

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Etablierung einer Methode zur Herstellung von adulten
pluripotenten Stammzellen**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Frieder Wolf
aus
Jena

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Hasenfuß

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2011

Abbildungsverzeichnis:	VI
Tabellenverzeichnis:	VIII
Abkürzungen	IX
1. Einleitung	1
1.1. Myokardinfarkt	1
1.2. Stammzelltherapie für die Herzregeneration	2
1.2.1. Embryonale Stammzellen.....	3
1.2.2. Adulte Stammzellen	5
1.2.3. Chancen und Risiken von ESCs im Vergleich mit adulten Stammzellen	7
1.2.4. Konversion von somatischen Zellen zu pluripotenten Stammzellen.....	8
1.2.5. Keimbahnstammzellen	10
1.3. Ziel der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Medien und Substanzen für die Zellkultur	12
2.2. Stammzellkultivierung	14
2.2.1. Zellen	14
2.2.2. Isolation und Kultivierung von embryonalen Fibroblasten der Maus.....	14
2.2.3. Kultivierung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen der Maus	15
2.2.4. Isolation und Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen des Menschen und der Maus	15
2.2.5. Isolation von spermatogonialen Stammzellen der Maus.....	16

2.2.6. Kulturtestung zur Konversion von SSCs und Etablierung von Zelllinien	17
2.3. Semi-quantitative RT-PCR-Analyse.....	17
2.3.1. Primer	18
2.3.2. Vorbereitung des Zellmaterials	19
2.3.3. RNA-Isolation	20
2.3.4. Reverse Transkription (RT).....	21
2.3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.3.6. Elektrophorese und quantitative Auswertung der Genexpression.....	22
2.4. Immunfluoreszenz	23
2.5. Durchflusszytometrie	25
2.5.1. Vorbereitung des Zellmaterials	25
2.5.2. Auswertung mittels Durchflusszytometrie	26
2.6. Alkalische Phosphatase	26
2.7. Isolation von Zytoplasma-Fragmenten.....	26
2.7.1. Vorbereitung der ESCs.....	26
2.7.2. Zellmarkierung von ESCs	27
2.7.3. Zytoplasmafragmentisolation	27
2.8. Fusion von Zytoplasmafragmenten mit mesenchymalen Stammzellen	28
3. Ergebnisse	29
3.1. Reprogrammierung von MSCs zu pluripotenten Stammzellen.....	29
3.1.1. Charakterisierung von mMSCs im Vergleich zu mESCs.....	29
3.1.2. Charakterisierung von hMSCs im Vergleich zu mMSCs.....	35

3.1.3. Reprogrammierung von MSCs.....	40
3.2. Gewinnung von pluripotenten Stammzellen aus adulten SSCs der Maus.....	52
3.2.1. Isolation und Kultivierung von mSSCs.....	52
3.2.1. Etablierung und Charakterisierung von maGSCs.....	53
4. Diskussion	60
4.1. MSCs der Maus und des Menschen zeigen keine Pluripotenz.....	60
4.2. MSCs können nicht durch Fusion mit mESC-Zytoplasma in pluripotente Stammzellen reprogrammiert werden.....	64
4.3. Adulte SSCs der Maus können durch Kulturbedingungen zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert werden.....	67
5. Zusammenfassung.....	72
6. Literaturverzeichnis.....	74

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Übersicht über den Ursprung verschiedener Stammzellen.....	11
Abb. 2: Isolation von hMSCs aus dem Knochenmark	16
Abb. 3: Morphologie von isolierten und kultivierten mMSCs und mESCs.....	29
Abb. 4: RT-PCR-Analyse der Genexpression von Stammzell- (a) und osteopoetischen bzw adipoetischen Differenzierungsmarkern (b) bei mMSCs und mESCs.	30
Abb. 5: Immunfluoreszenzanalyse von OCT4, Nestin und Ki67 in mESCs und mMSCs.....	31
Abb. 6: Analyse von Markerproteinen in mESCs und mMSCs mittels Durchflusszytometrie.	33
Abb. 7: Quantitative Analyse der Expression von Markerproteinen bei MEFs, mMSCs und mESCs.	34
Abb. 8: Morphologie von isolierten und kultivierten hMSCs	35
Abb. 9: RT-PCR-Analyse der Genexpression von Pluripotenzmarkern (a), frühen kardialen, osteopoetischen und adipoetischen Differenzierungsmarkern (b) in hMSCs, hESCs und MEFs.	36
Abb. 10: Analyse der Expression der Markerproteine OCT4, Nestin und Ki67 in hMSCs durch Immunfluoreszenzmikroskopie.	37
Abb. 11: Analyse der Expression von Markerproteinen in hMSCs im Vergleich mit mESCs durch Immunfluoreszenzmikroskopie.	38
Abb. 12: Vergleich der Expression von Markerproteinen bei mMSCs und hMSCs mittels Durchflusszytometrie.....	39
Abb. 13: Doppelfärbung von mESCs mit PKH 26 und DAPI.	41
Abb. 14: Zytoplasma-Isolation mittels Ficoll-Entkernung.....	42
Abb. 15: Vergleich der Spontanfusion vs. PEG-Fusion von mMSC- mit mESC-Zytoplasma.	44
Abb. 16: Vergleich der Spontanfusion vs. PEG-Fusion von hMSC- mit mESC-Zytoplasma.	46
Abb. 17: Kolonie von fusionierten mesenchymalen Zellen (FMCs) im Vgl. zu mESCs.....	47

Abb. 18: Genexpression von mFMCs im Vergleich zu mMSCs.	48
Abb. 19: Genexpression von hFMCs im Vergleich zu hMSCs.....	49
Abb. 20: Prozentualer Anteil von Markerproteinen bei mMSCs vs. mFMCs mittels Immunfluoreszenz.	50
Abb. 21: Analyse der Expression von Markerproteinen bei hMSCs vs. hFMCs mittels Immunfluoreszenz.	51
Abb. 22: Schematische Darstellung der Isolation von SSCs und maGSCs	52
Abb. 23: Typische SSC-Kolonie nach Isolation.....	53
Abb. 24: Morphologie und alkalische Phosphataseaktivität von SSCs unter verschiedenen Kulturbedingungen.	55
Abb. 25: RT-PCR-Analyse von SSCs unter verschiedenen Kulturbedingungen.....	56
Abb. 26: Immunfluoreszenzfärbung von SSCs unter Kondition 4.....	57
Abb. 27: Flowzytometrische Analyse von SSCs unter Kulturbedingungen 1-4 im Vergleich zu mESCs.	59

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Differenzierungsmöglichkeiten von mESCs *in vitro* 4

Tabelle 2: Differenzierung von humanen und nicht-humanen MSCs *in vitro* und *in vivo* 6

Tabelle 3: Verwendete Primer zur Charakterisierung humaner Stammzellen 18

Tabelle 4: Verwendete Primer zur Charakterisierung von Zellen der Maus..... 19

Tabelle 5: Für Immunfluoreszenz verwendete Antikörper..... 23

Tabelle 6: Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundäantikörper..... 24

Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> (Fibroblasten Wachstumsfaktor-2)
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
Cy3	Indocarbocyanin
Cyto B	Cytochalasin B
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
dATP	2-Deoxyadenosin-5-Triphosphat
dCTP	2-Deoxycytidin-5-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2-Deoxyguanosin-5-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2-Desoxynukleotid-Triphosphat
dpc	<i>day post coitum</i> (Tag nach Befruchtung)
dpp	<i>day post partum</i> (Tag nach Geburt)
dTTP	2-Deoxythymidin-5-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGC	<i>embryonic germ cell</i> (Embryonale Keimbahnzelle)
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
ESC	<i>embryonic stem cell</i> (Embryonale Stammzelle)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FMC	fusionierte mesenchymale Zelle
GDNF	<i>glial derived neurotrophic factor</i>
h	human
HSC	<i>haematopoietic stem cell</i> (Hämatopoetische Stammzelle)

ICM	<i>inner cell mass</i> (Innere Zellmasse)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
iPSC	<i>induced pluripotent stem cell</i> (induzierte pluripotente Stammzelle)
KM	Knochenmark
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
m	<i>mouse</i> (Maus)
maGSC	<i>multipotent adult germline stem cell</i> (Multipotente adulte Keimbahnstammzelle der Maus)
mGSC	<i>multipotent germline stem cell</i> (Multipotente Keimbahnstammzelle der Maus)
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i> (Embryonaler Fibroblast der Maus)
MMC	Mitomycin C
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i> (Mesenchymale Stammzelle)
NEAA	<i>non-essential amino acid</i> (Nichtessentielle Aminosäuren)
ntESC	<i>nuclear transfer embryonic stem cell</i> (Zellkerntransferierte embryonale Stammzelle)
PBS	<i>phosphate buffered salt solution</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PGC	<i>primordial germ cell</i> (Urkeimzelle)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylen-Glykol
PFA	Paraformaldehyd
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SCF	<i>stem cell factor</i> (Stammzellfaktor)
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> (schwerer kombinierter Immundefekt)
SCNT	<i>somatic cell nuclear transfer</i> (Somatischer Zellkerntansfer)
SSC	<i>spermatogonial stem cell</i> (spermatogoniale Stammzelle)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung

1.1. Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt mit Übergang in eine ischämische Herzkrankheit ist eine der häufigsten Diagnosen von hospitalisierten Patienten in den Industriestaaten. In Deutschland versterben jedes Jahr über 125.000 Menschen aufgrund einer ischämischen Herzkrankheit (Muller-Nordhorn et al., 2008) und davon über 60.000 Menschen aufgrund eines akuten Myokardinfarkts (Statistisches Bundesamt, 2010).

Grund eines akuten Myokardinfarkts ist in der Regel die abrupte Unterbrechung des Blutflusses in einer Koronararterie. Ursache eines Verschlusses ist meist eine rupturierende oder ulzerierende atherosklerotische Plaque, die zur lokalen wandständigen Thrombusbildung an der Stelle der Plaqueläsion führt und das Gefäß okkludiert. In einer geringeren Zahl von Fällen kommt es auch durch Koronararterienembolien, angeborenen Fehlbildungen oder Koronararterienspasmen zu einem Verschluss des Herzkranzgefäßes und damit zu einem akuten Myokardinfarkt. Die daraus resultierende Minderversorgung des Gewebes im Versorgungsbereich der okkludierten Koronararterie führt zu einem Verlust der Pumpfunktion sowie zum Zusammenbruch des basalen Zellstoffwechsels. Es kommt zu einem irreversiblen Verlust von Herzmuskelgewebe, welches durch Narbengewebe ersetzt wird. Das Ausmaß des Gewebeuntergangs ist abhängig von multiplen Faktoren wie der Größe des Versorgungsgebietes, dem Teil- oder Vollverschluss, der Dauer der Koronararterienokklusion, der Versorgung durch Kollateralarterien, dem Sauerstoffbedarf des Myokards sowie individuellen Faktoren. Abhängig von der Größe des infarzierten Areals kann es zu einer Vielzahl von Komplikationen kommen wie zum Beispiel zur chronischen Herzinsuffizienz durch zelluläre Umbauprozesse („*Remodelling*“) als Kompensationsmechanismus oder zu Arrhythmien.

Primäres Ziel der Therapie ist die schnelle Reperfusion des okkludierten Gefäßes. Hierfür stehen die Thrombolyse (pharmakologisch) und die Koronarangioplastie (mechanisch) zur Verfügung. Die chron. Herzinsuffizienz als eine Folge des Myokardinfarktes wird unter anderem mit ACE-Hemmern, AT₁-Antagonisten, β -Blockern, Diuretika und Aldosteronantagonisten nach Stufenschema therapiert (Dickstein et al., 2008). Hier nehmen β -Blocker und ACE-Hemmer eine besondere Rolle ein, da sie das „*Remodelling*“ verlangsamen können. Weitere Therapiemaßnahmen umfassen antithrombotische Medikation sowie die Reduktion bestehender Risikofaktoren. Trotz dieser großen Fortschritte in der

medikamentösen als auch mikroinvasiven Therapie kann es zu einer terminalen Herzinsuffizienz mit einer Auswurffunktion (Ejektionsfraktion) des Ventrikels unter 20 Prozent kommen. Eine Herztransplantation stellt die einzige Option mit längerfristigem Erfolg dar, sodass die betroffenen Patienten auf Spenderherzen angewiesen sind. Diese Option ist jedoch nur Patienten unter 65 Jahren vorbehalten. Aufgrund der Organknappheit und langen Wartezeiten versterben 25 Prozent der Patienten in dieser Phase. Zahlreichen Patienten könnte geholfen werden, wenn andere Möglichkeiten der Organregeneration zur Verfügung stünden.

In den letzten Jahren wird die stammzellbasierte Zelltherapie als eine Alternative zur konventionellen Organtransplantation diskutiert. Hierfür wurden verschiedene Zellpopulationen vorgeschlagen, die neonatale Kardiomyozyten, skelettale Myoblasten, aus embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten und adulte Stammzellen einschließen (Rubart und Field, 2008). Voraussetzung einer Stammzelltherapie zur Reparatur krankheitsbedingter kardialer und vaskulärer Schäden ist zum einen die Differenzierung der Stammzellen zu reifen gewebstypischen Zellen und zum anderen die Integration ins geschädigte Gewebe und die Verbesserung der Organfunktion.

1.2. Stammzelltherapie für die Herzregeneration

Die Definition von Stammzellen beinhaltet folgende Eigenschaften:

1. Stammzellen können sich über einen unbestimmten Zeitraum teilen und behalten dabei ihre ursprünglichen Eigenschaften. Dieses wird als Selbsterneuerung bezeichnet („*self-renewal*“)
2. Unter geeigneten Umgebungsbedingungen oder bei Stimulation können sich Stammzellen in mindestens einen spezifischen, erwachsenen Körperzelltyp mit dessen charakteristischer Morphologie und Funktion differenzieren (Kirschstein und Skirboll, 2001).

Stammzellen können über verschiedene Klassifikationssysteme eingeteilt werden. Eine bedeutende Einteilung orientiert sich an dem Differenzierungsspektrum der Zellen, d.h. dem Potential, verschiedene Gewebe zu bilden. Man unterscheidet totipotente, pluripotente, multipotente und unipotente Stammzellen. Totipotente (lat. totus = ganz, ungeteilt) Zellen können einen ganzen Embryo mit seinen drei Keimblättern sowie extraembryonales Gewebe wie Plazenta und Nabelschnur bilden. Die befruchtete Eizelle und die Blastozysten Zellen bis zum Achtzellstadium sind totipotent und können somit zu einem Embryo mit

extraembryonalen Gewebe heranreifen (Boheler et al., 2002). Der Begriff Pluripotenz (lat. plures = Mehrzahl) wird für Zellen verwendet, die sich in alle Gewebe der drei Keimblätter entwickeln können, aber keine Fähigkeit zur Bildung von extraembryonalem Gewebe aufzeigen. Somit kann kein kompletter Organismus mehr entstehen. Multipotente (lat. multi = viele) Zellen haben die Fähigkeit, sich in Abkömmlinge verschiedener Gewebe zu differenzieren, jedoch nicht in alle drei Keimblätter. Unipotente (lat. unus = eins, ein einziger) Zellen sind in der Lage, sich innerhalb einer Linie zu differenzieren. Des Weiteren wurden Stammzellen aufgrund ihres Ursprungs eingeteilt. Man unterscheidet embryonale Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESCs), die aus der Blastozyste (frühestes Entwicklungsstadium des Embryos) entnommen werden, und adulte Stammzellen, die in multiplen Geweben des Organismus zu finden sind.

Bislang vorliegende Befunde weisen darauf hin, dass im Herzen residente Stammzellen (c-kit+, Sca-1+, Isl-1+) vorliegen, die sich in Kardiomyozyten, Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen differenzieren können (Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003; Laugwitz et al., 2005). Prinzipiell ist das Potenzial für kardiale Reparaturvorgänge durch das Vorhandensein solcher Zellpopulationen angelegt. Offensichtlich zeigt sich jedoch, dass diese intrinsischen Reparaturmechanismen nach Ischämie oder kardialer Überbelastung nicht in der Lage sind, zu einer adäquaten Wiederherstellung der Funktion beizutragen.

Weitere neue Arbeiten weisen darauf hin, dass adulte und embryonale Stammzellen in Kardiomyozyten ausdifferenzieren können und somit in kardialer Organregeneration Verwendung finden könnten.

1.2.1. Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden aus dem Blastozystenstadium von Embryonen gewonnen. Die Blastozyste bezeichnet das Entwicklungsstadium des Embryos vor der Nidation (Implantation in Uteruswand). In diesem Stadium besteht der Embryo aus einer äußeren Hülle, dem Trophoblast, einer flüssigkeitsgefüllten Höhle (Blastocoel) und einem inneren Zellhaufen (*inner cell mass*, ICM), dem Embryoblast. Aus diesem Embryoblast können pluripotente ESCs isoliert werden (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Embryonale Stammzelllinien aus Säugetieren konnten bis heute von Mäusen (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981), von Affen (Thomson et al., 1995; Thomson und Marshall, 1998), von Menschen (Thomson et al., 1998) und erst kürzlich auch von Ratten (Buehr et al., 2008; Li P et al., 2008; Li C et al., 2009) gewonnen werden. ESCs der Maus (mESCs) benötigen zur

Kultivierung entweder eine Kokultur mit speziellen Zellen wie embryonalen Fibroblasten der Maus (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) (Wobus et al., 1984; Wobus et al., 1991), STO Zellen (Evans und Kaufman, 1981) oder eine Kultivierung unter Differenzierungsinhibitoren wie z.B. „*leukemia inhibitory factor*“ (LIF) (Williams et al., 1988; Burdon et al., 1999). ESCs sind pluripotente Stammzellen.

