturmedium an; die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte (N=5) der positiv kontrahierenden Kardiomyozyten im 24-Loch Funktionstest mit den (○) entsprechenden Einzelwerten aller redundanten Messungen.

Im mikroskopischen Bild der 24-Loch Funktionsanalyse zur Untersuchung spontan kontrahierender Areale waren morphologische Unterschiede der EBs ersichtlich (Abb. 4. 14 a-f). So hatten die EBs in 1 %, 0,5 % und 0,25 % FBS mit Supplementierung eine ähnliche Struktur wie die Testansätze der Positivkontrollen mit 15 % FBS ohne Supplementierung, die sich in eine zentrale Anhäufung von Zellen mit flächiger Ausbreitung zeigte (Abb. 4.14 a-d). Die EBs in den serumfreien supplementierten Testansätzen hingegen erschienen durch ihre konvexen Ränder zusammengezogen (Abb. 4.14 e und f).

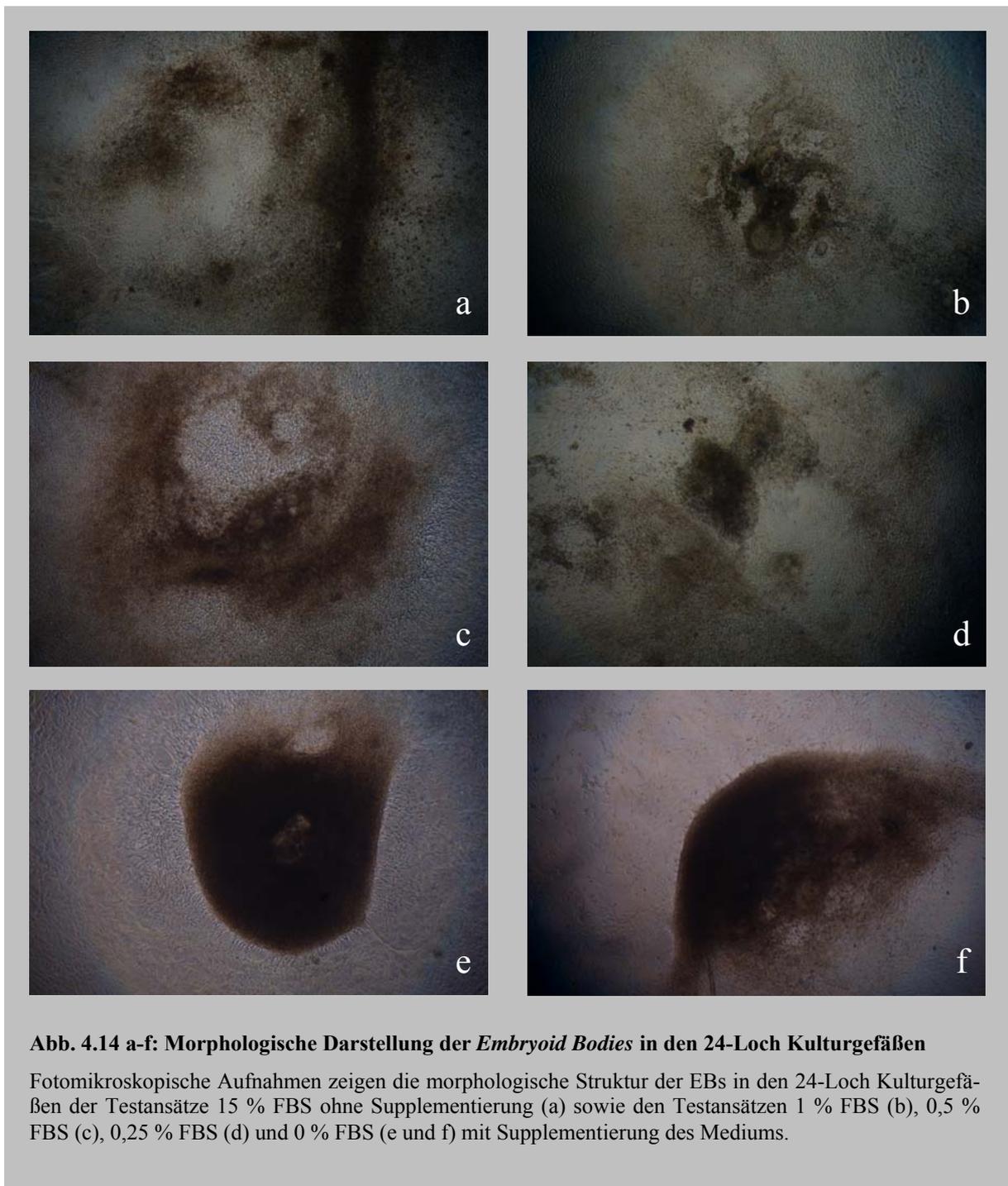
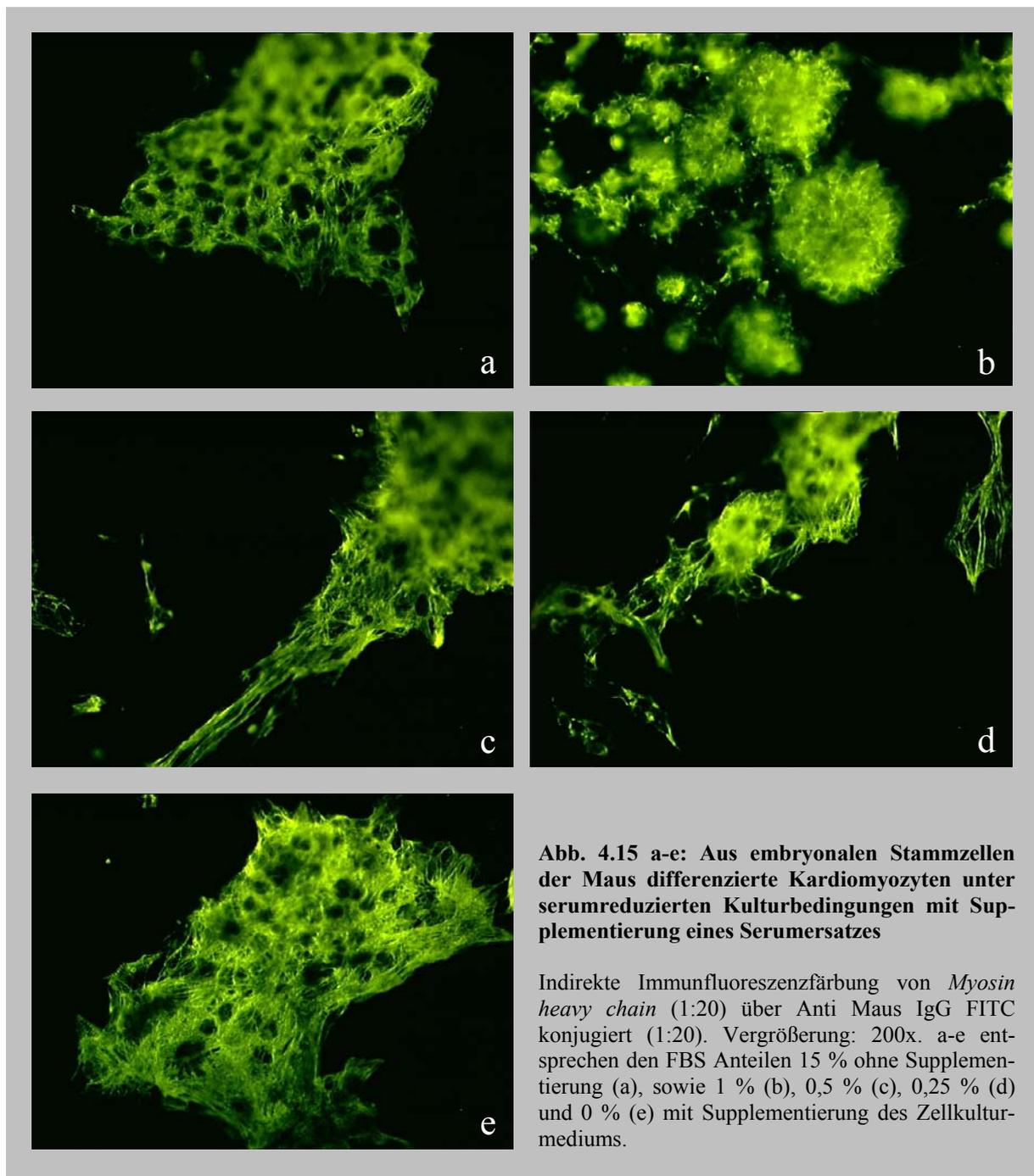


Abb. 4.14 a-f: Morphologische Darstellung der *Embryoid Bodies* in den 24-Loch Kulturgefäßen

Fotomikroskopische Aufnahmen zeigen die morphologische Struktur der EBs in den 24-Loch Kulturgefäßen der Testansätze 15 % FBS ohne Supplementierung (a) sowie den Testansätzen 1 % FBS (b), 0,5 % FBS (c), 0,25 % FBS (d) und 0 % FBS (e und f) mit Supplementierung des Mediums.

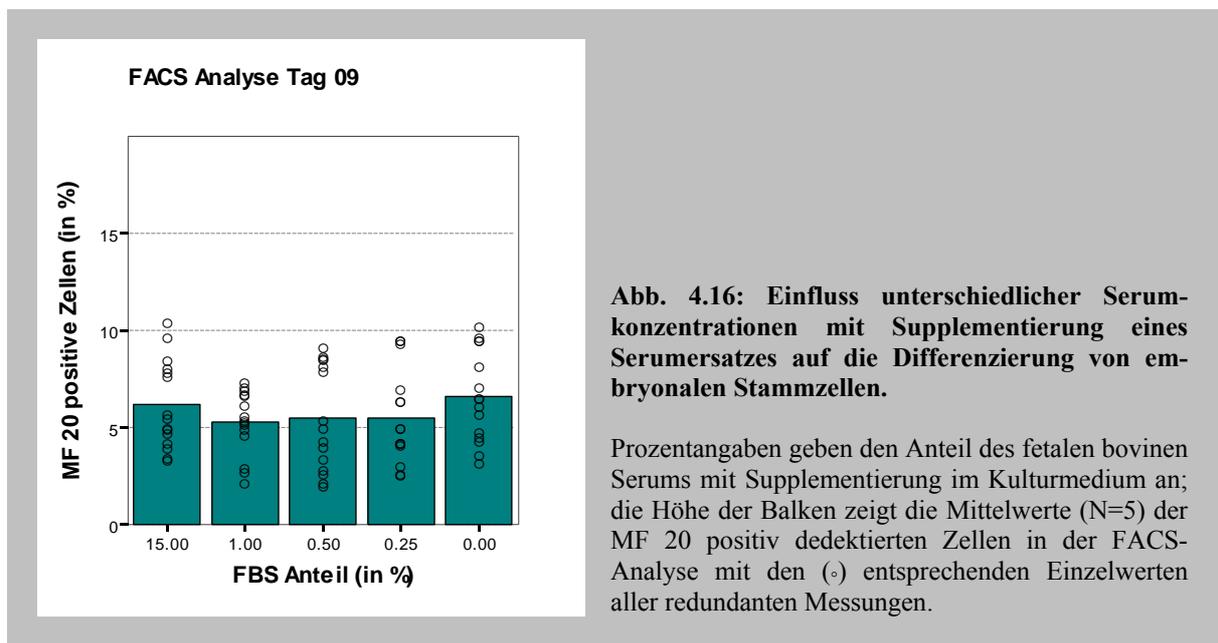
4.3.2.2 Immunzytologische Untersuchung

Die Darstellung der filamentären Strukturen innerhalb der EBs zeigte kaum Unterschiede zwischen den getesteten Serumanteilen. So können am Differenzierungstag Neun sowohl in der Positivkontrolle mit 15 % FBS (Abb. 4.15 a) als auch in den Testreihen mit supplementierten Medien (Abb. 4.15 b-e) unter serumreduzierten Kulturbedingungen sarkomere Strukturen mit gleich bleibender Färbungsintensität detektiert werden, die vor ihrer Fixation spontan kontrahierten.



4.3.2.3 FACS-Analyse

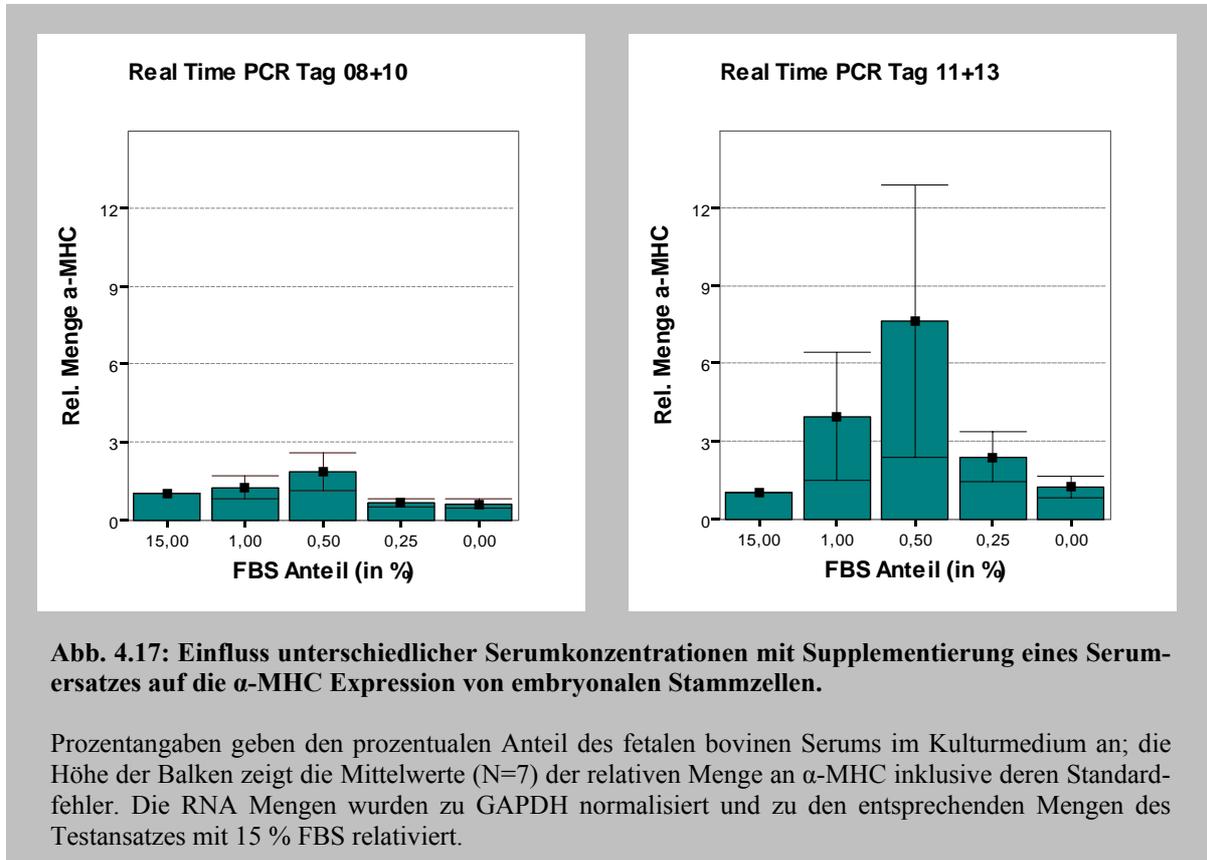
Aufgrund des beobachteten verzögerten Differenzierungsverhaltens der ES-Zellen im 24-Loch Funktionstest wurde die durchflusszytometrische Analyse mittels FACScan einen Tag später durchgeführt. So lag am Differenzierungstag Neun der Anteil mit MF 20 markierten Zellen aller Tests im Mittel über dem Schwellwert von 5 %. Sowohl die Tests mit Supplementierung als auch die dazu gehörigen Positivkontrollen mit einem FBS Anteil von 15 % im Kulturmedium erreichten im Mittel Werte zwischen 5 und 7 % und ließen keine Serumabhängigkeit erkennen (Abb. 4.16).



