

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin und der  
Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie/ Charité Campus Virchow  
Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

"*In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zum  
Differenzierungspotenzial von humanen Stammzellen"

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dipl. Ing. Biotechnologie (FH) Marlen Keil

aus Sondershausen

Datum der Promotion: 11.12.2015

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite 2</b>
1. Kurzfassung Deutsch	Seite 3
Kurzfassung Englisch (Abstract)	Seite 4
2. Einleitung und Zielstellung	Seite 5
3. Methoden	Seite 6
3.1 <i>In vitro</i> - Methoden	Seite 6
3.1.1 Zellkulturtechniken für humane embryonale und adulte Stammzellen	Seite 6
3.1.2 Zellanalyse	Seite 6
3.2 <i>In vivo</i> Methoden	Seite 7
3.2.1 Nachweis der <i>in vivo</i> Pluripotenz (Teratom-Assay) - hepatische Differenzierung der hESZ	Seite 7
3.2.2 Transplantation der CD34 <sup>+</sup> Stammzellen	Seite 7
4. Ergebnisse	Seite 8
4.1 <i>In vitro</i> - Zellkultur - Analyse des Differenzierungsstatuts der Stammzellen	Seite 8
4.2 <i>In vivo</i> - Eigenschaften der humanen embryonalen Stammzellen	Seite 10
4.3 <i>In vivo</i> - Anreicherung und Differenzierung der adulten CD34 <sup>+</sup> Stammzellen	Seite 12
5. Diskussion	Seite 14
5.1 <i>In vitro</i> - Eigenschaften und Differenzierungspotenzial der embryonalen und adulten Stammzellen	Seite 14
5.2 <i>In vivo</i> - Differenzierungseigenschaften der Stammzellen	Seite 16
6. Literatur	Seite 19
Anhang	8 Seiten
Anteilsklärung/ eidesstattliche Versicherung	1 Seite
3 Publikationen	26 Seiten
Lebenslauf	2 Seiten
ausgewählte Publikationsliste	1 Seite
komplette Publikationsliste	3 Seiten
Danksagung	1 Seite

## 1 Kurzfassung Deutsch

### ***In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zum Differenzierungspotenzial von humanen Stammzellen**

Ziel der Untersuchung war eine vergleichende Analyse des Differenzierungspotenzials von humanen adulten und embryonalen Stammzellen. Dabei wurden humane embryonale Stammzellen (hESZ) ungerichtet und spontan *in vitro* differenziert, während humane adulte Stammzellen (CD34<sup>+</sup>) erstmals *in vitro* mittels Ko-Kultur auf murinen AML12 Zellen gerichtet differenziert wurden. *In vivo* wurde die Kapazität zur Bildung von Teratomen von spontan vordifferenzierten hESZ in immundefizienten Mäusen umfassend geprüft. Auch wurden adulte CD34<sup>+</sup> - Zellen direkt in die Leber von neugeborenen und adulten immundefizienten Mäusen appliziert. Die hESZ wurden auf unterschiedlichen Matrizen, wie murinen und humanen Zellen kultiviert und zeigten ein vergleichbares Expressionsprofil. Die Analyse der Markerexpression der undifferenzierten und spontan differenzierten Zellen erfolgte auf RNA-Ebene. Die spontane *in vitro* Differenzierung der hESZ zeigte zum frühen Zeitpunkt (14 Tage) einen leichten Anstieg der frühen endodermalen Marker und des hepatischen Differenzierungsmarkers Albumin. Zum späteren Zeitpunkt (82 Tage) wurde auf der Ebene der endodermalen Differenzierung eine höhere Expression der hepatischen Transkriptionsfaktoren und des endodermalen Markers verzeichnet, der ektodermale Marker war dagegen herunterreguliert. Die Pluripotenzmarker zeigten zu beiden Zeitpunkten eine gleich bleibend hohe Expression. Die mittels Ko-Kultur hepatisch induzierten CD34<sup>+</sup> Zellen zeigten eine schwach ausgeprägte endodermale Differenzierung, nachgewiesen durch die Expression von Connexinen und Zytokeratinen. Wesentliche Änderungen der Zellmorphologie waren nicht nachweisbar. Die undifferenzierten hESZ exprimierten auf hohem Niveau Transkripte für Pluripotenz und die drei Keimblätter, zudem führten sie *in vivo* zur Teratombildung. Die spontane Differenzierung der hESZ *in vitro* über die Zeit (25, 60 und 89 Tage) führte zu einer niedrigeren Wachstumsrate und zu einem einheitlicheren histopathologischen Phänotyp *in vivo*. Weiterhin wurden in Teratomen von 25 und 60 Tagen vordifferenzierten Zellen frühe endodermale und hepatische Marker gefunden, jedoch keine in Teratomen von 89 Tage vordifferenzierten Zellen. Die intrahepatisch transplantierten CD34<sup>+</sup> Zellen in neugeborenen Mäusen führte zu einem Anwachsen in unterschiedlichen Organen, wie Knochenmark, Milz und Thymus, sowie zu einer exklusiven Expression vom B-Zell Marker CD19. Nach Applikation in die Lebern von adulten Mäusen wurde dagegen kein Anwachsen in den Organen detektiert. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die humanen embryonalen, als auch adulten Stammzellen durch Anwendung unterschiedlicher *in vitro* und *in vivo* Methoden in Zellen mit endodermal-hepatischen, als auch hämatopoetischen Merkmalen, differenzieren.

## **Kurzfassung Englisch (Abstract)**

### ***In vitro* and *in vivo* studies of the differentiation potential of human stem cells**

In this study we analyzed the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells (hESC) *in vitro* and *in vivo* and we investigate the influence of *in vitro* differentiation on *in vivo* teratoma formation in immunodeficient mice. Further, the hematopoietic stem cells (CD34<sup>+</sup>) were comparatively examined with respect to their normal and induced hepatic differentiation potential. In addition, we proved the engraftment of CD34<sup>+</sup> cells *in vivo* after intrahepatic transplantation in immunodeficient mice. The SA002 human embryonic stem cells were cultured on irradiated mouse embryonic fibroblasts, on irradiated human foreskin fibroblasts, or feeder-free using matrigel. The CD34<sup>+</sup> stem cells were cultured according to in-house established *in vitro* protocols. The marker expression of undifferentiated and differentiated stem cells was monitored by real time RT-PCR. Further microarray profiling, electron microscopy, FACS-analysis and dye transfer methods, as well as immunohistochemistry were used to determine the differentiation status of stem cell preparations. Undifferentiated SA002 stem cells were cultured under different conditions. These morphologically undifferentiated cells had a comparable marker expression profile, with high expression levels of pluripotency markers and low-to-moderate expression levels of germ layer markers. The undifferentiated CD34<sup>+</sup> cells showed a high expression for CD34 transcript whereas endodermal markers were expressed on low level. The *in vitro* spontaneously differentiated SA002 stem cells demonstrated at early time points a slight upregulation of endodermal marker expression and of the liver marker albumin. At later time points, the expression of transcripts for hepatic and endodermal markers was upregulated, whereas expression of the ectodermal marker transcripts was downregulated. Expression of pluripotency markers remained high, and hematopoietic markers were not expressed. The induced hepatic CD34 cells showed a low endodermal differentiation potential with expression of transcripts for connexins and cytokeratins. Further, significant changes in cell morphology were not detectable. SA002 cells that showed spontaneous partial differentiation *in vitro* had a low teratoma formation capacity *in vivo*. Cells that were partially differentiated led to slower growing teratomas with more uniform histology. The intrahepatically transplanted CD34<sup>+</sup> cells into newborn mice led to an engraftment in various organs like bone marrow, spleen and thymus as well as to an exclusive expression of B-cell markers. In summary, we determined that human embryonic as well as adult stem cells differentiate in cells with endodermal-hepatic properties using different methods. The results presented in this study can contribute to experimental research, especially the understanding of processes of organ differentiation, as well as the application of cell therapy in the context of regeneration.

## 2 Einleitung und Zielstellung

Stammzellen werden nach ihrer Herkunft in embryonale, fötale und adulte Typen unterschieden. Die hESZ besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und können in Zelltypen aller 3 Keimblätter differenzieren. Für die Prüfung dieser Pluripotenz der kultivierten hESZ existieren verschiedene Methoden, wie die Expression von Oberflächen- und intrazellulären Markern. Es existieren etablierte Zellkulturprotokolle für hESZ, die auf einem Zellrasen oder auf einer Beschichtung mit extrazellulären Matrizen basieren. Die spontane Differenzierung *in vitro* ist variabel und wird bestimmt durch die Herkunft, die Isolierung und die Kultivierungsbedingungen der hESZ <sup>1</sup>. Spontan differenzierte Zellen enthalten sowohl Progenitorzellen, als auch undifferenzierte Zellen, bedingt durch den Mechanismus der Selbsterneuerung, z. Bsp. durch asymmetrische Zellteilung. Der *in vivo* Teratom-Assay ist die Methode der Wahl um die Qualität der hESZ *in vivo* zu beurteilen <sup>2</sup>. Der Einfluss einer spontanen oder gerichteten Zelldifferenzierung embryonaler Zellen *in vitro* auf die Teratombildungsfähigkeit *in vivo* ist nur wenig untersucht <sup>3</sup>. Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die in Organen und Geweben vorkommen und sich an der Geweberegeneration beteiligen. Eine besondere klinische Bedeutung weisen die hämatopoetischen Stammzellen des Nabelschnurblutes auf. Adulte CD34<sup>+</sup> Zellen zeigen meistens eine gewebespezifische Differenzierung <sup>4</sup>. Aus Literaturdaten ist bekannt, dass CD34<sup>+</sup> Zellen das Potenzial zur Differenzierung in nicht-hämatopoetisches Gewebe haben, wie z Bsp. hepatische Zellen <sup>5</sup>. In publizierten Protokollen werden lösliche Faktoren oder Cocktails angewandt um eine nicht-hämatopoetische Differenzierung - eine Transdifferenzierung - einzuleiten. Für die hepatische Differenzierung *in vitro* werden CD34<sup>+</sup> Zellen mit dem Hepatozyten Wachstumsfaktor, dem epidermalen Wachstumsfaktor und Oncostatin behandelt <sup>6</sup>. Die Differenzierung wurde hauptsächlich durch die Induktion der endodermal-hepatischen Markerexpression, die Morphologie und funktionellen Eigenschaften analysiert. Die Transplantation der adulten Stammzellen in immundefiziente SCID Mäuse wurde angewandt um das Anwachsen in den Organen und die Differenzierungskapazität zu studieren <sup>7</sup>. In neugeborenen NOD/SCID/IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> Mäusen wurde eine erfolgreiche Rekonstitution der myeloerythroiden und der lymphoiden Reifung nachgewiesen <sup>8</sup>. Die CD34<sup>+</sup> Zellen werden systemisch, intravenös oder intraperitoneal appliziert, um das hämatopoetische Anwachsen und die Differenzierung zu untersuchen. Die hier angewandte organspezifische Transplantation der adulten Stammzellen in die fetale Mausleber bietet eine Alternative um die humane Hämatopoese und die Zelldifferenzierung zu studieren <sup>9</sup>. Das Ziel der Arbeit ist erstmals eine vergleichende und umfassende Untersuchung des Differenzierungspotenzials von embryonalen und adulten Stammzellen unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen.

### 3 Methoden

Die hier im folgenden auszugsweise beschriebenen *in vitro*- und *in vivo* Methoden sind in den drei Publikationen ausführlich dargelegt,

- 1) „Transcriptional expression profile of cultured human embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo*“<sup>10</sup>;
- 2) „Intrahepatic transplantation of CD34<sup>+</sup> cord blood stem cells into newborn and adult NOD/SCID mice induce differential organ engraftment“<sup>11</sup> und
- 3) „Cell differentiation mediated by co-culture of human umbilical cord blood stem cells with murine hepatic cells“<sup>12</sup>, ausführlich erläutert.

#### 3.1 *In vitro* - Methoden

##### 3.1.1 Zellkulturtechniken für humane embryonale und adulte Stammzellen

Die Kultivierung der humanen embryonalen Stammzellen erfolgte auf mitotisch inaktivierten murinen Zellen, auf humanen Vorhautfibroblasten und auf Matrigel in Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient F-12 mit verschiedenen Zusätzen. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und undifferenzierte Zellen wurden enzymatisch oder mechanisch alle 5-7 Tage passagiert. Die Isolierung der CD34<sup>+</sup> Zellen erfolgte nach einer literaturkundigen Methode mittels Dichtegradientenzentrifugation und Magnet-Bead-Technologie.

Die murinen AML12 Zellen wurden nach Herstellerangaben kultiviert. Für die Produktion von konditioniertem Medium wurden die konfluenten Zellen in serumfreien Sautin Medium kultiviert und alle 1, 3 und 7 Tage wurde der Überstand abgenommen und sterilfiltriert.