Um ESCs genauer definieren zu können, wurden spezifische Kriterien eingeführt. Eine Liste von wesentlichen Merkmalen wurde von Forschern um Austin Smith aufgestellt. Die wichtigsten Kriterien sind die Herkunft aus Embryoblast/Epiblast der Blastozyste, die Fähigkeit für unbegrenzte Teilung ohne Differenzierung („*long-term self-renewal*“ Langzeit Selbsterneuerung), Zellen aller drei Keimblätter (Ekto-, Endo- und Mesoderm) zu bilden, sich in fetales Gewebe während der Entwicklung zu integrieren, eine genetisch identische Kolonie aus einer einzelnen ESC zu bilden („*Clonogenic*“ Klonogenität), ein spezifisches Expressionsmuster (z.B. Oct4 Expression) aufzuweisen sowie Teratome nach Transplantation in immundefiziente Mäuse wie z.B. SCID-Mäuse zu bilden.

Durch intensive Forschung der letzten Jahre konnte die *in-vitro*-Differenzierung von mESCs in Zellen aller drei Keimblätter sowie Keimzellen gezeigt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Differenzierungsmöglichkeiten von mESCs *in vitro*

Vorläufergewebe	Zell Typ	Referenz
Ektoderm	Neuronen	(Bain et al., 1995; Strubing et al., 1995)
	Astrozyten	(Fraichard et al., 1995)
	Oligodendrozyten	(Brustle et al., 1999; Liu et al., 2000)
	Keratinocyten	(Bagutti et al., 1996; Yamashita et al., 2000)
Mesoderm	Herzmuskelzellen	(Doetschman et al., 1985; Maltsev et al., 1993)
	Skelettmuskelzellen	(Rohwedel et al., 1994)
	Glatte Muskelzellen	(Yamashita et al., 2000)
	Hämatopoetische Zellen	(Wiles und Keller, 1991; Nakano et al., 1996; Nishikawa et al., 1998)
	Adipozyten	(Dani et al., 1997)
	Chondrozyten	(Kramer et al., 2000; Hegert et al., 2002)
	Osteoblasten	(Buttery et al., 2001)
Endoderm	Pankreaszellen	(Lumelsky et al., 2001)
	Hepatozyten	(Chinzei et al., 2002; Kuai et al., 2003)
Keimzellen	Oozyten	(Hubner et al., 2003)
	Spermien	(Nayernia et al., 2006)

Auch konnte eine *in-vitro*-Differenzierung in Kardiomyozyten aus mESCs gezeigt werden (Tabelle 1). Diese differenzierten Zellen zeigten Eigenschaften von funktionellen Kardiomyozyten wie eine spontane kontraktile Aktivität, Expression von kardialen Transkriptionsfaktoren und Strukturproteinen sowie typische elektrophysiologische

Potenziale (Doetschman et al., 1985; Wobus et al., 1991; Maltsev et al., 1993; Wobus et al., 1995). Die aufgereinigten Kardiomyozyten zeigten nach Applikation in Mäuseherzen eine funktionelle Integration in das Myokard (Klug et al., 1996). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nicht nur aus mESCs, sondern auch aus humanen ESCs (hESCs) funktionelle Kardiomyozyten generiert werden können. Diese mit fetalen oder embryonalen Kardiomyozyten vergleichbaren Zellen zeigten ebenso wichtige kardiale Marker und eine spontane Kontraktilität (Kehat et al., 2001; Xu et al., 2002). Auch konnten Kardiomyozyten mit einem atrialen, ventrikulären oder schrittmacherähnlichen elektrophysiologischen Phänotyp unterschieden werden (He et al., 2003). Weitere *in-vitro*-Studien zeigten, dass aus hESCs gewonnene Kardiomyozyten strukturell und elektromechanisch sowohl mit Rattenmyozyten als auch mit Spenderkardiomyozyten funktionell interagieren (Kehat et al., 2004; Xue et al., 2005).

Somit stellen aus hESCs differenzierte Kardiomyozyten nach Transplantation ins Patientenherz und mechanischer und elektronischer Kopplung mit den Wirtskardiomyozyten eine mögliche Quelle für eine stammzellbasierte Transplantationstherapie dar, um untergegangenes Herzmuskelgewebe zu regenerieren

1.2.2. Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen konnten in multiplen differenzierten Geweben wie beispielsweise Blut, Knochenmark, Gehirn, Leber und Hoden gefunden werden. Sie zeigen wie alle Stammzellen mindestens zwei Eigenschaften. Sie besitzen die Fähigkeit, sich über einen längeren Zeitraum zu vermehren, ohne ihre ursprünglichen Eigenschaften zu verlieren, und sie können sich zu spezifischen, erwachsenen Körperzellen mit deren charakteristischer Morphologie und Funktion differenzieren. Adulte Stammzellen sind multipotent oder unipotent. Weiterhin wurde gezeigt, dass adulte Stammzellen sich nicht nur in das Gewebe, aus dem sie stammen, sondern auch in andere Arten von Gewebe differenzieren können. Die Differenzierung von Stammzellen konnte innerhalb eines Keimblattes als auch von Stammzellen aus einem der drei Keimblätter zu einem anderen Keimblatt gezeigt werden. So können beispielsweise aus dem Knochenmark gewonnene mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSCs) sowohl in Gewebe mesodermalen Ursprungs wie Skelettmuskel (Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999) als auch ektodermalen Ursprungs wie neuronales Gewebe (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000) differenzieren. Diese Eigenschaft wird als „Plastizität“, „unorthodoxe Differenzierung“ oder „Transdifferenzierung“ (Kirschstein und Skirboll, 2001) bezeichnet.

Besondere Beachtung fanden aus Knochenmark isolierte hämatopoetische Stammzellen (*haematopoietic stem cells*, HSCs). HSCs sind im Organismus zur kontinuierlichen Regeneration von Blutzellen erforderlich. Sie sind die am längsten beschriebenen Stammzellen. Verschiedene Publikationen weisen auf eine Plastizität dieser Zellen hin. Orlic et al. beschreiben eine HSC-Population (lin⁻, c-kit⁺), die, injiziert in die Randzone eines Myokardinfarktes bei Mäusen, zu einer Differenzierung dieser Zellen in Kardiomyozyten, Gefäßendothelzellen und glatten Muskelzellen und somit zu einer über 60%igen Regeneration des geschädigten Ventrikels führt (Orlic et al., 2001).

Weitere Publikationen zeigen eine Transdifferenzierung der HSCs (Jackson et al., 2001; Kajstura et al., 2005), wohingegen andere Untersuchungen das Transdifferenzierungspotenzial in Frage stellen (Balsam et al., 2004; Murry et al., 2004; Nygren et al., 2004) und von Zell-Zell-Fusionseffekten ausgehen (Alvarez-Dolado et al., 2003; Nygren et al., 2004). Untersuchungen in den letzten Jahren mit vielseitigen Methoden und unterschiedlichen Stammzellpopulationen ohne genetische Modifikation unterstützen die These, dass Transdifferenzierung, wenn überhaupt, ein sehr seltenes Ereignis ist (Alvarez-Dolado et al., 2003).

Über die ebenfalls aus dem Knochenmark isolierten MSCs ist weit weniger bekannt. Sie stellen eine weniger gut beschriebene Population von adulten Stammzellen dar. Jedoch wurde ihnen in den letzten Jahren aufgrund vielversprechender Erfolge vermehrt Aufmerksamkeit gewidmet. Eine Auswahl der bis heute erreichten Differenzierungsergebnisse von humanen und nicht-humanen MSCs ist in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Differenzierung von humanen und nicht-humanen MSCs *in vitro* und *in vivo*

	Human	Nicht-Human
<i>in vitro</i>	Adipozyten, Chondrozyten, Osteozyten (Pittenger et al., 1999) Neuronale Zellen (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000)	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Tenozyten (Pereira et al., 1995; Prockop, 1997) Astrozyten, Neurone (Sanchez-Ramos et al., 2000) Skelettmuskelzellen (Wakitani et al., 1995)
<i>in vivo</i>	Kardiomyozyten (Toma et al., 2002) Myozyten, Knochenmark-Stromazellen, Thymus-Stromazellen (Liechty et al., 2000) Purkinjefasern (Airey et al., 2004)	Kardiomyozyten (aus SP) (Jackson et al., 2001) Glatte Muskelzellen, Endothelzellen (Al-Khaldi et al., 2003)

1999 wurde erstmals bei aus humanem Knochenmark isolierten MSCs eine Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten gezeigt (Pittenger et al., 1999). Verschiedene Publikationen zeigen eine Regenerationsfähigkeit und Funktionsverbesserung des Herzens nach MSC-Applikation. Tomita et al. konnten am Rattenmodell zeigen, dass sich vorbehandelte MSCs nach einem Myokardinfarkt in das Herz integrieren, zum Narbengewebe beitragen und die kardiale Funktion verbessern (Tomita et al., 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass hMSCs nach Injektion in infarzierte Herzen von Mäusen sich zu Zellen mit Kardiomyozyteneigenschaften differenzieren (Toma et al., 2002). Dennoch zeigte sich in diesen und weiteren Untersuchungen trotz hoher applizierter Zellzahl nur eine sehr geringe Integration dieser Zellen (Wang et al., 2000; Toma et al., 2002).

Es wurde weiterhin gezeigt, dass hMSCs in fetale Schafsherzen appliziert, sich in Purkinjenzellen differenzieren und zu über 40% zum Purkinjefasersystem beitragen (Airey et al., 2004). Anhand dieser Ergebnisse zeigen hMSCs eine hohe Plastizität mit hohem Wert für die spätere klinische Anwendung. Eine Differenzierung von hMSCs in Kardiomyozyten *in vitro* konnte bis heute nicht nachvollzogen werden.

1.2.3. Chancen und Risiken von ESCs im Vergleich mit adulten Stammzellen

ESCs stellen aufgrund ihrer Pluripotenz eine vielversprechende Zellquelle für neue Therapieansätze dar. Dennoch zeigen sich auch problematische Seiten in der Forschung mit hESCs. Einige Punkte seien hier aufgeführt.

1. Um hESCs zu gewinnen, müssen Ei- und Samenzelle *in vitro* miteinander verschmelzen und einen neuen Embryo bilden. Aus der so gewonnenen Blastozyste werden die hESCs isoliert. Damit ergibt sich aber, dass die gewonnenen Zellen immer fremdes (allogenes) Zellmaterial darstellen und somit nach Differenzierung, wenn sie in einen neuen Organismus verpflanzt würden, zu einer Abstoßungsreaktion führen.
2. Humane ESCs besitzen ein teratogenes Potenzial. Werden sie in einen Organismus appliziert, kann es zur Tumorentstehung kommen.
3. Wie unter Punkt eins beschrieben, benötigt man zur hESC-Gewinnung Ei- und Samenzelle. Die Gewinnung von humanen Oozyten für evtl. spätere therapeutische Anwendung stellt ein bis jetzt nicht gelöstes Problem dar und führt in Teilen der Bevölkerung zu ethischen Vorbehalten gegenüber der embryonalen Stammzellforschung. Weiterhin bestehen Ängste des Missbrauchs von hESCs.

4. In Deutschland ist die Gewinnung von hESCs durch das Stammzellgesetz seit dem 28.06.2002 verboten (Stammzellgesetz, 2002). Eine Kompromissregelung erlaubt jedoch die Forschung an im Ausland hergestellten und importierten hESCs unter strengen Auflagen. Diese müssen aufgrund von gesetzlichen Vorgaben vor dem 01.05.2007 gewonnen worden sein (Gesetz zur Änderung des Stammzellgesetzes, 2008).

Neben den hESCs gibt es die humanen adulten Stammzellen, die allerdings ein geringeres Differenzierungspotenzial aufweisen. Dennoch haben die adulten Stammzellen im Vergleich zu ESC einige Vorteile: Humane adulte Stammzellen können bei betroffenen Patienten z.B. aus dem Knochenmark isoliert werden, sind autolog und zeigen damit keine Abstoßungsreaktionen. Die so gewonnenen adulten Stammzellen haben ein geringes teratogenes Potenzial. Weiterhin bestehen keine ethischen Vorbehalte. Allerdings zeigen die adulten Stammzellen ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial. Die Differenzierungsmöglichkeit in die kardiovaskuläre Richtung konnte von adulten Stammzellen nicht oder nur sehr eingeschränkt gezeigt werden (Guan und Hasenfuss, 2007). Die direkte Applikation von humanen adulten Stammzellen wie z.B. Knochenmarkstammzellen nach Myokardinfarkt zeigt in klinischen Studien eine nur geringe bis keine kardiale Funktionsverbesserung (Meyer et al., 2006; Schachinger et al., 2006), die kontrovers diskutiert wird. Sie wird eher als ein positiver parakriner Effekt der applizierten Zellen auf überlebende Kardiomyozyten gesehen, als eine Transdifferenzierung in funktionelle Kardiomyozyten.

1.2.4. Konversion von somatischen Zellen zu pluripotenten Stammzellen

Die Herstellung von autologen pluripotenten Stammzellen ist ein entscheidender Punkt für die potenzielle Anwendung von Stammzellen in der regenerativen Medizin. Diese patientenspezifischen Zellen sollten hinsichtlich ihres Differenzierungspotenzials Eigenschaften von ESCs aufweisen, um eine effiziente Differenzierung in die gewünschte Zellpopulation zu ermöglichen. In letzter Zeit wurden Wege zur Gewinnung von pluripotenten Stammzellen mit empfängerspezifischem Chromosomensatz beschrieben. Drei verschiedene Möglichkeiten werden heutzutage diskutiert: die therapeutische Klonierung mittels nukleärer Transfertechnik, die Überexpression von pluripotenz-induzierenden Faktoren in somatischen Zellen und die Fusion von Stammzellen mit somatischen Körperzellen.

Bei der Klonierung wird bei einer Eizelle der Zellkern entfernt und mittels eines somatischen Zellkerns ersetzt. Dieser somatische Zellkern beinhaltet seinen spezifischen Chromosomensatz und bestimmt damit die genetischen Eigenschaften der neu entstandenen Zelle. Die Eizelle hat nach Stimulation die Eigenschaften einer normal befruchteten Eizelle. Sie kann sich teilen und zu einer Blastozyste entwickeln (Wilmut et al., 1997). Die sich entwickelnde Blastozyste kann in einen Uterus implantiert werden und ein neuer Organismus kann geboren werden (Wilmut et al., 1997). Aus der Blastozyste können jedoch auch ESCs gewonnen werden. Diese haben den Chromosomensatz der somatischen Kernspenderzelle aber die Eigenschaften von ESCs. Diese Zellen könnten für die regenerative Medizin ohne Abstoßungsreaktionen verwendet werden. Jedoch konnten diese Erfolge noch nicht mit humanen Zellen bestätigt werden. Auch hierbei würden die Bedenken hinsichtlich Oozytenspende und dementsprechend ethische Vorbehalte bestehen bleiben.

Diese Bedenken könnten mit der Induktion von pluripotenten Stammzellen mittels Überexpression von Transkriptionsfaktoren umgangen werden. 2006 wurde erstmals von der Gruppe um Yamanaka beschrieben, dass die Überexpression von vier Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) in Fibroblasten der Maus diese in pluripotente Stammzellen reprogrammieren kann. Diese werden als induzierte pluripotente Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) bezeichnet (Takahashi und Yamanaka, 2006; Okita et al., 2007). 2007 zeigten die Gruppen um Thomson und Yamanaka, dass auch humane Fibroblasten reprogrammiert werden können (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Für die Reprogrammierung der somatischen Zellen wurden die vier Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc oder Oct4, Sox2, Nanog, Lin28) mittels viraler Transfektion in die Zellen gebracht. Nachteilig an dieser Methode sind die Überexpression von potenziellen Tumorgenen in der Zelle und die virale Integration im Chromosom.

Alternativ resultiert die Fusion von ESCs mit somatischen Körperzellen ebenfalls in Zellen, die Eigenschaften von pluripotenten Zellen aufweisen. Dieses konnte sowohl für Zellen der Maus (Tada et al., 2001; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002) als auch für humane Zellen (Cowan et al., 2005) nachgewiesen werden. Die pluripotenten Eigenschaften dieser Zellen beschränken sich nicht nur auf das fusionierte Zytoplasma und den Zellkern der ESCs, sondern es kommt auch zu einer Reprogrammierung des somatischen Zellkerns (Tada et al., 2001). Jedoch besitzen die so entstandenen Zellen einen vierfachen Chromosomensatz, was sie für den therapeutischen Einsatz unbrauchbar macht.

1.2.5. Keimbahnstammzellen

Eine weitere bedeutende Stammzellpopulation stellen die Keimbahnstammzellen dar. Diese Stammzellen können sowohl aus embryonalem als auch aus adultem Gewebe isoliert werden. Um eine lebenslange Aufrechterhaltung der Spermatogenese beim Mann und die Anlage der Oozyten bei der Frau zu gewährleisten, sind Keimbahnzellen als deren Ursprung von großer Bedeutung. Keimbahnstammzellen entwickeln sich aus dem Epiblast während der Gastrulation am 7. Tag (*day post coitum*, dpc) bei der Maus und werden zu diesem Zeitpunkt als Urkeimzellen (*primordial germ cells*, PGCs) bezeichnet (Ginsburg et al., 1990). Im weiteren Verlauf der Entwicklung erreichen die PGCs um den Tag 12 dpc die Genitalfalte und werden bei männlichen Tieren dort von sich differenzierenden Sertolizellen eingeschlossen. Ab diesem Zeitpunkt ändert sich die Morphologie der Keimbahnstammzellen, und sie werden als Gonozyten bezeichnet. Nach der Geburt wandern beim Mann die Gonozyten zur Basalmembran der Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) und differenzieren sich zu Typ-A-Spermatogonien, den spermatogonialen Stammzellen (*spermatogonial stem cells*, SSCs). Diese Zellen haben einen diploiden Chromosomensatz und die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern. Die SSCs können sich zu Spermatogonien, Spermatiden und Spermien differenzieren und sind damit beim Mann bis ins hohe Alter für die Spermatogenese verantwortlich.