4.3.2.4 Quantitative RT-PCR

Der Einfluss des supplementierten Kulturmediums auf die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten wurde mittels TaqMan-PCR-Analyse untersucht. Durch die Verzögerung der Differenzierung im 24-Loch Funktionstest wurde die Expression des kardialen α -MHC an den Differenzierungstagen 8, 10, 11 und 13 analysiert. Auch hier wurden die RNA Mengen zu GAPDH normalisiert, mit einer Probe von cDNA differenzierter embryonaler Stammzellen des Differenzierungstages Zwölf kalibriert und zu den entsprechenden Mengen des Testansatzes mit 15 % FBS Substitution relativiert. Im Vergleich zum Standardansatz (15 % FBS) zeigten die EBs der Testreihen mit supplementierten Medien an den Differenzierungstagen Acht und Zehn einen vergleichbaren Expressionslevel. Mit einer zeitlichen Verzögerung von zwei Tagen konnte jedoch eine erhöhte Expression von α -MHC bei den Testan-

sätzen mit einem Restserumanteil von 1 und 0,5 % detektiert werden. Der RNA Anteil bei dem Testansatz mit 0,5 % lag im Mittel über dem siebenfachen, es wurde aber auch hier eine Zunahme der Streuung beobachtet.



4.3.3 Zufallswahrscheinlichkeiten der Testergebnisse des 24-Loch Funktionstests und der FACS-Analyse

Um auch hier die Signifikanz der Testresultate einzuschätzen, empfahl sich zur Betrachtung der Zufallswahrscheinlichkeiten der Binomialtest. Wie bereits im Kapitel 4.1.2 wurden die Ergebnisse durch Erreichen des Schwellenwertes dichotomisiert (positiv vs. negativ) und eine Binominalverteilung für positive und negative Testergebnisse von 50 % bei einer Stichprobenanzahl von N=5 berechnet (Tab. 4.1). Damit wird ersichtlich, dass die Zufallswahrscheinlichkeiten für die Ergebnisse der 24-Loch Funktionsanalyse innerhalb der Testansätze stark schwanken. So liegen diese bei den Testansätzen der Positivkontrolle und der supplementieren Serumsubstitution von 0,5 % FBS bei 3,1 %, während bei der 1 % und 0 % supplementierten FBS Substitution die Ergebnisse zu über 30 % mit dem Zufall vereinbar sind. Die Zufallswahrscheinlichkeit der Ergebnisse der FACS-Analyse liegt im Fall der 1 %igen Serumreduktion mit 4 von 5 positiven Ergebnissen bei über 10 %. Im Gegensatz dazu kann bei

bei den anderen Testansätzen mit supplementierten Medien eine Abnahme positiver Ergebnisse beobachtet werden. Damit werden die Ergebnisse dieser Testsätze trotz der positiven Mittelwerte nicht signifikant.

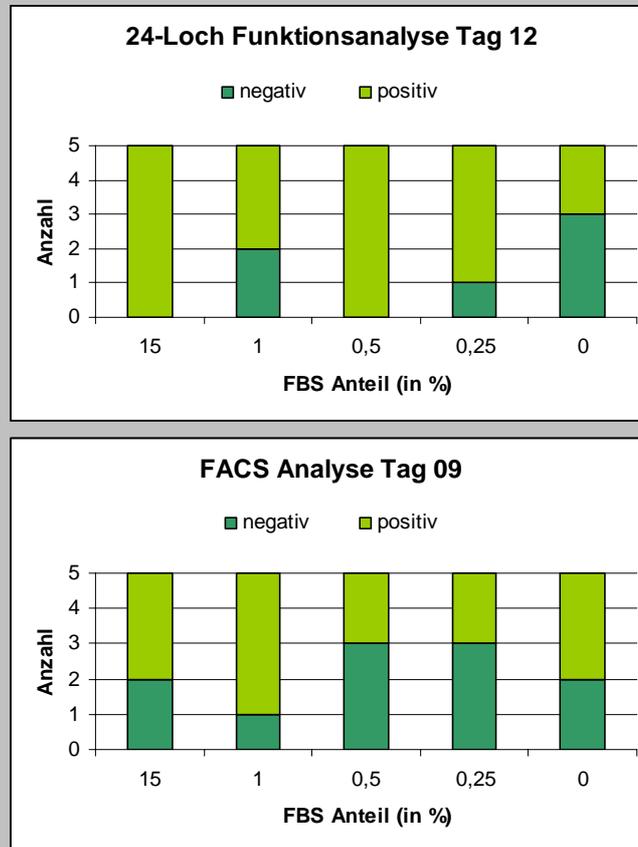


Abb. 4.18: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der positiven Testresultate bei den verschiedenen Versuchsreihen in der 24-Loch Funktionsanalyse bzw. in der FACS-Analyse. Die Messergebnisse der 24-Loch Funktionsanalyse sowie der FACS-Analyse wurden anhand des Schwellenwertes auf ein dichotomes Datenniveau transformiert. Positiv bedeutet in diesem Fall den Schwellenwert von 21 von 24 in der 24-Loch Funktionsanalyse bzw. >5 % MF20 positive Zellen in der FACS-Analyse erreicht. Negativ bedeutet, dass die Schwellenwerte nicht erreicht wurden.

4.4 Vergleichende Darstellung der quantifizierbaren Ergebnisse für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit und ohne Supplementierung des Kulturmediums mit einem Serumersatz

Neben der Etablierung von neuen Endpunkten für die Untersuchung der *in-vitro*-Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen in Kardiomyozyten, sollte ein modifiziertes serumreduziertes Kulturmedium untersucht werden. Zu Beurteilen galt es, in wie fern die Supplementierung definierter Bestandteile die Proliferation und Differenzierung embryo-

naler Stammzellen zu Kardiomyozyten unterstützt und ob dieser Serumersatz vergleichbare Ergebnisse zum Standardkulturmedium mit 15 % FBS liefert. Ein Vergleich zweier Gruppen mit identischen Serumkonzentrationen und unterschiedlicher Supplementierung ist aufgrund des gewählten Versuchsdesigns nicht möglich. Die Ergebnisse der Gruppen mit den supplementierten Serumkonzentrationen liegen den Werten der Gruppe mit 2,5 % FBS ohne Supplementierung am nächsten. Ein Vergleich wird daher zwischen den Gruppen mit den supplementierten Medien, der Gruppe mit 2,5 % FBS und dem Standardkulturmedium mit 15 % FBS durchgeführt. Die in den folgenden Tabellen dargestellten Arbeitshypothesen dienen zur Überprüfung, die sich aus den in folgenden Abbildungen dargestellten Mittelwertsunterschieden ergeben.

Zur Überprüfung der Signifikanz der beobachteten Verteilungen bietet sich im Regelfall eine varianzanalytische Betrachtung an. "Die einfaktorielle Varianzanalyse überprüft die Auswirkung einer p-fach gestuften, unabhängigen Variablen auf die abhängige Variable" (Bortz, 1999). Im vorliegenden Datensatz bildet der Serumanteil eine 2-fach (ohne Supplement vs. mit Supplement) gestufte, unabhängige Variable und die Messwerte des MTT-Tests, des 24-Loch Funktionstest, der FACS-Analyse und der quantitativen RT-PCR die jeweiligen abhängigen Variablen. Von Bortz (1999) werden Voraussetzungen genannt, die alle für die Anwendung der einfaktoriellen Varianzanalyse (engl. ANOVA) erfüllt sein müssen. Eine dieser Voraussetzungen ist, dass die Abweichungen der Messwerte ($N < 40$) vom Stichprobenmittelwert normalverteilt sein müssen. Für die Überprüfung einer Normalverteilung bieten sich laut Bortz und Lienert (2003) der Chi-Quadrat-Test sowie der KSA-Test (Kolmogoroff-Smirnov-Anpassungstest) an, wobei ersterer jedoch nur auf große Stichproben angewendet werden kann. Der KSA-Test benötigt vor allem bei kleinen Stichproben extreme Abweichungen von einer Normalverteilung, um auf höheren Signifikanzniveaus die Annahme einer Normalverteilung zu verwerfen. Eine Nichtverwerfung der Annahme einer Normalverteilung durch diese Berechnungsform stellt somit noch keinen Beweis für das Vorliegen einer Normalverteilung dar. Zur Überprüfung auf Normalverteilung wurde demnach der Quotient von Mittelwert und Median gebildet. Dieser sollte zwischen 0,9 und 1,1 liegen (Mitteilung von PD Dr. Dr. Hopfenmüller, Charite – Universitätsmedizin Berlin, Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie). Bei Nichterfüllung einer Normalverteilung kam der KSO-Test (Kolmogoroff-Smirnov-Omnibustest) als alternatives statistisches Testverfahren zum Einsatz. Dieser sogenannte non-parametrische Test macht keine Annahmen über die Art der Verteilung und bestimmt die kumulierten relativen Häufigkeiten indem er alle Messwerte der zu vergleichenden Stichproben in eine gemeinsame Rangreihe ordnet.

4.4.1 Proliferationstest

4.4.1.1 MTT-Proliferationstest

Die Mittelwerte der optischen Dichte im MTT-Proliferationstest zeigten ein starkes Wachstum der ES-Zellen bei den Testansätzen mit 15 % FBS im Kulturmedium. Unter serumreduzierten bzw. serumfreien Kulturbedingungen mit Supplementierung eines Serumersatzes erreichten die Wachstumsraten der ES-Zellen OD-Werte um 0,6. Die serumreduzierten Testansätze (2,5 % FBS) ohne Zusatz eines Serumersatzes zeigten hingegen kaum Wachstum.

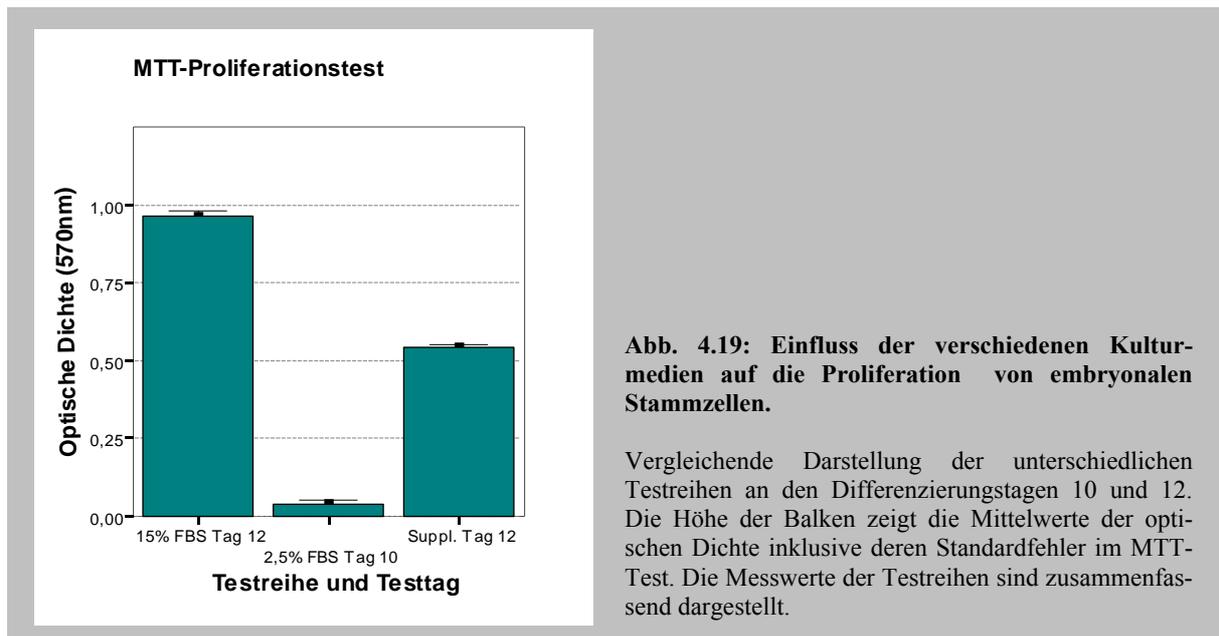


Abb. 4.19: Einfluss der verschiedenen Kulturmedien auf die Proliferation von embryonalen Stammzellen.

Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Testreihen an den Differenzierungstagen 10 und 12. Die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte der optischen Dichte inklusive deren Standardfehler im MTT-Test. Die Messwerte der Testreihen sind zusammenfassend dargestellt.

Die mit dem MTT-Proliferationstest gemessenen Mittelwertsunterschiede zeigen mit der ANOVA eine sehr hohe statistische Signifikanz. Im Vergleich zu den Testansätzen mit 2,5 % FBS im Kulturmedium fördern die mit Serumersatz supplementierten Kulturmedien das Wachstum der ES-Zellen, jedoch nicht in dem Maße wie bei der herkömmlichen Substitution mit 15 % FBS (Tab. 4.7).

Testart	Hypothesen	Zufallswahrscheinlichkeit
ANOVA	15 % ohne Supplementierung (Tag 12) > alle mit Supplementierung (Tag 12)	<0,1%
	2,5 % ohne Supplementierung (Tag 8) < alle mit Supplementierung (Tag 12)	<0,1%

Tab. 4.7: Überprüfung der statistischen Bedeutsamkeit aller Arbeitshypothesen für den MTT-Test.

Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Zellkulturmedien im Proliferationstest mittels ANOVA und nachfolgendem *Post hoc Bonferroni Test*.

4.4.2 Differenzierungstest

4.4.2.1 24-Loch Funktionsanalyse

Der Vergleich der Gruppen untereinander zeigt in der 24-Loch Funktionsanalyse deutliche Unterschiede im Differenzierungsverhalten. Konnten im Mittel bei den Testansätzen mit 15 % FBS am Differenzierungstag Zehn in nahezu 20 von 24 *wells* der 24-Loch Kulturgefäße spontan kontrahierende Kardiomyozyten detektiert werden, waren es zu diesem Differenzierungszeitpunkt in den supplementierten Testansätzen lediglich die Hälfte (Abb. 4.20). Mit zunehmender Differenzierungsdauer zeigte sich hingegen auch eine Zunahme kontrahierender Areale bei diesen Testansätzen. So konnte im Mittel am Differenzierungstag Zwölf in über 20 von 24 *wells* kontrahierendes Myokard innerhalb der EBs gefunden werden. Kaum kontrahierendes Myokard wurde bei den Ansätzen mit einem FBS Anteil von 2,5 % im Zellkulturmedium beobachtet. Im Mittel wurden dort am Differenzierungstag Zehn in nur 6 von 24 *wells* der 24-Loch Kulturgefäße spontan kontrahierende Areale vorgefunden.