Die humanen Stammzellen (hESZ und CD34<sup>+</sup>) wurden auf Matrigel beschichteten Wells mit dem konditionierten Medium unter Zusatz verschiedener Wachstumsfaktoren kultiviert. Jeden 2. Tag erfolgte ein Mediumwechsel und eine mikroskopische Analyse der Zellen.

Für die Ko-Kultur wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen auf konfluenten murinen AML12 Zellen ausgesät und mit Sautin Medium unter Zusatz von 100ng/ml Stammzellfaktor (SCF) und 20ng/ml Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) kultiviert. Proben für die Genexpressionsanalyse wurden an verschiedenen Zeitpunkten der Zellkultivierung entnommen.

##### 3.1.2 Zellanalyse

Für die Reverse Transkription (RT-PCR) der unterschiedlichen Zellpräparationen und auch der Teratome wurden die RNeasy- Kits von Qiagen nach Herstellerangaben genutzt. Für die RNA Quantifizierung wurde das Nanaodrop Spektralfotometer von PeqLab eingesetzt. Die RT-PCR wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung des TaqMan-Reverse-Transcription-Reagents-Kit durchgeführt. Für die Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (real time-PCR) wurden

humanspezifische Primerassays (siehe Anhang Tabelle A1) und der TaqMan Universal Master Mix nach Herstellerangaben eingesetzt. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der  $\Delta$ Ct-Methode, dabei werden die unterschiedlichen Ct-Werte der analysierten Gene auf das House-keeping-Gen GAPDH normalisiert.

Für die Elektronenmikroskopie wurden die unterschiedlich kultivierten CD34<sup>+</sup> Zellen nach einem etablierten aus Literaturdaten abgeleiteten Protokoll vorbereitet und in einem FEI Morgagni Elektronenmikroskop aufgenommen.

Die Farbstoffübertragung (Dye Transfer) der ko-kultivierten Zellen wurde mit Hilfe einer pH26 Färbung der CD34 Zellen und einer CalceinAM Färbung der murinen AML12 Zellen untersucht. Die Zellen wurden für 48 Stunden ko-kultiviert, und die Aufnahme von CalceinAM in den markierten CD34<sup>+</sup> Zellen wurde per Durchflusszytometrie gemessen.

Für die Durchflusszytometrie wurden die humanen Zellen in murinen Organen nach eigenen etablierten Protokollen aufgearbeitet, mit humanen monoklonalen Antikörpern gefärbt, in einem FACSCalibur System gemessen und mit Hilfe der CellQuest Software ausgewertet. Die Aufarbeitung des Gewebes und die Färbungen für die Immunohistochemie erfolgte nach eigenen etablierten Protokollen für die verschiedenen Zellpräparationen und die Gewebeschnitte.

## **3.2 In vivo Methoden**

### **3.2.1 Nachweis der in vivo – Pluripotenz (Teratom-Assay) und der hepatische Differenzierung der hESZ**

Für die Teratombildung *in vivo* wurden die undifferenzierten und spontan *in vitro* vordifferenzierten humanen embryonalen Stammzellen unter die Haut (subkutan) in einer 1:1 Matrigelverdünnung in *NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ* (NSG) und in *NOD/SCID/IL2r $\gamma$ <sup>-/-</sup>* Mäuse nach standardisierten Protokollen (SOP) transplantiert. Dabei variierten die Zellzahlen zwischen  $1.0 \times 10^6$  und  $1.2 \times 10^6$  pro Injektion und Maus. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Mäuse abgetötet und die Teratome entnommen, gewogen und konserviert.

### **3.2.2 Transplantation der CD34<sup>+</sup> Stammzellen**

Die immundefizienten *NOD/SCID/IL2r $\gamma$ <sup>-/-</sup>* Mäuse wurden 3 - 5 Stunden vor Zelltransplantation bestrahlt. Die 6 - 8 Wochen alten adulten Mäuse erhielten 1,6 Gray und die 3 - 5 Tage alten neugeborenen Mäuse 1,2 Gray. Für die Transplantation in die Leber der Mäuse wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 25  $\mu$ l Zellsuspension eingesetzt. Die Leber der neugeborenen Mäuse sind sichtbar und die Transplantation erfolgte ohne Narkose durch die Haut, direkt in die Leber. Die adulten Tiere wurden narkotisiert, das Bauchfell wurde aufgeschnitten und die Zellsuspension direkt in die Leber injiziert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *In vitro* - Analyse des Differenzierungsstatus der Stammzellen

Die im folgenden Kapitel kurz beschriebenen Ergebnisse sind detailliert in den Publikationen<sup>10;12</sup> erläutert. Die SA002 Stammzellen wurden auf unterschiedlichen Zellrasen, wie den embryonalen Mausfibroblasten (MEF) und humanen Vorhautzellen (HFF), oder zellrasenfrei auf Matrigel kultiviert und blieben für die Analysen längstens 10 Passagen in einem morphologisch undifferenzierten Zustand (Anhang Bild A1). Bei der Echtzeit ("real time") - PCR zeigten die SA002 Stammzellen ein vergleichbares Expressionsmuster der unterschiedlichen Pluripotenz- und Differenzierungsmarker hinsichtlich der verschiedenen Kultivierungsmethoden (siehe Tabelle 1).

*Tabelle 1:*

	SA002 auf MEF (n=3)	SA002 auf HFF (n=6)	SA002 Feederfrei (n=6)	Differenzierte SA002 (n=3)	
	Undifferenzierte hESZ			d14	d82
<b>Marker</b>	$\Delta Ct_{\text{mean}}$	$\Delta Ct_{\text{mean}}$	$\Delta Ct_{\text{mean}}$	$\Delta Ct_{\text{mean}}$	$\Delta Ct_{\text{mean}}$
<b>Oct4</b>	2,81	1,34	1,01	2,44	4,18
<b>TRA-1</b>	0,83	1,31	0,82	2,58	3,92
<b>AP</b>	3,84	5,50	5,22	6,33	8,51
<b>CD34+</b>	13,74	18,18	17,68	14,60	17,12
<b>CD38</b>	18,04	16,93	16,27	16,39	17,89
<b>CD45</b>	ud	ud	ud	ud	ud
<b>AFP</b>	11,03	20,67	16,84	20,37	12,95
<b>alphaACT</b>	8,03	6,31	6,69	6,45	5,90
<b>beta-3-TUB</b>	8,26	8,17	7,38	6,59	8,79
<b>CX32</b>	12,85	16,22	13,34	11,41	16,68
<b>SOX17</b>	12,52	19,19	17,10	14,46	17,11
<b>CXCR4</b>	8,36	11,79	11,11	9,09	11,94
<b>HNF-3beta</b>	9,60	17,25	16,14	16,88	14,57
<b>HNF-4alpha</b>	9,52	18,03	17,99	17,86	16,02
<b>C/EBPalpha</b>	9,66	11,20	10,07	8,18	8,56
<b>ALB</b>	16,47	18,58	17,54	14,38	16,52
<b>ADH</b>	ud	ud	ud	ud	ud
<b>CK19</b>	4,87	6,01	5,60	4,95	4,37
<b>NES</b>	7,12	7,59	6,07	6,04	6,68
<b>GAPDH</b>	0	0	0	0	0

"real time" - PCR Transkriptionsexpressionsprofile ( $\Delta Ct_{\text{mean}}$  Werte) der undifferenzierten SA002 Zellen (Tag 0) mit unterschiedlichen Zellkulturtechniken und von spontan differenzierten SA002 Zellen (Tag 14, 82). Für die relative Quantifizierung benutzten wir die  $\Delta Ct$  Methode wie folgt:  $\Delta Ct < 0-4$  hohe Expression;  $\Delta Ct 4.1-8$ , moderate Expression;  $\Delta Ct 8.1-12$ , schwache Expression;  $\Delta Ct 12.1-16$ , niedrige Expression;  $\Delta Ct > 16$ , keine Expression; ud keine gemessene Expression, n Anzahl der Experimente. Die Standardabweichungen der  $\Delta Ct_{\text{mean}}$  Werte der unterschiedlichen Marker lagen im Bereich von ~20%.

Die Pluripotenzmarker wurden bei allen Kultivierungsmethoden gleichermaßen hoch exprimiert, der ektodermale Marker beta-3-Tubulin (b-3-Tub), Nestin (NES) und der mesodermale Marker

alpha Actin (alphaACT) zeigten eine vergleichbare schwache bis moderate Expression. Die endodermalen Marker, wie alpha Fetoprotein (AFP) und SOX17 wurden schwach oder gar nicht exprimiert und die hepatischen Differenzierungsmarker Albumin (ALB) und Alkoholdehydrogenase (ADH) waren nicht detektierbar. Die hämatopoetischen Differenzierungsmarker wurden niedrig exprimiert oder gar nicht detektiert. Ebenso wurde der Gallenepithelzellenspezifische Marker Zytokeratin 19 (CK19) auf moderatem Niveau exprimiert unabhängig von der Kultivierungsmethode. Die hepatischen Transkriptionsfaktoren (HNF)-3beta und (HNF)-4alpha wurden schwach exprimiert bei MEF kultivierten SA002 Zellen. Karyotypanalysen der SA002 Stammzellen zeigten keine chromosomalen Veränderungen bezüglich der unterschiedlichen Zellkulturtechniken (MEF, HFF oder auf MG), als auch der unterschiedlichen Umsetzungsmethoden. Die spontane *in vitro* Differenzierung der SA002 Stammzellen wurde durch die Zellmorphologie (Anhang Bild A1 /D) und das Expressionsprofil der auf Matrigel kultivierten Zellen in Abwesenheit vom basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) an Tag 14 und 82 gemessen (Tabelle 1). Während dieser Zeitperiode änderten die hESZ ihr typisches Erscheinungsbild von kompakten multizellularen Kolonien hin zu einem Phänotyp mit aufgelockertem Zellverband und verschiedenen fibroblastoiden, epithelzellartigen und multilayerartigen embryonalen Zellaggregaten. Die SA002 Zellen, die 14 Tage auf Matrigel kultiviert wurden, zeigten weiterhin eine hohe bis moderate Expression der Pluripotenzmarker (Oct-4, TRA-1, AP). Die endodermalen und hepatischen Marker, wie SOX17, ALB und Connexin 32 (Cx32) wurden auf einem leicht höheren Niveau exprimiert, ebenso wie der ektodermale Marker beta-3-Tub und der mesodermale Marker alphaACT. Das Expressionsmuster der übrigen Marker veränderte sich nicht im Vergleich zu undifferenzierten SA002 Zellen. Am Tag 82 wurden die endodermalen Marker AFP, HNF-3-beta und der hepatische Marker HNF-4alpha leicht stärker exprimiert als am Tag 14. Die Expression von b-3-Tub, CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) und NES nahm leicht ab, wurde aber auf einem niedrigen bis moderaten Niveau detektiert. Die genannten Pluripotenzmarker, der mesodermale Marker und CK19 werden weiterhin hoch exprimiert und veränderten sich nicht mit einer längeren Kultivierungszeit (Tag 82). Dagegen wurden die hämatopoetischen Differenzierungsmarker unter den gewählten Bedingungen am Tag 82 nicht detektiert.

*Adulte CD34<sup>+</sup> Stammzellen* zeigten bei der Kultivierung mit konditioniertem AML12- Medium eine Erhöhung der Zellzahl und einen adhärenteren Phänotyp im Vergleich zu normal kultivierten CD34<sup>+</sup> Zellen. In elektronmikroskopischen Untersuchungen konnte bei der Kultivierung mit konditioniertem Medium von murinen AML12- Zellen ein enger interzellulärer Zell-Zellkontakt der CD34<sup>+</sup> Zellen mit Membranfusionen beobachtet werden (Anhang Bild A2).