Keimbahnstammzellen können zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung isoliert werden. PGCs konnten am Tag 8,5 dpc aus der Keimbahn der Maus isoliert und *in vitro* gehalten werden (Matsui et al., 1992) (Abb. 1). Diese kultivierten Zellen werden als embryonale Keimbahnstammzellen (*embryonic germ cells*, EGCs) bezeichnet. EGCs benötigen zur Kultivierung MEF- bzw. STO-Zellen sowie den Stammzellfaktor (*stem cell factor*, SCF). Diese Zellen zeigen die Eigenschaften des „*long-term self-renewal*“, der Klonogenität und der Differenzierung in alle drei Keimblätter. Darüber hinaus exprimieren sie spezifische Markergene und können somit als pluripotente Zellen angesehen werden.

Des Weiteren konnten SSCs bei Mäusen nach der Geburt isoliert und für lange Zeit in Kultur gehalten werden (Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Nagano et al., 2003; Kanatsu-Shinohara et al., 2005). Diese Zellen haben das Potenzial zur Spermatogenese *in vivo* (Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Ogawa T et al., 2004; Kubota et al., 2004a).

Aus neonatalen Mäusen isolierte SSCs (1-3 dpp) können unter definierten Kulturbedingungen zu multipotenten Keimbahnstammzellen (*multipotent germline stem cells*, mGSCs) dedifferenziert werden (Kanatsu-Shinohara et al., 2004a; Kanatsu-Shinohara et al., 2008) (Abb. 1). Diese neonatalen mGSCs zeigen hinsichtlich Morphologie, Proliferation, „*long-*

term self renewal“, Klonogenität und Expression von Pluripotenzmarkern starke Ähnlichkeit zu mESCs. Weiterhin können diese Zellen *in vitro* und *in vivo* in funktionelle Zellen aller drei Keimblätter differenzieren und tragen nach Blastozysteninjektion bei der Maus zu lebendem Nachwuchs bei.

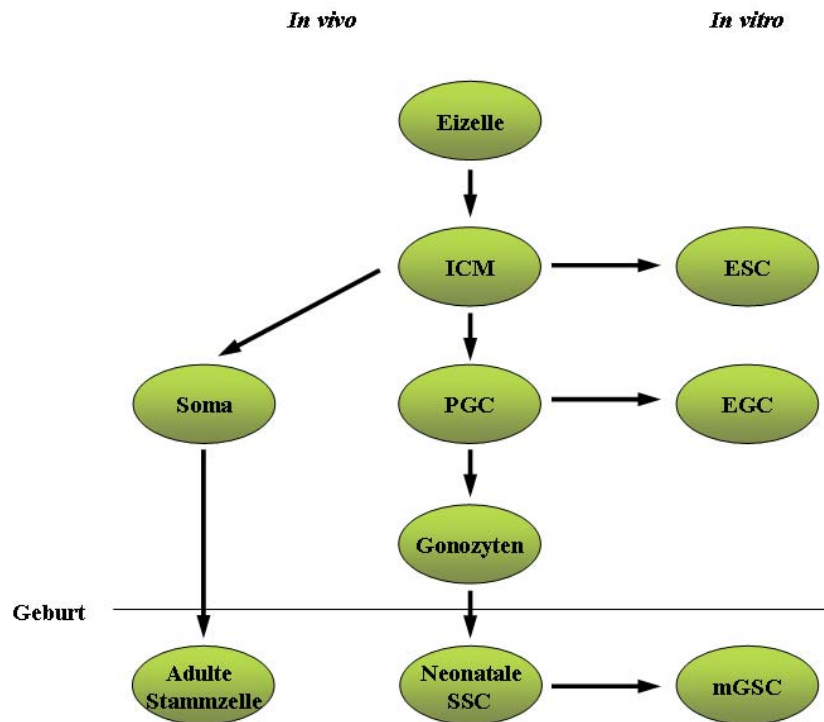


Abb. 1: Übersicht über den Ursprung verschiedener Stammzellen

Aus der befruchteten Eizelle entwickelt sich die ICM, von welcher die *in vitro* kultivierten ESCs abstammen. *In vivo* differenziert sich die ICM in somatische Zellen (Soma), welche adulte Stammzellen enthalten können und Keimbahnstammzellen (PGCs, Gonozyten und SSCs). Unter speziellen Kulturbedingungen können aus PGCs und neonatalen SSCs *in vitro* EGCs und mGSCs generiert werden.

1.3. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung adulter pluripotenter Stammzellen. Aufgrund dessen soll sich diese Arbeit im ersten Teil mit der Charakterisierung von MSCs im Vergleich zu ESCs hinsichtlich ihres Potenzials zur Pluripotenz beschäftigen. Darüber hinaus sollen MSCs durch Fusion mit ESC-Zytoplasmafragmenten reprogrammiert werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollen als alternative Stammzellpopulation adulte SSCs der Maus isoliert und charakterisiert werden und deren Potenzial zur Reprogrammierung durch Kulturbedingungen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Medien und Substanzen für die Zellkultur

1. PBS „*Dulbecco's Phosphate buffered Salt Solution*“ ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Invitrogen).
2. HBSS “*Hanks' Balanced Salt Solution*” ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Invitrogen)
3. Trypsinlösung: 0,2% Trypsin (Invitrogen) in PBS.
4. EDTA-Lösung: 0,02% EDTA (Serva) in PBS.
5. Trypsin-EDTA-Lösung: Trypsin : EDTA = 1 : 1, zum Ablösen der Zellen.
6. Gelatine-Lösung: 1% Gelatine (Fluka) in Aqua bidest, autoklaviert und 1 : 10 mit PBS verdünnt (= 0,1%).
7. Gelatinebeschichtung: 60 mm Zellkulturschalen (Nunc) ohne oder mit sterilen Deckgläsern (18x18 mm, Menzel-Gläser) wurden mit jeweils 2 ml 0,1% Gelatine über Nacht bei 4°C behandelt.
8. Mitomycin C Puffer: 2 mg Mitomycin C (MMC, Serva) in 10 ml PBS (= Stammlösung) lösen, sterilfiltrieren, 300 µl MMC Stammlösung in 6 ml Medium geben (= MMC Puffer) zur Hemmung der Zellteilung. MMC Stammlösung kann bei 4°C Lagerung eine Woche verwendet werden.
9. β -Mercaptoethanol (β -ME, Serva): Stammlösung: 7 µl β -ME in 10 ml PBS, sterilfiltriert (bei 4°C lagern).
10. Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA): 100x Stammlösung (Invitrogen), bei 4°C aufbewahren.
11. Bovine Albumin Fraktion V Solution (BSA): 7,5% BSA (Sigma) wurde mit PBS auf Konzentrationen von 1% bzw. 0,1% BSA verdünnt.
12. Kulturmedium I: Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l D-Glucose (Invitrogen) versetzt mit 15% fötalem Kälberserum (FKS, Invitrogen) zur Kultivierung von MEFs.
13. Kulturmedium II: DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose versetzt mit 15% FKS, 1x NEAA, β -ME (1 ml Stammlösung/ 100 ml Medium) und LIF, (Millipore, 10^5 Einheiten/ 100 ml Medium) zur Kultivierung von undifferenzierten pluripotenten Stammzellen der Maus.
14. Kulturmedium III: DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose versetzt mit 20% FKS, 1x NEAA, und β -ME (1 ml Stammlösung/ 100 ml Medium) zur Kultivierung von hMSCs.
15. Kulturmedium IV: DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose versetzt mit 10% FKS, 1x NEAA und β -ME (1ml Stammlösung/ 100 ml Medium) zur Kultivierung von mMSCs.

16. Kulturmedium V: DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose versetzt mit 15% FKS, 1x NEAA und β -ME (1 ml Stammlösung/ 100 ml Medium) zur Kulturtestung von SSCs.
17. Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep., Sigma P4333) 1:100 verwendet.
18. *Basic Fibroblast Growth Factor*, human recombinant (bFGF): 50 μ g bFGF (PeproTech) in 500 μ l 5 mM Tris-HCl pH6,7 150 mM NaCl gelöst (100 μ g/ml), aliquotiert, bei -20°C gelagert als Stocklösung, Arbeitskonzentration; 10 μ g/ml (mit 0,1% BSA verdünnt).
19. *Glial Derived Neurotrophic Factor*, rat recombinant (GDNF): 10 μ g GDNF (PeproTech) in 100 μ l 0,1% BSA gelöst (100 μ g/ml), aliquotiert, bei -20°C gelagert als Stocklösung, Arbeitskonzentration; 2 μ g/ml (mit 0,1% BSA verdünnt).
20. Lymphozyten Separations-Medium (PAA).
21. Paraformaldehyd (PFA): 0,8 g PFA (Sigma) wurden in 20 ml PBS bei 100°C für 20 Minuten gelöst (= 4% PFA).
22. Triton X-100 (Sigma): Triton X-100 wurde 1:500 mit PBS verdünnt.
23. DAPI: 5 mg DAPI (Sigma) in 5 ml sterilem Aqua bidest gelöst (= 1 mg/ml), bei 4°C gelagert, 1:1000 verdünnt eingesetzt.
24. PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit (Sigma) mit 10 ml Diluent C und 0,1 ml PKH26 Linker.
25. Ficoll PM400: Ficoll PM400 (Amersham Biosciences) wurde in Aqua bidest 1 : 1 (w/w) über Nacht mittels Magnetrührer gelöst (50%ige Ficolllösung), autoklaviert, bei -20°C gelagert, verdünnt auf End-Konzentrationen von 25%, 17% ,16%, 15% und 12,5% mittels DMEM.
26. Cytochalasin B (Cyto B): 5 mg Cytochalasin B (Sigma) in 0,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) gelöst, bei 4°C gelagert.
27. Polyethylen Glykol (PEG) 1450: PEG (Sigma) wurde mit 75 mM HEPES = 1 : 1 (w/v) gemischt, autoklaviert.
28. 6x Loading Puffer: 0,25% Bromophenolblau (Sigma), 0,25% Xylencyanol FF (Sigma), 30% Glycerol (Serva) in autoklaviertem Wasser.

2.2. Stammzellkultivierung

2.2.1. Zellen

Die Studie wurde mit folgenden Zellen durchgeführt:

1. hMSCs, gewonnen aus Knochenmark. Diagnostisch gewonnene Knochenmarksproben wurden nach Ausschluss einer pathologischen Veränderung und nach Freigabe für wissenschaftliche Zwecke, verwendet. Diesbezüglich bestanden keine ethischen und rechtlichen Bedenken seitens der Ethikkommission (Antragsnummer: 14/2/01).
2. mMSCs aus Knochenmark des Femur und der Tibia von zwei Monate alten CD1/NMRI Mäusen.
3. mESCs der Linie MPI-II (freundlich überlassen von Prof. Gruss, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen).
4. mSSCs von vier bis sechs Wochen alten transgenen Mäusen, die eine Straßgetriebenes verstärktes grün fluoreszierendes Protein (eGFP) tragen und einem gemischt genetischen Hintergrund aufweisen (FVB/C57Bl6/129Sv).

2.2.2. Isolation und Kultivierung von embryonalen Fibroblasten der Maus

15 bis 17 Tage alte Embryonen wurden schwangeren Mäusen (CD 1 / NMRI) entnommen, in PBS gespült und von Plazenta und Fruchtblase befreit. Nach erneuter Spülung wurden Kopf, Leber und Herz entfernt und in 0,2% Trypsinlösung überführt. Embryonales Gewebe wurde in 5 ml frischem Trypsin zerkleinert, in einen Erlenmeyerkolben überführt und für 25 bis 45 Minuten auf einem Magnetrührer gerührt (abhängig von embryonaler Entwicklung). Das gelöste Gewebe wurde durch ein Sieb filtriert, 10 ml Kulturmedium I hinzugefügt und bei 2000 rpm (~800g) abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 3 ml Medium I resuspendiert und in 100 mm Zellkulturschalen (Nunc, 2×10^6 Zellen pro 100 mm Schale) mit 10 ml Medium I gegeben und bei 37°C, 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Mediumwechsel erfolgte nach einem Tag, um Zellreste, Erythrozyten und nicht angeheftete Zellen zu entfernen. Nach ein bis zwei Tagen der Kultivierung wurden die MEFs mit Trypsin gelöst und im Verhältnis 1:2 bis 1:3 auf neue 100 mm Zellkulturschalen gegeben (Passage I) und für weitere ein bis drei Tage in Kulturmedium I kultiviert. MEFs in Passage I bis IV wurden mit MMC Puffer für zwei bis drei Stunden behandelt, nach Entfernung des MMC Puffers dreimal mit PBS gespült, zum Ablösen trypsiniert und in Kulturmedium I auf 60 mm Gelatine-beschichtete (0,1%)

Zellkulturschalen umgesetzt. MEFs wurden zur Kultivierung von mESCs und mSSCs im Zeitraum von ein bis zwei Tagen nach MMC Behandlung eingesetzt.

2.2.3. Kultivierung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen der Maus

Die undifferenzierten mESCs der Linie MPI-II wurden auf konfluent wachsenden MEFs in Kulturmedium II bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert (Voss et al., 1997), um die mESCs in undifferenziertem Zustand zu halten. Alle 24-48 Stunden erfolgte die Passagierung der Zellen auf Gewebekulturschalen (60 mm) mit neuen MEFs.

Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung ersetzt. Nach einer Einwirkzeit von 30 bis 60 Sekunden bei Raumtemperatur wurde die Lösung vorsichtig entfernt und die sich lösenden Zellen mit einer Glaspipette in 2 ml Kulturmedium II resuspendiert und im Verhältnis 1:3 bis 1:6 auf die zuvor vorbereiteten MEFs (60 mm) gegeben.

2.2.4. Isolation und Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen des Menschen und der Maus

Für die Isolation von hMSCs wurde das von Pittenger et al. beschriebene Protokoll verwendet (Pittenger et al., 1999). Die hMSCs wurden aus humanem Knochenmark isoliert. Hierfür wurden 10-20 ml Knochenmark im Verhältnis 1:2 bis 1:3 (abhängig von der Viskosität des Knochenmarks) mit DMEM gemischt. In ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) wurden 20 ml Lymphozyten-Separations-Medium gegeben und darüber vorsichtig 20 ml des verdünnten Knochenmarks geschichtet. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 800g ohne Abbremsen wurden an der Lymphozyten-Separations-Mediums-Grenze die mononukleären Zellen abpipettiert und zweimal mit der dreifachen Menge DMEM gewaschen (Abb. 2). Die gewonnenen Zellen wurden mit Kultivierungsmedium III resuspendiert und in 100 mm Zellkulturschalen (2×10^7 Zellen pro 100 mm Schale) mit 10 ml Kulturmedium III, 10 ng/ml bFGF gegeben und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Mediumwechsel erfolgte nach drei Tagen, um Zellreste, Erythrozyten und nicht angeheftete Zellen zu entfernen.

Für die Isolation von mMSCs wurde das Protokoll von Pereira et al. in modifizierter Form verwendet (Pereira et al., 1995). Zur Gewinnung von mMSCs wurde nach zervikaler Dislokation Femur und Tibia freigelegt und in eine 100 mm Petrischale mit PBS und 10% FKS überführt. Nach dem Auswaschen des Knochenmarks mittels Spritze und Kanüle wurden

die Zellen abzentrifugiert, in 2 ml Kulturmedium IV resuspendiert und mit Femur- und Tibia-Knochenstücken auf 100 mm Zellkulturschalen (2×10^6 Zellen pro 100 mm Schale) mit 10 ml Kulturmedium IV, 10 ng/ml bFGF gegeben und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Mediumwechsel erfolgte nach drei Tagen, um Knochen-, Zellreste, Erythrozyten und nicht angeheftete Zellen zu entfernen.

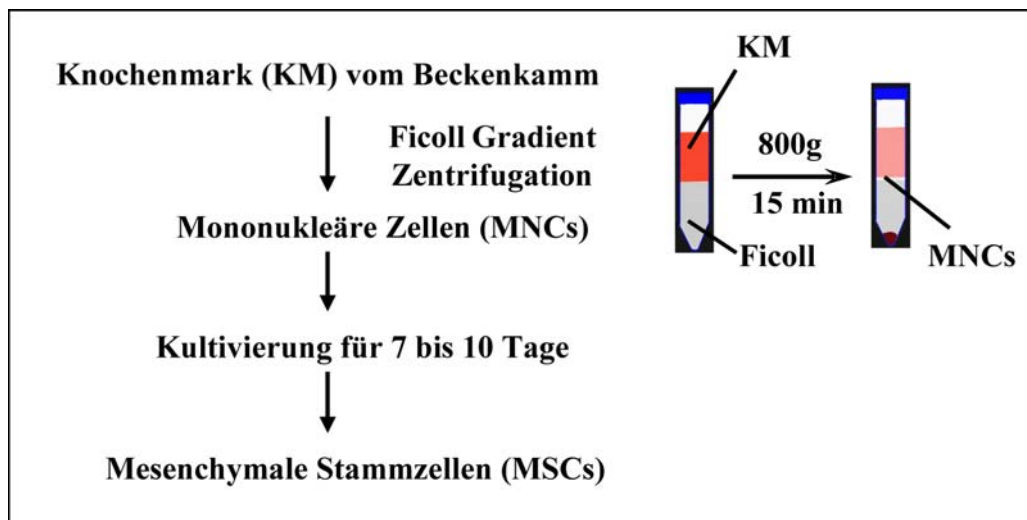


Abb. 2: Isolation von hMSCs aus dem Knochenmark

Die hMSCs und mMSCs wurden bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht kultiviert und im Verhältnis 1:3 bis 1:5 umgesetzt. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA für zwei Minuten gelöst und in FCS-haltigem Medium resuspendiert. Nach einem weiteren Waschgang in PBS wurden die hMSCs und mMSCs auf frische 100 mm-Zellkulturschalen mit Kulturmedium III bzw IV und 10 ng/ml bFGF gegeben. Die Kultivierung der hMSCs und mMSCs erfolgte abhängig von der Morphologie bis zur 8. Passage.