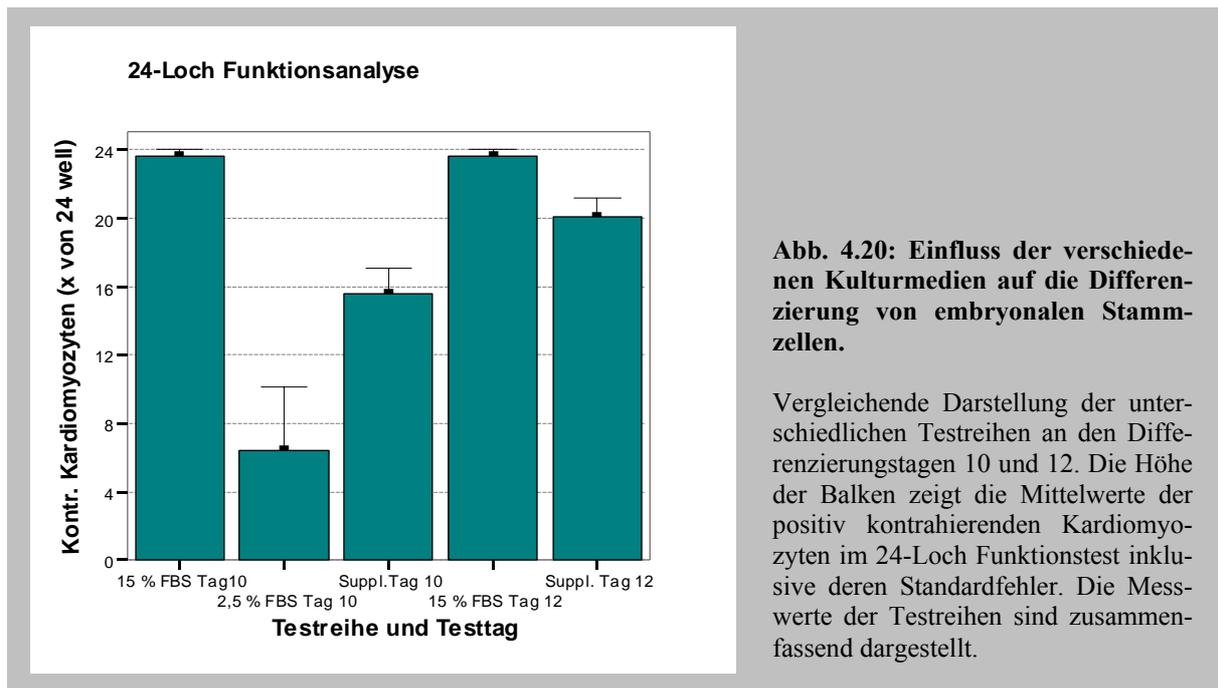


Abb. 4.20: Einfluss der verschiedenen Kulturmedien auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen.

Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Testreihen an den Differenzierungstagen 10 und 12. Die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte der positiv kontrahierenden Kardiomyozyten im 24-Loch Funktionstest inklusive deren Standardfehler. Die Messwerte der Testreihen sind zusammenfassend dargestellt.

Betrachtet man das Differenzierungsverhalten in der 24-Loch Funktionsanalyse, so zeigt die ANOVA eine statistische Signifikanz gegenüber der Behauptung, dass die serumreduzierten supplementierten Kulturmedien im Vergleich zur 2,5 % FBS Substitution die Herzzelldifferenzierung besser fördern. Statistisch nicht signifikant hingegen sind die Unterschiede zwischen den serumreduzierten supplementierten Kulturmedien und der Substitution mit 15 % FBS an den Differenzierungstagen Zehn und Zwölf (Tab.4.8).

Testart	Hypothesen	Zufallswahrscheinlichkeit
ANOVA	15 % ohne Supplementierung (Tag 10) > alle mit Supplementierung (Tag 10)	n.s
	2,5 % ohne Supplementierung (Tag 10) < alle mit Supplementierung (Tag 12)	<5% ¹
	15 % ohne Supplementierung (Tag 12) > alle mit Supplementierung (Tag 12)	n.s

Tab. 4.8: Überprüfung der statistischen Bedeutsamkeit aller Arbeitshypothesen für den 24-Loch Funktionstest.

Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Zellkulturmedien im 24-Loch Funktionstest mittels ANOVA und *Post hoc Bonferroni Test*. (¹ gilt nicht für 1% FBS mit Supplementierung; n.s. nicht signifikant)

4.4.2.2 FACS-Analyse

Bei der Untersuchung des Differenzierungsverhaltens mittels FACS-Analyse konnten keine Differenzierungsunterschiede bei den ES-Zellen gefunden werden. Sowohl bei der Kultivierung im Standardkulturmedium mit 15 % FBS als auch bei den serumreduzierten Testansätzen mit und ohne Supplementierung lag der Anteil MF20 positiver Zellen zwischen 5 und 7 % (Abb. 4.21).

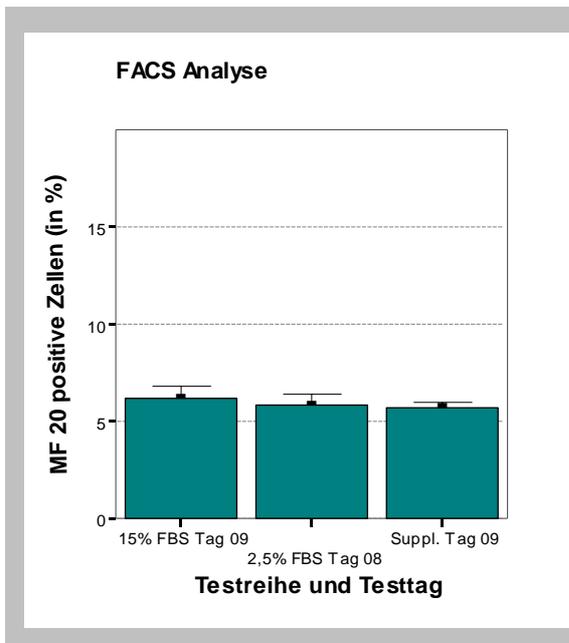


Abb. 4.21: Einfluss der verschiedenen Kulturmedien auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen.

Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Testreihen an den Differenzierungstagen 8 und 9. Die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte der MF20 positiven Zellen in der FACS Analyse inklusive deren Standardfehler. Die Messwerte der Testreihen sind zusammenfassend dargestellt.

Bedingt durch die kaum vorhandenen Mittelwertsunterschiede in Abb. 4.21 fallen die Zufallswahrscheinlichkeiten in der ANOVA für die Unterschiede der FACS-Messungen erwartungs-

gemäß hoch aus (Tab. 4.9). Ausgehend von der Nullhypothese, geben diese Messungen somit keinen Hinweis auf differenzierungsfördernde Eigenschaften der untersuchten Kulturmedien.

Testart	Hypothesen	Zufallswahrscheinlichkeit
ANOVA	15 % ohne Supplementierung (Tag 09) > alle mit Supplementierung (Tag 09)	n.s
	2,5 % ohne Supplementierung (Tag 08) < alle mit Supplementierung (Tag 09)	n.s

Tab. 4.9: Überprüfung der statistischen Bedeutsamkeit aller Arbeitshypothesen für die FACS-Analyse

Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Zellkulturmedien in der FACS-Analyse mittels ANOVA und Post hoc Bonferroni Test (n.s. nicht signifikant).

4.4.2.3 Quantitative RT-PCR

Eine erhöhte Expression von α -MHC in der TaqMan PCR Analyse konnte sowohl bei den supplementierten Testansätzen mit einem Restserumanteil von 1 und 0,5 % FBS als auch bei den serumreduzierten Testansätzen mit 2,5 % FBS detektiert werden. Die Expression des kardialen α -MHC stieg in der Testreihe mit 2,5 % FBS vom Differenzierungstag Acht zum Differenzierungstag Zehn bis über das Fünffache relativiert zur Menge des Standardkulturmediums mit 15 % FBS an. Mit einer zeitlichen Verzögerung von zwei Tagen konnte auch in den Testreihen mit Serumersatz und mit 0,5 % FBS eine bis zu achtfach höhere Expression relativiert zum Standardkulturmedium mit 15 % FBS beobachtet werden.

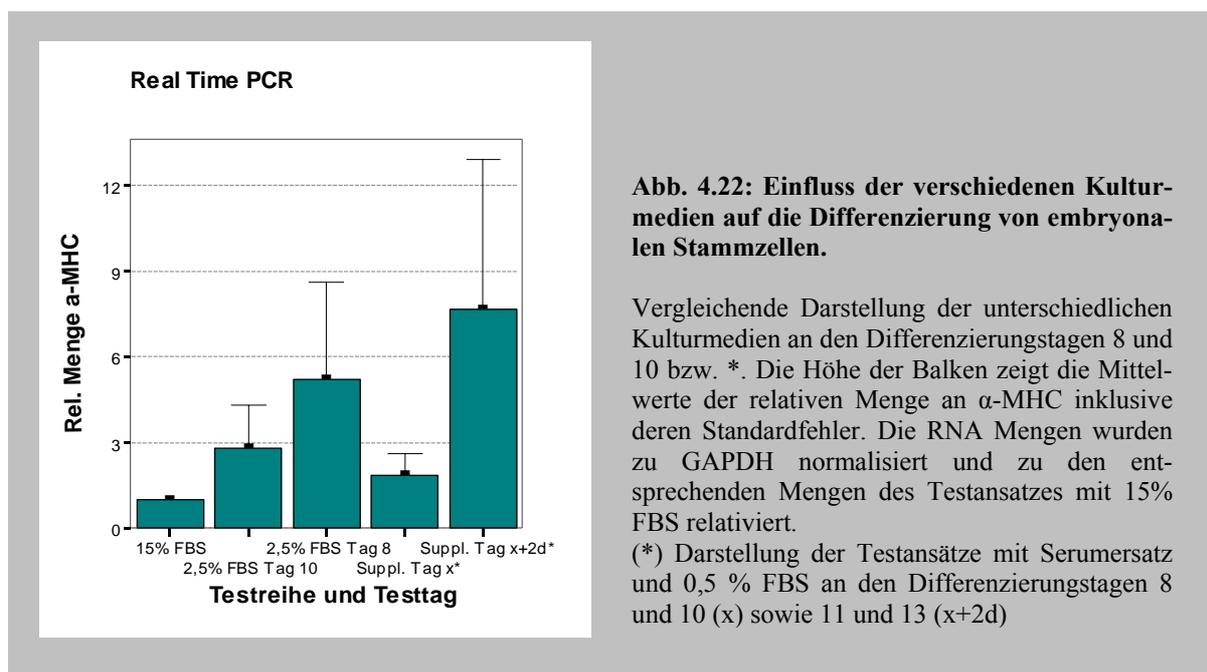


Abb. 4.22: Einfluss der verschiedenen Kulturmedien auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen.

Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Kulturmedien an den Differenzierungstagen 8 und 10 bzw. *. Die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte der relativen Menge an α -MHC inklusive deren Standardfehler. Die RNA Mengen wurden zu GAPDH normalisiert und zu den entsprechenden Mengen des Testansatzes mit 15% FBS relativiert.

(*) Darstellung der Testansätze mit Serumersatz und 0,5 % FBS an den Differenzierungstagen 8 und 10 (x) sowie 11 und 13 (x+2d)

Mit der Zunahme der Expression konnte aber auch eine Zunahme der Streuung der Einzelwerte um die Mittelwerte beobachtet werden. Da die Grundvoraussetzungen zur Durchführung einer ANOVA nicht gegeben waren, wurde somit auf ein alternatives Testverfahren, den KSO-Test zurückgegriffen. Im direkten Vergleich zum Standard-Kulturmedium (15 % FBS) nimmt nur der supplementierte Testansatz mit 0,5 % FBS signifikant höhere Rangplätze ein und ist mit einem Zufall von unter 5 % vereinbar. In diesem Falle induziert das supplementierte Kulturmedium die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten in höherem Maße als das Standardkulturmedium mit 15 % FBS. Keine signifikanten Unterschiede konnten im Vergleich mit dem serumreduzierten Kulturmedium mit 2,5 % FBS gefunden werden. Weder das Standardkulturmedium mit 15 % noch die mit Serumersatz supplementierten Kulturmedien bestätigten im KSO-Test differenzierungsfördernde Eigenschaften.

Testart	Hypothesen	Zufallswahrscheinlichkeit
KSO	15 % ohne Supplementierung (Tag 10) < 2,5 % ohne Supplementierung (Tag 10)	n.s
	15 % ohne Supplementierung (Tag x+2d) < 0,5 % mit Supplementierung (Tag x+2d)	<5 %
	2,5 % ohne Supplementierung (Tag 10) < 0,5 % mit Supplementierung (Tag x)	n.s

Tab. 4.10: Überprüfung der statistischen Bedeutsamkeit aller Arbeitshypothesen für die quantitative RT-PCR

Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Zellkulturmedien in der quantitativen RT-PCR mittels Kolmogoroff-Smirnov-Omnibustest (n.s. nicht signifikant).

4.5 Beurteilung der angewendeten Untersuchungsmethoden auf Praktikabilität und Redundanz des Informationsgehaltes

ES-Zellen der Maus wurden unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit und ohne Supplementierung mit einem Serumersatz kultiviert und auf ihr Proliferations- und Differenzierungsverhalten hin untersucht. Um den Informationsgehalt der angewendeten Messinstrumente auf seine interne und externe Genauigkeit zu überprüfen, wurden auch hier deren Konvergenzen anhand von Kendalls-Konkordanzkoeffizienten W bzw. Kendalls Tau berechnet.

4.5.1 Interne Übereinstimmung (Reliabilität) der Messinstrumente

4.5.1.1 Serumreduktion ohne Supplementierung eines Serumersatzes

Die interne Messgenauigkeit lässt sich sowohl durch die Anzahl redundanter Messungen in einer Versuchsreihe (MTT Test 20, FACS 3) als auch durch die Anzahl der wiederholten unabhängigen Versuchsreihen ($N=7$) bestimmen und kann mit Hilfe des Kendalls Konkordanzkoeffizienten W abgebildet werden.

Der Mittelwert aller Konkordanzkoeffizienten der MTT-Analysen von fünf verschiedenen Messobjekten weist mit 0,63 auf eine mittelhohe Übereinstimmung hin, deren Zufallswahrscheinlichkeit unter 5 % liegt (Tab. 4.11). Der Mittelwert aller Konkordanzkoeffizienten der FACS-Analysen von sieben verschiedenen Messobjekten weist mit 0,92 ebenfalls auf eine starke Übereinstimmung hin (Tab. 4.12). Für jeden einzelnen Konkordanztest liegt die Zufallswahrscheinlichkeit unter 5 %, womit auch hier von einer hohen Reliabilität innerhalb der einzelnen unabhängigen Versuche ausgegangen werden kann.

Block Nr	Konkordanz W	Signifikanz auf 5% Niveau?
Block 7	0,69	ja
Block 8	0,69	ja
Block 11	0,87	ja
Block 14	0,57	ja
Block 15	0,35	ja

Tab.4.11: Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) des MTT-Proliferationstests

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Konkordanzkoeffizient W der 20 wiederholten Messungen des MTT-Tests. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Übereinstimmung, ein Wert von Null von keiner Übereinstimmung. Gestestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5%.

Block Nr	Konkordanz W	Signifikant auf 5% Niveau?
Block 2	0,78	ja
Block 4	0,85	ja
Block 7	0,96	ja
Block 8	0,96	ja
Block 11	0,96	ja
Block 14	0,96	ja
Block 15	1,00	ja

Tab.4.12: Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der FACS Analyse

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Konkordanzkoeffizient W der drei wiederholten Messungen der FACS Analyse. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Übereinstimmung, ein Wert von Null von keiner Übereinstimmung. Gestestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5%.

Die Bewertung der Reliabilität der einzelnen Testsysteme in bezug auf die einzelnen unabhängigen Versuche zeigt hingegen ein anderes Bild. So deutet die Konkordanz des MTT-Tests auf eine mittlere Übereinstimmung, deren Zufallswahrscheinlichkeit unter 5 % liegt. Im 24-Loch Funktionstest nehmen die Konkordanzkoeffizienten mit zunehmender Differenzierung stetig zu. Eine mittelhohe Übereinstimmung wird jedoch erst mit der Auswertung am Differenzierungstag Zehn signifikant. Die Konkordanz der FACS-Analyse am Differenzierungstag Acht zeigt eine mittlere Übereinstimmung, die der TaqMan PCR Analysen zeigen hingegen keine reliablen Resultate. Sowohl Analysetag Acht als auch Zehn ist nicht signifikant (Tab. 4.13).