Die Expressionsprofile der CD34<sup>+</sup> Zellen wurden durch "real time" - PCR mittels eines Panels von humanen Primersets für frühe endodermale und hepatische Marker bestimmt. Bei den PCR-Analysen wurden bei normal kultivierten CD34<sup>+</sup>-Zellen der CD34<sup>+</sup> Marker hoch exprimiert, die endodermalen bzw. hepatischen Marker wie AFP, ALB oder Cx32 blieben auf niedrigem Niveau. Bei der Kultivierung mit konditioniertem Medium nahm die CD34 Expression ab, und eine Erhöhung der Cx32 und Cx43 Expression wurde detektiert. Dagegen blieb die Expression der endodermalen und hepatischen Marker (AFP, ALB und HNF-4alpha) unverändert. Weiterhin wurde das Genexpressionsprofil der CD34<sup>+</sup> Zellen mit konditioniertem Medium im Vergleich zu undifferenzierten CD34<sup>+</sup> Zellen durch BeadArray Technologie bestimmt. Es wurde gefunden, dass 604 Gene mehr als 2-fach erhöht und 1126 Gene herunterreguliert waren in CD34<sup>+</sup> Zellen, die für 10 Tage mit hepatischem Medium kultiviert wurden. Außerdem zeigten die Ergebnisse der Microarrayanalyse eine diverse Hochregulierung von Genen, die einen Einfluss auf die endodermale Differenzierung ausüben, wie E-cadherin (16-fach erhöht) und CK19 (5-fach erhöht). Um die Zell - Zell Kommunikation zu analysieren, wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen mit dem Farbstoff pKH26 und die adhärenenten murinen AML12-Zellen mit CalceinAM markiert. Danach erfolgte die Ko-Kultur (Dye Transfer) und die pKH26/ Calcein positiven Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert (Anhang Bild A3). Bei dieser Ko-Kultur von AML12-Zellen mit CD34<sup>+</sup> Zellen wurde beim Dye Transfer, als auch im Zeitraffervideo (Anhang Bild A4) nur ein sporadischer Kontakt zwischen den Zellen für längere Zeitperioden festgestellt. Auch im Elektronenmikroskop wurden keine dichten Zell- Zellkontakte sichtbar, nur gelegentliche CD34<sup>+</sup> zu AML12 Kontakte an der Peripherie der Plasmamembran. Auf RNA Ebene wurde eine leichte Abnahme der Expression des CD34 Transkriptes festgestellt, sowie eine Erhöhung der Cx32 und Cx43 Expression und des frühen endodermalen Markers SOX17. Weiterhin wurde eine Erhöhung der Zytokeratine 8, 18 und 19 von einem niedrigen zu einem moderaten Niveau detektiert. Die endodermalen und hepatischen Marker AFP und ALB blieben im wesentlichen unverändert.

#### **4.2 *In vivo* - Eigenschaften der humanen embryonalen Stammzellen**

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse sind umfassend in meiner Publikation<sup>10</sup> erläutert. Die undifferenzierten und die ungerichteten spontan *in vitro* differenzierten humanen embryonalen Stammzellen wurden in immundefiziente Mäuse (NOD/SCID und NSG) appliziert, um die Kapazität zur Teratombildung genau zu untersuchen. Die Teratome aus undifferenzierten SA002 Zellen wurden am Tag 48 bis 116 entnommen, und Ihr RNA-Expressionsprofil (Tabelle 2) sowie die Morphologie untersucht. Die *in vitro* vordifferenzierten hESZ wurden auf Matrigel

in Abwesenheit von bFGF für 25, 60 und 89 Tage kultiviert und anschließend subkutan in immundefiziente NSG- Mäuse transplantiert. Die daraus resultierenden Teratome wurden am Tag 156 entnommen, gewogen und ebenfalls mittels PCR (Tabelle 2) und histologisch analysiert und dabei mit Teratomen aus undifferenzierten hESZ verglichen.

Tabelle 2:

	Teratombildungskapazität nach subkutaner Transplantation			
	Undifferenzierte hESZ	<i>in vitro</i> vordifferenzierte hESZ		
<b>Marker</b>	0d $\Delta Ct_{\text{mean}}$ (n=3)	25d $\Delta Ct_{\text{mean}}$ (n=3)	60d $\Delta Ct_{\text{mean}}$ (n=3)	89d $\Delta Ct_{\text{mean}}$ (n=3)
<b>Oct4</b>	8,76	7,15	5,71	9,53
<b>TRA-1</b>	5,02	nd	nd	nd
<b>AP</b>	12,54	nd	nd	nd
<b>CD34+</b>	9,89	2,81	5,74	4,18
<b>CD38</b>	12,69	ud	ud	12,54
<b>CD45</b>	ud	ud	ud	ud
<b>AFP</b>	6,69	ud	ud	ud
<b>alphaACT</b>	9,67	8,37	ud	12,20
<b>beta-3-TUB</b>	6,19	4,61	9,35	10,60
<b>CX32</b>	9,04	5,97	7,40	10,00
<b>SOX17</b>	12,93	7,15	12,89	ud
<b>CXCR4</b>	7,50	2,74	7,91	ud
<b>HNF-3beta</b>	8,66	ud	ud	ud
<b>HNF-4alpha</b>	8,80	ud	ud	ud
<b>C/EBPalpha</b>	8,02	4,91	1,69	6,61
<b>ALB</b>	12,27	ud	11,73	ud
<b>ADH</b>	ud	ud	ud	ud
<b>CK19</b>	3,29	4,28	2,72	5,54
<b>NES</b>	8,47	2,91	8,03	7,23
<b>GAPDH</b>	0	0	0	0

"real time" - PCR Transkriptionsexpressionsprofile ( $\Delta Ct_{\text{mean}}$  Werte) von Teratomen von undifferenzierten hESZ (Tag 0) verglichen mit Teratomen von *in vitro* spontan vordifferenzierten hESZ (Tage 25, 60 und 89). Die Teratome wurden nach 48 bis 156 Tagen nach Transplantation analysiert. Für die relative Quantifizierung benutzten wir die  $\Delta Ct$  Methode wie folgt:  $\Delta Ct < 0-4$  hohe Expression;  $\Delta Ct 4.1-8$ , moderate Expression;  $\Delta Ct 8.1-12$ , schwache Expression;  $\Delta Ct 12.1-16$ , niedrige Expression;  $\Delta Ct > 16$ , keine Expression; nd wurde nicht bestimmt, ud keine gemessene Expression, n= Anzahl und d= Tage. Die Standardabweichungen der  $\Delta Ct_{\text{mean}}$  Werte der unterschiedlichen Marker lagen im Bereich von ~20%.

Die undifferenzierten hESZ bilden in den NSG Mäusen Teratome mit Differenzierungsmerkmalen aller drei Keimblätter. Die Keimblattspezifischen Marker, AFP, alphaACT und b-3-TUB, wurden in diesen Teratomen auf moderatem Niveau exprimiert. Auch wurden Transkripte der Pluripotenzmarker auf niedrigem bis moderatem Niveau detektiert. Dagegen zeigt die Analyse der Kinetik der Markerexpression der Teratome aus vordifferenzierten hESZ eine reduzierte Expression des Pluripotenzmarkers OCT-4, sowie der endodermalen Marker AFP, SOX17, Cx32 und CXCR4, als auch der ektodermale Marker b-3-

TUB und der mesodermale Marker alphaACT. Die hepatischen Transkriptionsfaktoren HNF-3beta und HNF-4alpha sind deutlich detektierbar in Teratomen von undifferenzierten Zellen, aber nicht nachweisbar in Teratomen von spontan vordifferenzierten Zellen. Der hämatopoetische Stammzellmarker CD34 wurde dagegen auf hohem Niveau in Teratomen von vordifferenzierten Zellen exprimiert und nur schwach in Teratomen von undifferenzierten Zellen. Bei den histologischen Untersuchungen zeigten die Teratome aus undifferenzierten hESZ Merkmale aller drei Keimblätter, wie knorpelartige und tubuläre Strukturen, sowie epitheliales und stromaartiges Gewebe (Anhang Bild A5/ A). Im Gegensatz dazu, findet man in Teratomen aus vordifferenzierten Zellen ein heterogeneres Erscheinungsbild (Anhang Bild A5/ B bis D). In Teratomen von 25 Tagen vordifferenzierten Zellen zeigte sich eine Mischung von verschiedenen epithelialen und mesenchymalen Zelltypen mit Kollagen. Zusätzlich sind einige gut aufgebaute drüsenartige Strukturen mit sezerniertem Material detektierbar. Teratome, gebildet von 60 Tagen vordifferenzierten Zellen bestanden hauptsächlich aus Binde-, Fett-, myxoidem – und fokalen Talgdrüsen Gewebe, sowie aus Einschlusszysten, die Keratinlamellen enthalten. Ein signifikantes und einheitlicheres Gewebefeld mit überwiegend mesenchymalen Zelltypen mit Kollagen wurde gefunden bei Teratomen die von 89 Tagen vordifferenzierten Zellen gebildet wurden.

Die spontane ungerichtet *in vitro* Vordifferenzierung der Zellen reduzierte signifikant das Teratomwachstum *in vivo* in NSG Mäusen verglichen mit undifferenzierten hESZ (Anhang Bild A6). Ebenso war die endodermale hepatische *in vivo* Differenzierung dieser Zellen im Vergleich zu undifferenzierten hESC Zellen eingeschränkt. Jedoch war die Pluripotenz dieser Zellen immer noch auf einem moderaten Level nachweisbar.

### **4.3 *In vivo* - Anreicherung und Differenzierung der adulten CD34<sup>+</sup> Stammzellen**

Die Ergebnisse, die in diesem Kapitel erläutert werden, sind in der Publikation<sup>11</sup> ausführlich beschrieben. Das Kurzzeit- und Langzeitanwachsen (-engraftment) der hämatopoetischen CD34<sup>+</sup> Stammzellen wurde geprüft nach intrahepatischer (i.hep.) Transplantation in die Leber von neugeborenen und adulten Mäusen. Dabei wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen nach i.hep. Transplantation in neugeborene und adulte Mäuse nach drei Minuten und 14 Tagen mittels PCR ("real time") in der Leber, Lunge, Milz, Thymus und Knochenmark (KM) detektiert (Anhang Tabelle A2).

Im Kurzzeitengraftment fand man drei Minuten nach i.hep. Transplantation bei neugeborenen und adulten Mäusen 0,02% humane Zellen in der Leber, ähnliche Werte wurden auch in Milz und Lunge der neugeborenen Mäuse mittels PCR nachgewiesen. Bei den adulten Tieren konnten in Milz, Thymus und Lunge keine humanen Zellen detektiert werden. Weiterhin wurden zu diesem Zeitpunkt im KM und Thymus 6 bis 7 mal höhere Mengen von humanen Zellen bei

neugeborenen Mäusen gefunden. Dagegen wurden nur drei mal so viele humane Zellen im KM von adulten Mäusen detektiert. 14 Tage nach i.hep. Transplantation konnte durch PCR Analyse eine erhöhte Anzahl an humanen Zellen im KM (0,54%), in der Milz (0,55%), als auch in der Lunge (0,07%) von neugeborenen Mäusen nachgewiesen werden, dagegen wurden bei adulten Mäusen keine humanen Zellen in diesen Organen detektiert. Auch mittels Durchflusszytometrie wurden nach 14 Tagen niedrige Level an CD34 Zellen im KM, Milz und Leber von neugeborenen und adulten Mäusen gefunden. Ähnliche Ergebnisse wurden erstmals durch Biolumineszenzanalyse erhalten. Stammzellen, die mit dem pEGFP<sub>Luc</sub> Vektor nukleofiziert wurden, konnten 24 Stunden nach i.hep. Transplantation in den adulten Lebern sichtbar gemacht werden, waren jedoch in keinen anderen Organ nachweisbar (Anhang Bild A7).

Im Langzeitengraftment wurden mittels Durchflusszytometrie 42 und 70 Tage nach i.hep. Transplantation der CD34<sup>+</sup> Zellen humane HLA-I positive Zellen bestimmt. Am Tag 42 wurde eine signifikante Stammzellenanreicherung im KM (9,1%) und in der Milz (2,1%) bei neugeborenen Mäusen gemessen. In der Leber blieb der Prozentsatz an humanen Zellen konstant niedrig. Dagegen konnte am Tag 42 im KM, Blut, Milz und Leber von adulten Mäusen keine Erhöhung der humanen Zellen im Vergleich zu Tag 14 durchflusszytometrisch festgestellt werden. Am Tag 70 erhöhte sich der Anteil an humanen Zellen in neugeborenen Mäusen nochmals deutlich um das 4-fache im KM, um das 2-fache in der Milz und um das 9-fache in der Leber. In den adulten Mäusen wurden hingegen signifikant niedrigere Werte von humanen Zellen am Tag 70 im Vergleich zu Tag 14 in den genannten Organen detektiert. Die Leber der neugeborenen Mäuse stellt daher ein geeignetes Organ für die Differenzierung der hämatopoetischen CD34<sup>+</sup> Zellen dar. Im Gegensatz dazu ist die Leber der adulten Mäuse ungeeignet, da sich hier die ausdifferenzierten Hepatozyten anscheinend in einer Zellzyklusruhephase befinden.

Das *in vivo* Differenzierungspotenzial von i.hep. transplantierten CD34<sup>+</sup> Zellen in neugeborene Mäuse wurde im KM und in der Milz nach 70 Tagen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Anhang Tabelle A3). Im KM wurden 7,8% humane CD34 Zellen und 30,3% humane CD38 Zellen, sowie 6,3% humane CD33 Zellen gefunden. Ein hoher Prozentsatz der transplantierten Zellen (27,6%) war positiv für den B-Zellmarker CD19, wohingegen keine CD3 und CD15 positiven Granulozyten in Thymus, Milz oder KM detektiert wurden. Im Vergleich zum KM wurden in der Milz ca. 7- bis 8 mal weniger HLA-I positive humane Zellen gefunden. Das Differenzierungsprofil der transplantierten Stammzellen geht in der Milz in Richtung B-Zellen, CD34- und CD38 Zellen. Es wurde keine myeloide und T-Zell- Differenzierung gefunden, was

vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Leber ist. In der Leber von adulten Mäusen war aufgrund der geringen Zellanreicherung von CD34<sup>+</sup> Zellen in anderen Mausorganen nach i.hep. Transplantation kein Anwachsen nachweisbar und keine Differenzierung mittels Durchflusszytometrie bestimmbar. Diese Ergebnisse deuten auf eine humane Hämatopoese in der murinen Leber von neugeborenen Mäusen nach intrahepatischer Applikation der CD34 Zellen hin. Der Ansatz ist geeignet um so genannte humanisierte Mäuse zu generieren.