2.2.5. Isolation von spermatogonialen Stammzellen der Maus

Für die Isolation von SSCs wurden vier bis sechs Wochen alte transgene Mäuse mit einem Straß-getriebenen eGFP verwendet. Die Isolation wurde nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt (Bellve, 1993; Guan et al., 2006). Hier ein kurzer Überblick über das Prozedere: Nach zervikaler Dislokation der Tiere wurden die Hoden frei präpariert, entnommen und in HBSS gewaschen. Nach Entfernung der *Tunica albuginea* wurde der Hoden durch zwei Pinzetten leicht zerkleinert und mit Collagenase IV für 15-25 Minuten bei 37°C inkubiert. Die vereinzelt Tubules wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 450g, fünf

Minuten zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde dreimal mit HBSS gewaschen und nachfolgend mit Trypsin/EDTA für zwei Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln weiter verdaut. Der Verdau wurde mit 15% FKS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen wurden durch Resuspendieren vereinzelt und nach Zentrifugation in frisches Medium überführt. Isolierte SSCs wurden für ein bis zwei Wochen auf Gelatine-beschichteten Schalen kultiviert und dann nach Stra8-positiven Zellen mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) anhand des Stra8 gekoppelten eGFP sortiert. Stra8⁺ SSCs wurden von der Arbeitsgruppe Prof. W. Engel in Busulfan behandelte Mäuse injiziert, um das Beitragen zur Spermatogenese zu belegen.

2.2.6. Kulturtestung zur Konversion von SSCs und Etablierung von Zelllinien

Stra8-eGFP positive Zellen wurden für ein bis zwei Wochen unter Kulturmedium V versetzt mit 4 ng/ml GDNF vermehrt. Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA vereinzelt und in einem Verhältnis 1:3 alle vier bis fünf Tage passagiert. Anschließend wurden Stra8⁺ SSCs einer Testung verschiedener Kulturbedingungen unterzogen. Getestet wurden Kondition 1 (Kulturmedium V), Kondition 2 (Kulturmedium V + LIF 10³ Einheiten/ml), Kondition 3 (Kulturmedium V + MEFs) und Kondition 4 (Kulturmedium V + LIF 10³ Einheiten/ml + MEFs). Die so kultivierten Zellen wurden einer morphologischen Auswertung unterzogen. Zellen mit einer mESC-ähnlichen Morphologie wurden zur Etablierung neuer Zelllinien mechanisch aus der Kultur entfernt, auf neue MEFs gesetzt und weiter kultiviert.

2.3. Semi-quantitative RT-PCR-Analyse

Zur Charakterisierung von hMSCs, mMSCs und mSSCs wurde die Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktions (*reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR)-Analyse angewendet (Wong et al., 1994).

2.3.1. Primer

Die im Rahmen der RT-PCR-Analyse verwendeten Primer sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 3: Verwendete Primer zur Charakterisierung humaner Stammzellen

Name	Primer Sequenzen (5'--- 3')	Größe (bp)	Annealing (°C)	Zyklen	Referenz
<i>OCT4</i>	GACAACAATGAAAATCTTCAGGAG TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA	219	59	41	(Kehat et al., 2001)
<i>NANOG</i>	AGTCCCAAAGGCAAACAACCCACTTC ATCTGCTGGAGGCTGAGGTATTTCTGTCT C	164	64	43	Eigenes Labor
<i>SOX2</i>	ATGCACCGCTACGACGTGA CTTTTGCACCCCTCCCATTT	437	56	43	(Ginis et al., 2004)
<i>Nestin</i>	CAGCTGGCGCACCTCAAGATG AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG	209	66	31	(Kukekov et al., 1999)
<i>NKX2.5</i>	GGCCTCAATCCCTACGGTTA CACGAGAGTCAGGGAGCTGT	327	65	45	Eigenes Labor
<i>MEF2c</i>	GGTAACACAGGCGGTCTGAT TTGTTGAAATGGCTGATGGA	349	62	31	Eigenes Labor
<i>GATA4</i>	AGACATCGCACTGACTGAGAAC GACGGGTCATCTGTGGAAC	475	61	45	(Kehat et al., 2001)
<i>Osteocalcin</i>	CCACCGAGACACCATGAGAG CCATAGGGCTGGGAGGTCAG	419	60	35	(Tsutsumi et al., 2001)
<i>Osteopontin</i>	CTAGGCATCACCTGTGCCATAACC CAGTGACCAGTTCATCAGATTCATC	373	61	31	(Tsutsumi et al., 2001)
<i>Brachyury</i>	CATGTACTCTTCTTGCTGG GGTCTCGGGAAAGCAGTGGC	313	51	38	Eigenes Labor
<i>PPAR</i>	CATTCTGGCCCACCAACTT CCTTGATCCTTCACAAGCA	372	54	32	(Tsutsumi et al., 2001)
<i>GAPDH</i>	AGAGGCAGGGATGATGTTCT TCTGCTGATGCCCCATGTT	282	55	34	Eigenes Labor

Tabelle 4: Verwendete Primer zur Charakterisierung von Zellen der Maus

Name	Primer Sequenzen (5'--- 3')	Größe (bp)	Annealing (°C)	Zyklen	Referenz
<i>Oct4</i>	GGCGTTCTCTTTGCAAAGGTGTTCTCGAACCACATCCTTCTCT	314	61	38	Eigenes Labor
<i>Nanog</i>	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTGCAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG	363	66	34	(Mitsui et al., 2003)
<i>Utf1</i>	GATGTCCCGGTGACTACGTCTTCGGGGAGGATTCGAAGGTAT	643	57	28	Eigenes Labor
<i>Esg1</i>	ATAAGCTTGATCTCGTCTTCCCTTGCTAGGATGTAACAAAGC	501	59	28	Eigenes Labor
<i>Rex1</i>	GGCCAGTCCAGAATACCAGAGAAGCTCGCTTCCAGAACCTG	232	59	28	Eigenes Labor
<i>Stra8</i>	GCCAGAATGTATTCCGAGAACTCACTCTTGCTCAGGAAAC	649	60	38	Eigenes Labor
<i>Nestin</i>	AGTGTGAAGGCAAAGATAGCTCTGTCAGGATTGGGATGGG	311	55	39	(Ginis et al., 2004)
<i>Brachyury</i>	GCTGTGACTGCCTACCAGAATGGAGAGAGAGCGAGCCTCCAAAC	231	52	33	(Ginis et al., 2004)
<i>Osteocalcin</i>	GCAGCTTGGTGCACACCTAGACCTTATTGCCCTCCTGCTT	145	60	40	(Ogawa R et al., 2004a)
<i>Osteopontin</i>	CATTGCCTCCTCCCTCCCGGTGGCTATCACCTCGGCCGTTGGGG	415	56	29	(Ogawa R et al., 2004a)
<i>Ppar</i>	GCCTTGCTGTGGGGATGCTCCTTGGCCCTCTGAGATGAG	530	60	34	(Ogawa R et al., 2004b)
<i>Gapdh</i>	GCAGTGGCAAAGTGGAGATTCTCCATGGTGGTGAAGACA	249	56	31	Eigenes Labor

2.3.2. Vorbereitung des Zellmaterials

Um eine Trennung von MEFs und den auf ihnen kultivierten Stammzellen für die PCR-Probennahme zu erreichen, wurden diese einem „Preplating“ unterzogen.

Hierfür wurden die auf MEFs kultivierten Stammzellen mittels Trypsin/EDTA gelöst, mit FCS-haltigem Kulturmedium II die Trypsinierung abgestoppt und nach Resuspendieren auf eine neue 60mm Gelatine-beschichtete (0,1%) Zellkulturschale gegeben. Nach 60 Minuten hatten sich die MEFs an die Zellkulturschale angeheftet und die sich noch in Suspension

befindlichen Stammzellen wurden abgenommen, zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 400 µl Lysis Puffer (Promega) gelöst.

Mesenchymale Stammzellen wurden zunächst zweimal in PBS gewaschen und anschließend in 400 µl Lysis Puffer gelöst. Alle Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.3.3. RNA-Isolation

Die zur RNA-Isolierung angewandte Einzelschritt-Extraktionsmethode basiert auf der Anwendung eines Agens (Guadinin Thiozyanat), welches Ribonukleasen inaktiviert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die hierfür verwendeten Materialien und Agenzien wurden von der Firma Promega bezogen. Zur Vorbereitung wurde das Lysat (400 µl) aufgetaut, die Hälfte entnommen und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß erneut mit 150 µl Lysis-Puffer versetzt.

Die sich anschließenden Schritte der RNA-Isolation wurden anhand des SV Total RNA Isolation Kits durchgeführt. Die so gewonnene RNA wurde in 100 µl Nuklease freiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm mit dem Photometer (Gene Quant II, Pharmacia Biotech). Hierzu wurden 5 µl RNA der einzelnen Proben mit jeweils 70 µl DEPC- H_2O verdünnt. Anhand der ermittelten Messwerte wurden alle Proben mittels DEPC- H_2O auf eine RNA-Konzentration von 50 ng/µl eingestellt.

2.3.4. Reverse Transkription (RT)

Alle für die RT sowie PCR erforderlichen Agenzien wurden fertig geliefert (Applied Biosystems). Die RT wurde mit einem Volumen von 20 μ l pro 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) durchgeführt. Es enthielt folgende Komponenten:

RNA	4,0 μ l (200 ng)
DEPC-H ₂ O	6,2 μ l
10 x PCR Puffer II (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl)	2,0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4,0 μ l
dNTPs (Mix aus dGTP, dATP, dCTP und dTTP, je 25 mM)	0,8 μ l
RNase Inhibitor	1,0 μ l
Oligo d(T) ₁₆ (50 μ M)	1,0 μ l
MuLv reverse transkriptase (50 U/ μ l)	1,0 μ l

Gesamtvolumen	20 μ l

Die RT erfolgte unter folgenden Bedingungen im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf): 10 Minuten bei 22°C, 50 Minuten bei 42°C, 10 Minuten bei 95°C und Abkühlung auf 4°C. Danach wurde das RT-Reaktionsprodukt bei -20°C gelagert.

2.3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde mit einem Volumen von 50 μ l pro 0,5 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Folgende Komponenten waren darin enthalten:

cDNA (RT-Reaktionsprodukt)	2,0 μ l
DEPC-H ₂ O	31,4 μ l
10 x PCR-Puffer II	4,8 μ l
MgCl ₂	3,6 μ l
dNTPs	3,2 μ l
(Mix aus dGTP, dATP, dCTP und dTTP, je 25 mM)	
Sense primer	2,0 μ l
Antisense primer	2,0 μ l
AmpliTaq® DNA polymerase	0,5 μ l
DMSO	0,5 μ l

Gesamtvolumen	50 μ l
---------------	------------

Die für die PCR notwendige Zyklenzahl (28-45 Zyklen) sowie die Reaktionsbedingungen waren abhängig von den verwendeten Primern (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4). Folgende Standardbedingungen wurden jedoch immer zugrunde gelegt: Denaturierung bei 94°C über 15 Sekunden, Annealing bei 54-66°C über 15 Sekunden und Extension bei 72°C über 30 Sekunden. Nach Ablauf aller Zyklen erfolgte die Abkühlung der PCR-Maschine auf 4°C.

2.3.6. Elektrophorese und quantitative Auswertung der Genexpression

Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurden die PCR-Proben mit je 10 μ l 6x Loading Puffer versetzt. 15 μ l jeder Probe wurden auf ein 1,5% Agarosegel (DNA Agar™, MBI) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die unter UV-Licht fluoreszierenden Banden wurden mittels Multimage™ Light Cabinet digital aufgenommen und durch AlphaEase Software (Version 5.1) quantitativ ausgewertet. Dabei wurde die Intensität der von den Banden ausgehenden Fluoreszenzsignale quantitativ erfasst und in prozentuale Werte umgerechnet.

Die Genexpressionsdaten der einzelnen Gene wurden jeweils aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

2.4. Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurden verschiedene Zelltyp-spezifische Markerproteine von mMSCs, hMSCs, mESCs, mSSCs und MEFs detektiert. Die dazu verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgelistet. Die Zellen wurden ein bis drei Tage zuvor auf 18x18 mm sterile Gelatine-beschichtete (0,1%) Deckgläser in Zellkulturschalen gegeben. ESCs und SSCs der Maus wurden auf mit MEFs bewachsenen Deckgläsern für einen Tag kultiviert.

Tabelle 5: Für Immunfluoreszenz verwendete Antikörper

Zell-Spezifische Antigene	Name des Klones	Isotyp	Stamm-lösung	Verdünnung	Herkunft
SSEA1	MC-480	Maus IgM	Kultur-überstand	unverdünnt	Developmental Studies Hybridoma Bank, USA
SSEA3	MC-631	Maus IgM	Kultur-überstand	1:1	Developmental Studies Hybridoma Bank, USA
SSEA4	MC-813-70	Maus IgG ₃	Kultur-überstand	unverdünnt	Developmental Studies Hybridoma Bank, USA
OCT4	9E3	Maus IgG ₁	1 mg/ml	1:100	MAB4305, Chemicon Int., USA,
OCT4	40/Oct3	Maus IgG ₁	250 µg/ml	1:50	611203, BD Biosciences
NANOG	-	Kaninchen polyclonal	400 µg/ml	1:200	ab 21603, Abcam, UK
SOX2	-	Kaninchen polyclonal	1,2 mg/ml	1:1500	AB5603 Millipore
Nestin	-	Maus IgG	1 mg/ml	1:400	ab7659, Abcam, UK
c-kit	-	PE-gelabelt		1:100	Becton Dickinson
Sca-1	-	PE-gelabelt		1:100	Becton Dickinson

Thy1	-	PE-gelabelt		1:100	Becton Dickinson
Ter119	-	PE-gelabelt		1:100	Becton Dickinson
CD34	-	PE-gelabelt		1:100	Becton Dickinson
Ki67	MIB-5	Maus IgG ₁	190 mg/l	1:50	DakoCytomation, DK
GFP	-	Kaninchen polyclonal	Antiserum		Ab290, Abcam, UK

Tabelle 6: Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper

Produkt		Konzentration	Verdünnung	Herkunft
Sheep Anti-mouse IgG (H+L)	Fluorescein (FITC)	1.4 mg/ml	1:400 1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Sheep Anti-mouse IgG (H+L)	Cy3™	1.4 mg/ml	1:600, 1:400	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Goat Anti-mouse IgM	Fluorescein (FITC)	1.5 mg/ml	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Goat Anti-mouse IgG+IgM (H+L)	Cy3™	1.5 mg/ml	1:400	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Goat Anti-rabbit IgG (H+L)	Fluorescein (FITC)	1.5 mg/ml	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Goat Anti-rabbit IgG (H+L)	Cy3™	1.5 mg/ml	1:400	Jackson ImmunoResearch Laboratories

Das Zellmaterial wurde zunächst zweimal mit PBS gespült anschließend mit 4% PFA für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Für nukleär lokalisierte Marker wie OCT4, NANOG, SOX2 und Ki67 wurden die Zellen initial permeabilisiert. Hierfür wurden die Zellen in 0,2% Triton X-100 für 10 Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Um unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen für 60 Minuten in 10% Ziegen Serum (Chemicon) oder 4% BSA bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung des Ziegen Serums bzw. BSAs wurden 60 µl des 1. Antikörpers appliziert und für 60 Minuten bei 37°C belassen. Hierauf folgte eine dreifache Spülung mittels PBS. Als 2. Antikörper wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Antikörper in Abhängigkeit des Primärantikörpers eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37°C. Nach erneuter dreifacher Spülung erfolgte

die Zellkernfärbung zur Zelldetektion mit 50 µl 1,0 µM DAPI für fünf Minuten. Nach Wiederholung des Waschvorganges wurde das Deckglas auf einen Objektträger mit „Vectashield Mounting Medium“ (Vector Laboratories) gegeben und durch Nagellack an den Rändern fixiert.

Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) mit Verwendung von Emissionsfiltern für DAPI (Excitation 365, Beamsplitter FT 395, Emission BP 445/50), Cy3™ (Excitation BP 546/12, Beamsplitter FT 580, Emission LP 590) und FITC (Excitation BP 470/40, Beamsplitter FT 495, Emission BP 525/50) Farbstoffe.

2.5. Durchflusszytometrie

Zur quantitativen Analyse Zelltyp-spezifischer Markerproteinen von mMSCs, hMSCs, mESCs, mSSCs und MEFs wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt.

2.5.1. Vorbereitung des Zellmaterials

Zur Trennung von MEFs und den darauf kultivierten Zellen wurde das Verfahren des „Preplatings“ angewendet.