Testreihe	Anzahl der Versuche	Test	Konkordanz W	Signifikanz auf 5 % Niveau
Serumreduktion ohne Supplementierung eines Serumersatzes	N=7	MTT-Test d10	0,57	ja
		24-Loch Funktionstest d08	0,25	nein
		24-Loch Funktionstest d09	0,53	nein
		24-Loch Funktionstest d10	0,65	ja
		FACS Analyse d08	0,56	ja
		Real Time PCR d08	0,04	nein
		Real Time PCR d10	0,09	nein

Tab. 4.13: Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der unabhängigen Versuche

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Konkordanzkoeffizient W der wiederholten Versuche (N=7). Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Konvergenz, ein Wert nahe Null von einer niedrigen Konvergenz. Getestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5 %.

4.5.1.2 Serumreduktion mit Supplementierung eines Serumersatzes

Die Überprüfung der internen Genauigkeit der Testsysteme in dieser Testreihe zeigt eine starke Übereinstimmung. So zeigen die 20 redundanten Messungen des MTT-Test eine Konvergenz im Mittel von 0,83, die der drei redundanten Messungen der FACS-Analyse eine Konvergenz im Mittel von 0,87 (Tab. 4.14 und 4.15). In beiden Testsystemen liegt die Zufallswahrscheinlichkeit unter 5 %, so dass man diesen Testsystemen eine hohe Reliabilität zuordnen kann.

Block Nr.	Konkordanz W	Signifikanz auf 5% Niveau?
Block 5	0,75	ja
Block 6	0,82	ja
Block 10	0,80	ja
Block 12	0,99	ja
Block 13	0,78	ja

Tab.4.14: Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) des MTT-Proliferationstests

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Konkordanzkoeffizient W der 20 wiederholten Messungen des MTT-Tests. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Übereinstimmung, ein Wert von Null von keiner Übereinstimmung. Gestestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5%.

Block Nr.	Konkordanz W	Signifikanz auf 5% Niveau?
Block 5	0,87	ja
Block 6	0,90	ja
Block 10	0,72	ja
Block 12	0,97	ja
Block 13	0,87	ja

Tab.4.15: Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der FACS-Analyse

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Konkordanzkoeffizient W der drei wiederholten Messungen der FACS-Analyse. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Übereinstimmung, ein Wert von Null von keiner Übereinstimmung. Gestestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5%.

Bei der Betrachtung der wiederholten unabhängigen Versuche weist die Konkordanz des MTT Tests mit 0,61 auf eine mittlere Übereinstimmung hin. Die Tests der 24-Loch Funktionsanalyse an den Auswertungstagen Acht, Neun und Zehn zeigen eine mittlere Übereinstimmung, deren Zufallswahrscheinlichkeiten unter 5 % liegen. Eine geringe Konkordanz lässt sich sowohl bei den 24-Loch Funktionstests an den Tagen Elf und Zwölf, bei der FACS-

Analyse als auch bei der TaqMan PCR finden, deren Zufallswahrscheinlichkeiten über 5 % liegen. (Tab. 4.16).

Testreihe	Anzahl der Versuche	Test	Konkordanz W	Signifikanz auf 5 % Niveau
Serumreduktion mit Supplementierung eines Serumersatzes	N=5	MTT-Test d12	0,61	ja
		24-Loch Funktionstest d08	0,62	ja
		24-Loch Funktionstest d09	0,72	ja
		24-Loch Funktionstest d10	0,69	ja
		24-Loch Funktionstest d11	0,40	nein
		24-Loch Funktionstest d12	0,45	nein
		FACS Analyse d09	0,14	nein
		Real Time PCR	0,37	nein

Tab. 4.16: Interne Messgenauigkeit (Reliabilität) der unabhängigen Versuche

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Konkordanzkoeffizient W der wiederholten Versuche (N=5) Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Konvergenz, ein Wert nahe Null von einer niedrigen Konvergenz. Getestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5 %.

4.5.2 Externe Übereinstimmung (Validität) der Messinstrumente

Wie schon in Kapitel 4.2 beschrieben lässt sich neben der internen Übereinstimmung der verschiedenen Messmethoden (Reliabilität) auch deren externe Übereinstimmung einschätzen. Das Differenzierungsverhalten der ES-Zellen wurde sowohl unter serumreduzierten Kulturbedingungen ohne als auch mit Supplementierung eines Serumersatzes auf drei verschiedenen Ebenen analysiert. Funktionell wurden die spontanen Kontraktionen innerhalb der EBs gewertet, auf Proteinebene die Differenzierung der ES-Zellen zu Kardiomyozyten mittels Durchflusszytometer quantifiziert und schließlich auf RNA Ebene die Expression herzzellspezifischer Gene untersucht. Für diese drei verschiedenen Messmethoden, die alle ein Maß für den gleichen Endpunkt darstellen, lassen sich jeweils die Konkordanzkoeffizienten bestimmen. Die externe Bewertung aller drei Messmethoden lässt sich anhand des Kendalls Konkordanzkoeffizienten W durchführen, für die paarweisen Zusammenhangsbetrachtungen lassen sich deren Rangkorrelationen nach Kendalls Tau bestimmen.

4.5.2.1 Serumreduktion ohne Supplementierung eines Serumersatzes

Eine Kombination der drei Messmethoden 24-Loch Funktionstest, FACS-Analyse und TaqMan PCR ist für den Differenzierungstag Acht durchführbar, kann jedoch in ihrer Validität nicht überzeugen. Lediglich in einem von fünf Fällen kann von einer hohen Übereinstimmung ausgegangen werden, deren Zufallswahrscheinlichkeit unter 5 % liegt (Tab. 4.17).

24-Loch, FACS, TaqMan PCR	Konkordanz W	Signifikanz auf 5% Niveau?	
Serumreduktion ohne Supplementierung, Tag 8	Block 4	0,34	nein
	Block 7	0,69	nein
	Block 8	0,84	ja
	Block 11	0,08	nein
	Block 14	0,22	nein
	Block 15	0,16	nein

Tab. 4.17: Externe Messgenauigkeit der drei Messinstrumente in den einzelnen Testreihen

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Konkordanzkoeffizient W zur Berechnung der Validität der drei Messinstrumente. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Konvergenz, ein Wert nahe Null von einer niedrigen Konvergenz. Getestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5 %.

Für die paarweisen Zusammenhangsbetrachtungen zeigt der direkte Vergleich von PCR und FACS-Analyse, PCR und 24-Loch Funktionstest sowie FACS-Analyse und 24-Loch Funktionstest eine statistisch nicht signifikante schwache Übereinstimmung, deren Tau Werte alle unter 0,3 liegen. (Tab. 4.18).

Kombination der Messmethoden	Kendalls Tau (Mittelwert)	Signifikanz auf 5 % Niveau?
PCR/ FACS	0,01	nein
PCR/24-well	0,29	nein
FACS/24-well	0,29	nein

Tab. 4.18: Externe Messgenauigkeit der Messinstrumente in Form von Kendalls Tau

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Tau zur Berechnung der Validität der Messinstrumente. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Konvergenz, ein Wert nahe Null von einer niedrigen Konvergenz. Getestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5 %.

4.5.2.2 Serumreduktion mit Supplementierung eines Serumersatzes

Eine Betrachtung der externen Genauigkeit aller drei Messinstrumente ist für diese Testreihe nicht möglich. Es findet sich kein Analysetag, an dem alle drei Messmethoden gleichzeitig zur Anwendung gekommen sind. Eine paarweise Betrachtung ist nur zwischen den Testsystemen 24-Loch Funktionsanalyse und FACS- sowie 24-Loch Funktionsanalyse und RT-PCR möglich. Zusammenfassend zeigen diese eine niedrige Übereinstimmung, deren Zufallswahrscheinlichkeiten über 5 % liegen und demnach in ihrer Validität nicht überzeugen (Tab. 4.19)

Kombination der Messmethoden	Kendalls Tau (Mittelwert)	Signifikanz auf 5 % Niveau?
24-well/ PCR	0,24	nein
24-well/ FACS	0,12	nein

Tab. 4.19: Externe Messgenauigkeit der Messinstrumente in Form von Kendalls Tau

Darstellung des Zusammenhangsmaßes Kendalls Tau zur Berechnung der Validität der Messinstrumente. Ein Wert nahezu Eins zeugt von einer hohen Konvergenz, ein Wert nahe Null von einer niedrigen Konvergenz. Getestet wurde auf ein Signifikanzniveau von 5 %.

5. Diskussion

Pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen), isoliert aus der inneren Zellmasse der Blastozyste der Maus (Doetschman et al., 1985), können in Zellkultur mit Hilfe des *Leukemia inhibitory factor* (LIF) im undifferenzierten Stadium gehalten werden (Williams et al., 1988). Unter definierten Kulturbedingungen und ohne Einwirkung von LIF können sich ES-Zellen in Zellen der drei Keimblätter Endoderm, Ektoderm und Mesoderm differenzieren. Um *Embryoid Bodies* (EBs) auszubilden, benötigen ES-Zellen einen so genannten initialen Aggregationsschritt, welcher durch eine Vielzahl von Parametern beeinflusst wird. Die *in vitro* Kultivierung der ES-Zellen in hängenden Tropfen (Rudnicki und McBurney, 1987) spiegelt die Verhältnisse des lebenden Embryos am besten wider. Ein vier bis fünf Tage alter EB in Kultur entspricht in seinem prinzipiellen zellulären Aufbau einer Blastozyste zum Zeitpunkt der Implantation, ein sieben bis acht Tage alter EB zeigt Strukturen eines Embryos im Eizylinder-Stadium (Bradley, 1990). Um sich in Kultur zu Kardiomyozyten zu entwickeln, wirken sich die Anzahl der Zellen in den EBs, die Art des Zellkulturmediums, Fötale Kälberserum (FBS), Wachstumsfaktoren, die Herkunft der Zelllinie sowie der Platierungszeitpunkt auf das Differenzierungspotential dieser Zellen aus (Wobus et al., 2002). Mit der Etablierung von Endpunkten für die Untersuchung der *in-vitro*-Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen in Kardiomyozyten, sollte im ersten Teilabschnitt dieser Arbeit die Differenzierung der murinen Stammzelllinie D3, in Abhängigkeit von der Zeit, unter Standard-Kulturbedingungen (15 % FBS) charakterisiert werden. Da sich in einem EB simultan neben den Kardiomyozyten noch viele andere Zelltypen entwickeln, mussten für die Untersuchungen Strukturen als Endpunkte ausgewählt werden, die sich spezifisch in Herzmuskelzellen finden. Bei der Maus, wie bei den meisten Säugetieren, ist das *Myosin heavy chain* (MHC) das quantitativ am meisten vorkommende kontraktile Protein, welches im Genom als eine Einheit mehrerer Isoformen repräsentiert wird (Robbins et al., 1990; Ng et al., 1991). Angesichts dieser Tatsache wurde somit das Differenzierungsverhalten der ES-Zellen zu Kardiomyozyten sowohl auf spontane Kontraktionen überprüft, als auch auf die Expression des sarkomeren MHC auf der Protein- und RNA-Ebene untersucht. Die Beurteilung der etablierten Untersuchungsmethoden auf Praktikabilität und Redundanz des Informationsgehaltes diente dazu, diese Endpunkte im zweiten Teilabschnitt für die Charakterisierung der Differenzierung von ES-Zellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen anzuwenden und ein zuvor etabliertes Gemisch von Supplementen als Serumersatz zu beurteilen.

5.1 Etablierung von Endpunkten für die Untersuchung der *In-vitro*-Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten

Als ein validierter Endpunkt im konventionellen Embryonalen Stammzelltest (EST) wird die Differenzierung der murinen ES-Zellen zu Kardiomyozyten morphologisch bestimmt (Genschow et al., 2002). Die mikroskopische Auswertung des Differenzierungstests, durch Untersuchung der EBs auf Kontraktionen wird von mehreren Autoren als zeitaufwendig und erfahrungserfordernd kritisiert (Seiler et al., 2002; Buesen et al., 2004). Um diese Auswertungsstrategie zu optimieren wurden in einem Zeitfenster der Differenzierungstage Fünf bis Zehn unter Standard-Kulturbedingungen (15 % FBS) Endpunkte etabliert, die die Kardiomyozytendifferenzierung charakterisieren. Neben der herkömmlichen Funktionalitätsüberprüfung auf spontane Kontraktionen, wurden die sich zu Kardiomyozyten differenzierenden Zellen über die indirekte Immunzytochemie identifiziert und die morphologische Struktur dieser Zellen innerhalb der EBs immunfluoreszent dargestellt. Als ein weiterer Endpunkt wurde die Herzzell-differenzierung der ES-Zellen durch die FACS-Analyse auf Proteinebene quantifiziert. Der Nachweis herzspezifischer RNA-Targets sollte die Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten auf molekularer Ebene beschreiben.

Um dem Problem der Chargenschwankungen zu begegnen, wurde laborintern das verwendete Serum (FBS 149ff. S0115, Biochrom Berlin) dem Kulturmedium in Konzentrationen bis zu 30 % zugesetzt. Da Serum aufgrund des Ausgangsmaterials und des Herstellungsprozesses einer Chargenvariabilität unterliegt, ist es daher vor der Verwendung auf die Eignung für die Zellkultur und eine mögliche Toxizität zu überprüfen (Tessarollo, 2001). Im Hinblick auf die Durchführung des EST kommen für die Kultivierung der ES-Zellen nur Seren in Betracht, mit denen gleichzeitig hohe Proliferationsraten und hohe Differenzierungsraten erreicht werden.

Spontan kontrahierende Herzmuskelzellen konnten, wie von anderen Autoren beschrieben (Guan et al., 1999; Boheler et al., 2002), erstmals am Tag Sechs mikroskopisch detektiert werden. Bereits am Differenzierungstag Acht waren im 24-Loch Funktionstest in mehr als 21 von 24 Lochvertiefungen kontraktile Areale sichtbar. Da schlagende Herzmuskelzellen mit der konventionellen mikroskopischen Auswertung zu diesem Zeitpunkt nicht immer zuverlässig detektierbar sind, wurde als optimaler Untersuchungszeitpunkt hierfür Tag Zehn der Differenzierung als valide eingestuft (Seiler et al., 2002). Für ein Routinescreeningverfahren ist dies ein relativ langer Test-Zeitraum (Seiler et al. 2002). Ferner ist die mikroskopische Aus-

wertung hinsichtlich der quantitativen Abschätzung der Differenzierung wenig aussagekräftig. Weder Größe noch Anzahl der Areale innerhalb eines EBs werden in diesem Differenzierungsassay berücksichtigt und erlauben somit keine Aussage zur Quantität.

Um die im Protokoll des „Hängenden Tropfens“ (Wobus, 2002) spontan auftretende Entwicklung von Kardiomyozyten in den EBs nachzuweisen, wurden diese immunfluoreszent mit einem Antikörper gegen MHC gefärbt. Als gut charakterisierter Antikörper ist MF20 in der Lage, spezifisch beide Isoformen des MHC zu detektieren und erkennt dann aufgrund seiner starken Bindung an sarkomeres Myosin sowohl die nativen als auch die denaturierten Formen (Bader et al., 1982). Obwohl MF20 sowohl mit Herz- als auch mit Skelettmuskel reagiert, haben Studien gezeigt dass Skelettmuskelzellen zu diesem Zeitpunkt der ES-Zelldifferenzierung nicht präsent sind (Klug et al., 1996; Doevendans et al., 2000). Bei immunzytochemischen Untersuchungen an gewachsenen EBs am Tag 5 bis 10 wurde festgestellt, dass das Auftreten von MHC als Strukturprotein für differenzierte, funktionstüchtige Kardiomyozyten mit den schlagenden Herzmuskelzellen, die morphologisch im Mikroskop identifiziert werden konnten, korrespondiert. In Übereinstimmung mit den Befunden von Boheler et al. (2002) waren die markierten Zellen innerhalb der EBs nach ihrem Ausplattieren klein und rund. In Entstehung befindliche sarkomere Strukturen wiesen eine spärliche und unregelmäßig organisierte Verteilung auf. Mit zunehmender Differenzierung wurden die Zellen gestreckter und entwickelten eine immer deutlicher ausgereifte myofibrilläre Anordnung dieser Strukturen, die sich in Form von dicht gelagerten Bündeln zeigte.