## **5 Diskussion**

Das Ziel dieser Arbeit war die vergleichende Bewertung des Differenzierungspotenzials von humanen embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag auf der endodermal-hepatischen Differenzierung dieser Stammzellen *in vitro* und *in vivo*. Mit einem ausgewählten Panel von Markerproteinen und mittels zellbiologischer Methoden und Genexpressionsanalysen wurde diese Eigenschaften erstmals umfassend bestimmt. An humanen embryonalen SA002 Stammzellen wurde die Pluripotenz und der Einfluss der spontanen *in vitro* Vordifferenzierung auf die Keimblattbildung in immundefizienten NSG - Mäusen untersucht. Weiterhin wurde das endodermal-hepatische Differenzierungspotenzial von hämatopoetischen CD34<sup>+</sup> Nabelschnurblutstammzellen (CD34<sup>+</sup>) nach Ko-Kultur auf murinen hepatischen AML12-Zellen und durch konditioniertes AML12 Medium zum ersten Mal analysiert. Die Rolle des Mikromilieus auf die Proliferation und Differenzierung der CD34<sup>+</sup> Stammzellen wurde nach Transplantation in die Leber von neugeborenen und adulten Mäusen bestimmt. Weitere Schwerpunkte der Arbeit waren Aspekte der Zell-Zell-Kommunikation, der Bedeutung von sezernierten löslichen Faktoren, sowie der Einfluss des Mikromilieus auf die Differenzierung der unterschiedlichen Stammzellen.

### ***5.1 In Vitro - Eigenschaften und Differenzierungspotenzial der embryonalen und adulten Stammzellen***

Zum ersten mal wurde so umfassend der Einfluss einer Ko-Kultur von humanen embryonalen Stammzellen (hESZ) mit Zelltypen unterschiedlicher Spezies (human und murin), sowie der zellfreien Kultivierung mit Matrigel auf das *in vitro* Transkriptionsprofil von SA002 Zellen geprüft. Ein wesentliches Resultat war, dass keine signifikanten Veränderungen auf die Expression von Pluripotenz- und Keimblattspezifischen Markern nachweisbar war. Eine Speziesabhängigkeit (human oder murin) für die Kultivierung konnte nicht nachgewiesen werden. Unter den gewählten Kulturbedingungen war die zellfreie Kultivierung mit Matrigel wegen der Abwesenheit von akzessorischen Zellen (Begleitzellen) vorteilhaft für weiterführende

Zellanalysen. Zur Bestimmung des Expressionsprofils von Pluripotenz- und Keimblattmarkern auf RNA Ebene wurde erstmals ein Panel von ausgewählten Markern angewandt. Die Quantifizierung der Transkriptionsexpression unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen basiert auf einem publizierten Taq Man Delta-Ct-system<sup>13</sup>. Die in dieser Arbeit kultivierten Stammzellen wiesen eine über mehrere Zellpassagen hohe Expression von Pluripotenzmarkern und eine geringe bis moderate Expression von keimblattspezifischen Differenzierungsmarkern auf. Daher erschienen diese undifferenzierten hESZ geeignet für *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Induktion der Zelldifferenzierung unter ausgewählten Bedingungen. Aus Literaturdaten war bekannt, dass Änderungen der *in vitro* Kulturbedingungen zu morphologischen Änderungen führen können<sup>14</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Kultur der hESZ auf Matrigel in Abwesenheit von bFGF die Kinetik der Veränderung der Zellmorphologie und des Differenzierungsprofils umfassend anhand von typischen Zelltranskripten analysiert. Diese induzierte spontane Differenzierung der hESZ im Zeitraum bis zu 82 Tagen bewirkte teilweise einen moderaten Abfall der Pluripotenzmarker OCT-4 und PODXL (TRA-1). Dagegen wurden die Transkripte für die mesodermalen und ektodermalen Marker der hESZ auf einem moderaten Niveau exprimiert. Die Expression der Transkripte für die leberspezifischen Marker, wie ALB, und auch die frühen endodermalen Marker, wie SOX17 und Cx32, wurden auf einem geringem Niveau detektiert. Dieses Ergebnis stimmt mit bereits publizierten Studien überein, die die Anwesenheit von neuroektodermalen rosette-artigen Zellen beschreibt, die positiv für Nestin und beta-3-Tubulin sind<sup>15</sup>. Die Analyse der Zellen, die 82 Tage kultiviert wurden, zeigte eine überwiegende Expression von Transkripten für endodermale Marker, einschließlich die Expression von leberspezifischen Transkripten. Literaturdaten belegen, dass eine späte Expression der endodermale Marker während der *in vitro* Differenzierung von SA002-Kolonien auftreten<sup>16</sup>. Die nach der spontanen Differenzierung nachweisbaren pluripotenten und undifferenzierten Stammzellen sind ein Hinweis auf die Selbsterneuerungskapazität der embryonalen Stammzellen durch eine asymmetrische Zellteilung<sup>17</sup>. Die Anwesenheit von pluripotenten Zellen nach asymmetrischer Zellteilung ist eine wesentliche Voraussetzung für die regenerierende Aktivität im Verlauf von degenerativen Erkrankungen und Wundheilungsprozessen.

Die multipotenten hämatopoetischen CD34<sup>+</sup> Nabelschnurblutstammzellen sind verantwortlich für die Bildung von hämatopoetischen Zellen im Organismus. Andererseits ist aus Literaturdaten bekannt, dass eine "Transdifferenzierung" in andere gewebespezifische Zellen möglich ist<sup>18</sup>. Die Mechanismen dieser Zelldifferenzierung unter Beteiligung direkter Zell-Zell-Kommunikation

und/ oder sezernierter löslicher Faktoren waren nicht im Detail untersucht. Verschiedene *in vitro* Protokolle, meist auf der Basis der Kombination von Chemikalien, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, wurden benutzt, um eine mehrstufige hepatische Differenzierung einzuleiten<sup>5</sup>. Als Modelle einer endodermal-hepatischen Differenzierung von CD34<sup>+</sup> Zellen wurden in unseren Untersuchungen erstmals Ko-Kulturmodelle mit murinen AML12-Zellen eingesetzt. Diese Zellen exprimieren auf hohem Niveau mRNA für Serumalbumin, alpha-1-Antitrypsin, Transferrin und "Gap junction" Proteine wie Connexin 26 und 32. Als Quelle für die sezernierten löslichen Faktoren wurde in unserer Arbeit das konditionierte Medium von murinen AML12-Zellen eingesetzt um eine endodermale Differenzierung von CD34<sup>+</sup> Zellen zu induzieren. Es wurde eine erhöhte Expression von Epithelmarkern, wie Zytokeratin 8, 19, sowie Marker für "gap junction" Proteine wie Cx32 und Cx43 auf RNA Ebene gefunden. Die endodermal-hepatischen Genexpressionsprofile von SOX17, HNF-3-beta, AFP und HNF-4 alpha änderten sich nur auf geringem Niveau. Es wird diskutiert, dass Proteine, die für die Zell-Zell-Kommunikation verantwortliche sind und "gap junctions" Proteine, wie die Connexine, eine wichtige Rolle während der Entwicklung und Differenzierung von Stammzellen spielen<sup>19</sup>. In direkter Ko-Kultur der CD34<sup>+</sup> Zellen auf murinen AML12-Zellen wurde eine Expression von Transkripten für Zytokeratin 8, 18 und 19, sowie Connexinen auf moderatem bis hohem Niveau gefunden. Eine erhöhte Genexpression von SOX17 wird als Markerprotein für eine endodermale Differenzierung der Zellen diskutiert<sup>20</sup>. Undifferenzierte CD34<sup>+</sup> Zellen wiesen eine niedrige Connexin Genexpression (Cx32 und 43) auf, die durch die Ko-Kultur mit murinen AML12-Zellen auf höherem Niveau exprimiert wurden<sup>21</sup>. Der Vergleich der beiden Kulturmodelle mit CD34<sup>+</sup> Zellen zeigte eine deutliche Differenzierungsinduktion durch Zell-Zell-Wechselwirkung im Vergleich zu sezernierten löslichen Faktoren der murinen AML12- Zellen. Die Analyse der Transkriptionsexpression der induzierten Zellen deutete auf eine frühe Stufe der endodermalen Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen infolge von leberspezifischen Faktoren hin.

## **5.2 *In vivo* - Differenzierungseigenschaften der Stammzellen**

Eine wichtige Eigenschaft zur Bewertung der humanen embryonalen Stammzellen (hESZ) ist die Ausbildung von Zellen der drei unterschiedlichen Keimblattstrukturen mit einer Teratombildung *in vivo*<sup>22</sup>. Aus ethischen Gründen ist die tetraploide Komplementierung oder die Formation von Chimären, in die hESZ involviert sind, in Deutschland nicht erlaubt<sup>23</sup>. Als Modell zur Bestimmung der Pluripotenz wurde die Teratombildung der hESZ in immundefizienten *NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ* (NSG) Mäusen qualitativ und quantitativ untersucht. Es wurde erstmals das Markerprofil der Teratome bezüglich der Pluripotenzmarker und der endodermalen

(AFP), der ektodermalen (b-3-Tub) und der mesodermalen (alphaACT) Marker durch Genexpressionsanalysen bestimmt (Tabelle 2 und Anhang Tabelle A1). Undifferenzierte hESZ induzierten in NSG Mäusen Teratome, die durch eine schwache bis moderate Expression von Transkripten der Keimblatt- und Pluripotenzmarker definiert waren. Für potenzielle Anwendungen von hESZ für regenerative Prozesse ist die Teratombildung durch undifferenzierte hESZ ein unerwünschtes und nicht kalkulierbares Risiko. Daher ist im Einzelfall zu prüfen, inwieweit *in vitro* vordifferenzierte hESZ eine geringere Teratombildungsrate mit partieller Ausbildung der Zellen in das organoide Gewebe induzieren. Durch ausgewählte Kulturbedingungen *in vitro* wurde eine spontane Differenzierung der hESZ bis Tag 89 (siehe Kapitel 4.1) induziert und die *in vivo* Eigenschaften von teratomartigen Strukturen erweiternd untersucht. Die Analyse der Kinetik der Teratombildung der *in vitro* vordifferenzierten hESZ zeigte eine zeitabhängige Verringerung der Teratombildung *in vivo*. Diese Reduktion der Teratombildungsrate war assoziiert mit einer geringeren Expression der Pluripotenzmarker, wie auch mit einer deutlich verringerten Expression der Keimblattmarker (Tabelle 2). Dagegen zeigte der hämatopoetische Marker CD34 eine stärkere Expression im teratomartigen Gewebe von vordifferenzierten Zellen. Es wurden keine Transkripte von endodermalen Markern (ALB, AFP und HNF-3/4) in den teratomartigen Strukturen von *in vitro* spontan differenzierten hESZ gefunden. Dies steht in Übereinstimmung mit dem meist einheitlichen mesenchymalen Zellbild, welches nach immunhistologischen Analysen von teratomartigen Geweben aus partiell differenzierten hESZ angefertigt wurde. Literaturdaten in anderen tierexperimentellen Modellen belegen eine Assoziation zwischen langer Kultivierungszeit, Differenzierungsinduktion und Teratombildung <sup>24</sup>. Die spontane *in vitro* Vordifferenzierung der hESZ ist geeignet, die Teratombildungsrate im tierexperimentellen Modell (*in vivo*) zu minimieren. Inwieweit diese Zellpräparationen geeignet sind für Prozesse der regenerativen Medizin ist zu prüfen.