Die von MEFs befreiten Zellen wurde zunächst zweimal mit PBS gespült anschließend mit 4% PFA für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Bei der Untersuchung von nukleär lokalisierten Markern, wurden die Zellen initial permeabilisiert. Hierfür wurden die Zellen in 0,1% Triton X-100 für 10 Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Um unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen für 60 Minuten in 10% Ziegen Serum oder 4% BSA bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung des Ziegen Serums bzw. BSAs wurden 60 µl des 1. Antikörpers appliziert und für 60 Minuten bei 37°C belassen. Hierauf folgte eine dreifache Spülung mittels PBS. Als 2. Antikörper wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Antikörper in Abhängigkeit des Primärantikörpers eingesetzt. Die 2. Antikörper waren mit FITC oder Cy3™ gekoppelt. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37°C. Nach dreifacher Wiederholung des Waschvorganges wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie in 500 µl 0,1% BSA aufgenommen.

2.5.2. Auswertung mittels Durchflusszytometrie

Die Messungen erfolgten an einem Durchflusszytometer (Becton Dickinson) mittels eines UV Lasers. Eingesetzt wurden die Antikörper-gekoppelten Farbstoffe FITC, PE oder Cy3™. Bei jeder Bestimmung wurden 1×10^4 Zellen in dem FACScan-Durchflusszytometer und mit Hilfe des Programms CellQuest (Becton Dickinson, New Jersey, USA) erfasst und mit der Anwendungssoftware WinMDI (Win MDI 2.8, Joseph Trotter) ausgewertet. Die Messwerte wurden graphisch in einem zweidimensionalen Koordinatendiagramm dargestellt, wobei die Abszisse (x) die Zellgröße und die Ordinate (y) die Fluoreszenzintensität angab.

2.6. Alkalische Phosphatase

Die unter den Kulturbedingungen 1-4 gehaltenen SSCs wurden hinsichtlich ihrer alkalischen Phosphatase-Aktivität als ein Pluripotenzcharakteristikum untersucht. Hierfür wurde das alkalische Phosphatase-Färbe-Kit von Sigma-Alrich (86R) verwendet. Hier ein kurzer Überblick über das Prozedere: Die Zellen wurden zu Beginn von Medium befreit und zweimal mit PBS gewaschen. Die anschließende Fixierung der Zellen für 30 Sekunden erfolgte mittels Citrat/Aceton/Formaldehyd aus dem Kit bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden die Zellen mit der alkalischen Färbelösung für 15 Minuten gefärbt. Die Gegenfärbung mittels Hämatoxylin erfolgte nach zwei Waschschriften mit destilliertem Wasser. Abschließend wurden Reste des Hämatoxylins mittels Leitungswasser abgespült. Die Auswertung der Färbung erfolgte am Durchlichtmikroskop.

2.7. Isolation von Zytoplasma-Fragmenten

2.7.1. Vorbereitung der ESCs

Die embryonalen Stammzellen wurden einen Tag zuvor von MEFs getrennt („*Preplating*“) (siehe 2.3.2.). ESCs wurden anschließend auf eine 100 mm Gelatine-beschichtete (0,1%) Zellkulturschale gegeben. Nach 24 Stunden Kultivierung wurden die Zellen zur Proliferationsprävention der später isolierten Zytoplasmafragmente mit MMC-Puffer für zwei bis drei Stunden behandelt, nach Entfernung des MMC-Puffers dreimal mit PBS gespült, durch Trypsin/EDTA abgelöst und mit FCS-haltigem Kulturmedium I die Trypsinierung abgestoppt und in Suspension überführt.

2.7.2. Zellmarkierung von ESCs

Zur Markierung von Zellkern und Zytoplasma wurden die mESCs mittels Fluoreszenzfarbstoffen behandelt. Eingesetzt wurden die Farbstoffe DAPI zur Zellkerndetektion sowie der Zytoplasmafarbstoff PKH26.

In Suspension befindliche Zellen wurden nach Zentrifugation bei 2000 rpm (~800g) einmal mit DMEM gewaschen, gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen pro ml PBS verdünnt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit 20 μ l DAPI (1 mg/ml) pro ml versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur an einem dunklen Ort inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Die Zytoplasma Markierung wurde mit dem PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit (Sigma) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit 1 ml Diluent C und 2 μ l PKH26 pro 1×10^7 Zellen versetzt und für vier Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Färbevorgang mit 1 ml fetalem Kälberserum pro 1×10^7 Zellen gestoppt und die Zellen dreimal mit DMEM gespült.

2.7.3. Zytoplasmafragmentisolaton

Die Zytoplasmafragmentisolaton erfolgte nach der modifizierten Ficoll-Dichtegradienten-Methode von Wigler und Weinstein (1975). Hierfür wurde einen Tag zuvor ein 13 ml Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann, No.331372) mit 2 ml 25% Ficoll, 2 ml 17% Ficoll, 0,5 ml 16% Ficoll, 0,5 ml 15% Ficoll und 2 ml 12,5% Ficoll jeweils 12 μ g/ml Cytochalasin B enthaltend beschichtet und bei 4°C steril gelagert. Die mit PKH26 und DAPI gefärbten Zellen wurden in einer Konzentration von maximal 2×10^6 Zellen mit 12,5% Ficoll und 12 μ g/ml Cytochalasin B gemischt. Je 5 ml der Suspension wurden auf die vorbereiteten Ultrazentrifugenröhrchen geschichtet und bei 100.000 g, 31 °C für 100 Minuten in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Optima L-70) mit einem Ausschwingrotor (Beckmann SW 41 Ti) zentrifugiert. Die Zytoplasmafragmente wurden bei der sichtbaren Bande an der Trennphase zwischen 11% und 12,5% sowie 12,5% und 15% durch eine Pasteurpipette abgenommen, zweimal mit DMEM gewaschen und je 10 Minuten bei 3360 g abzentrifugiert. Der Erfolg der Zytoplasmafragmentisolaton wurde fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

2.8. Fusion von Zytoplasmafragmenten mit mesenchymalen Stammzellen

Die Zytoplasma-Zell-Fusion erfolgte nach der modifizierten Methode von Davidson und Gerald mittels PEG 1450 (Davidson und Gerald, 1976).

Hierfür wurde einen Tag vor Versuchsbeginn $1,5 \times 10^5$ hMSCs bzw. $1,8 \times 10^5$ mMSCs auf 35mm-Gelatine-beschichtete (0,1%) Zellkulturschalen kultiviert. Die aus der Zytoplasmaisolation gewonnenen Fragmente wurden im Verhältnis 1:20 bis 1:130 auf die mit MSCs kultivierten Schalen mit 1,5 ml Kulturmedium II, 15 μ l Penicillin/Streptomycin und 10 ng/ml bFGF gegeben. Nach zwei Tagen Inkubation wurde das Medium vorsichtig entfernt, Zellen mit 1 ml 22°C warmen PEG 1450 für 60 Sekunden behandelt, dreimal mit 2 ml DMEM gewaschen und weiter in 1,5 ml Kulturmedium II, 15 μ l Penicillin/Streptomycin und 10 ng/ml bFGF bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Nach vier bis sieben Tagen wurden die Zellen gelöst, ein Drittel wurde für PCR-Proben verwendet, der Rest wurde auf MEFs Gewebekulturschalen (60 mm) umgesetzt und weiter kultiviert.

3. Ergebnisse

3.1. Reprogrammierung von MSCs zu pluripotenten Stammzellen

3.1.1. Charakterisierung von mMSCs im Vergleich zu mESCs

Die direkt aus dem Knochenmark gewonnenen mononukleären Zellen wurden mit Kulturmedium IV in einer Gelatine-beschichteten Kulturschale kultiviert. Nach drei bis fünf Tagen waren sich ausbreitende mMSC-Kolonien erkennbar, die plastikadhärente Eigenschaften und eine für MSCs typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie zeigten (Abb. 3a). Im Gegensatz dazu wuchsen mESCs auf MEFs in runden, erhabenen, scharf abgegrenzten Kolonien (Abb. 3b). Bei weiterer Kultivierung zeigten die mMSCs eine Zellverdopplungsrate von ca. 0,5 pro Tag gegenüber 1,7 pro Tag bei mESCs.

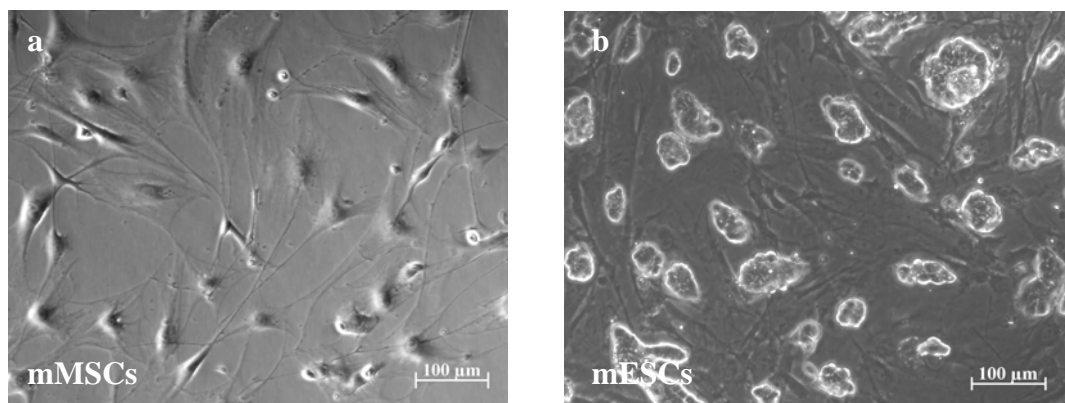


Abb. 3: Morphologie von isolierten und kultivierten mMSCs und mESCs.

Isolierte mMSCs sind plastikadhärent und zeigen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie (a). mESCs kultiviert auf MEFs wachsen in runden, erhabenen und scharf abgegrenzten Kolonien (b). Größenstandard: 100 µm.

Zur weiteren Charakterisierung der isolierten und kultivierten mMSCs wurde eine Expressionsanalyse von embryonalen Stammzellmarkern (*Oct4*, *Nanog*, *Utf1*), des „*multilineage progenitor*“ Zellmarkers *Nestin* und des frühen mesodermalen Markers *Brachyury* mittels semiquantitativer RT-PCR durchgeführt.

Die untersuchten embryonalen Stammzellmarker *Oct4*, *Nanog*, und *Utf1* zeigten keine Genexpression bei MSCs isoliert aus drei unabhängigen Mäusen. Eine deutliche Expression von *Oct4*, *Nanog* und *Utf1* konnte in mESCs gezeigt werden. *Oct4*, ein Transkriptionsfaktor der POU Familie (Donovan, 2001), und der Homeobox Transkriptionsfaktor *Nanog* (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003) sind zur Selbsterneuerung von ESCs notwendig.

Utf1, ein embryonaler Zelltranskriptionsfaktor in undifferenzierten Zellen, wird als ein weiterer Marker der Pluripotenz angesehen (Okuda et al., 1998).

Für das als „*multi-lineage progenitor*“ Marker angesehene Intermediärfilament *Nestin* (Wiese et al., 2004) konnte eine leichte Genexpression bei zwei von drei mMSCs nachgewiesen werden. Diese war jedoch gegenüber mESCs stark erniedrigt. Eine Expression von *Brachyury* konnte bei mMSCs im Gegensatz zu mESCs nicht festgestellt werden (Abb. 4).

MSCs können in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten differenziert werden. Zur Charakterisierung unserer isolierten mMSCs wurde eine semiquantitative RT-PCR für typische Marker von Adipozyten (*Ppar*) und Osteozyten (*Osteopontin*, *Osteocalcin*) durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei allen drei unabhängigen Proben eine deutliche Expression für alle untersuchten Gene. Im Gegensatz dazu exprimierten mESCs *Ppar* und *Osteopontin* schwach bei ähnlich starker Expression für *Osteocalcin* (Abb. 4).

Die Ergebnisse zeigen, dass mMSCs keine Expression von Pluripotenzmarkern auf mRNA Ebene aufzeigen und sich damit von pluripotenten mESCs unterscheiden. Darüber hinaus konnte eine für mMSCs typische Expression von Osteogenese und Adipozytenmarker gezeigt werden.

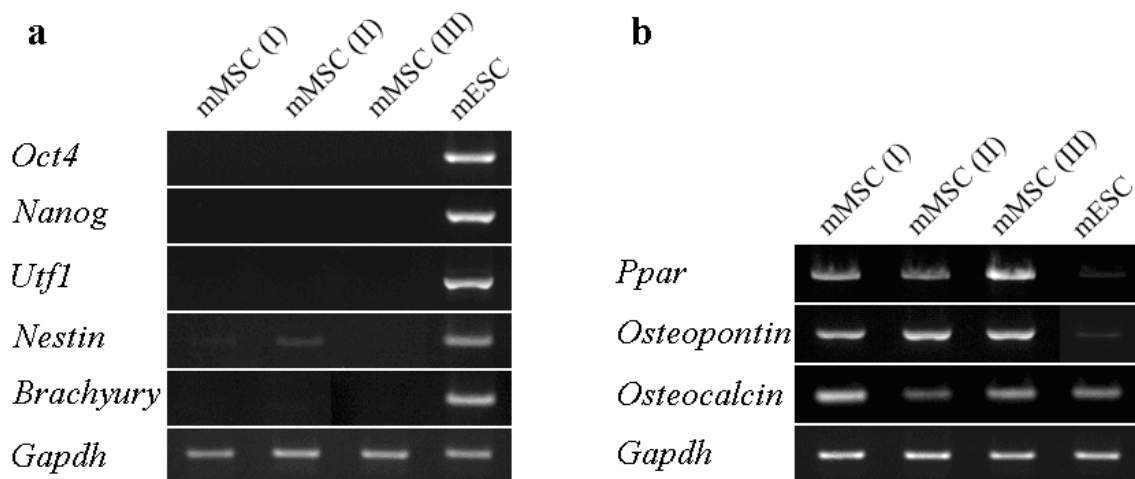


Abb. 4: RT-PCR-Analyse der Genexpression von Stammzell- (a) und osteopoetischen bzw. adipoetischen Differenzierungsmarkern (b) bei mMSCs und mESCs.

Zur Analyse der Expression stammzellspezifischer Marker auf Proteinebene wurde eine Immunfluoreszenzanalyse mittels Antikörper gegen OCT4, Nestin und Ki67 durchgeführt.

Abbildung 5 zeigt die Expression von OCT4 und Nestin als Doppelfärbung. In mESCs konnten deutlich OCT4- (Abb. 5a) und Nestin-Signale (Abb. 5c) detektiert werden. Auch mMSCs exprimieren die Proteine OCT4 (Abb. 5b) und Nestin (Abb. 5d). In den als

Negativkontrolle dienenden MEFs konnte kein OCT4 bzw. Nestin nachgewiesen werden (Abbildung nicht gezeigt).

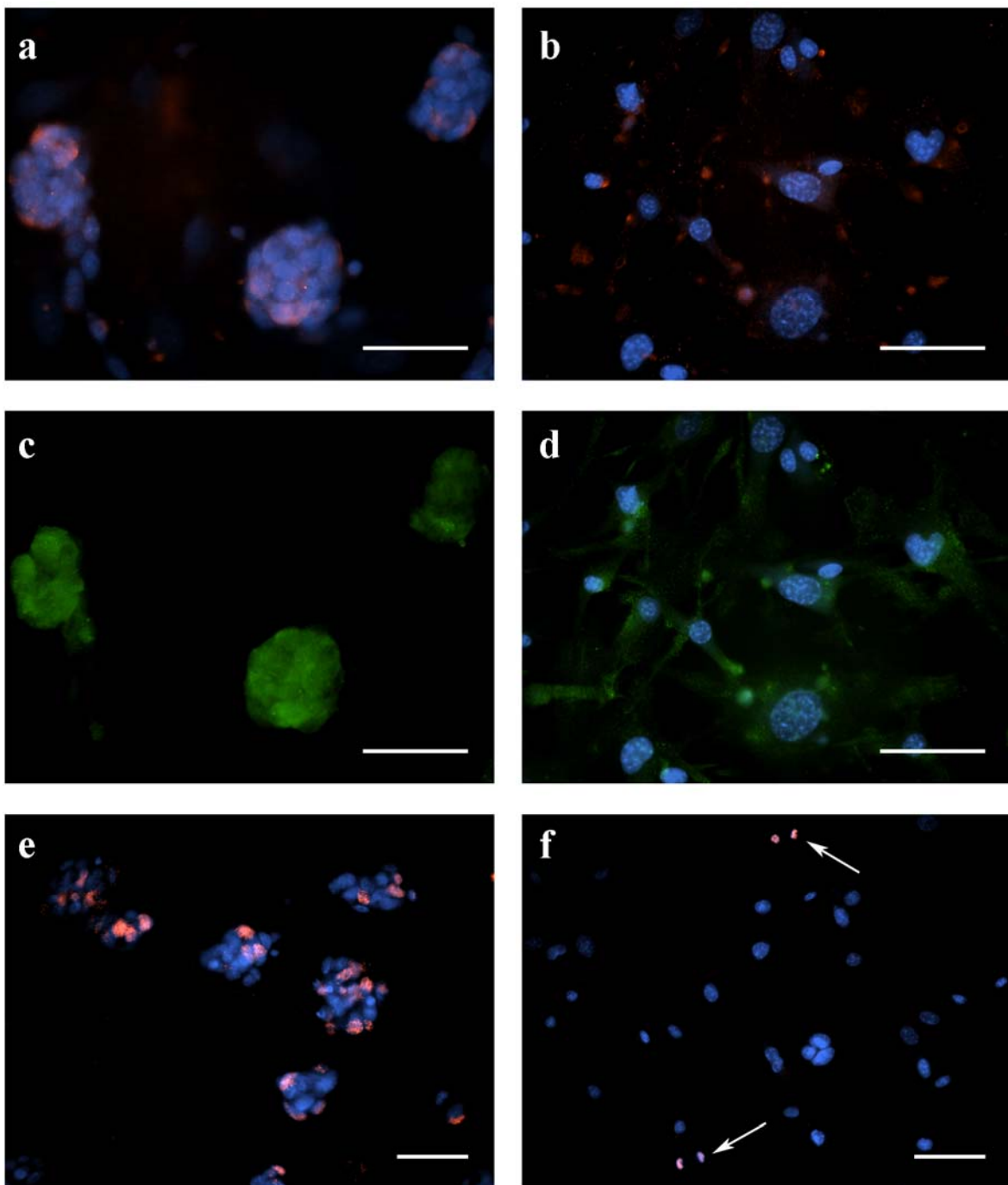


Abb. 5: Immunfluoreszenzanalyse von OCT4, Nestin und Ki67 in mESCs und mMSCs
mESCs (a, c, e) und mMSCs (b, d, f) wurden hinsichtlich ihrer Proteinexpression von OCT4 (rot; a, b), Nestin (grün; c, d) sowie Ki67 (rot; e, f; Pfeil) untersucht. Zur Zellkerndetektion wurde der Farbstoff DAPI (blau) eingesetzt. Größenstandard: 50 μ m.

