
Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 HINTERGRUND DER ARBEIT	2
1.2 STAND DER FORSCHUNG	4
1.2.1 Stammzellen allgemein	4
1.2.1.1 Charakteristika.....	4
1.2.1.2 Marker für embryonale Stammzellen	5
1.2.2 Kultivierung von embryonalen Stammzellen.....	7
1.2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen für embryonale Stammzellen	7
1.2.2.2 Hemmung der Differenzierung von embryonalen Stammzellen	9
1.2.2.3 Differenzierung von embryonalen Stammzellen	12
2 EIGENE UNTERSUCHUNGEN	14
2.1 ZIELSETZUNG	14
2.2 MATERIAL.....	16
2.2.1 Geräte	16
2.2.2 Glas- und Plastikware	16
2.2.3 Chemikalien	17
2.2.4 Zelllinien	19
2.2.5 Rezepturen selbst hergestellter Lösungen	20
2.3 METHODEN	21
2.3.1 Zellkultur.....	21
2.3.1.1 Zelllinien.....	21
2.3.1.2 Kulturmedien für die Kultivierung von ES Zellen und STO-Fibroblasten.....	21
2.3.1.3 Routinevorgänge in der Zellkultur.....	23

2.3.2 Proliferations- und Differenzierungstests	27
2.3.2.1 Proliferationstest.....	27
2.3.2.2 Differenzierungstest.....	29
2.3.3 Untersuchungen zu den Kulturbedingungen	32
2.3.4 Methoden zur Beurteilung des undifferenzierten Status der ES Zellen.....	32
2.3.4.1 Morphologische Untersuchung.....	32
2.3.4.2 Immunzytochemische und zytochemische Untersuchungen	32
2.3.4.3 Durchflusszytometrische Untersuchungen	37
2.3.4.4 Enzym-Aktivitätstest auf Alkalische Phosphatase-Aktivität.....	39
2.3.5 Hauptstudie	40
2.3.5.1 Vorbereitung der ES Zellen.....	41
2.3.5.2 Subkultivierung der ES Zellen.....	41
2.3.6 Statistische Verfahren	42
3 ERGEBNISSE.....	44
3.1 UNTERSUCHUNGEN ZU DEN KULTURBEDINGUNGEN	44
3.1.1 Einfluss verschiedener Serumkonzentrationen auf die Proliferation und die Differenzierung von ES Zellen	44
3.1.2 Einfluss der Hitzeinaktivierung des Serums auf die Proliferation und Differenzierung von ES Zellen	46
3.1.3 Inaktivierung der STO-Fibroblasten und Trennung von ES Zellen.....	48
3.2 QUALITÄTSKONTROLLEN DER EMBRYONALEN STAMMZELLEN	51
3.3 HAUPTSTUDIE	54
3.3.1 Qualitätskontrolle der embryonalen Stammzellen für die Hauptstudie	55
3.3.2 Morphologische Beurteilung der ES Zellen in den Zellkulturflaschen	57
3.3.3 Proliferations- und Differenzierungstest	58
3.3.3.1 Proliferationstest.....	58
3.3.3.2 Differenzierungstest.....	62
3.3.4 Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	72
3.3.4.1 Untersuchung der ES Zellen auf die Expression von SSEA-1	72

3.3.4.2	Untersuchung der ES Zellen auf Alkalische Phosphatase-Aktivität.....	75
3.3.5	Enzym-Aktivitätstest auf Alkalische Phosphatase-Aktivität	78
3.3.6	Immunzytochemische und zytochemische Untersuchungen	80
3.3.6.1	Immunzytochemische Färbung der ES Zellen gegen SSEA-1	80
3.3.6.2	Zytochemische Untersuchung der ES Zellen auf Alkalische Phosphatase-Aktivität ..	86
4	DISKUSSION	91
4.1	VORUNTERSUCHUNGEN	92
4.1.1	Serumkonzentration und Hitzeinaktivierung des Serums	92
4.1.2	Qualitätskontrollen der ES Zellen	94
4.2	HAUPTSTUDIE	94
4.2.1	Verschiedene Methoden der Differenzierungshemmung.....	95
4.2.1.1	Positivkontrolle (ohne Differenzierungshemmung)	95
4.2.1.2	<i>Feeder Layer</i>	96
4.2.1.3	Leukemia Inhibitory Factor (LIF)	97
4.2.1.4	Oncostatin M	99
4.2.2	Proliferations- und Differenzierungstest	99
4.2.2.1	Proliferationstest.....	99
4.2.2.2	Differenzierungstest.....	100
4.2.3	Marker für den undifferenzierten Zustand von Stammzellen	101
4.2.3.1	Morphologie der ES Zellen	102
4.2.3.2	SSEA-1	103
4.2.3.3	Alkalische Phosphatase-Aktivität.....	105
4.2.4	Ausblick	107
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
6	SUMMARY	112
7	LITERATURVERZEICHNIS	114
8	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	127

9 ANHANG	129
9.1 AUSWERTUNG DER DIFFERENZIERUNGSTESTS VERSUCHSTAG 10	130
9.2 AUSWERTUNG DER DIFFERENZIERUNGSTESTS VERSUCHSTAG 7 UND 10.....	136
9.2.1 Unbehandelte Kontrollen	136
9.2.2 Penicillin-Kontrollen.....	142
9.2.3 Fluorouracil- Kontrollen	148
10 LEBENSLAUF	154
11 DANKSAGUNG	155
12 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	156