In der durchflusszytometrischen Analyse an den Differenzierungstagen Fünf bis Zehn wurden für das Markerprotein MHC die häufigsten Signale an den Tagen Acht und Neun der Differenzierung beobachtet. Waren mit dem Antikörper MF20 im Durchschnitt 6,7 % von 30.000 Zellen am Tag Acht markiert, so lag am Tag Neun der Anteil MF20 positiver Zellen bei 8,4 %. Im Vergleich zu den von anderen Autoren (Buesen et al., 2004; Seiler et al., 2004) durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen, sind diese Werte als niedrig anzusehen. In den Untersuchungen von Buesen et al. (2004) wurde eine maximale Expression des für Herzmuskelzellen spezifischen Markerproteins bereits an Tag Sieben der Differenzierung, mit einem Anteil von 17 % positiven Zellen, beobachtet. In einer anderen Studie wird der Anteil MF 20 positiver Zellen sogar mit 20 % am Differenzierungstag Sieben angegeben (Seiler et al., 2006). Ein vergleichbares Ergebnis zeigt sich hingegen am Differenzierungstag Zehn. Sowohl in der Studie von Seiler et al. (2004), als auch in der vorliegenden Studie konnte eine Abnahme MF20 positiver Zellen auf 7 % detektiert werden. Deutlich niedrigere Werte erziel-

ten Zandstra et al. (2003) mit einem vergleichbaren Differenzierungsprotokoll. In dieser Arbeit wurden lediglich 3,9 % MF 20 positiver Zellen am Differenzierungstag Neun gemessen. Ein Ansteigen der Werte darüber hinaus konnte zu keinem späteren Zeitpunkt nachgewiesen werden.

In der Real Time PCR konnte in dieser Studie eine Zunahme der RNA-Expression des kardialen α -MHC am Differenzierungstag Fünf festgestellt werden, die ihr Maximum an den Differenzierungstagen Acht, Neun und Zehn erreichte. Ein Anstieg der Expression konnte ebenfalls von zur Nieden et al. (2001) ab Tag Fünf nachgewiesen werden, wobei am Differenzierungstag Neun ein Peak beobachtet werden konnte und anschließend ein Rückgang der Expression von α -MHC zu vermerken war. Ein nahezu identischer Verlauf zeigt der Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit denen der Studie von Kaltenhäuser (2006). Ein deutlicher Expressionsanstieg von kardialem α -MHC am Differenzierungstag Sechs, der sich am Differenzierungstag Acht mit einer mehr als 1000fache Zunahme seinem Plateau nähert. Wie in der *in vivo* Embryogenese findet während der EB-Entwicklung eine Verschiebung in der Expression und Verteilung der MHC Isoform statt (Metzger et al., 1995). So konnte die Expression von β -MHC während der ES-Zelldifferenzierung in einzelnen EBs von Sanchez et al. bereits zu Tag Vier beobachtet werden, während die Expression von α -MHC erst mit Einsetzen spontaner Kontraktion nachgewiesen wurde (Sanchez et al., 1991). In dieser Studie wurden jedoch Strukturen als Endpunkte gewählt, die zeitgleich mit Einsetzen der Kontraktionen nachzuweisen sind. Vergleichend zu den Analysen des 24-Loch Funktionstests und der FACS-Analyse stieg die Expression des α -MHC in den EBs mit zunehmender Differenzierungsdauer. Die Hauptexpressionszeit dieses herzmuskelspezifischen Markers befindet sich demnach an den Tagen, an denen maximale Kontraktionen innerhalb der EBs nachzuweisen sind bzw. die höchsten Werte MHC positiver Zellen mittels Durchflusszytometer detektiert werden.

Im Hinblick auf die nachstehenden Untersuchungen im zweiten Teilabschnitt dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines nichtparametrischen Anpassungstest der Differenzierungstag identifiziert, an dem die Expression kardialer Strukturproteine optimal nachzuweisen ist. Vergleichend zum 24-Loch Funktionstest lieferte der Differenzierungstag Acht in der FACS-Analyse die stabilsten Ergebnisse und wurde somit für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Die Real-Time PCR Analyse des kardialen α -MHC wies die Differenzierungstage Acht, Neun und Zehn als Hauptexpressionszeitpunkte aus. Bestärkt durch den nahezu identischen Verlauf des

α -MHC Expressionsprofiles in der Studie von Kaltenhäuser (2006) wurde somit die Expression des α -MHC für die weiteren Tests am Tag Acht und Zehn gemessen.

Neben der Etablierung dieser Messmethoden wurde auch deren Praktikabilität und Messgenauigkeit bewertet. Die konventionelle Auswertung mit dem 24-Loch Funktionstest benötigt Erfahrung. Wie schon ausgeführt, wird bei der Beurteilung der kontrahierenden Areale nicht die Größe der kontrahierenden Areale bestimmt, sondern es wird nur festgestellt, ob die Zellpopulation eines *Embryoid Body* mindestens eine kontrahierende Zelle aufweist oder nicht. Die interne Messgenauigkeit der sich wiederholenden Versuche dieses Testsystems wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Kendalls Konkordanzkoeffizienten berechnet und wies eine mittelhohe Übereinstimmung mit 0,79 auf. Die indirekte Immunfluoreszenz ist relativ leicht anzuwenden, und die mikroskopische Betrachtung der immunfluoreszent gefärbten EBs erlaubt es sarkomere Strukturen zu beschreiben. Eine detaillierte Aussage über die Menge und den Grad der Differenzierung ist jedoch nur bedingt möglich. Bei der durchflusszytometrischen Analyse handelt es sich um ein zeitaufwendiges Protokoll, dessen geringe Reproduzierbarkeit in dieser Arbeit mit einem Kendalls Konkordanzkoeffizienten von nur 0.39 berechnet wurde. Als ein für die FACS-Analyse idealer Antikörper zeigt MF 20 eine starke spezifische Bindung zu den sarkomeren Strukturen. Auf diese Weise markierte Zellen können exakt von denen der Negativkontrolle separiert werden und weisen keine unspezifischen Bindungen auf (Seiler et al., 2004). Da es sich hierbei um eine intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung handelt, dient eine kurzfristige Permeabilisierung der Zellen dem Durchtritt des Antikörpers in das Zytoplasma. Da es dadurch zu einem Verlust des ohnehin schon begrenzten Zellmaterials und daraus resultierenden Abweichungen kommen kann, ist eine exakte Quantifizierung nur bedingt möglich. Nach persönlicher Mitteilung von Dr. Burkhard Flick im August 2007 (Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charite – Universitätsmedizin Berlin) ist die unabhängige Reproduktion in unabhängigen Laboratorien bisher noch nicht gelungen. Hierbei konnte keine ausreichende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhalten werden. Vielversprechend hingegen zeigt sich die Real Time PCR Analyse, deren Reproduzierbarkeit in dieser Arbeit mit einem Konkordanzkoeffizienten von 0,92 berechnet wurde. Zwar handelt es sich um ein relativ kostenaufwendiges Verfahren, doch zeigt auch der Vergleich mit der Studie von Kaltenhäuser (2006) das große Potential dieser Untersuchungsmethode. Damit bietet sich die Möglichkeit, die Differenzierung von ES-Zellen zu Herzmuskelzellen reproduzierbar zum Differenzierungstag Acht mit Methoden zu erfassen, deren Parameter mit der mikroskopischen Auswertung nicht bestimmt werden können. Neben einer Quantifizierung ist es somit

möglich eine Vielzahl anderer herzzellspezifischer Markergene auf ihre Expression zu untersuchen.

5.2 Kultivierung embryonaler Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen ohne Supplementierung eines Serumersatzes

Nach dem INVITTOX Protokoll Nr. 113 (Spielmann und Scholz, 1999) für die Durchführung des embryonalen Stammzelltestes (EST), wird dem Kulturmedium 20 % FBS zugesetzt. Diese Serumsubstitution wird ebenfalls von anderen Autoren angegeben (Wobus et al., 1991; Strübing et al., 1995; Fijnvandraat et al., 2003), wobei in neueren Protokollen eine Serumreduktion auf 15 % FBS im Kulturmedium zulässig ist (Seiler et al., 2006). Um die Notwendigkeit dieser Serumzugabe zu untersuchen, wurden die ES-Zellen in den jeweiligen Kulturmedien mit 20 %, 15 %, 10 %, 5 % und 2,5 % FBS gehalten. Neben der Analyse des Differenzierungsverhaltens mittels 24-Loch Funktionstest, kamen die etablierten Endpunkte aus dem ersten Teilabschnitt dieser Arbeit zum Einsatz. Mit der Durchführung der indirekten Immunzytochemie, der FACS-Analyse und der Real Time PCR sollte die Differenzierung der ES-Zellen zu Kardiomyozyten sowohl auf der Protein- als auch auf der RNA-Ebene untersucht werden. Als ein weiterer validierter Endpunkt im EST wurde in dieser Versuchsreihe der MTT-Test zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens angewendet. Für den Proliferationstest, durchgeführt mit der embryonalen Stammzelllinie D3, werden in den Protokollen des embryonalen Stammzelltestes verschiedene Referenzbereiche angegeben. Für die unbehandelte Kontrolle des Proliferationstest wird im INVITTOX Protokoll Nr. 113 für embryonale Stammzellen D3, bezogen von der ATCC, ein Referenzbereich der optischen Dichte von 0,9 - 1,6 angegeben (Spielmann und Scholz, 1999). Seiler et al. (2006) gibt hingegen einen Referenzbereich für die Stammzelllinie D3, bezogen von der ATCC, von 0,50 und 1,6 an.

Kral (2006) zeigte ein Ansteigen der Proliferationsraten der ES-Zellen im untersuchten Konzentrationsbereich mit zunehmender Serumkonzentration. Dagegen war in den vorliegenden Untersuchungen zwar zunächst ebenfalls eine Zunahme des Wachstums zu verzeichnen, nach dem Erreichen eines Proliferationsmaximums bei 10 %iger Serumkonzentration führte das weitere Erhöhen der Serumkonzentration jedoch zu einem Rückgang der Proliferation. Rein optisch waren die Vertiefungen der 96-Loch Platten mit zunehmender Serumkonzentration dichter mit Zellen bewachsen und das enthaltende Medium in den sauren Bereich verfärbt. Da der MTT-Test als Maß für die Viabilität der Zellen dient und Dehydrogenasen nur in leben-

den Zellen aktiv sind (Mosmann et al., 1983), lässt sich daraus schließen, dass bei hohen Serumkonzentrationen bereits ein Zelluntergang stattfindet. Ein reger Stoffwechsel der Zellen führt sowohl zum Verbrauch wichtiger Nutritiva als auch zur Anreicherung von Metaboliten, was bei begrenzter Pufferkapazität eine Störung des physiologischen Milieus bedeutet und somit den Zelluntergang einleitet. Die kaum detektierbare Proliferation bei einer Serumkonzentration von 2,5 % FBS lässt sich folgendermaßen begründen: Bei optischer Betrachtung waren die Vertiefungen der 96-Loch Platten spärlich mit Zellen bewachsen. Die Zellen zeigten zum Teil keine Anheftung am Kulturgefäß und wurden bei Durchführung des Tests herausgespült. Bedingt durch den geringen Gehalt an FBS im Kulturmedium, fehlt es den Zellen nicht nur an genügend vorhandenen Nutritiva zur Proliferation sondern auch an Anheftungsfaktoren, die für eine erforderliche Adhäsion an den Kulturgefäßen benötigt werden.

Die Auswertung des Differenzierungsverhaltens mittels 24-Loch Funktionstest an den Differenzierungstagen Acht bis Zehn zeigte eine Proportionalität zu den Serumkonzentrationen. Je mehr Serum dem Kulturmedium supplementiert wurde, desto höher war der Anteil kontrahierender Areale in den *wells*. Um eventuelle differenzierungshemmende Eigenschaften von hohen FBS Konzentrationen im Kulturmedium zu untersuchen, wurde in der Arbeit von Kral (2006) das Differenzierungsverhalten von ES-Zellen zu Kardiomyozyten in einem Konzentrationsbereich von 5, 15, 20 sowie 30 % FBS im Kulturmedium untersucht. Es konnte am Differenzierungstag Zehn kein Einfluss der Serumkonzentration auf die Differenzierung zu Herzmuskelzellen beobachtet werden. Die Auswertung am Differenzierungstag Sieben zeigte hingegen, dass zu diesem frühen Auswertungszeitpunkt mit niedrigen Serumkonzentrationen höhere Differenzierungsraten erreicht wurden. Sachinidis et al. (2003a) beschreibt, dass mit zunehmender Serums substitution die Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten verhindert wird. Dieser und Krals Auffassung nach beinhaltet Serum nicht nur Faktoren, die die Herzzelldifferenzierung unterstützen sondern auch solche, die an einer Differenzierungshemmung beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit zeigt die Differenzierung sowohl am Tag Acht als auch am Tag Zehn eine deutliche Serumabhängigkeit. Je höher der Anteil der FBS Konzentration im Kulturmedium ist, desto höher ist der Anteil kontrahierender Areale innerhalb der EBs. Inwiefern bei noch höheren Serumkonzentrationen ein Rückgang zu verzeichnen wäre, wurde in dieser Studie nicht getestet. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch die Tatsache, dass bei den oben genannten Arbeiten (Sachinidis et al., 2003a; Kral, 2006) mit jeweils unterschiedlichen Serumchargen gearbeitet wurde. Im Hinblick auf die undefinierte Zusammensetzung von FBS, sowie der vorhanden Chargenvariabilität ist es schwierig, mit solch empfindlichen Testsystemen reproduzierbare Ergebnisse zu schaffen.

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung zur Quantifizierung der differenzierten Kardiomyozyten am Differenzierungstag Acht konnte mit Hilfe der Rangkorrelation nach Spearman ein mittlerer Zusammenhang zwischen dem Anteil MF 20 positiver Zellen zur Serumkonzentration festgestellt werden. Je höher der Anteil des Serums im Kulturmedium war, desto höher war der Anteil der mit dem Antikörper MF20 gekoppelten Zellen. Dies gilt jedoch nur für den Bereich von 5 bis 20 % FBS im Kulturmedium. Bei einer FBS Konzentration von 2,5 % im Zellkulturmedium lag der Anteil MF20 positiver Kardiomyozyten mit mehr als 6 % über denen mit einer Serumkonzentration von 5 bzw. 10 % FBS. Im Gegensatz zu den Beobachtungen aus der 24-Loch-Funktionsanalyse, konnte eine Zunahme der Differenzierung unter solch niedrigen Serumkonzentrationen erstmals nur durch den Einsatz der FACS Analyse gezeigt werden. Diese Ergebnisse werden von der Genexpressionsanalyse mittels Real Time PCR gestützt. Sie ließ im Bereich von 20 und 10 % FBS zwar keine Serumabhängigkeit erkennen, eine Zunahme von α -MHC bei einer Serumkonzentration von 2,5 % FBS konnte jedoch auch hier beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die fehlenden bzw. nur in geringem Maße vorhandenen FBS-Inhaltstoffe im Zellkulturmedium einen stressinduzierenden und somit für die Differenzierung der embryonalen Stammzellen positiven Einfluss ausüben. So wird zwar bei dieser niedrigeren FBS Konzentration sarkomeres *Myosin Heavy Chain* in den Zellen expremiert, die Zellen sind jedoch nicht funktional, d.h. sie kontrahieren nicht.