Zur Untersuchung der Zellteilungsaktivität wurden die Zellen auf die Proteinexpression von Ki67 getestet. Der nukleäre Transkriptionsfaktor Ki67 wird während des Zellzyklus in den Phasen G₁, S, G₂ und M exprimiert und ist in der Zellruhephase (G₀) nicht vorhanden. Damit kann Ki67 als ein Markerprotein für sich aktiv im Zellzyklus befindliche Zellen angesehen werden (Gerdes et al., 1984). Im Gegensatz zu der hohen Ki67-Expression in mESCs (Abb. 5e) konnte in mMSCs nur eine geringe Ki67-Expression detektiert werden (Abb. 5f). Die als Negativkontrolle verwendeten MMC-behandelten MEFs zeigten keine Ki67-Expression.

Des Weiteren wurden die Immunfluoreszenzdaten quantitativ mittels Durchflusszytometrie bestätigt. In drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils 10.000 Zellen untersucht. Als Negativkontrolle wurden MMC-behandelte MEFs eingesetzt.

Mittels Durchflusszytometrie konnte eine signifikant erhöhte Anzahl von OCT4-exprimierenden mMSCs (11,6%) gegenüber MEFs (1,5%, $p < 0,05$) festgestellt werden. Jedoch zeigte sich im Vergleich zu 55,3% OCT4-exprimierenden mESCs eine signifikante Herabregulation von OCT4 bei mMSCs ($p < 0,001$) (Abb. 6, Abb. 7).

Des Weiteren konnte in nur 4,8% der mMSCs eine Nestin-Expression nachgewiesen werden, was im Vergleich zu mESCs (78,4%) mit einer Signifikanz von $p < 0,001$ deutlich erniedrigt war, im Vergleich zu den MEFs (1,4%) allerdings nicht signifikant erhöht war.

Untersuchungen bezüglich des Proliferationsmarkers Ki67 zeigten 19,5% positive mESCs, 1,7% positive mMSCs und 0,2% positive MEFs. Eine Signifikanz konnte im *t-Test* jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 6, Abb. 7)

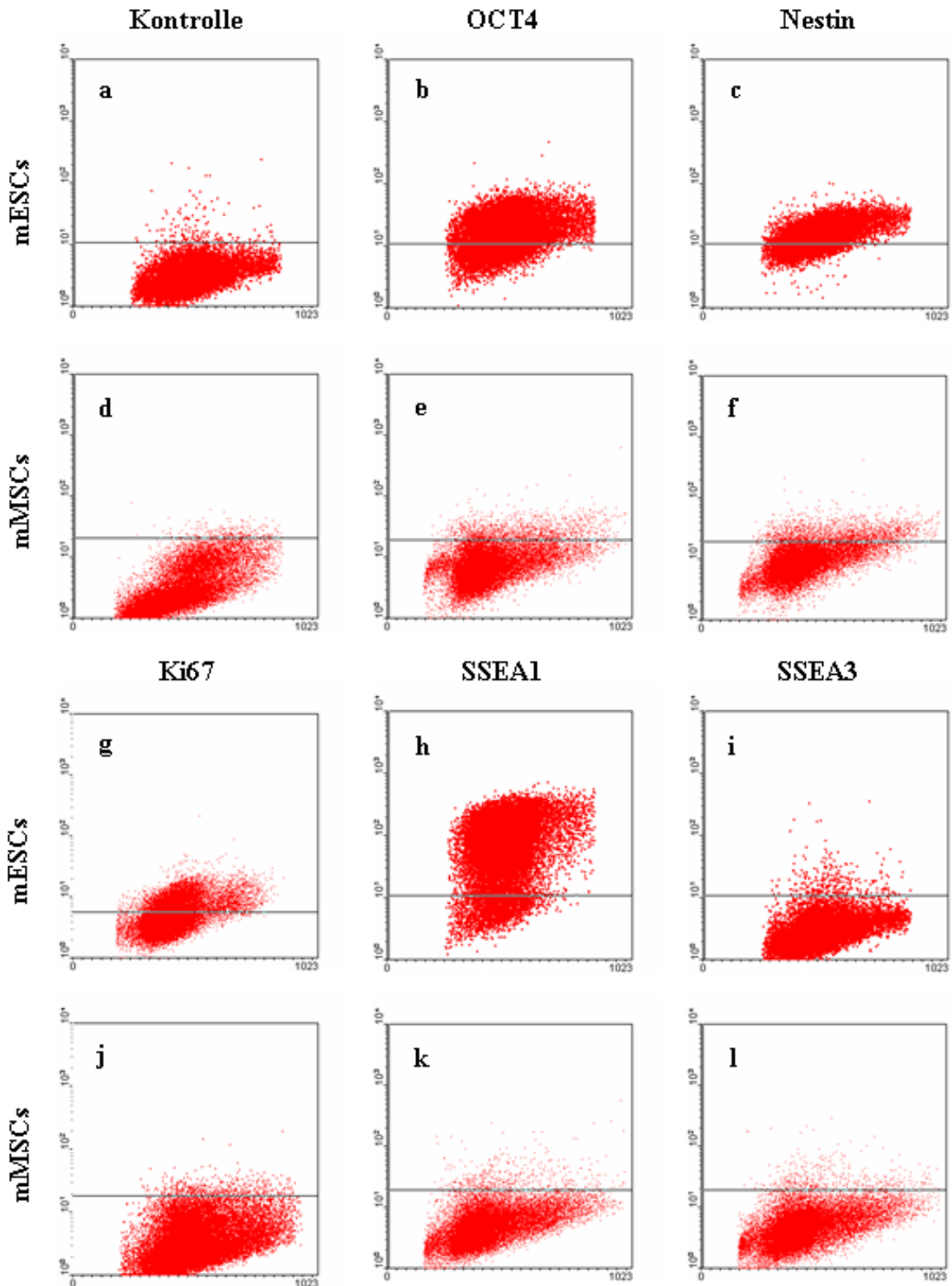


Abb. 6: Analyse von Markerproteinen in mESCs und mMSCs mittels Durchflusszytometrie.

Die mMSCs und mESCs wurden mit Cy3TM gekoppelten Antikörpern gegen OCT4, Nestin, Ki67, SSEA1 und SSEA3 behandelt und mit je 10.000 Zellen pro Zelllinie und Antikörper mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

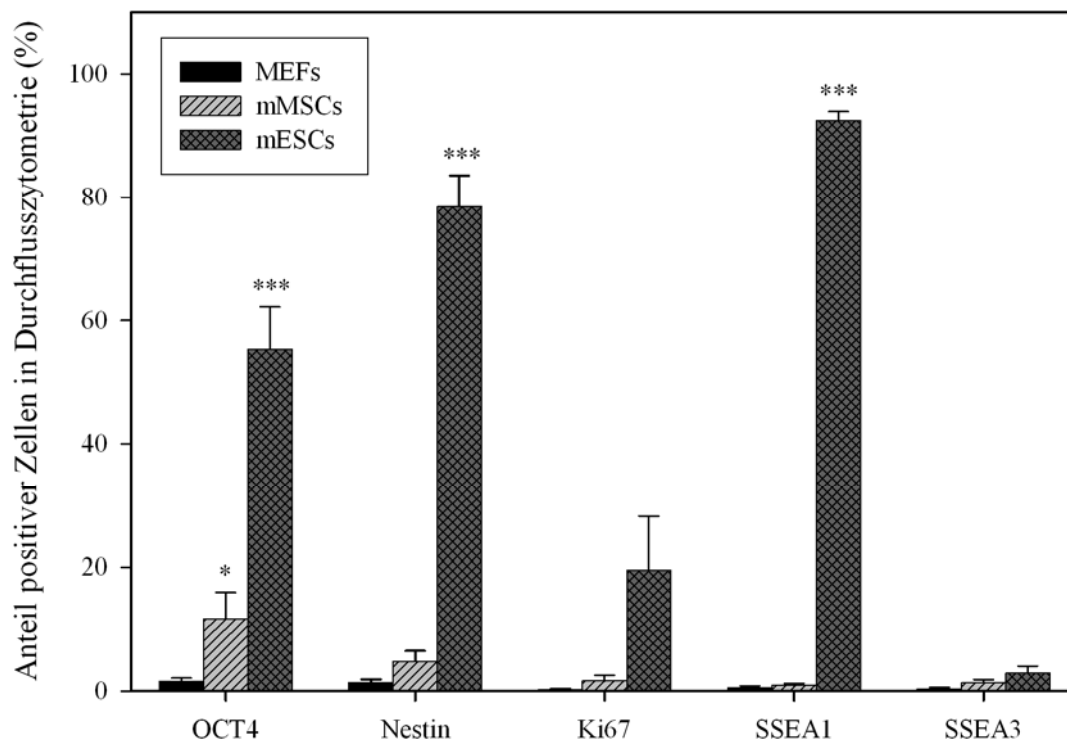


Abb. 7: Quantitative Analyse der Expression von Markerproteinen bei MEFs, mMSCs und mESCs.

Die Zellen wurden mit Cy3TM gekoppelten Antikörpern gegen OCT4, Nestin, Ki67, SSEA1 und SSEA3 behandelt und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Die Darstellung erfolgte als prozentualer Anteil von positiven Markerproteinen auf 100 Zellen. Die Daten wurden an 3 unabhängigen Versuchen mit einer Zellzahl von je 10.000 Zellen erhoben.

Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Abweichungen der Expression von Markerproteinen gegenüber MEFs wurden mit dem *t-Test* auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Signifikante Unterschiede sind mit (***) für $p < 0,001$, (**) für $p < 0,01$ und (*) für $p < 0,05$ markiert.

Weiterhin wurde auf das „*Stage Specific Embryonic Antigen 1 und 3*“ (SSEA1, SSEA3) untersucht. SSEA1, ein Marker für undifferenzierte mESCs, wird auf der Zelloberfläche exprimiert. Bei mESCs kommt es während der frühen Differenzierung zu einem Verlust. Im Gegensatz dazu zeigen undifferenzierte hESCs keine SSEA1-Expression. Bei Differenzierung kommt es bei ihnen jedoch zu einer SSEA1-Expression (Solter und Knowles, 1978). SSEA3, ein Marker für undifferenzierte hESCs, wird wie SSEA1 auf der Zelloberfläche exprimiert. Bei Differenzierung kommt es zu einem Verlust von SSEA3. Demgegenüber kommt es bei mESCs zu einer Expressionszunahme bei Differenzierung ohne Expression im undifferenzierten Zustand.

Eine signifikant erhöhter Anteil SSEA1-exprimierender mESCs mit 92,5% konnte gegenüber 0,9% mMSCs ($p < 0,001$) beobachtet werden. Allerdings war der Anteil der SSEA1 exprimierender MEFs mit 0,5% ähnlich gering.

Untersuchung bezüglich des Oberflächenmarkers SSEA3 resultierten in 2,9% positiven mESCs, 1,3% mMSCs und 0,4% MEFs. Eine Signifikanz konnte im *t-Test* nicht nachgewiesen werden

3.1.2. Charakterisierung von hMSCs im Vergleich zu mMSCs

Für die Isolation von hMSCs wurde das von Pittenger et al. (1999) beschriebene Protokoll angewendet. Die aus Knochenmark isolierten mononukleären Zellen wurden in einer Zellkulturschale für sieben bis zehn Tage kultiviert. Nach drei bis fünf Tagen zeigten sich in der Kulturschale ausbreitende hMSC-Kolonien, die wie mMSCs plastikadhärente Eigenschaften und eine Fibroblasten-ähnlichen Morphologie zeigten und somit keinen Unterschied zu mMSCs aufwiesen (Abb. 8, Vergl. Abb. 3). Bei weiterer Kultivierung zeigten die hMSCs eine ähnliche Zellverdopplungsrate wie mMSCs.

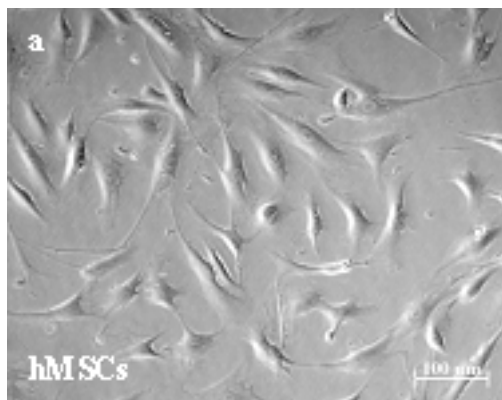


Abb. 8: Morphologie von isolierten und kultivierten hMSCs.

Isolierte hMSCs sind auf Zellkulturschalen adhären und zeigen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie. Größenstandard: 100 μm .

In Anlehnung an die untersuchten mMSCs erfolgte die Analyse des Expressionsprofils von hMSCs hinsichtlich embryonaler Stammzellmarker und Differenzierungsmarker für Kardio-, Adipo- und Osteozyten.

Hierbei zeigte sich eine kontinuierliche Expression der Stammzellmarker *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *LIN28* und *Nestin* bei vier unabhängigen Versuchen (Abb. 9a). Jedoch zeigte sich eine deutlich geringere Expression der Stammzellmarker *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* und *LIN28* gegenüber hESCs (Abb. 9a). Bei der Analyse der frühen mesodermalen und

Kardiogenesemarker konnte eine kontinuierliche Expression von *Brachyury* und eine variable Expression von *NKX2.5* und *MEF2c* gesehen werden. Jedoch konnte der wichtige Kardiogenesefaktor *GATA4* nicht nachgewiesen werden. Die Marker der Osteogenese, *Osteocalcin* und *Osteopontin*, und der Adipogenesemarker, *PPAR* wurden durchgängig exprimiert (Abb. 9b).

Die Ergebnisse zeigen, dass hMSCs eine deutlich geringere Expression von Pluripotenzmarkern auf mRNA Ebene aufzeigen und sich damit von pluripotenten hESCs unterscheiden. Allerdings konnte eine variable und deutlich geringere Expression von frühkardialen Markern gezeigt werden. Darüber hinaus zeigen hMSCs eine Expression von Osteogenese und Adipozytenmarkern.

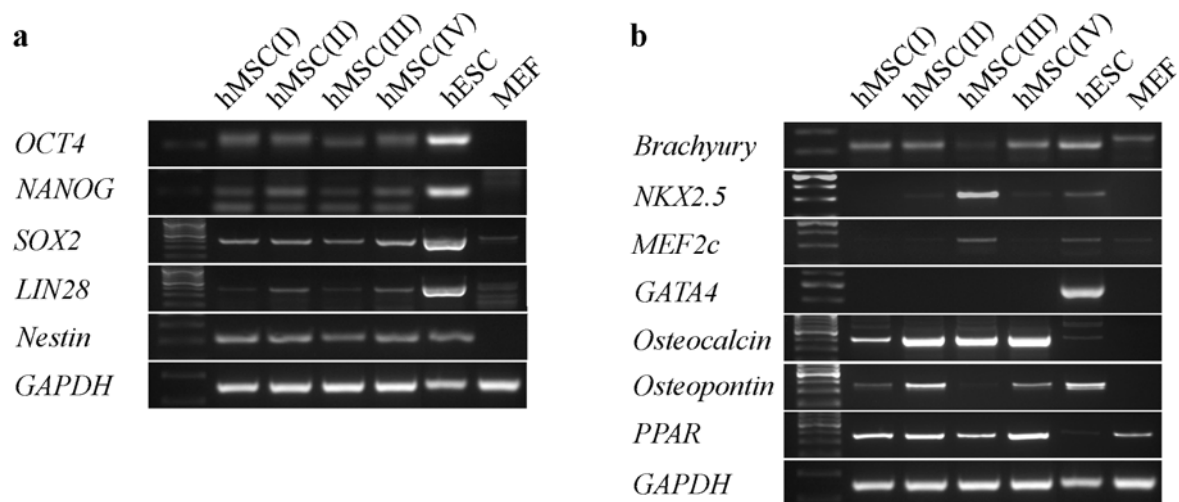


Abb. 9: RT-PCR-Analyse der Genexpression von Pluripotenzmarkern (a), frühen kardialen, osteopoetischen und adipoetischen Differenzierungsmarkern (b) in hMSCs, hESCs und MEFs.