Der Einfluss des Organmikromilieus auf die Differenzierung der hämatopoetischen CD34<sup>+</sup> Zellen wurde durch die Applikation in die Leber von neugeborenen und adulten NOD/SCID/IL2 $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen untersucht. Im Gegensatz zur Leber der adulten Mäuse ist die Leber von neugeborenen Mäusen ein Ort der Hämatopoese. Aus Literaturdaten ist bekannt, dass die extramedulläre Hämatopoese von neugeborenen Mäusen eine strukturelle Mikroumgebung für die Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen darstellt <sup>25</sup>. In Mikroarraystudien wurde gezeigt, dass die Mikroumgebung der fetalen Leber den Zellzyklus der applizierten Zellen anregt, in dem der Wnt-Signalweg aktiviert ist. Dies steht im Gegensatz zu den Lebern der adulten Tiere, wo der Notch-Signalweg wesentlichen Einfluss auf den Ruhezustand der Zellen hat <sup>26</sup>. Mittels Genexpressionsanalysen wurde die Rolle des Mikromilieus auf die Differenzierung der

CD34<sup>+</sup> Zellen nach intra hepatischer (i.hep.) Transplantation in die Leber von neugeborenen und adulten Mäusen untersucht. In der Kurzzeitorganverteilung der CD34<sup>+</sup> Zellen nach i.hep. Applikation in neugeborenen Mäusen wurde ein geringer Anteil an humanen Zellen in Leber, Lunge und Milz, sowie das 6-fache im Thymus und im Knochenmark (KM) detektiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ein Teil der Zellen nach intrahepatischer Transplantation durch Zirkulation rasch in andere Organe verteilt wurde und dort anwachsen konnte<sup>27</sup>. Die meisten i.hep. applizierten CD34<sup>+</sup> Zellen wurden 14 Tage nach Transplantation in hämatopoetischen Organen, wie KM und Milz, gefunden. In den Lebern der adulten Mäuse dagegen wurde nur ein geringer Anteil an humanen Zellen in Leber und KM gefunden, der nach 14 Tagen nicht mehr detektierbar war. Diese Ergebnisse korrespondieren mit der Anzahl von humanen HLA-1 positiven Zellen, die mittels Durchflusszytometrie zu diesem Zeitpunkt detektiert wurden. Der Einfluss des Organmikromilieus in der Langzeitorganverteilung zeigte, dass in neugeborenen Mäusen die Anzahl an humanen Zellen in den Organen zunimmt, während in adulten Mäusen dagegen zu späteren Zeitpunkten keine nachweisbar waren. Im KM und in der Milz von neugeborenen Mäusen wurden die meisten humanen Zellen detektiert. Aus Literaturdaten ist bekannt, dass eine Verschiebung der Mausehämatopoese von der Leber zum KM und Milz nachweisbar ist, durch Veränderung des Mikromilieus und durch Änderung der Zellzykluseigenschaften<sup>26</sup>. Diese differenzierten humanen Zellen exprimieren den CD19 B-Zellmarker (Leukozyten) auf hohem Niveau, was auf eine linienspezifische Hämatopoese der applizierten CD34<sup>+</sup> Zellen schließen lässt<sup>28</sup>. Die Abwesenheit von weiteren differenzierten humanen Leukozyten und undifferenzierten CD34<sup>+</sup> Zellen deutet auf eine nicht vollständige linienspezifische Differenzierung der humanen Zellen in den Mausorganen hin. Aus der Literatur ist bekannt, dass unterschiedliche Transplantationsarten für hämatopoetische Stammzellen unterschiedliche Muster der Zelldifferenzierung auslösen. So wurde ein hoher Anteil an CD34<sup>+</sup> Zellen, sowie CD38 Zellen und die Ausbildung von reifen B-Zellen nach i.hep. Transplantation und weniger unreife Zellen nach systemischer Applikation gefunden<sup>29</sup>. Auch die Applikation in andere immundefiziente Mausstämme zeigte, dass hämatopoetische Stammzellen weitere Typen von Immunzellen bilden<sup>30</sup>. Der Vorteil der i.hep. Transplantation in NOD/SCID Mäusen ist die exklusive CD19 B-Zelldifferenzierung ohne signifikante T-Zellanreicherung. Dieses Modell kann daher genutzt werden um spezifische zelluläre Therapien im Rahmen der regenerativen Medizin zu untersuchen, sowie um humane Antikörper zu generieren<sup>31</sup>. Im Gegensatz zur adulten Leber, stellt die fetale Mausleber ein hierfür geeignetes Modell dar.

## 6 Literatur

1. Amit M, Itskovitz-Eldor J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat* 2002; 200(Pt 3):225-232.
2. Zhou J, Ou-Yang Q, Li J, Zhou XY, Lin G et al. Human feeder cells support establishment and definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2008; 17(4):737-749.
3. Li HY, Chien Y, Chen YJ, Chen SF, Chang YL et al. Reprogramming induced pluripotent stem cells in the absence of c-Myc for differentiation into hepatocyte-like cells. *Biomaterials* 2011.
4. Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E et al. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86(12):1301-1314.
5. Lavon N. Generation of hepatocytes from human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 2010; 640:237-246.
6. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K et al. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003; 21(2):217-227.
7. Goan SR, Fichtner I, Just U, Karawajew L, Schultze W et al. The severe combined immunodeficient-human peripheral blood stem cell (SCID-huPBSC) mouse: a xenotransplant model for huPBSC-initiated hematopoiesis. *Blood* 1995; 86(1):89-100.
8. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 2005; 106(5):1565-1573.
9. Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 1999; 126(22):5073-5084.
10. Keil M, Siegert A, Eckert K, Gerlach J, Haider W et al. Transcriptional expression profile of cultured human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2012; 48(3):165-174.
11. Wulf-Goldenberg A, Keil M, Fichtner I, Eckert K. Intrahepatic transplantation of CD34+ cord blood stem cells into newborn and adult NOD/SCID mice induce differential organ engraftment. *Tissue Cell* 2012; 44(2):80-86.
12. Stecklum M, Wulf-Goldenberg A, Purfurst B, Siegert A, Keil M et al. Cell differentiation mediated by co-culture of human umbilical cord blood stem cells with murine hepatic cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2014.
13. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30(6):503-512.
14. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19(3):193-204.
15. Lu J, Hou R, Booth CJ, Yang SH, Snyder M. Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(15):5688-5693.
16. Heins N, Englund MC, Sjoblom C, Dahl U, Tønning A et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22(3):367-376.

17. Park YB, Kim YY, Oh SK, Chung SG, Ku SY et al. Alterations of proliferative and differentiation potentials of human embryonic stem cells during long-term culture. *Exp Mol Med* 2008; 40(1):98-108.
18. Esrefoglu M. Role of stem cells in repair of liver injury: Experimental and clinical benefit of transferred stem cells on liver failure. *World J Gastroenterol* 2013; 19(40):6757-6773.
19. Choi YS, Dusing GJ, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han XL et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* 2010; 14(4):878-889.
20. Rolletschek A, Schroeder IS, Schulz H, Hummel O, Huebner N et al. Characterization of mouse embryonic stem cell differentiation into the pancreatic lineage in vitro by transcriptional profiling, quantitative RT-PCR and immunocytochemistry. *Int J Dev Biol* 2010; 54(1):41-54.
21. Solan JL, Lampe PD. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 2009; 419(2):261-272.
22. Drukker M, Katchman H, Katz G, Even-Tov FS, Shezen E et al. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* 2006; 24(2):221-229.
23. Eakin GS, Hadjantonakis AK, Papaioannou VE, Behringer RR. Developmental potential and behavior of tetraploid cells in the mouse embryo. *Dev Biol* 2005; 288(1):150-159.
24. Brederlau A, Correia AS, Anisimov SV, Elmi M, Paul G et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells* 2006; 24(6):1433-1440.
25. Sasaki K, Iwatsuki H. Origin and fate of the central macrophages of erythroblastic islands in the fetal and neonatal mouse liver. *Microsc Res Tech* 1997; 39(5):398-405.
26. Martin MA, Bhatia M. Analysis of the human fetal liver hematopoietic microenvironment. *Stem Cells Dev* 2005; 14(5):493-504.
27. Wulf-Goldenberg A, Eckert K, Fichtner I. Cytokine-pretreatment of CD34(+) cord blood stem cells in vitro reduces long-term cell engraftment in NOD/SCID mice. *Eur J Cell Biol* 2008; 87(2):69-80.
28. Pflumio F, Izac B, Katz A, Shultz LD, Vainchenker W et al. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood* 1996; 88(10):3731-3740.
29. Wulf-Goldenberg A, Eckert K, Fichtner I. Intrahepatically transplanted human cord blood cells reduce SW480 tumor growth in the presence of bispecific EpCAM/CD3 antibody. *Cytotherapy* 2011; 13(1):108-113.
30. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 2004; 304(5667):104-107.
31. Becker PD, Legrand N, van Geelen CM, Noerder M, Huntington ND et al. Generation of human antigen-specific monoclonal IgM antibodies using vaccinated "human immune system" mice. *PLoS One* 2010; 5(10).

## Anhang

**Tabelle A1:** Die TaqMan Gen Expressions Assays® von Applied Biosystems.

Assay-ID (Applied Biosystem)	Genname	Gewebe/ Spezifität
Hs00156373_m1 CD34,	hCG21280	humane CD34+ Stammzellen, adulte Stammzellen
Hs00233552_m1 CD38,	T10	Leukozyten
Hs00174541_m1	CD45, PTPRC	Hämatopoetischen Stammzellen
Hs01895061_u1 POU5F1,	OCT3	Pluripotenz, undifferenzierter Phänotyp
Hs00751752_s1	SOX17	Fetale Leber, definitives Endoderm
Hs00237052_m1	CXCR4	Fetale Leber, definitives Endoderm
Hs00173490_m1	AFP, hCG15197	Fetale Leber, spezifisch für Endoderm
Hs00609411_m1	ALB, hCG14967	Adulte Leber, Hepatozyten
Hs00232764_m1	HNF-3beta, FOXA2	Fetale Leber, definitives Endoderm
Hs00230853_m1 HNF-4alpha		Adulte Leber, Hepatozyten
Hs00269972_s1 CEBPA,	hCG20142	Adulte Leber, Hepatozyten
Hs00761767_s1 KRT19,	hCG2043341	Gallenepithelzellen, reife Gallenzellen
Hs00707120_s1 NES,	hCG1999207	Neuronale Progenitorzellen
Hs00606316_m1 ACTC,	hCG38786	spezifisch für Mesoderm
Hs00801390_s1 TUBB3,	hCG1983504	spezifisch für Ectoderm
Hs99999905_m1 GAPDH,	hCG2005673	Positivkontrolle (House keeping gene)
Hs00605167_g1 ADH		Adulte Leber
Hs00702141_s1	Cx32, GJB1	Leber, "gap junction" (Zell-Zell-Kontakt)
Hs01574644_m1 TRA-1,	PODXL	Pluripotenz, undifferenzierter Phänotyp
Hs01029144_m1 AP,	ALPL	Pluripotenz, undifferenzierter Phänotyp

Diese Primersets wurden für die relative Quantifizierung zur Analyse des Markerexpressionsprofils von undifferenzierten humanen embryonalen Stammzellen (hESZ) und von spontan *in vitro* differenzierten hESZ eingesetzt. Die undifferenzierten hESZ wurden mit unterschiedlichen Zellkulturtechniken kultiviert. Weiterhin wurden diese Marker auch für die Bestimmung des Transkriptionsexpressionsprofil von Teratomen benutzt, die von undifferenzierten und von spontan *in vitro* vordifferenzierten hESZ generiert wurden.

**Table A2:** Kurzzeitorganverteilung von intra hepatisch transplantierten CD34<sup>+</sup> Zellen in Organen von neugeborenen und adulten Mäusen.

		<b>Knochenmark</b>	<b>Milz</b>	<b>Thymus</b>	<b>Leber</b>	<b>Lunge</b>
<b>Neugeborene Mäuse</b>	3 Minuten	0,15%	0,03%	0,13%	0,02%	0,02%
	14 Tage	0,54%	0,55%	0,19%	0,01%	0,07%
<b>Adulte Mäuse</b>	3 Minuten	0,07%	0%	0%	0,02%	0%
	14 Tage	0%	0%	0%	0%	0%