5.3 Kultivierung embryonaler Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit Supplementierung eines Serumersatzes

Fötales Kälberserum wird in Zellkulturen nahezu ubiquitär verwendet und versorgt die Zellen mit allen für das Wachstum und für die Differenzierung notwendigen Substanzen. Hinsichtlich der Zusammensetzung und der Gewinnung von FBS gibt es jedoch starke Bedenken (Gstraunthaler, 2003). Die Zusammensetzung des FBS ist nicht genau definiert und unterliegt quantitativ starken Schwankungen (Barnes et al., 1987). Massive ethische Bedenken werden in Bezug auf ein mögliches Leiden der Rinderföten bei der Rohserumgewinnung laut, da die Gewinnung durch eine kardiale Punktion am lebenden Fötus erfolgt (van der Valk et al., 2004). Um diese Nachteile der Verwendung von FBS zu vermeiden wurde der Einfluss von voll definierten Zellkultursupplementen in unterschiedlich reduzierten Serumkonzentrationen untersucht. Dabei wurden dem klassischen Kulturmedium bestehend aus *Iscove's modified Dulbecco's medium* Wachstumsfaktoren, Hormone, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Ami-

nosäuren, Vitamine, Spurenelemente, Antioxidantien und Puffer zugesetzt. Das serumreduzierte bzw. serumfreie Kulturmedium wurde dann im Vergleich zu einem Standardkulturmedium mit 15 % FBS in den unterschiedlichen Differenzierungs- und Proliferationstests auf seine Eignung als Serumersatz geprüft.

Bei Betrachtung des Proliferationsverhaltens embryonaler Stammzellen unter serumreduzierten Kulturbedingungen mit Supplementierung eines Serumersatzes zeigen sich Unterschiede zur herkömmlichen Serumsubstitution von 15 %. Der für ATCC Zellen im INVITTOX Protokoll Nr. 113 (Spielmann und Scholz, 1999) angegebene Referenzbereich für die optische Dichte für murine embryonale Stammzellen der Linie D3 von 0,9 bis 1,6 wurde nur in der Positivkontrolle (15 % FBS) erreicht. In den mit Serumersatz supplementierten Kulturmedien wurden Werte um 0,6 detektiert. Damit liegen diese zwar nicht in dem vom INVITTOX Protokoll Nr.113 angegebenen Referenzbereich, befinden sich jedoch in dem von Seiler et al. (2006) aufgeführten Referenzbereich zwischen 0,5 bis 1,6, welcher für die Anwendung im EST akzeptabel ist. Vergleichend zur Positivkontrolle zeigte sich bei der Betrachtung der Vertiefungen der 96-Loch Zellkulturplatten in den mit Serumersatz supplementierten Anteilen zwar ein dichter Zellrasen, es konnte bei der Durchführung der Tests jedoch ein Ablösen der Zellen beobachtet werden. Dieser Zellverlust lässt sich folgendermaßen erklären: Bei der Testdurchführung des MTT Proliferationstests werden die ES-Zellen auf die gelatinebeschichteten 96-Loch Kulturgefäße gesät und mit den entsprechenden Zellkulturmedien überschichtet. Die Kultivierung der Zellen auf einer solchen Unterlage bedingt eine adhärente Bindung an die Oberfläche mit der charakteristischen Ausbildung einer abgeflachten Morphologie (Knox und Griffiths, 1980). Anheftung und Ausbreitung sind dabei eine Grundvoraussetzung für die Proliferation, welche als Phänomen der Anheftungsabhängigkeit (*anchorage-dependance*) beschrieben wird (Stoker et al., 1968). Unabdingbar für das Überleben, die Proliferation, sowie die Ausbreitung von Zellen in der Zellkultur ist die Supplementierung des Zellkulturmediums mit Serum, wie schon von Wolpert et al. (1969) postuliert. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen, dass durch die nur in geringem Maße vorkommenden Adhäsionsfaktoren bei der Supplementierung des Kulturmediums mit 2,5 % FBS kaum Wachstum zu verzeichnen ist. Die Supplementierung mit FBS in einer Konzentration von 15 % hingegen zeigte eine optimale Versorgung der Zellen, was sich in hohen Werten der optischen Dichte widerspiegelt. Ein leichter Rückgang der Proliferation ist bei den mit Serumersatz supplementierten serumreduzierten Testansätzen zu vermerken, was einen Mangel an Adhäsionsfaktoren im Kulturmedium impliziert. Diese Vermutung wird durch die morphologische Betrachtung der EBs in den Kulturgefäßen gestützt (Vgl. Abb. 4.14 a-f). Eine

fehlende Adhäsion an der Oberfläche der Kulturgefäße lässt die EBs in den serumfreien Testansätzen zusammengezogen und rund erscheinen.

Bei der Funktionalitätsüberprüfung in den 24-Loch Platten konnte im Zeitraum von Differenzierungstag Acht bis Zwölf eine stetige Zunahme kontraktiler Kardiomyozyten in den mit Serumersatz supplementierten Kulturmedien beobachtet werden. Die Positivkontrolle mit der herkömmlichen Serumkonzentration von 15 % zeigte bereits am Tag Acht in über 21 von 24 Vertiefungen spontan kontrahierende Herzmuskelzellen. Zu diesem Zeitpunkt konnten in den mit Serumersatz supplementierten Ansätzen lediglich in 50 % der 24-Loch Platten spontane Kontraktionen detektiert werden. Mit zunehmender Differenzierungsdauer wurde jedoch bei den mit Serumersatz supplementierten Testansätzen von 0,5 bzw. 0,25 % FBS bis zum Tag Zwölf im Mittel der Schwellenwert von 21 erreicht. Laut INVITTOX Protokoll Nr. 113 wird der Test akzeptabel, wenn in der Kontrolle 21 von 24 EBs spontan kontrahierende Areale aufweisen. Dabei handelt es sich um ein Qualitätskriterium im EST, welches Effekte vom Kulturmedium auf die Differenzierung der ES-Zellen ausschließen soll. Spielmann und Scholz (1999) zufolge wird eine hundertprozentige Differenzierung, mit kontrahierenden Zellen in allen 24 wells in nur 50 % der Tests am Differenzierungstag Zehn erreicht. Bei einer Spannweite von 21 bis 24 positiven wells hingegen, weisen nahezu 95 % aller Tests an diesem Tag kontrahierende Zellen auf. Bei Betrachtung der einzelnen durchgeführten Versuche in der hier vorliegenden Studie, werden vergleichbare Ergebnisse bei den mit Serumersatz supplementierten Kulturmedien mit 0,25 % und 0,5 % FBS am Untersuchungstag 12 erreicht. In einer ähnlich aufgebauten Studie (Schlechter et al., 2005) wurde ein serumfreies Kulturmedium, bestehend aus *Advanced D-MEM* mit *KnockOut™-Serum Replacement* kombiniert und allein bzw. in Verbindung mit den spezifischen Faktoren BMPs, Activin A sowie Ascorbinsäure auf seine Eignung zur optimalen Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten getestet. In der 24-Loch Funktionsanalyse konnte die Akzeptanz des Tests nur in Verbindung mit den spezifischen Faktoren ebenfalls am Differenzierungstag Zwölf erzielt werden. Vergleicht man die Mittelwerte aus der Studie von Schlechter et al. (2005) mit denen der hier durchgeführten Studie, so werden annähernd gleiche Ergebnisse in der Schlechter Studie jedoch erst am Differenzierungstag 14 erreicht. Beurteilt man das in dieser Studie verwendete Gemisch von Supplementen mit dem in der Studie von Schlechter et al. (2005) eingesetzten Additiva auf die Eignung als Serumersatz, schneidet das hier verwendete Gemisch besser ab. Mit 0,25 bzw. 0,5 % FBS im Kulturmedium schafft die Zugabe der in dieser Studie getesteten Supplementenmischung ein nahezu definiertes Kulturmedium, was mit dem *KnockOut™-Serum Replacement*, dessen Zusammensetzung nicht bekannt ist, nicht möglich ist. Zusam-

menfassend wird somit deutlich, dass die in dieser Studie getestete Mischung von Supplementen erhebliche Vorteile im Vergleich zu dem *KnockOut™-Serum Replacement* bezüglich der Effektivität und der definierten Zusammensetzung aufweist.

Aufgrund der Feststellung des verzögerten Differenzierungsverhaltens mittels der 24-Loch Funktionsanalyse wurde die durchflusszytometrische Auswertung nach Absprache mit dem Betreuer am Differenzierungstag Neun statt am Differenzierungstag Acht durchgeführt. Die dann erhaltenen Ergebnisse lassen keine Unterschiede zwischen herkömmlicher Serumkonzentration von 15 % FBS im Kulturmedium und den mit Serumersatz supplementierten Kulturmedien erkennen. Schlechter et al. (2005) wendeten ebenfalls die FACS-Analyse zur Testung ihres serumfreien Kulturmediums an. Die Ergebnisse dieser Studie weichen nur gering von denen dieser Arbeit ab. So konnte ein Maximum von 8 % MHC positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie am Differenzierungstag Zehn unter serumfreien Kulturbedingungen quantifiziert werden. Ein Vergleich zum Standarddifferenzierungsprotokoll mit einer FBS Konzentration von 20 % oder 15 % im Kulturmedium wurde jedoch nicht durchgeführt.

Relativiert zum Standardkulturmedium mit 15 % FBS zeigten sich in der quantitativen RT-PCR mit einer Zeitverzögerung von zwei Tagen eine im Mittel siebenfach höhere Expression des kardialen α -MHC. Ein direkter Vergleich zu anderen Studien ist in diesem Fall nur schwer möglich, da in diesen die Effekte nur einzelner Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Serums substitutionen untersucht wurden. Die Substitution von Ascorbinsäure in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l in einem Kulturmedium mit 10 % FBS förderte die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten (Takahashi et al., 2003). Neben anderen herzmuskelspezifischen Markern erreichte in dieser Studie die α -MHC Expression ihr Maximum am Differenzierungstag Zehn und hielt sich auf diesem Niveau bis zum Tag 16 konstant. In einer Studie von Kawai et al. (2004) wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der Wachstumsfaktoren FGF-2 und BMP-2 auf die Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten untersucht. Relativiert zur unbehandelten Kontrolle führte die Kombination aus FGF-2 und BMP-2 zu einer 8-10 fach höheren Expression von α -MHC am Differenzierungstag Zehn. Dabei hatten sowohl die unbehandelte Kontrollgruppe, als auch die mit Wachstumsfaktoren supplementierten Gruppen einen Restserumanteil von 10 % FBS im Kulturmedium.

5.4 Vergleich Serumreduktion mit und ohne Supplementierung eines Serumersatzes

Als ein wichtiges Zellmodell werden embryonale Stammzellen der Maus zur Untersuchung von Prozessen der frühen Embryonalentwicklung eingesetzt (Desbaillets, 2000). Die reproduzierbare Induktion der Kardiomyogenese, welche in kultivierten ES-Zellen beobachtet werden kann, eignet sich, die für die Einleitung der Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten notwendigen Faktoren zu identifizieren (Wei et al., 2005). So wurden diverse Wachstumsfaktoren und Zytokine exzessiv auf ihre Funktion in der Kardiomyogenese und ihre Rolle bei der Induktion von kardialen Transkriptionsfaktoren und Strukturproteinen untersucht. Da Serum zahlreiche Wachstumsfaktoren enthält, sind einzelne Effekte in Bezug auf die Kardiomyogenese schwierig zu erfassen oder gar zu differenzieren. Dies hat dazu geführt serumfreie Kulturmedien zu etablieren, um die Funktion von Wachstumsfaktoren durch ihre gezielte Zugabe zum Medium auf die Kardiomyogenese zu verstehen. So stieg die Expression von α und β MHC Genen bei ES-Zellen die in einem *Serum Replacement Medium*, supplementiert mit Insulin und Transferrin, kultiviert wurden, um das sechsfache an (Sachinidis et al., 2003a). Die Supplementierung des Kulturmediums mit PDGF-BB oder Sphingosine-1-Phosphat, steigerte die Anzahl kontrahierender EBs (Sachinidis et al., 2003a). *In vivo* unterstützten *bone morphogenetic protein*-Signale zum einen die Kardiomyogenese in Vertebraten und wurden zum anderen für die Generierung mesodermaler Herzzellen aus embryonalen Karzinomazellen und murinen embryonalen Stammzellen in Kultur benötigt (Johansson und Wiles, 1995; Zaffran und Frasch, 2002; Schneider et al., 2003). Mitglieder der TGF- β Superfamilie (TGF- β und BMP-2) regulieren insbesondere Transkripte hoch, welche sowohl die herzspezifischen Transkriptionsfaktoren Nkx2,5 und MEF2C, sowie Brachyury, einen mesodermalen Linienmarker kodieren (Schultheiss et al., 1997; Lough und Sugi, 2000). Dieser ist für die Formierung und Differenzierung des späteren Mesoderms und der axialen Entwicklung aller Vertebraten notwendig. EBs, die mit diesen Wachstumsfaktoren stimuliert werden, zeigen ein gesteigertes Potential für die Herzdifferenzierung im Zusammenhang mit einer signifikanten Steigerung an schlagenden Arealen und erhöhter Myofibrillogenese (Befahr et al., 2002). Zusammenfassend beschreiben die oben genannten Methoden, um die Effekte bestimmter Faktoren auf die Kardiomyogenese *in vitro* abzuschätzen. Diese Studien wurden auch unter serumreduzierten Kulturbedingungen durchgeführt, die so identifizierten Wachstumsfaktoren sind jedoch bisher weder kombiniert noch zusammen untersucht worden (Sachinidis et al., 2003b).

Zusammenfassend wurde im zweiten Teilabschnitt dieser Arbeit ein zuvor etabliertes Gemisch von Supplementen (Flick und Klug, 2005), welches in der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe konstant ist, auf seine Eignung als Serumersatz untersucht. Dabei kamen unterschiedliche Analysemethoden zum Einsatz, die sowohl das Proliferationsverhalten der ES-Zellen als auch die Differenzierung dieser Zellen zu Kardiomyozyten bewerten. Durch die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) wurde die Signifikanz der Unterschiedlichkeit der Mittelwerte zwischen den mit Serumersatz supplementierten serumreduzierten Testansätzen und den Testansätzen mit FBS Konzentrationen von 15 und 2,5 % geprüft. Da bei der Varianzanalyse nicht ermittelt wird, welche Gruppenmittelwerte sich voneinander unterscheiden, wurde zur Klärung nachfolgender Mittelwertvergleiche der *Post hoc Bonferroni* Test herangezogen. Sofern die Mittelwertvergleiche signifikant waren, wurde die Nullhypothese (keine Mittelwertunterschiede) abgelehnt und stattdessen die Alternativhypothese (Mittelwerte in der Grundgesamtheit sind verschieden) angenommen.