Die Expression von Stammzellmarkern auf Proteinebene wurde mittels Immunfluoreszenz analysiert. Als Kontrolle wurden mESCs und MEFs verwendet.

Bei hMSCs zeigte sich insgesamt eine sehr variable Expression der Markerproteine. Es konnte eine Expression von OCT4 und Nestin gezeigt werden (Abb. 10a, b), die jedoch nicht konstant, sondern nur bei einzelnen hMSC-Reihen nachzuweisen war. Eine Expression von Ki67 konnte mit starken Schwankungen bei allen hMSC-Reihen gezeigt werden (Abb. 10d). SSEA1, als ein Marker für sich differenzierende pluripotente Zellen, konnte bei hMSCs in der Immunfluoreszenz nicht detektiert werden, wohingegen eine vereinzelte Expression von SSEA3 und 4 zu sehen war (Abb. 11). SSEA4 ist wie SSEA3 ein Marker für humane undifferenzierte, pluripotente Zellen. Gegensätzlich verhält sich SSEA4 bei Zellen der Maus,

wo er wie SSEA3 auf undifferenzierten Zellen nicht exprimiert wird und erst bei differenzierenden Zellen erscheint.

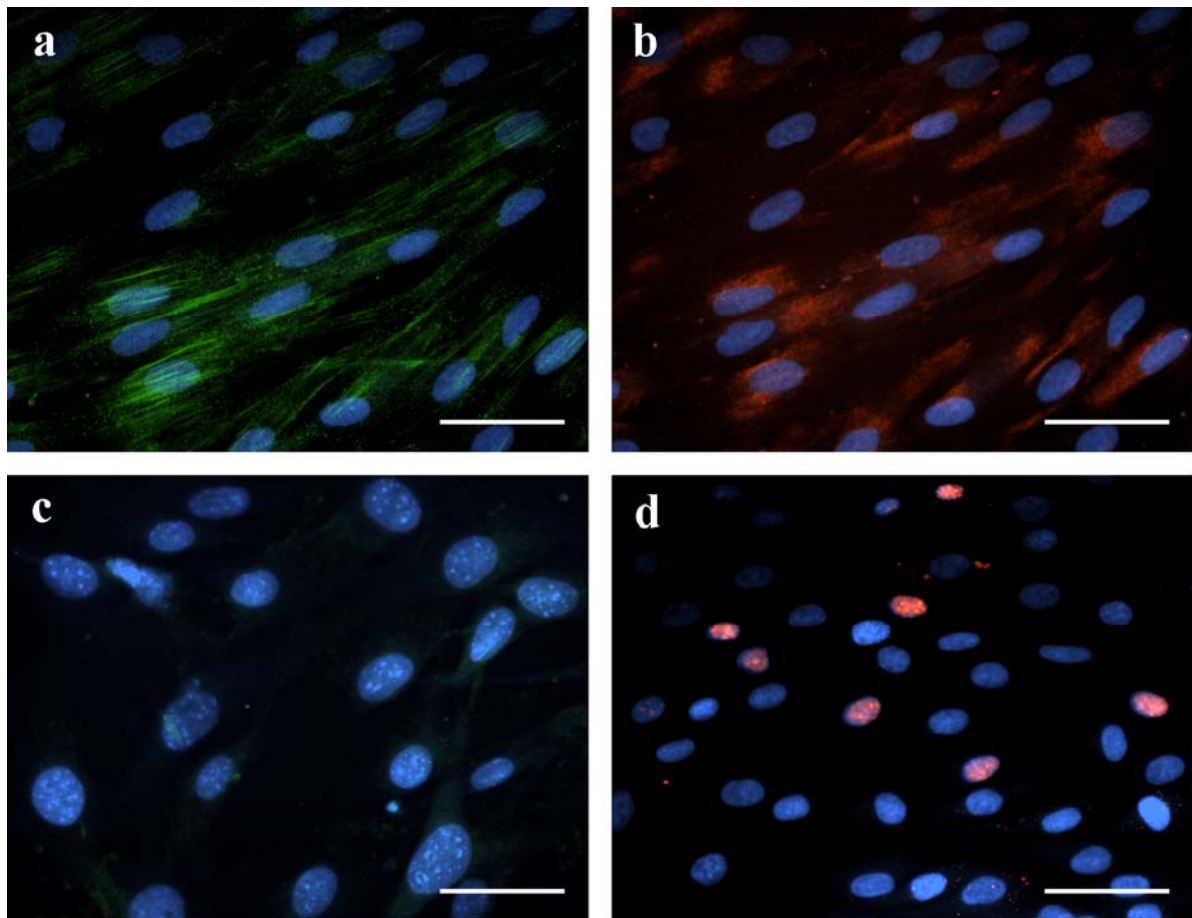


Abb. 10: Analyse der Expression der Markerproteine OCT4, Nestin und Ki67 in hMSCs durch Immunfluoreszenzmikroskopie.

hMSCs und MEFs wurden mittels Antikörpern gegen Nestin (grün, a, c) und OCT4 (rot, b, c), sowie Ki67 (rot, d) gefärbt. Zur Zellkerndetektion wurde der Farbstoff DAPI (blau) eingesetzt. In hMSCs konnte Nestin (a), OCT4 (b) sowie Ki67 (d) detektiert werden. Die als Negativkontrolle dienenden MEFs waren OCT4 und Nestin negativ (c). Größenstandard: 50 μm .

Somit zeigt sich auf Proteinebene eine partielle Expression von Pluripotenzmarkern. Um die erhaltenen Ergebnisse der Immunfluoreszenz quantitativ zu verifizieren, wurden hMSCs mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es wurden Antikörper gegen OCT4, Nestin, Ki67, SSEA1 und SSEA3 verwendet. Die Untersuchung erfolgte an drei unabhängigen Versuchen mit einer Zellzahl von je 10.000 Zellen. Als Kontrolle für hMSCs wurden MEFs eingesetzt. Die Ergebnisse wurden mit denen der Durchflusszytometrie von mMSCs verglichen.

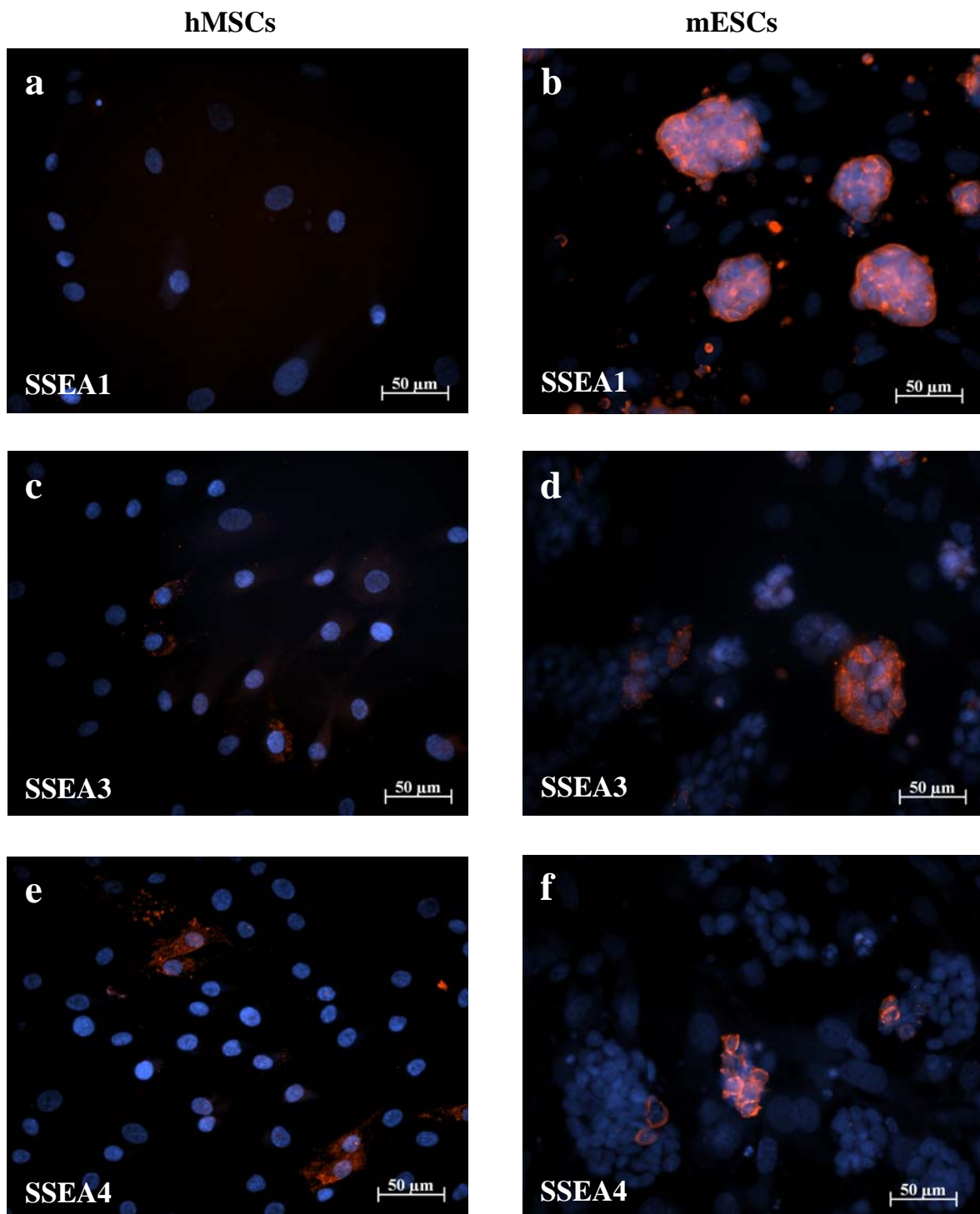


Abb. 11: Analyse der Expression von Markerproteinen in hMSCs im Vergleich mit mESCs durch Immunfluoreszenzmikroskopie.

Die Proteine SSEA 1 (a-b), SSEA3 (c-d) und SSEA 4 (e-f) wurden mittels Immunfluoreszenz (rot) an hMSCs (a, c, e) und mESCs (b, d, f) dargestellt. hMSCs waren negativ für SSEA1(a) im Gegensatz zu stark positiv gefärbten mESCs (b). Im Gegensatz dazu konnten SSEA3 und 4 vereinzelt in hMSCs (c, e) sowie in mESCs (d, f) detektiert werden. Zur Zellkerndetektion wurde DAPI (blau) eingesetzt. Größenstandard: 50 μm.

Hierbei zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster von hMSCs und mMSCs (Abb. 12). Eine nahezu identische Anzahl positiver Zellen für die Marker Nestin und Ki67 zeigte sich in hMSCs und mMSCs. 3,7% der hMSCs exprimieren Nestin, was den 4,8% mMSCs sehr ähnlich ist. Der Proliferationsmarker Ki67 zeigte sich bei hMSCs in 1,9% der Fälle gegenüber 1,7% bei mMSCs. Somit stimmen die Proliferationsmarkerergebnisse mit dem Wachstum der Zellen überein. OCT4 konnte nur in 2,5% der hMSCs detektiert werden im Gegensatz zu 11,6% in mMSCs. Jedoch konnte im *t-Test* keine Signifikanz nachgewiesen werden.

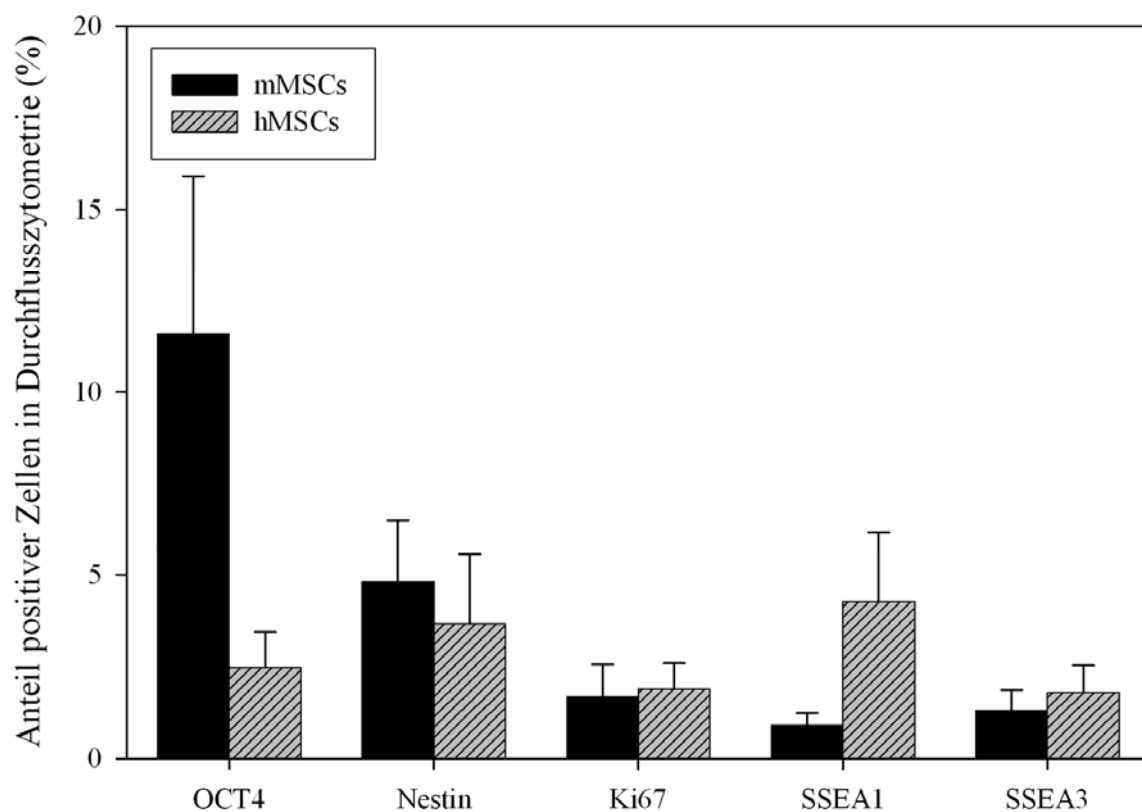


Abb. 12: Vergleich der Expression von Markerproteinen bei mMSCs und hMSCs mittels Durchflusszytometrie.

Die Zellen wurden mit Cy3-gekoppelten Antikörpern gegen OCT4, Nestin, Ki67, SSEA1 und SSEA3 behandelt und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Die Darstellung erfolgte als prozentualer Anteil von Markerprotein-positiven Zellen auf 100 Zellen. Die Daten wurden an drei unabhängigen Versuchen mit einer Zellzahl von je 10.000 Zellen erhoben. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen mMSCs und hMSCs konnten im *t-Test* nicht nachgewiesen werden.

Die Oberflächenmarker für undifferenzierte, pluripotente Zellen der Maus (SSEA1) und des Menschen (SSEA3) zeigten eine geringe Expression. 1,8% der hMSCs exprimierten SSEA3 gegenüber 0,9% SSEA1 bei mMSCs. Im Gegensatz dazu standen die frühen Differenzierungsmarker für humane Zellen (SSEA1) und Zellen der Maus (SSEA3). 4,3% der hMSCs exprimierten SSEA1 gegenüber 1,3% SSEA3 bei mMSCs. Jedoch konnte bei hoher

Variabilität der Einzelergebnisse keine Signifikanz im *t-Test* festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass hMSCs und mMSCs im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen pluripotenten Zellen eine quantitativ deutlich geringere Expression von Pluripotenzmarkern auf Proteinebene aufweisen. Weiterhin unterscheiden sich hMSCs nicht signifikant von mMSCs hinsichtlich der untersuchten Pluripotenzmarker.

Um jedoch die Ergebnisse der Immunfluoreszenz einem quantitativen Vergleich zugänglich zu machen, wurden an jeweils drei unabhängigen Versuchen acht Gesichtsfelder ausgezählt und die erhaltene Zahl positiver Zellen auf 100 Zellen bezogen. Dieses erfolgte für hMSCs und mMSCs. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden denen der Durchflusszytometrie in der Tabelle 7 gegenübergestellt. Trotz leichter Schwankungen der Ergebnisse zeigten sich im *t-Test* keine signifikanten Unterschiede, so dass die Ergebnisse der Durchflusszytometrie bestätigt werden konnten.

Tabelle 7: Vergleich Durchflusszytometrie vs. Immunfluoreszenz

	MEFs		hMSCs		mMSCs	
	Flow	IF	Flow	IF	Flow	IF
OCT4	1,5 ± 0,6	0,0 ± 0,0	2,5 ± 1,0	0,0 ± 0,0	11,6 ± 4,3	9,4 ± 5,2
Nestin	1,4 ± 0,5	3,0 ± 2,1	3,7 ± 1,9	0,8 ± 0,6	4,8 ± 1,7	7,6 ± 3,8
Ki67	0,2 ± 0,2	2,6 ± 2,6	1,9 ± 0,7	2,9 ± 1,5	1,7 ± 0,9	11,3 ± 11,2
SSEA1	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0	4,3 ± 1,9	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,3	0,0 ± 0,0
SSEA3	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,4	1,8 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,5	0,5 ± 0,3

Vergleichende Darstellung von Durchflusszytometrie (Flow) vs. Immunfluoreszenz (IF) bei MEFs, hMSCs und mMSCs. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Versuchen und der Standardfehler.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl hMSCs als auch mMSCs nicht pluripotent sind und sich bezüglich dieser Eigenschaften nicht signifikant unterscheiden.