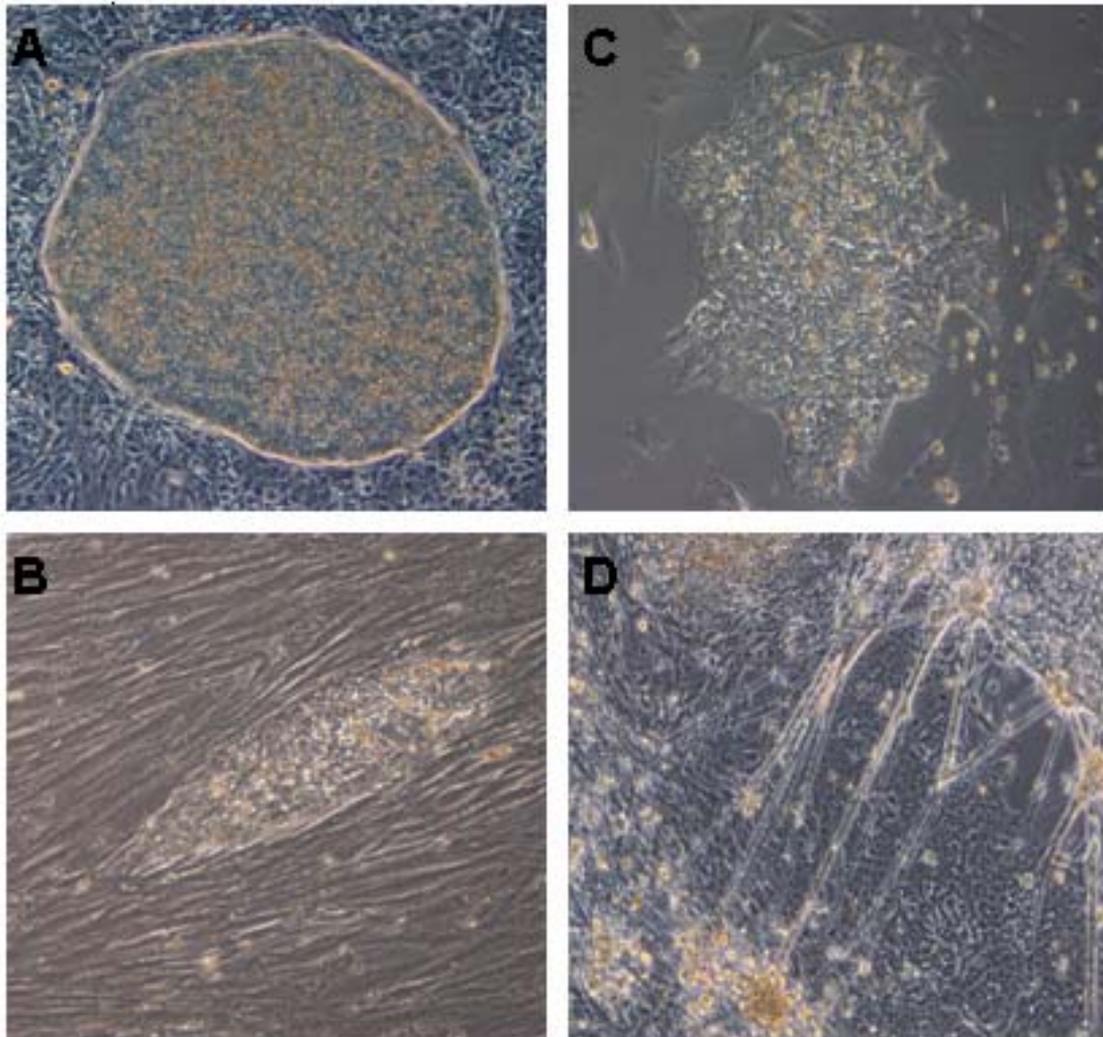
Die Ergebnisse werden als (Mittelwert) Prozent der humanen Zellen in jeder Gruppe von 2 Neugeborenen (3 Tage alt) und adulten Mäusen angegeben, die jeweils  $2 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> Zellen intra hepatisch injiziert bekamen. Die Quantifizierung der humanen Zellen in den verschiedenen Mausorganen nach 3 Minuten bzw. 14 Tagen erfolgte durch auf RNA Ebene (PCR). Es wurde ein verstärktes Anwachsen der humanen Zellen im Knochenmark und Milz in neugeborenen Mäusen 14 Tage nach Zelltransplantation im Vergleich zu 3 Minuten nach Applikation detektiert. Im Thymus, Leber und Lunge waren die Anwachsrate zu beiden Zeitpunkten gleich bleibend niedrig. In adulten Mäusen wurden keine humane Zellen nach 14 Tagen gefunden und sehr geringe Werte 3 Minuten nach Transplantation.

**Table A3:** Linienspezifische Differenzierung der humanen Zellen in Mausorganen nach intra hepatischer Transplantation von adulten Stammzellen in neugeborene Mäuse.

Marker	% humane Zellen im Knochenmark	% humane Zellen in der Milz
HLA-I	35,30 ± 20,88	4,90 ± 2,70
CD34	7,38 ± 7,42	0,25 ± 0,19
CD38	30,27 ± 18,71	4,37 ± 2,32
CD33	6,39 ± 5,27	nd
CD19	27,63 ± 13,56	2,19 ± 0,72
CD30		0
CD150		0

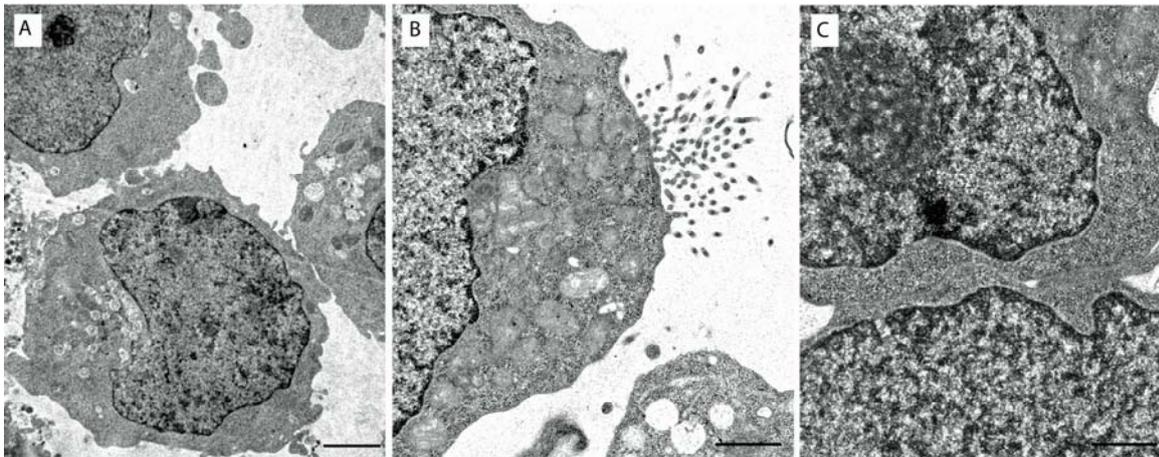
Durchflusszytometrische Bestimmung (Mittelwert ± Standardabweichung) der humanen Zellen und deren Subpopulationen im Knochenmark und in der Milz von NOD/SCID Mäusen 70 Tage nach intra hepatischer Transplantation der CD34<sup>+</sup> Zellen in neugeborene Mäuse. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung von je 10 Mäusen in 2 unabhängigen Experimenten (nd = wurde nicht bestimmt)

**Bild A1:** Morphologie der kultivierten humanen embryonalen SA002 Stammzellen.



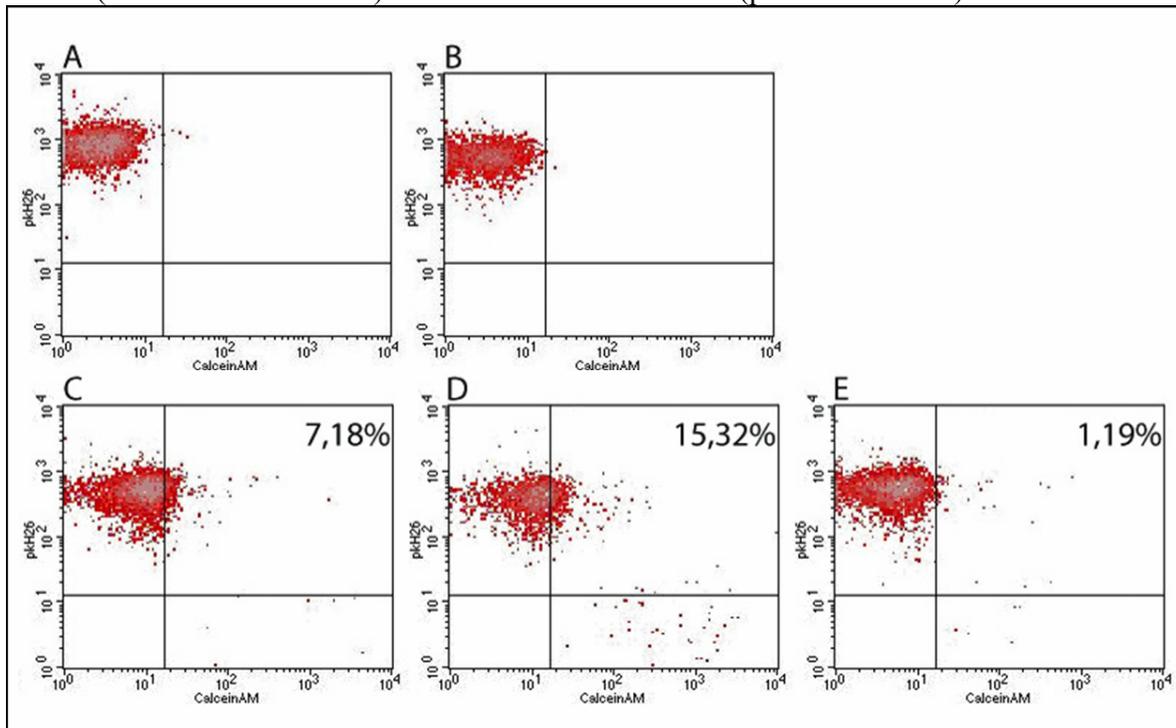
Im Bild A1 sind repräsentativ dargestellt: undifferenzierte SA002 Zellen (P50) auf inaktivierten MEFs (A), undifferenzierte SA002 Zellen (P51) auf inaktivierten HFFs (B) und undifferenzierte SA002 Zellen (P56) Zellrasenfrei auf Matrigel unter Zugabe vom Wachstumsfaktor bFGF gewachsen (C). (D) spontan *in vitro* differenzierte SA002 Zellen (P61), sie wurden zellrasenfrei auf Matrigel in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren kultiviert. (Vergrößerung x100).

**Bild A2:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der adulten CD34<sup>+</sup> Zellen



Der morphologische Vergleich zwischen frisch isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen (A) und CD34<sup>+</sup> Zellen, die 7 Tage mit konditioniertem Medium kultiviert wurden (B + C). Die unbehandelten, frischen CD34<sup>+</sup> Zellen zeigen keine deutliche Bildung von Microvilli und kaum Zell-Zell-Kontakte (A), wohingegen die behandelten CD34<sup>+</sup> Zellen einige Zellausläufer mit charakteristischen Kinozilien und Stereozilien (B) entwickelten. Auch Membranfusionen (C) wurden beobachtet. Maßstab in A 1µm und in B und C 500nm.

**Bild A3:** Durchflußzytometrische Analyse des Dyne-Transfers zwischen murinen AML12-Zellen (CalceinAM markiert) und adulten CD34<sup>+</sup> Zellen (pKH26 markiert) in Ko-Kultur.

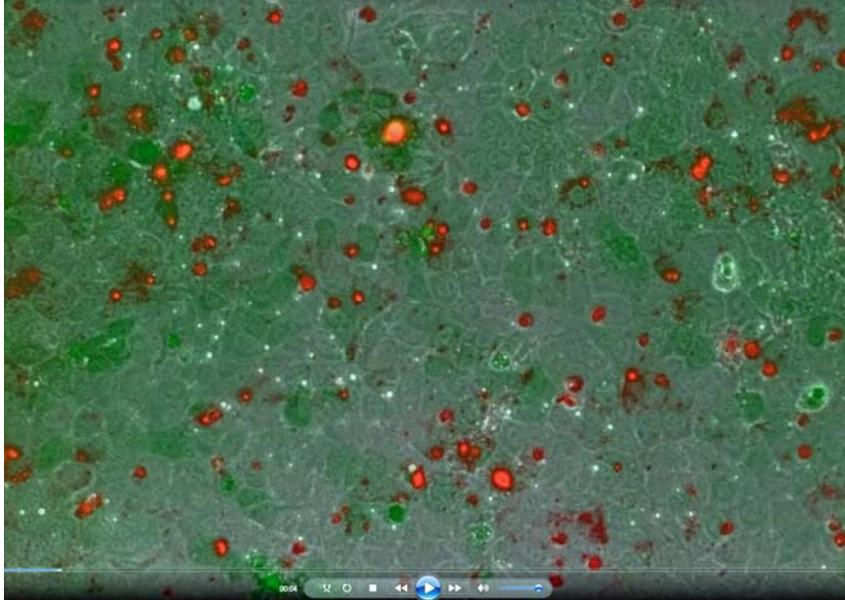


Zu den Zeitpunkten 0 (A) und 48h (B) nach Markierung der CD34<sup>+</sup> Zellen mit pKH26 sind keine wesentlichen Unterschiede in der Calcein vermittelten Fluoreszenzintensität messbar. Nach 48h in Kokultur mit den CalceinAM markierten murinen AML12 Zellen nahmen 7,18% (C) der CD34<sup>+</sup> Zellen Calcein auf und waren doppelt positiv. Um diese Methode zu validieren wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen für 48h mit Retinsäure (Aktivator) und mit 3-Heptanol (Inhibitor) inkubiert. Retinsäure erhöhte die Aufnahme von Calcein auf 15,32% (D), wohingegen 3-Heptanol die Aufnahme von Calcein auf 1,19% (E) reduzierte.

**Bild A4:** Zeitraffervideo von ko-kultivierten murinen AML12 Zellen und adulten Nabelschnurblutstammzellen (CD34<sup>+</sup>).