Die varianzanalytische Betrachtung der Testergebnisse des MTT-Proliferationstests zeigte signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zellkulturmedien. So traten die höchsten Wachstumsraten bei einer FBS Konzentration von 15 % auf, wohingegen bei einer FBS Substitution von 2,5 % kaum Wachstum zu beobachten war. Die mit dem Serumersatz supplementierten Kulturmedien lagen hingegen mit ihren Werten der optischen Dichte um 0,6. Wie schon im vorherigen Kapitel diskutiert, bedingt die mangelhafte Adhäsion der ES-Zellen an den Kulturgefäßen ein Ablösen der Zellen bei der Durchführung dieses Tests. Inwiefern die Zusammensetzung des als Serumersatzes geltenden Gemisches von Supplementen modifiziert werden kann, um in Zukunft diesen Verlust zu verringern, gestaltet sich schwierig. So führte in Optimierungsansätzen die Ergänzung von Adhäsionsfaktoren wie Fibronectin bzw. Fetuin im Kulturmedium zu keiner Verbesserung (Flick und Klug, 2005). Der Vergleich der einzelnen Testansätze in den konventionellen 24-Loch Funktionsanalysen zeigt nur einen signifikanten Unterschied zwischen den mit Serumersatz supplementierten serumreduzierten Testreihen und der Testreihe mit 2,5 % FBS im Kulturmedium am Differenzierungstag Zehn. Dieses Testsystem zeigt, dass das mit Serumersatz supplementierte Kulturmedium die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten deutlicher unterstützt als ein Kulturmedium mit nur 2,5 % FBS. Im direkten Vergleich zur Serumsupplementierung mit 15 % FBS bestätigt sich die Nullhypothese: „kein Unterschied“. Fehlende signifikante Mittelwertunterschiede lassen den Schluss zu, dass das definierte Kulturmedium im selben Maße wie das Standarddifferenzierungsmedium die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten unterstützt. Die Betrachtung der paarweisen Vergleiche der Mittelwerte der

durchflusszytometrischen Analyse liefert keine Anhaltspunkte über eventuell vorhandene differenzierungsfördernde Eigenschaften der einzelnen Kulturmedien. Aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit und Genauigkeit dieses Testsystems fällt es schwer das Gemisch von Supplementen zur Eignung als Serumersatz zu beurteilen. Im Vergleich zum Standardkulturmedium (15 % FBS) konnte eine statistisch signifikant höhere Expression von kardialem α -MHC bei der mit Serumersatz supplementierten Gruppe mit einem Restserumanteil von 0,5 % FBS mittels KSO-Test berechnet werden. Die Kombination von Wachstumsfaktoren und Hormonen in der etablierten Supplementenmischung fördert die Induktion der herzmuskelspezifischen RNA Expression. Während in anderen Studien die Effekte von Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten mit einem Restserumanteil zwischen 3,5 und 10 % untersucht wurden (Monzen et al., 1999; Takahashi et al, 2003; Kawai et al., 2004), gelingt es in der vorliegenden Untersuchung mit dem Einsatz der definierten Supplementenmischung bei einer Serumsubstitution von nur 0,5% die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten zu fördern.

5.5 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit wurden zum einen in Abhängigkeit von der verwendeten FBS-Charge Endpunkte zur Bestimmung des Differenzierungsverhaltens embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten etabliert und zur Beurteilung eines Gemisches aus Supplementen als Serumersatz verwendet. Über die Funktionsanalyse hinaus wurde die Herzzelldifferenzierung der ES-Zellen mittels Immunzytochemie, Durchflusszytometrie sowie Real Time PCR analysiert. Als vielversprechendes Werkzeug zeigte sich in dieser Arbeit die Genexpressionsanalyse des herzzellspezifischen Markers α -MHC. Der nahezu identische Verlauf des Expressionsprofils im Vergleich zu anderen Studien (Kaltenhäuser, 2006), bietet somit die Möglichkeit andere herzzellspezifische Markergene in unterschiedlichen Differenzierungsstadien auf ihre Expression zu untersuchen und mit den Ergebnissen anderer externer Studien zu vergleichen.

Die Tatsache, eine Zellkultur mit einem nahezu definierten Kulturmedium durchführen zu können, erübrigt die sonst notwendige Testung unterschiedlicher Serumchargen auf ihre Eignung und verhindert eine Interferenz undefinierter Serumkomponenten mit eventuell zu untersuchenden Substanzen. So könnte dieser Supplementenmix in Testsystemen wie dem EST Anwendung finden, was zu einer höheren Standardisierbarkeit und einer verbesserten Reproduzierbarkeit der mit diesem Test generierten Daten führen würde.

Mit dem jetzigen Zeitpunkt ist die Anwendung des hier aufgeführten Gemisches von Zellkultursupplementen noch deutlich kostenintensiver als die alleinige Serumsupplementierung. Der Erwerb kleiner Aliquots der hierfür verwendeten Wachstumsfaktoren wirkte sich in dieser Machbarkeitsstudie bestimmend auf den Preis aus. Wünschenswert wäre daher die Übernahme dieser Rezeptur durch einen Zellkulturmediumhersteller, der somit die Möglichkeit hätte, ein fast serumfreies, definiertes Zellkulturmedium für die Kultivierung embryonaler Stammzellen der Maus zur Verfügung zu stellen. Eine Produktion in größerem Maße würde mit Sicherheit zu einer erheblichen Kostenersparnis führen.

Weiterhin bleibt abzuklären, in wiefern sich die serumreduzierten Gemische auch für das Passagieren pluripotenter ES-Zellen unter mLIF eignen. So sollte die Notwendigkeit einer schrittweisen Adaptation der ES-Zellen an die mit Serumersatz supplementierten serumreduzierten Kulturbedingungen überprüft werden, wie es bei Verwendung des *KnockOutTM-Serum Replacement* vorgeschrieben ist. In wie weit dadurch ein verbessertes Differenzierungs- und Proliferationsverhalten erreicht wird, bietet ebenso wie die weitere Optimierung des Supplementenmixes in Bezug auf die Adhäsion der ES-Zellen an die Kulturgefäße Ansatzpunkte für weiterführende Studien.

6 Zusammenfassung

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus haben die Fähigkeit sich in Zellkultur nahezu unbegrenzt zu vermehren und sich unter geeigneten Kultivierungsbedingungen in die Zelltypen aller drei Keimblätter Mesoderm, Endoderm und Ektoderm zu entwickeln. Für die erfolgreiche *in-vitro*-Kultivierung von ES-Zellen ist es wichtig, die Umgebungsbedingungen der Zellen so weit wie möglich den *in-vivo*-Bedingungen dieses Zelltyps anzupassen. Dies gilt insbesondere für die Versorgung der Zellen mit einem geeigneten Medium und den entsprechenden Zusätzen. Als ein solcher Zusatz wird fötales Kälberserum (FBS) eingesetzt, das aus einer Vielzahl unterschiedlicher Komponenten besteht, die für das Wachstum und die Differenzierung der ES-Zellen essentiell sind. Da es sich hierbei um ein undefiniertes Naturprodukt mit hoher Chargenvariabilität handelt, dessen Gewinnung ethisch bedenklich ist, wird versucht ES-Zellen ohne den Zusatz von FBS zu kultivieren. Bisher ist es kaum gelungen, undifferenzierte embryonale Stammzellen der Maus effizient unter serumfreien Kulturbedingungen in schlagende Kardiomyozyten zu differenzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Differenzierung von embryonalen Stammzellen der Maus unter serumreduzierten Kulturbedingungen charakterisiert und ein zuvor etabliertes Gemisch von Supplementen auf seine Eignung als Serumersatz beurteilt. Dazu wurden zunächst Endpunkte für die Untersuchung der *in-vitro*-Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten etabliert und auf die Praktikabilität und Redundanz ihres Informationsgehaltes überprüft. Dafür wurden die embryonalen Stammzellen über einen Zeitraum von zehn Tagen unter Standardkulturbedingungen (15 % FBS) kultiviert und an den Differenzierungstagen 5 bis 10 mit verschiedenen Methoden auf ihren Differenzierungsstatus untersucht. Neben der morphologischen Beurteilung der Zellen auf spontane Kontraktionen wurde die Differenzierung durch Markierung filamentärer Strukturen visualisiert und mittels Durchflusszytometrie und Genexpressionsanalyse quantifiziert. Als herzmuskelzellspezifisches Target diente hierzu *Myosin heavy chain* (MHC), welches sowohl mit der Immunzytochemie und in der FACS-Analyse auf Proteinebene, als auch in der Real Time PCR auf RNA Ebene nachzuweisen war. Im Gegensatz zur herkömmlichen mikroskopischen Auswertung bieten diese Methoden die Möglichkeit die ES-Zelldifferenzierung zu Kardiomyozyten zu einem früheren Zeitpunkt zu erfassen, jedoch ließen sich objektive sowie reproduzierbare Ergebnisse nur mit der RT-PCR erreichen.

Die Durchführung von an das Protokoll des Embryonalen Stammzelltest (EST) anlehenden Proliferations- und Differenzierungstests, sowie die Anwendung der zuvor etablierten Messmethoden ermöglichte im zweiten Abschnitt die Untersuchung des Einflusses von serumreduzierten Kulturbedingungen mit und ohne Supplementierung eines Serumersatzes auf das Wachstums- und Differenzierungspotential der Stammzellen. Es konnte gezeigt werden, dass bei der serumreduzierten Kultivierung ohne Supplementierung mit einem Serumersatz mit abnehmender Serumkonzentration ein Rückgang der Differenzierung zu verzeichnen war. Diese Zellpopulationen zeigten Unterschiede in der Immunzytochemie, wiesen eine verminderte Kontraktilität sowie eine geringere Expression von MHC auf Protein- und RNA-Ebene auf. Darüber hinaus konnte jedoch bei einer Serumkonzentration von 2,5 % FBS mittels FACS-Analyse und Real Time PCR eine leichte Zunahme des Differenzierungsverhaltens der ES-Zellen beobachtet werden.

Die Supplementierung mit einem als Serumersatz geltenden Gemisch aus Wachstumsfaktoren, Hormonen, Proteinen, Vitaminen, Spurenelementen und Antioxidantien ermöglichte die Kultivierung und Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten. Im Vergleich zum Standardkulturmedium (15 % FBS) zeigte sich mit 2 Tagen Verzögerung in der 24-Loch Funktionsanalyse eine maximale Kontraktilität. Immunzytologisch und durchflusszytometrisch konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Differenzierung beobachtet werden. Eine Induktion kardialer α -MHC RNA wurde hingegen bei einem Restserumanteil von 0,5 % FBS detektiert. Relativiert zum Standardkulturmedium zeigte sich in diesen Testansätzen eine bis zu 7-fach höhere Expression. Schwächen hinsichtlich der Adhäsion und daraus resultierende Zellverluste spiegelten sich in den niedrigen Werten des Proliferationsverhaltens wieder.

In dieser Studie erwies sich das Gemisch von Supplementen als geeignete Alternative zur Verwendung von fötalem Kälberserum für die Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen. Die Supplementierung definierter Bestandteile lässt embryonale Stammzellen unter nahezu serumfreien Kulturbedingungen zu Kardiomyozyten differenzieren. Eine daraus resultierende Serumreduktion von 15 % FBS auf lediglich 0,5 % FBS im Zellkulturmedium führt somit zu einer höheren Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit in Testsystemen. Zu dem leistet dies einen wichtigen Beitrag zu einer besseren Vereinbarkeit von Ethik und Wissenschaft.

7 Summary

Cultivation of murine embryonic stem cells under serum reduced culture conditions with and without supplementation of a serum replacement

Murine embryonic stem cells (ES-cells) in cell culture are capable of unlimited self-renewal. Provided with ideal culture conditions they develop into meso-, endo- and ectodermal cell types. Therefore the culture conditions should mimic the in-vivo environment of the specific cell type. This requires an appropriate cell culture medium and adequate supplements. A commonly used supplement is fetal bovine serum (FBS) which contains many different ingredients that are essential for proliferation and differentiation. FBS is an undefined natural product with high batch to batch variability. Great ethical doubts exist concerning the method by which it is obtained. Therefore it has been tried to keep ES-cells without the addition of FBS. Experiments investigating differentiation of murine embryonic stem cells into cardiomyocytes under serum free culture conditions in the absence of FBS have shown little success.

The differentiation of ES-cells under serum reduced culture conditions, as well as the usage of an approved mixture of supplements as a serum replacement, has been tested in the present study. Methods for the evaluation of ES-cell derived cardiomyocytes have been established and their practicalities and redundancy have been valued. The ES-cells were cultured for 10 days in standard culture conditions (15 % FBS) and their differentiation status was reported on days 5 to 10 using various test methods. Aside from the morphological evaluation of spontaneous contraction, differentiation was visualised by immunocytological staining of filaments and quantified by using flow cytometry and Real Time PCR analysis. Myosin heavy chain (MHC) served as the cardiomyocyte specific target. The presence of its proteins was shown with immunocytochemical staining and FACS-analysis and the presence of its RNA with Real Time PCR. Unlike conventional light microscope examination these methods allow the detection of earlier stages of ES-cell differentiation into cardiomyocytes. Consistent and objective results, however, have only been achieved with PCR.

The procedure of proliferation and differentiation assays based on the EST-protocol as well as the utilisation of the previously established measuring methods, has enabled the examination of the influence of serum reduced culture conditions with or without serum replacement on the proliferation and differentiation in the 2nd part of the study. In the serum reduced culturing

without any supply of serum replacement, a decreased differentiation with lower serum concentration could be noticed. Immunocytochemically the cell population showed differences as well as reduced contraction and lower expression of MHC. However a slight increase of differentiation was found at serum concentrations of 2,5 % FBS.

Supplementing a serum replacement containing growth factors, hormones, proteins, vitamins, trace elements and antioxidants allowed the culturing of ES-cells and enabled their differentiation into cardiomyocytes. Although the maximum of contraction was delayed for 2 days, no differences could be detected in the differentiation, compared to the standard culture medium (15 % FBS) using immunocytochemistry and flow cytometry. An induction of cardiac α -MHC RNA was seen at a serum concentration of 0,5 %. These sample preparations showed a 7 times increased expression in comparison to the standard culture medium. Low proliferation rates reflect the degraded adhesion and resulting cell loss.

In this study the supplement mixture for culturing ES-cells proved to be an adequate alternative to FBS. The addition of defined selected additives enables the differentiation of ES-cells into cardiomyocytes in nearly serum free culture conditions. The serum reduction from 15 % FBS to only 0,5 % FBS leads to higher standardisation and reproducibility of the testing systems. Furthermore it leads to a better compatibility of ethics and scientific research.

8 Literaturverzeichnis

Abe K, Niwa H, Iwase K, Takiguchi M, Mori M, Abe SI, Abe K, Yamamura KI. Endo-derm-Specific Gene Expression in Embryonic Stem Cells Differentiated to Embryoid Bodies. *Exp Cell Res.* 1996; 229: 27–34.

Antin PB, Yatskievych T, Dominguez JL, Chieffi P. Regulation of avian precardiac meso-derm development by insulin and insulin-like growth factors. *J Cell Physiol.* 1996; 168(1): 42-50.

Bader D, Masaki T, Fischman DA. Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro. *J Cell Biol.* 1982; 95: 763-770.

Bagutti C, Wobus AM, Fässler R, Watt FM. Differentiation of Embryonal Stem Cells into Keratinocytes: Comparison of Wild-Type and β_1 Integrin-Deficient Cells. *Dev Biol.* 1996; 179(1): 184-196.

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties in Vitro. *Dev Biol.* 1995; 168(2): 342-357.

Barnes D, McKeehan WL, Sato GH. Cellular endocrinology: integrated physiology in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23: 659-662.

Barnes D, Sato G. Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell.* 1980; 22(3): 649-655.

Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Puceat M. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J.* 2002; 16(12): 1558-1566.

Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* 2002; 91(3): 189-201.

Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004; 18(6): 827-842.

Bortz J. In: Bortz J (Hrsg.) *Statistik für Sozialwissenschaftler.* Springer, Berlin, 1999.

Bortz J, Lienert GA. In: Bortz J, Lienert GA (Hrsg.) *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung,* 2. Auflage, Springer, Heidelberg, 2003.

Bradley A. Embryonic stem cells: proliferation and differentiation. *Curr Opin Cell Biol,* 1990; 2(6): 1013-1017.

Buesen R, Visan A, Genschow E, Slawik B, Spielmann H, Seiler A. Trends in Improving the Embryonic Stem Cell Test (EST): an Overview. *ALTEX.* 2004; 21(1): 15-22.

Consigli SA, Joseph-Silverstein J. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor during chicken cardiac development. *J Cell Physiol.* 1991; 146(3): 379-385.

Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci.* 1997; 110(11): 1279-1285.

Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci.* 1983; 80: 2258-2262.

Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol.* 2000; 85(6): 645-651.

Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol.* 1985; 87: 27-45.

Doevendans PA, Kubalak SW, An RH, Becker KD, ChienKR, Kass RS. Differentiation of Cardiomyocytes in Floating Embryoid Bodies is Comparable to Fetal Cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32: 839–851.

Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Morano I, Luft FC, Wobus AM. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB J.* 1997; 11: 905-915.

Dushnik-Levinson M, Benvenisty N. Embryogenesis in vitro: study of differentiation of embryonic stem cells. *Biol Neonate.* 1995; 67(2): 77-83.

Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science.* 1955; 122(3168): 501-514.

European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General. Virus inactivation in bovine blood and blood products. Scientific Committee in Animal Health and Animal Welfare. 25 October 2000. Quelle: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out50_en.pdf
Zugriff 08/2008

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292(5819): 154-156.

Even MS, Sandusky CB, Barnard ND. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends Biotechnol.* 2006; 24(3): 105-108.

Fässler R, Rohwedel J, Maltsev V, Bloch W, Lentini S, Guan K, Gullberg D, Hescheler J, Addicks K, Wobus AM. Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *J Cell Sci.* 1996; 109: 2989-2999.

Fijnvandraat AC, van Ginneken ACG, de Boer PAJ. Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube. *Cardiovasc Res.* 2003; 58(2): 399-409.

Fishman MC, Chien KR. Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development.* 1997; 124: 2099-2117.

Flick B, Klug S. Establishment of a serum-free culture medium for the embryonic stem cell test (EST) - Annual Meeting of the European Teratology Society 2005, Haarlem, Netherlands.

Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci.* 1995; 108: 3181-3188.

Galembeck F, Cann JR. Fetuin as a Trypsin Inhibitor. *Arch Biochem Biophys.* 1974; 164(1): 326-331.

Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J.* 1987; 6(13): 3995-4002.

Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Seiler A, Brown N, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *Altern Lab Anim.* 2002; 30(2): 151-176.

Goodsell DS. Ferritin and Transferrin. Molecule of the month 2002. November 2002. Aus: http://www.pdb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/download/FerritinandTransferrin.pdf (Zugriff 08/2008)

Gough NM, Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stahl J, Gearing DP, Nicola NA, Metcalf D. LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev.* 1989; 1(4): 281-288.

Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX.* 2003; 20(4): 275-281.

Guan K, Rohwedel J, Wobus AM. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology.* 1999; 30: 211-226.

Gülden M, Mörchel S, Seibert H. Serum albumin binding at cytotoxic concentrations of chemicals as determined with a cell proliferation assay. *Toxicol Lett.* 2003; 137: 159-168.

Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G, Lewis D. Good cell culture practice. ECVAM good cell culture practice task force report 1. *Altern Lab Anim.* 2002; 30(4): 407-414.

Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res.* 1997; 36(2): 149-162.

Honn KV, Singley JA, Chavin W. Fetal bovine serum: a multivariate standard. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1975; 149: 344-347.

Hu WS, Europa AF. Process for the Continuous Culture of Cells. US Patent: 6,156,570. 2000.

Iscoe NN , Melchers F. Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J Exp Med.* 1978; 147: 923-932.

Jans DA, Hassan G. Nuclear targeting by growth factors, cytokines, and their receptors: a role in signaling? *Bioessays.* 1998; 20: 400–411.

Jayne DW, Epstein DA, Conrad DR. Fetal bovine serum alternatives. *Nature.* 1988; 334: 547–548.

Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim.* 2002; 30: 219–227.

Johansson BM, Wiles MV. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol.* 1995; 15(1): 141-151.

Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, Armulik A, Lohikangas L. Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci.* 1997; 2: 126-146.

Kaltenhäuser J. Einfluss embryotoxischer Substanzen auf die Expression differenzierungsspezifischer Gene in murinen embryonalen Stammzellen. 2006. Aus http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000002406 (Zugriff 08/2008)

Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, Kosai K. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J.* 2004; 68(7): 691-702.

Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest.* 1996; 98(1): 216-224.

Knox P, Griffiths S. The distribution of cell-spreading activities in sera: a quantitative approach. *J. Cell Sci.* 1980; 46: 97-112.

Kral V. Untersuchung verschiedener Methoden der Differenzierungshemmung bei Langzeitkultivierung embryonaler Stammzellen D3 im Hinblick auf die Durchführung des Embryonic Stem Cell Tests. 2006. Aus http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000002207 (Zugriff 08/2008)

Kovacevic Z, McGivan JD. Glutamine and Glutamate Metabolism. *Physiol Rev.* 1983; 63: 547-605.

Kutyavin IV, Afonia IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MV, Meyer RB, Hedgpeth J. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperature. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(2): 655-651.

Lambert KJ, Birch JR. Cell growth media. In: Spier RE, Griffiths JB (Hrsg.): *Animal Cell Biotechnology* Vol. 1, Academic Press, London u.a. 1985; 85-122.

Laschinski G, Vogel R, Spielmann H. Cytotoxicity test using blastocyst-derived euploid embryonal stem cells: a new approach to in vitro teratogenesis screening. *Reprod Toxicol.* 1991; 5(1): 57-64.

Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F, Stuhlmann H. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool.* 1999; 284: 67-81.

Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem.* 1984; 259: 6437-6446.

Lough J, Sugi Y. Endoderm and heart development. *Dev Dyn.* 2000; 217: 327-342.

Mahdavi V, Chambers AP, Nadal-Ginard B. Cardiac alpha- and beta-myosin heavy chain genes are organized in tandem. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81: 2626-2630.

Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev.* 1993; 191: 41-50.

Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res.* 1994; 75(2): 233-244.

Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72(4): 1441-1445.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78(12): 7634-7638.

Metzger JM, Lin WI, Johnston RA, Westfall MV, Samuelson LC. Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis. *Circ Res.* 1995; 76: 710-719.

Miller-Hance WC, LaCorbiere M, Fuller SJ, Evans SM, Lyons G, Schmidt C, Robbins J, Chien KR. In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. *J Biol Chem.* 1993; 268: 25244-25252.

Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine & Growth Faktor Rev.* 2000; 11: 15-22.

Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Habara-Ohkubo A, Nakaoka T, Fujita T, Yazaki Y, Komuro I. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(10): 7096-7105.

Morten HJ. A survey of commercially available tissue culture media. *In Vitro.* 1970; 6(2): 89-108.

- Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
- Muslin AJ, Williams LT.** Well-defined growth factors promote cardiac development in axolotl mesodermal explants. *Development*. 1991; 112(4): 1095-1101.
- Neu J, Shenoy V, Chakrabarti R.** Glutamine nutrition and metabolism: Where do we go from here? *FASEB J*. 1996; 19: 829-837.
- Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MSM.** Glutamine Metabolism in Lymphocytes: Its Biochemical, Physiological and Clinical Importance. *Q J Exp Physiol*. 1985; 70: 473-489.
- Ng WA, Grupp IL, Subramaniam A, Robbins J.** Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circ Res*. 1991; 68: 1742-1750.
- O'Brien TX, Lee K, Chien KR.** Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 5157-5161.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD.** Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev*. 1996; 59(1): 89-102.
- Olson EN.** Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*. 2006; 313: 1922-1927.
- Ornitz DM, Itoh N.** Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2001; 2(3): Reviews 3005.1-3005.12.
- Price, P.J., Gregory, E.A.** Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In Vitro* 1982; 18: 576-584.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ.** Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*. 1992; 359: 550-551.
- Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T.** Multifunctional roles for serum protein Fetuin-A in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 2920-2930.
- Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, Doetschman TC.** Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*. 1988; 102(3): 471-478.
- Roach, ML, McNeish, JD.** Methods for the isolation and maintenance of murine embryonic stem cells. In: Turksen K (Hrsg.) *Embryonic Stem Cells Methods and Protocols*. 2002: 1-16.
- Robbins J, Gulick J, Sanchez A, Howles P, Doetschman T.** Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *J Biol Chem*. 1990; 265 (20): 11905-11909.

Rohdewohld H, Wobus AM. Embryonale Stammzellen der Maus. Eigenschaften, Potential und Verwendung. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz. 2002; 45: 113-122.

Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold H-H, Hescheler J, Wobus AM. Myogenesis in vitro: Developmental expression of skeletal muscle determination genes and ionic currents in embryonic stem cell (ESC)-derived myocytes. Dev Biol. 1994; 164(1): 87-101.

Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus AM. Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospect. Toxicol in Vitro. 2001; 15: 741-753.

Rolletschek A, Blyszczuk P, Wobus AM. Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects. Toxicol Lett. 2004; 149(1-3): 361-369.

Ronnstrand L, Mori S, Arridsson AK, Eriksson A, Wernstedt C, Hellman U, Claesson-Welsh L, Heldin CH. Identification of two C-terminal autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor: involvement in the interaction with phospholipase C-gamma. EMBO J. 1992; 11(11): 3911-3919.

Rudnicki MA, McBurney MW. Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In: Robertson EJ (Hrsg.) Teratocarcinomas and Embryonic stem cells: A Practical Approach. 1987; IRL Press, Oxford: 71-112.

Russel WMS und Burch RL. In: Russel WMS, Burch RL (Hrsg.) The principle of human experimental technique. 1959 London, Methuen & Co. Ltd.

Sachinidis A, Gissel C, Nierhoff D, Hippler-Altenburg R, Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Identification of platelet-derived growth factor-BB as cardiogenesis-inducing factor in mouse embryonic stem cells under serum-free conditions. Cell Physiol Biochem. 2003a; 13(6): 423-429.

Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. Cardiovasc Res. 2003b; 58(2): 278-291.

Sanchez A, Jones WK, Gulick J, Doetschman T, Robbins J. Myosin heavy chain gene expression in mouse embryoid bodies. An in vitro developmental study. J Biol Chem. 1991; 266: 22419-22426.

Sassoon DA, Garner I, Buckingham M. Transcripts of α -cardiac and α -skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. Development. 1988; 104: 155-164.

Schlechter K, Buesen R, Slawik B, Spielmann H, Seiler A. The use of serum-free conditions in the embryonic stem cell test: defined culture conditions for cardiac stem cell differentiation. Poster. 5. Weltkongress über Alternativmethoden und den Einsatz von Versuchstieren in den Biowissenschaften. Berlin 21.-25. August 2005

Schmitt RM, Bruyns E, Snodgrass HR. Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. Genes Dev. 1991; 5: 728-740.

Schneider MD, Gaussin V, Lyons KM. Tempting fate: BMP signals for cardiac morphogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(1): 1-4.

Schöler HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germ-line specific expression of an Oct factor. *EMBO J.* 1989; 8: 2543-2550.

Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* 1997; 11: 451-462.

Seiler A, Visan A, Pohl I, Genschow E, Buesen R, Spielmann H. Etablierung molekularer Endpunkte zur Weiterentwicklung des Embryonalen Stammzelltests (EST) mit embryonalen Stammzellen der Maus (Zelllinie D3). *Altex.* 2002; 19(1): 55-63.

Seiler A, Visan A, Buesen R, Genschow E, Spielmann H. Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. *Reprod Toxicol.* 2004; 18: 231-240.

Seiler A, Buesen R, Visan A, Spielmann H. Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays – The embryonic stem cell test. *Methods Mol Biol.* 2006; 329: 371- 395.

Siddle K, Ursø B, Niesler CA, Cope DL, Molina L, Surinya KH, Soos MA. Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29: 513–525.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature.* 1988; 336(6200): 688-690.

Spielmann H, Pohl I, Doering B, Liebsch M, Moldenhauer F. The embryonic stem cell test, an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells in vitro. *Toxicol.* 1997; 10(1): 119-127.

Spielmann H, Scholz G. Invitox protocoll 113. Embryonic stem cell test. http://ecvamsis.irc.it/invitox/published/indexed_113.html (Zugriff 05/2004)

Stewart CL, Gadi I, Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol.* 1994; 161(2): 626-628.

Stoker M, O'Neill C, Berryman S, Waxman V. Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *Int J Cancer.* 1968; 3(5): 683-693.

Strübing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev.* 1995; 53(2): 275-287.

Stryer L. – In: Stryer L (Hrsg.) *Biochemie.* Übersetzung der 3. am. Aufl., Heidelberg Spektrum Akademischer Verlag 1988.

Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, Lee RT. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 2003; 107(14): 1912-1916.

Tessarollo L. Manipulating mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 2001; 158: 47-63.

United States Departement of Agriculture Quelle: http://www.ams.usda.gov/LSMNpubs/pdf_monthly/pharm.pdf (Zugriff 08/2007)

Van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Grubere F, Gstraunthaler G, Hellebrekers L, Hyllnerh J, Jonkeri FH, Prietøj P, Thalenk M, Baumansl V. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro* 2004; 18: 1-12.

VERORDNUNG (EG) Nr. 1774/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTES UND DES RATES vom 3. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte. Quelle <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:273:0001:0095:DE:PDF>

Verwei M, van Burgsteden JA, Krul CAM, van de Sandt JJM, Freidig AP. Prediction of in vivo embryotoxic effect levels with a combination of in vitro studies and PBPK modelling. *Toxicol Lett.* 2006; 165: 79-87.

Wei H, Juhasz O, Li J, Tarasova YS, Boheler KR. Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(4): 804-817.

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Nicos DM, Nicola A, Gough NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* 1988; 336: 684-687.

Wobus AM, Holzhausen H, Jäkel P, Schöneich J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res.* 1984; 152: 212-219.

Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation.* 1991; 48: 173-182.

Wobus AM, Guan K. Embryonic stem cell-derived cardiac differentiation: Modulation of differentiation and "Loss-of-Function" analysis in vitro. *Trends Cardiovasc Med.* 1998; 8(2): 64-74.

Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med.* 2000; 22: 149-164.

Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR. Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol.* 2002; 185: 127-156.

Wolpert L, Macpherson I, Todd I. Cell spreading and cell movement: an active or passive process? *Nature.* 1969; 233: 512-513.

Zaffran S, Frasch M. Early signals in cardiac development. *Circ Res.* 2002; 91: 457-469.

Zandstra PW, Bauwens C, Yin T, Liu Q, Schiller H, Zweigerdt R, Pasumarthi KBS, Field LJ. Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng.* 2003; 9 (4): 767-778.

zur Nieden NI, Ruf LJ, Kempka G, Hildebrand H, Ahr HJ. Molecular markers in embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro.* 2001; 15: 455-461.

9 Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt. Ich möchte mich hiermit bei allen herzlich bedanken, die mir bei der Durchführung und Anfertigung dieser Dissertation behilflich waren.

Herrn Prof. Dr. Ralf Stahlmann danke ich, dass ich meine Promotion an seinem Institut durchführen durfte.

Herrn Dr. Stephan Klug sowie Herrn Dr. Burkhard Flick danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die stets gewährte, persönliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit.

Gleichermaßen gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Johanna Plendl für die Übernahme und Vorlage der Dissertation am Fachbereich der Veterinärmedizin.

Für die Anleitung bei den PCR-Untersuchungen möchte ich mich sehr bei Frau Ricke Rolle bedanken. Ebenso gilt mein Dank Frau Nicole Müller und Frau Annegret Felies für die Hilfe bei den labortechnischen Arbeiten sowie das stets angenehme Arbeitsklima.

Dr. Jörg Huss danke ich sehr herzlich für die Einarbeitung und für die Begeisterung für die Statistik. Herrn Prof. Dr. Dr. Hopfenmüller danke ich für die Überprüfung der statistisch erhobenen Daten.

Bei der Sonnenfeld-Stiftung bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Nina und Thomas danke ich für die Unterstützung und Hilfestellung bei Auftreten von graphischen sowie formatierungsbedingten Fragen.

Einen großen Dank gilt ebenso meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit durchführen zu können und mir immer unterstützend zur Seite standen.

Judith danke ich für ihre Ruhe, Geduld und ihre aufmunternden Worte. Jederzeit war sie bereit mich bei Fragestellungen zu unterstützen. Ich danke ihr aus ganzem Herzen.

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Driffeld, den 22.12.2008

.....

Patrick Scholz

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5452-0



9 783835 195452 6