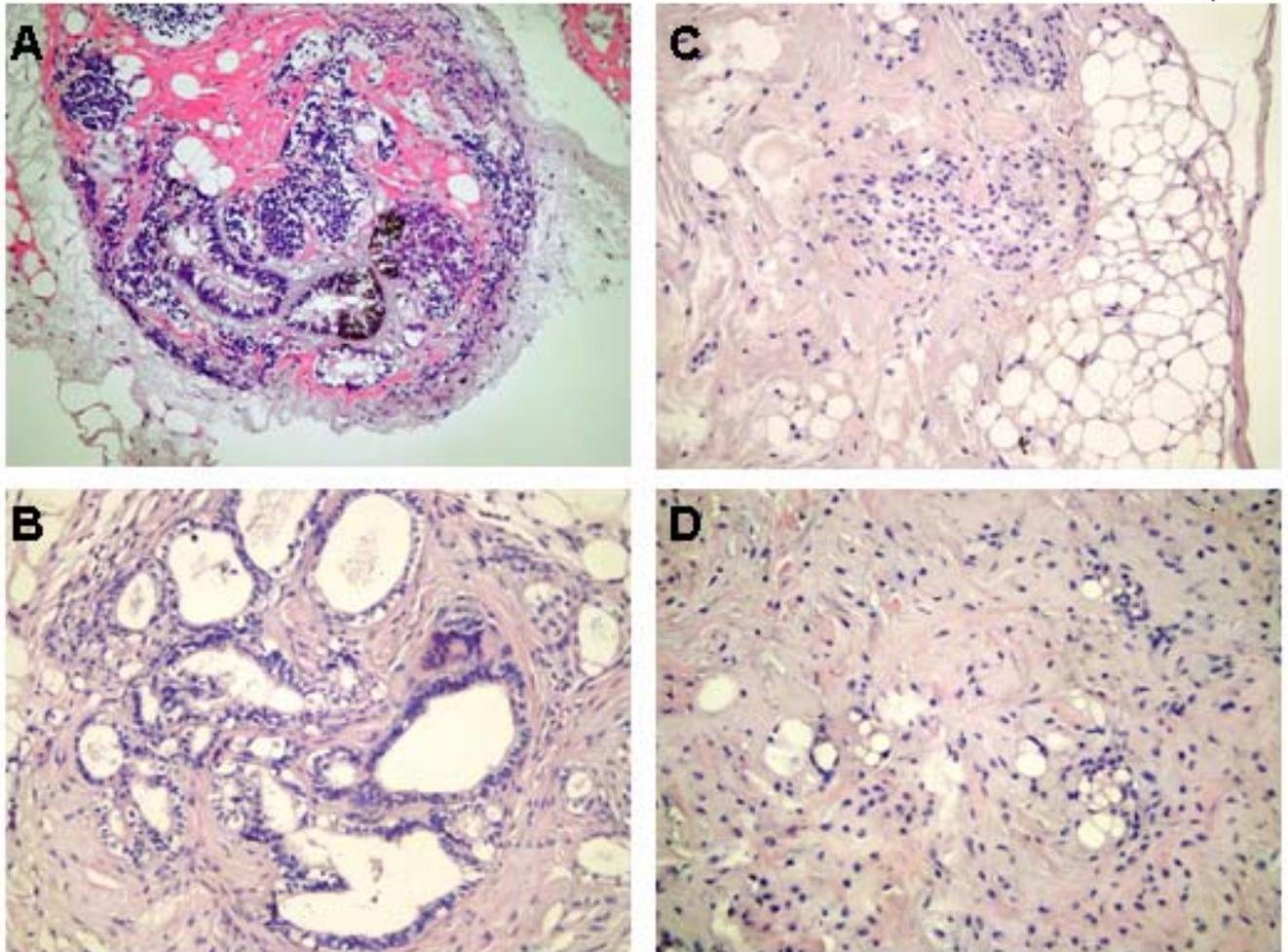


VideoCocultureCD34\_AML12.wmv



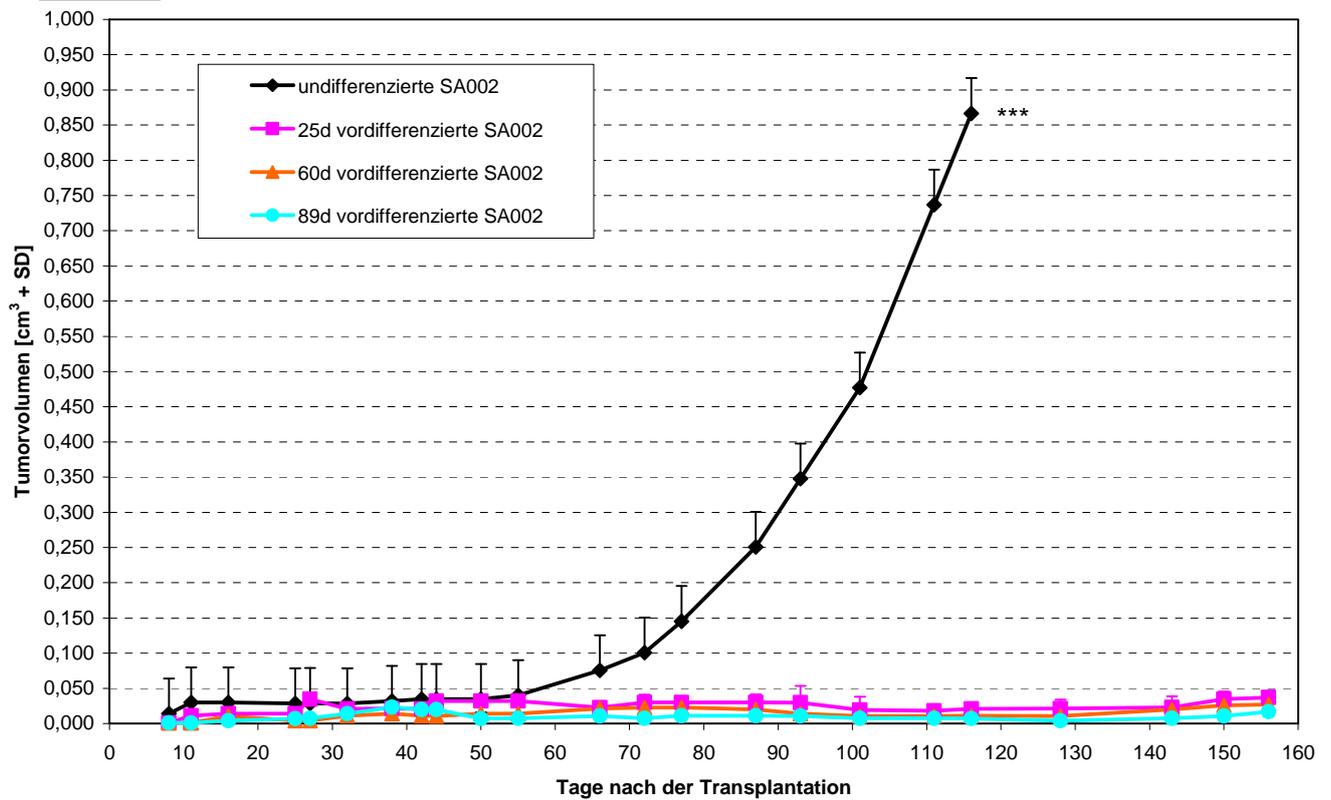
Videoaufnahmen über 24 h von ko-kultivierten ClacainAM markierten murinen AML12 Zellen (grün) und pkH26 m arkierten CD34<sup>+</sup> Zellen (rot). Zeitintervall der Videoaufnahme war alle 5min bei 20 facher Vergrößerung. Das Video zeigt die seltenen und sporadischen Zell-Zell-Kontakte zwischen beiden Zelltypen.

**Bild A5:** Immunhistochemische Aufnahmen der Teratome aus humanen embryonalen Zellen.



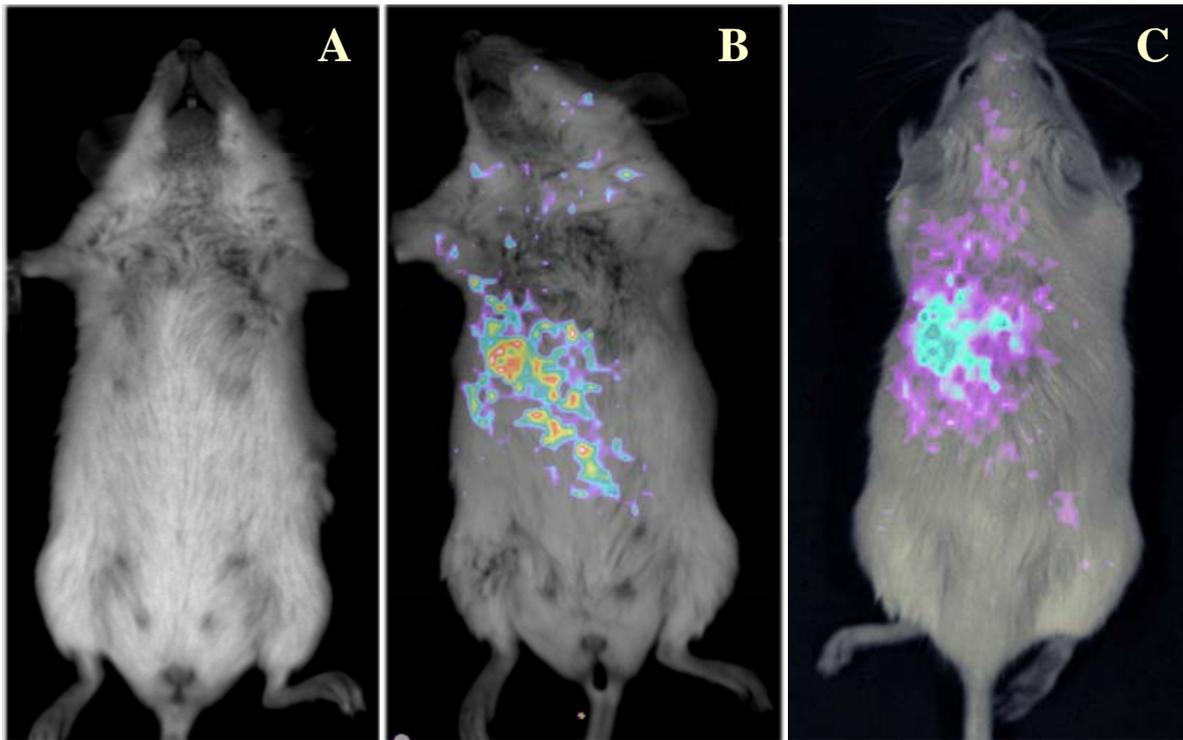
H/E Färbung der Teratome aus undifferenzierten SA002 Zellen (A) und von spontan *in vitro* vordifferenzierten SA002 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten: Kultivierung für 25 Tage (B), 60 Tage (C) und 89 Tage (D). Die Teratome wurden subkutan in immundefiziente Mäuse transplantiert und diese wurden nach 48 Tagen (A) und nach 156 Tagen (B - D) abgetötet. Vergrößerung x 200.

**Bild A6:** *In vivo* Teratomwachstum der unterschiedlichen humanen Stammzellpräparationen



Vergleich des *in vivo* Teratomwachstums von undifferenzierten und *in vitro* vordifferenzierten humanen SA002 Stammzellen (25, 60 und 89 Tage) nach subkutaner Transplantation in immundefiziente Mäuse. Die zeitabhängige *in vitro* Vordifferenzierung bewirkt eine signifikante Reduktion des Teratomwachstums (\*\*\*) im Vergleich zu undifferenzierten humanen Stammzellen. Der Tumordurchmesser wurde manuell mit einem Meßschieber bestimmt, das Tumolvolumen wurde nach der Formel Länge\*Breite\*Breite/2 bestimmt.

**Bild A7:** Biolumineszenzaufnahmen (*in vivo*) von intrahepatisch applizierten CD34<sup>+</sup> Zellen.



Darstellung des Kurzzeitanwachstums von intra hepatisch transplantierten CD34<sup>+</sup> Zellen in die Leber von adulten immundefizienten NOD/SCID Mäusen. Die Biolumineszenzanalyse wurde 20h nach Applikation ausgewertet. Bild A zeigt die Negativkontrolle, in Bild B wird die Rückenlage und in Bild C die Bauchlage einer Maus dargestellt, der  $5 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> Zellen i.hep. appliziert wurden. Diese CD34 Zellen wurden vorher *in vitro* mit dem pEGFP<sub>Luc</sub>-Vektor nukleofiziert. Es ist zu erkennen, dass sich die CD34<sup>+</sup> Zellen kurzzeitig in der Leber der adulten Maus anreichern. Diese Zellanreicherung ist allerdings nur bis 48h nach i.hep. Applikation sichtbar.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marlen Keil, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "***In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zum Differenzierungspotenzial von humanen Stammzellen.**" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

### Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Marlen Keil hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Annika Wulf-Goldenberg, Marlen Keil, Iduna Fichtner und Klaus Eckert, "Intrahepatic transplantation of CD34<sup>+</sup> cord blood stem cells into newborn and adult NOD/SCID mice induce differential organ engraftment", Tissue and Cell, 2011  
Beitrag im Einzelnen: Etablierung und teilweise Durchführung der Stammzellisolierung (*in vitro*), Expressionsanalyse aus ex vivo Material, Mitverfasser des Manuskriptes

Publikation 2: Marlen Keil, Antje Siegert, Klaus Eckert, Jörg Gerlach, Wolfram Haider, Iduna Fichtner, „Transcriptional expression profile of cultured human embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo*“, In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal, 2012  
Beitrag im Einzelnen: Etablierung der zellbiologischen und molekularbiologischen Methoden, Durchführung aller Experimente (*in vitro* und *in vivo*), Hauptverfasser des Manuskriptes

Publikation 3: Maria Stecklum, Annika Wulf-Goldenberg, Bettina Purfürst, Antje Siegert, Marlen Keil, Klaus Eckert und Iduna Fichtner, "Cell differentiation mediated by co-culture of human umbilical cord blood stem cells with murine hepatic cells", In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal, 2014  
Beitrag im Einzelnen: *in vitro* Stammzellkultivierung, Auswahl von Markern der Genexpressionsanalyse (Echtzeit - PCR), Mitverfasser des Manuskriptes

---

Datum

---

Unterschrift

## Publikation 1

"Intrahepatic transplantation of CD34+ cord blood stem cells into newborn and adult NOD/SCID mice induce differential organ engraftment."

Tissue Cell 2012; 44[2], 80-86.

Autoren: Wulf-Goldenberg A, Keil M, Fichtner I, and Eckert K

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2011.11.004>













## Publikation 2

"Transcriptional expression profile of cultured human embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo*",

In Vitro Cell.Dev.Biol. - Animal, 2012

Autoren: Marlen Keil, Antje Siegert, Klaus Eckert, Jörg Gerlach, Wolfram Haider, Iduna Fichtner

<http://dx.doi.org/10.1007/s11626-012-9487-y>



















### Publikation 3

"Cell differentiation mediated by co-culture of human umbilical cord blood stem cells with murine hepatic cells"

In Vitro Cell.Dev.Biol. - Animal, 2014

Autoren: Maria Stecklum, Annika Wulf-Goldenberg, Bettina Purfürst, Antje Siegert, Marlen Keil, Klaus Eckert und Iduna Fichtner

<http://dx.doi.org/10.1007/s11626-014-9817-3>

















# LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



**Liste der ausgewählten Publikationen mit Angabe des IF von Marlen Keil (chronologisch)**

- Publikation 1 für Promotion:  
"Intrahepatic transplantation of CD34+ cord blood stem cells into newborn and adult NOD/SCID mice induce differential organ engraftment."  
Tissue Cell 2012; 44[2], 80-86.  
Autoren: Wulf-Goldenberg A, Keil M, Fichtner I, and Eckert K  
IF: 1,095
- Publikation 2 für Promotion:  
"Transcriptional expression profile of cultured human embryonic stem cells in vitro and in vivo."  
In Vitro Cell Dev.Biol.Anim 2012; 48[3], 165-174.  
Autoren: Keil M, Siegert A, Eckert K, Gerlach J, Haider W, Fichtner I  
IF: 1,289
- Publikation 3 für Promotion:  
"Cell differentiation mediated by co-culture of human umbilical cord blood stem cells with murine hepatic cells."  
In Vitro Cell Dev.Biol.Anim 2014.  
Autoren: Stecklum M, Wulf-Goldenberg A, Purfurst B, Siegert A, Keil M, Eckert K, Fichtner I  
IF: 1,289

**Komplette Publikationsliste von Marlen Keil (chronologisch)**

- Projekttreffen BMBF-Forschungsverbund: "Stammzell-basierte Leberregeneration"  
April, 2006, Berlin  
Vortrag: Reporter-gen-Transfektion von Luciferase und grünfluoreszierenden Protein (GFP) in CD34 positive Stammzellenm aus Nabelschnurblut  
Autoren: Keil M, Wulf-Goldenberg A, Eckert K, Uckert W, Fichtner I
- 8<sup>th</sup> MDC/FMP PhD Student Retreat: Walking in molecular pathways  
07.09. - 09.09.2006, Motzen  
Poster: "Comparison of gene transfection methods in cord blood derived CD34+ stem cells for *in vivo* imaging"  
Autoren: Keil M, Wulf-Goldenberg A, Eckert K, Uckert W, Fichtner I
- International Conference: Embryonic and Somatic Stem Cells – Regenerative Systems for Cell and Tissue Repair  
24.09. - 27.09.2006, Dresden  
Poster: "Comparison of gene transfection methods in cord blood derived CD34+ stem cells for *in vivo* imaging"  
Autoren: Keil M, Wulf-Goldenberg A, Eckert K, Uckert W, Fichtner I
- 1<sup>st</sup> Congress of the German Society for Stem Cells Research  
03.11. - 04.11.2006, Köln  
Poster "Comparison of gene transfection methods in cord blood derived CD34+ stem cells for *in vivo* imaging"  
Autoren: Keil M, Wulf-Goldenberg A, Eckert K, Uckert W, Fichtner I
- 3<sup>rd</sup> World Congress on Regenerative Medicine  
18.10. - 20.10.2007, Leipzig  
Poster: "Gene transfection methods in cord blood derived CD34+ stem cells for *in vivo* imaging in NOD/SCID mice"  
Autoren: Keil M, Wulf-Goldenberg A, Eckert K, Uckert W, Fichtner I
- Projekttreffen BMBF-Forschungsverbund: "Stammzell-basierte Leberregeneration"  
09.05.2008, Gatersleben  
Vorstellung und Diskussion des Teilprojektes 3 (MDC) "Mausmodelle für die präklinische *in vivo* - Testung der stammzellbasierten Leberregeneration"  
Autoren: Eckert K, Wulf-Goldenberg A, Keil M, Fichtner I
- 2<sup>nd</sup> International Congress on Stem Cell and Tissue formation  
06.07. - 09.07.08, Dresden  
Poster "In vitro / in vivo differentiation potential of human embryonic H1 and SA002 stem cells"  
Autoren: Keil M, Siegert A, Wulf-Goldenberg A, Stachelscheid H, Zeilinger K, Eckert K, Fichtner I
- 1. Buch/ Monografie  
Veröffentlichung: 14.07.2008 in VDM Verlag Dr. Müller  
Titel: Reporter-gen-Transfektion von Luciferase und GFP in CD34+ Stammzellen  
Autor: Marlen Keil

- 10<sup>th</sup> MDC/FMP PhD Student Retreat: Ready to network  
18.09. - 20.09.2008, Döllnsee  
Poster: “*In vitro / in vivo* differentiation potential of human embryonic H1 and SA002 stem cells”  
Autoren: Keil M, Siegert A, Wulf-Goldenberg A, Stachelscheid H, Zeilinger K, Eckert K, Fichtner I
- 20<sup>th</sup> Europeans Students' Conference  
04.10. - 07.10.2009, Berlin  
Poster: “*In vitro / in vivo* differentiation potential of human embryonic H1 and SA002 stem cells”  
Autoren: Keil M, Siegert A, Wulf-Goldenberg A, Stachelscheid H, Zeilinger K, Eckert K, Fichtner I
- World conference on regenerative medicine  
29.10. - 31.10.2009, Leipzig  
Poster: “*In vitro / in vivo* differentiation potential of human embryonic H1 and SA002 stem cells”  
Autoren: Keil M, Siegert A, Wulf-Goldenberg A, Stachelscheid H, Zeilinger K, Eckert K, Fichtner I
- PhD Project Committee Meeting  
13.01.2009, Berlin  
Vortrag: "Comparative quantitative and functional analysis of the hepatic differentiation potential of human adult and embryonic stem cells under *in vitro* and *in vivo* conditions"  
Autor: Keil M
- Combined Meeting of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), German Society for Stem Cell Research (GSZ), German Society of Gene-Therapy (DG\_GT) and International Society for Cellular Therapy (ISCT)  
20.11. -25.11.2009, Hannover  
Poster: "*In vitro / in vivo* differentiation potential of human embryonic SA002 stem cells”  
Autoren: Keil M, Stecklum M, Siegert A, Haider W, Gerlach J, Erdmann B, Eckert K, Fichtner I
- 3<sup>rd</sup> International Congress on Stem Cell and Tissue formation  
11.07. - 14.07.2010, Dresden  
Poster: "*In vitro / in vivo* differentiation potential of human embryonic SA002 stem cells”  
Autoren: Keil M, Stecklum M, Siegert A, Haider W, Gerlach J, Erdmann B, Eckert K, Fichtner I
- 8<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR)  
16.06. - 19.06.2010, San Francisco  
Poster: "Comparison of human embryonic SA002 stem cell culture techniques concerning to their differentiation potential *in vitro* and *in vivo*"  
Autoren: Keil M, Siegert A, Haider W, Gerlach J, Eckert K, Fichtner I
- Conference "Stem Cells in Development and Disease 2011"  
11.09. - 14.09.2011, Berlin

Poster: : "Comparison of human embryonic SA002 stem cell culture techniques concerning to their differentiation potential *in vitro* and *in vivo*"

Autoren: Keil M, Siegert A, Haider W, Gerlach J, Eckert K, Fichtner I

- World conference on regenerative medicine  
02.11. - 04.11.2011, Leipzig  
Poster: "Comparison of human embryonic SA002 stem cell culture techniques concerning to their differentiation potential *in vitro* and *in vivo*"  
Autoren: Keil M, Siegert A, Haider W, Gerlach J, Eckert K, Fichtner I
- Publikation 1 für Promotion:  
"Intrahepatic transplantation of CD34+ cord blood stem cells into newborn and adult NOD/SCID mice induce differential organ engraftment."  
Tissue Cell 2012; 44[2], 80-86.  
Autoren: Wulf-Goldenberg A, Keil M, Fichtner I, and Eckert K
- Publikation 2 für Promotion:  
"Transcriptional expression profile of cultured human embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo*."  
In Vitro Cell Dev.Biol.Anim 2012; 48[3], 165-174.  
Autoren: Keil M, Siegert A, Eckert K, Gerlach J, Haider W, Fichtner I
- OncoTrack Annual Meeting Madrid  
22.09. - 24.09.2013, Madrid  
Vortrag: "Establishment and characterization of patient-derived tumor models (Xenografts) of colon cancer"  
Autoren: Keil M, Hoffmann J, Garin-Chesa P, Beran G
- AACR Annual Meeting 2014, San Diego;  
05.04. - 09.04.2014  
Conference Paper: "A pipeline within the OncoTrack project for generating Patient-tumor-derived 3D cell cultures (PD3C) and their application for individualized, targeted drug sensitivity assays."  
Autoren: Schumacher D, Boehnke K, Lange M, Welte Y, Davies C, Rivera M, Keil M, Keilholz U, Haybaeck J, Velasco JA, Yaspo ML, Lehrach H, Henderson D, Reinhard C, Hoffmann J, Schaefer R, Regenbrecht C
- Publikation 3 für Promotion:  
"Cell differentiation mediated by co-culture of human umbilical cord blood stem cells with murine hepatic cells."  
In Vitro Cell Dev.Biol.Anim 2014.  
Autoren: Stecklum M, Wulf-Goldenberg A, Purfurst B, Siegert A, Keil M, Eckert K, Fichtner I

## DANKSAGUNG

Nun ist es geschafft, mit der Fertigstellung dieser Promotionsarbeit geht eine wichtige und lehrreiche Phase meines Lebens zu Ende. Jetzt ist es Zeit mich bei denjenigen zu bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Iduna Fichtner für die Bereitstellung des interessanten und innovativen Themas. Für Ihre hilfreichen Ideen und fachkundlichen Ratschläge, für Ihre anregende Kritik und freundschaftlichen Aufmunterungen während dieser Zeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Doktorvater und Gutachter Herrn Prof. Jörg Gerlach für die Tipps und Anregungen und für die treue Begleitung während meiner Promotion.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. Klaus Eckert, der mir mit seinen wertvollen Hinweisen und seinem großen fachlichem Wissen ein unerschöpflicher Ratgeber war. Er stand mir in allen Phasen meiner Promotionsarbeit hilfreich zur Seite.

Ein herzlicher Dank geht an meine Kollegen, die mich vor allem in meiner praktischen Arbeit sehr unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir in dieser Zeit eine große moralische Stütze war und mir immer Mut zugesprochen hat. Dabei will ich mich besonders bei meinem Verlobten Marcel Kluth und meiner kleinen Tochter Emilia bedanken, die mir unheimlich viel Kraft gegeben haben und mir besonders in der Endphase meiner Promotion eine große seelische und emotionale Stütze waren.

Euch allen gilt mein Dank, ohne Euch wäre diese Arbeit nicht zu dem Werk geworden, das sie heute ist.

Vielen herzlichen Dank!