3.1.3. Reprogrammierung von MSCs

In diesem Teil der Arbeit sollte nach einer geeigneten Methode gesucht werden, um MSCs zu reprogrammieren. Hierfür sollten mESC-Zytoplasmafragmente isoliert und mit MSCs fusioniert werden. Die so gewonnenen Zellen sollten einer Charakterisierung unterzogen werden.

Zur Isolierung von Zytoplasmafragmenten von mESCs musste eine Markierung von dem zu gewinnenden Zytoplasma und dem zu trennenden Zellkern stattfinden. PKH 26 wurde für die Zellmembran- und DAPI für die Zellkernmarkierung in Form einer Doppelfärbung eingesetzt

(Abb. 13c). PKH 26 ist ein lipophiler, sich in die Zellmembran integrierender roter, DAPI ein DNA-bindender blauer Fluoreszenzfarbstoff. Die Membran der mESCs konnte mit dem rot fluoreszierenden PKH26 mit variierender Intensität in ca. 80-90% der Zellen detektiert werden (Abb. 13a). Im Gegensatz dazu waren 100% der Zellkerne DAPI positiv (Abb. 13b).

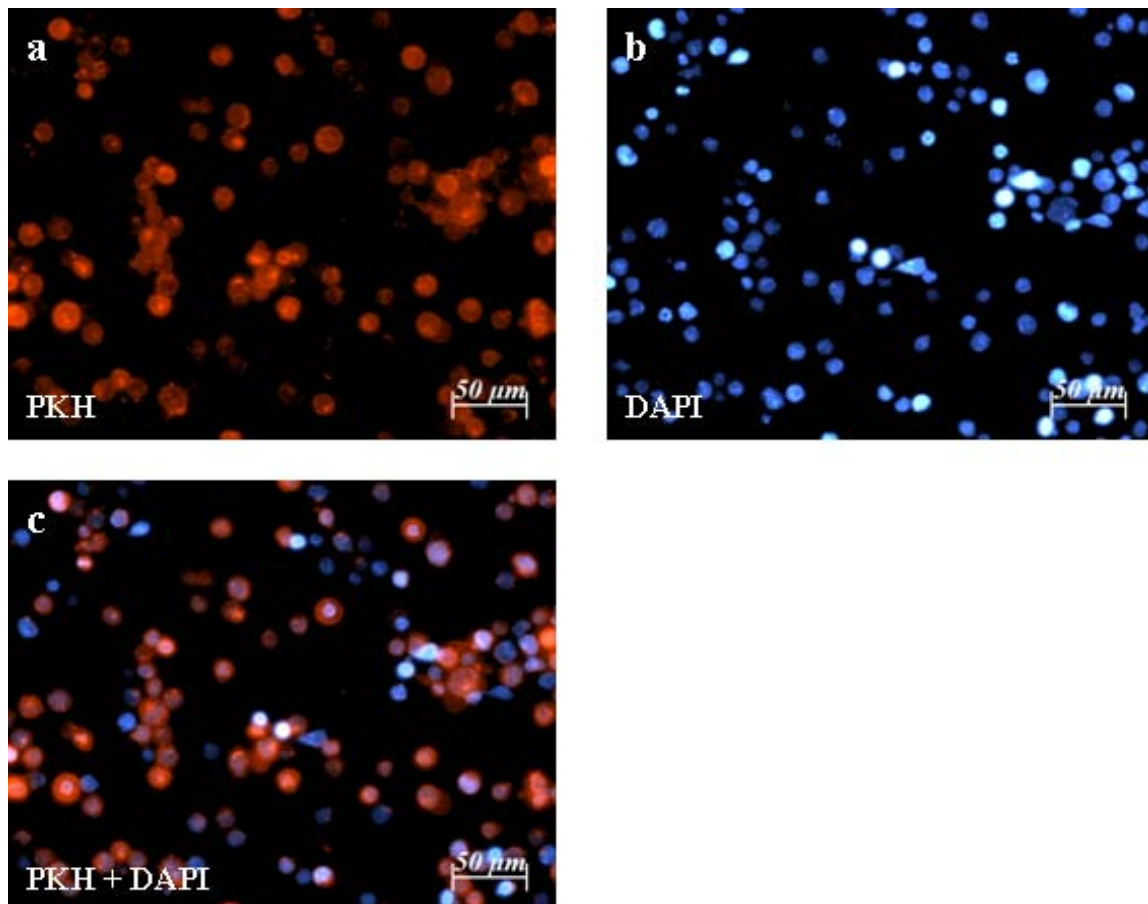


Abb. 13: Doppelfärbung von mESCs mit PKH 26 und DAPI.

Färbung mit PKH zur Markierung der Zellmembran (a) sowie DAPI zur Zellkerndetektion (b). Die Doppelfärbung zeigt, dass über 80% der Zellen positiv für beide Färbungen sind (c). Größenstandard: 50 µm.

Zur Isolierung von mESC-Zytoplasmafragmenten musste ein geeignetes Verfahren etabliert werden. Hierfür wurde die Ficoll-Dichtegradienten-Methode von Wigler und Weinstein für mESCs modifiziert (Abb. 14a) (Wigler und Weinstein, 1975). In diesem Verfahren wurde Cytochalasin B, ein Metabolit des Pilzes *Drechslera dermatioideum*, eingesetzt, welches die Bildung von kontraktilen Mikrofilamenten blockiert und damit unter anderem zur Zellkernextrusion führt (Carter, 1967; Krishan, 1972; Prescott et al., 1972). Die Zellkerne der so behandelten Zellen wurden durch das Auftreten von Scherkräften bei der Ultrazentrifugation vom Zytoplasma getrennt. Im Ficoll-Dichtegradienten zeigten sich Zytoplasmafragmentbanden bei den Trennphasen zwischen 11% und 12,5% sowie 12,5% und

15% (Abb. 14a, b). Beide Banden zeigten einen Gehalt von mehr als 95% von Zytoplasmafragmenten und weniger als 5% Zellkernen und ganzen Zellen. In der Trennphase zwischen 17% und 25% sammelten sich Zellkerne und nicht entkernte Zellen (Abb. 14a, c). Diese 5%ige Verunreinigung führte bei der weiteren Kultivierung zu einem Überwachsen der Kultur durch noch intakte mESCs. Aufgrund dessen erfolgte eine Proliferationsblockade der Zellkerne vor Eukleation. Hierfür wurden mESCs mittels MMC behandelt.

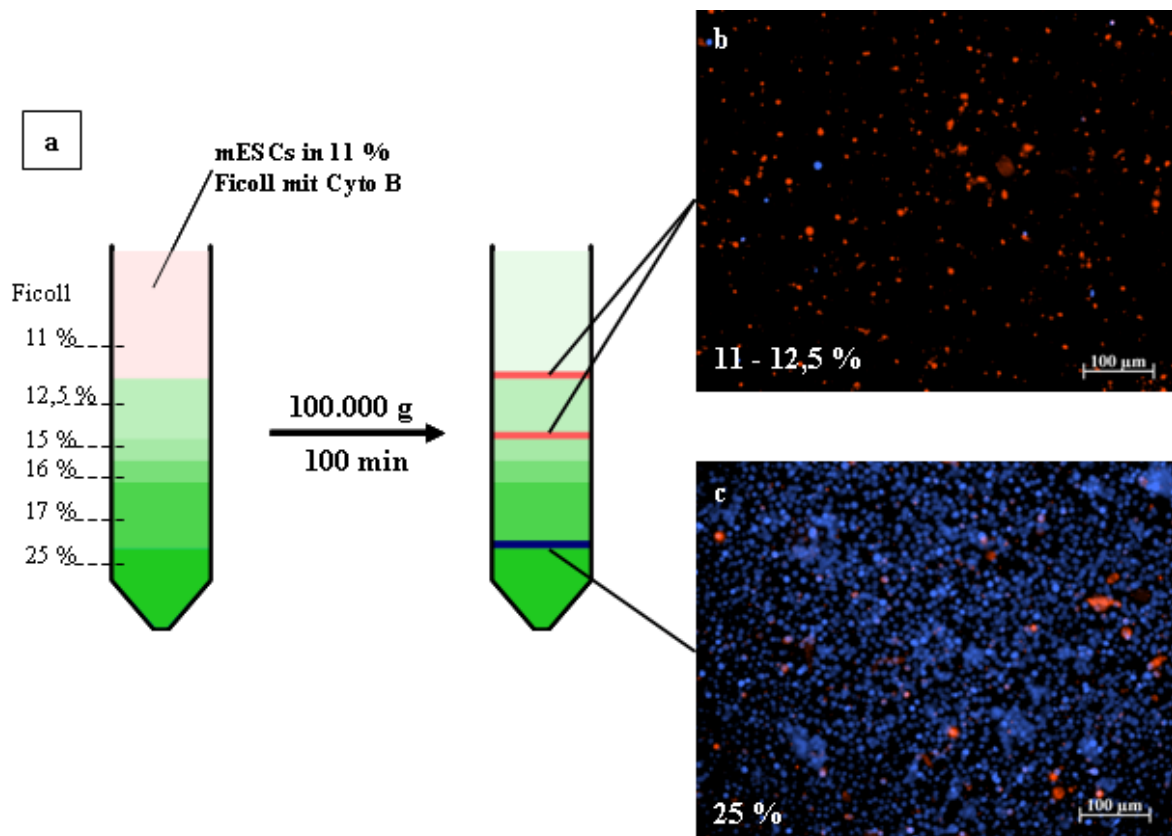


Abb. 14: Zytoplasma-Isolation mittels Ficoll-Entkernung.

Doppelgefärbte mESCs (Zytoplasma = rot, Zellkern = blau) wurden auf Ficollgradienten geschichtet und ultrazentrifugiert (a). Trennphasen zwischen 11% und 12,5% sowie 12,5% und 15% zeigten hohen Prozentsätze (>95%) an Zytoplasmafragmenten (b). In der Trennphase zwischen 17% und 25% sammelten sich Zellkerne und ganze Zellen (c). Größenstandard: 100 µm.

Die gewonnenen mESC-Fragmente sollten daraufhin mit MSCs fusioniert werden. Dafür wurde die spontane Fusion und die PEG 1450 induzierte Fusion auf Zellkulturschalen verglichen. PEG wurde 1975 von Pontecorvo erstmals zur Zellfusion von Säugetierzellen eingesetzt (Pontecorvo, 1975).

MESC-Zytoplasmafragmente wurden auf subkonfluent kultivierte MSCs gegeben und mit bzw. ohne PEG-Behandlung für zwei Tagen kultiviert und hinsichtlich der Fusionsrate ausgewertet. Hierbei zeigte sich eine hohe Spontanfusionsfähigkeit (> 70%) der mMSCs.

Direkt nach Zytoplasmazugabe sind die Fragmente gut abgrenzbar und keine Fusionen zu erkennen (Abb. 15a, b). Nach Kultivierung für zwei Tage wurden die mESC-Zytoplasmafragmente vollständig in die Zellen integriert (Abb. 15c, d). Dieses ist gut an inkorporierten, rot fluoreszierenden mESC-Zytoplasmafragmenten erkennbar, welche sich in der ganzen fusionierten Zelle verteilen und den Zellkern aussparten. Bei der PEG-induzierten Fusion zeigten mMSCs positive Ergebnisse (Abb. 15e, f). Fusionsraten von 70-80% wurden bei mMSCs erreicht. Nichtfusionierte Fragmente konnten wie bei Spontanfusion nach PEG-induzierter Fusion nicht gesehen werden. Jedoch zeigte sich keine deutliche Steigerung der Fusionsrate gegenüber Spontanfusion. Nachteilig wirkte sich PEG auf die Überlebensfähigkeit der Zellen aus. Ein Teil der Zellen starb unter der Behandlung ab und überlebende Zellen zeigten teilweise eine veränderte, abgeflachte Morphologie (Abb. 15e, f)

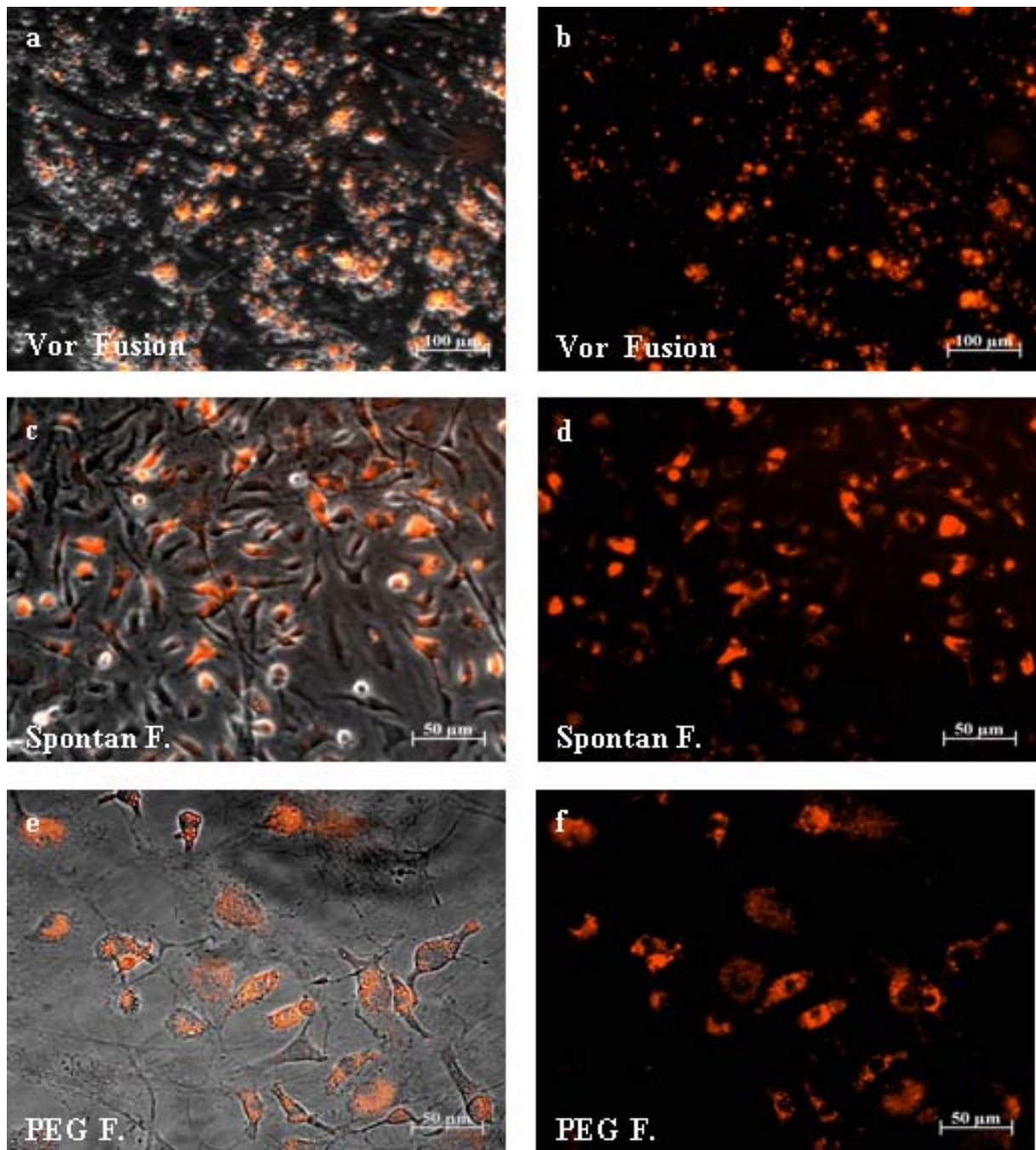


Abb. 15: Vergleich der Spontanfusion vs. PEG-Fusion von mMSC- mit mESC-Zytoplasma.

Dargestellt sind mMSCs und mESC-Zytoplasmafragmente nach Inkubation über Nacht (a, b), nach zwei Tagen Spontanfusion (c, d) und nach PEG-Applikation (e, f). Rot fluoreszierende Zytoplasmafragmente liegen vor Fusion auf mMSCs auf (a, b). Nach Spontanfusion wurden die rot fluoreszierenden Zytoplasmafragmente in das Zytoplasma von mMSCs integriert (c, d). Eine Steigerung der Fusionsrate von 70% konnte durch PEG-Applikation nicht erreicht werden (e, f). Jedoch zeigte sich unter PEG-Behandlung eine Verschlechterung der Morphologie. Größenstandard: 100 µm (a, b), 50 µm (c-f).

Humane MSCs zeigen gegenüber mMSCs eine sehr geringe Spontanfusionsrate (< 5%). Die Zytoplasmafragmente konnten nicht in die Zellen integriert werden, sondern befanden sich weiterhin auf den Zellen aufliegend. Dieses lässt sich gut an der Abb. 16a und Abb. 16c erkennen, wo die rot angefärbten Zytoplasmafragmente nicht in das Zytoplasma aufgenommen wurden. Demgegenüber stand die PEG-induzierte Fusion bei hMSCs. Hierbei konnten Fusionsraten von 40-50% erreicht werden. Jedoch auch hier zeigte sich, dass einzelne Fragmente nicht zur Fusion mit hMSCs kamen (Abb. 16e, f). Weiterhin zeigte sich wie bei mMSCs eine Schädigung der Zellen nach PEG-induzierter Fusion mit veränderter, abgeflachter Morphologie. Diese traten aber im Vergleich zu mMSCs weniger ausgeprägt auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die nachfolgenden Untersuchungen für mMSCs mittels Spontanfusion und hMSCs mittels PEG-induzierter Fusion durchgeführt. Die durch Fusion erhaltenen Zellen wurden als fusionierte mesenchymale Zellen (FMCs) bezeichnet.

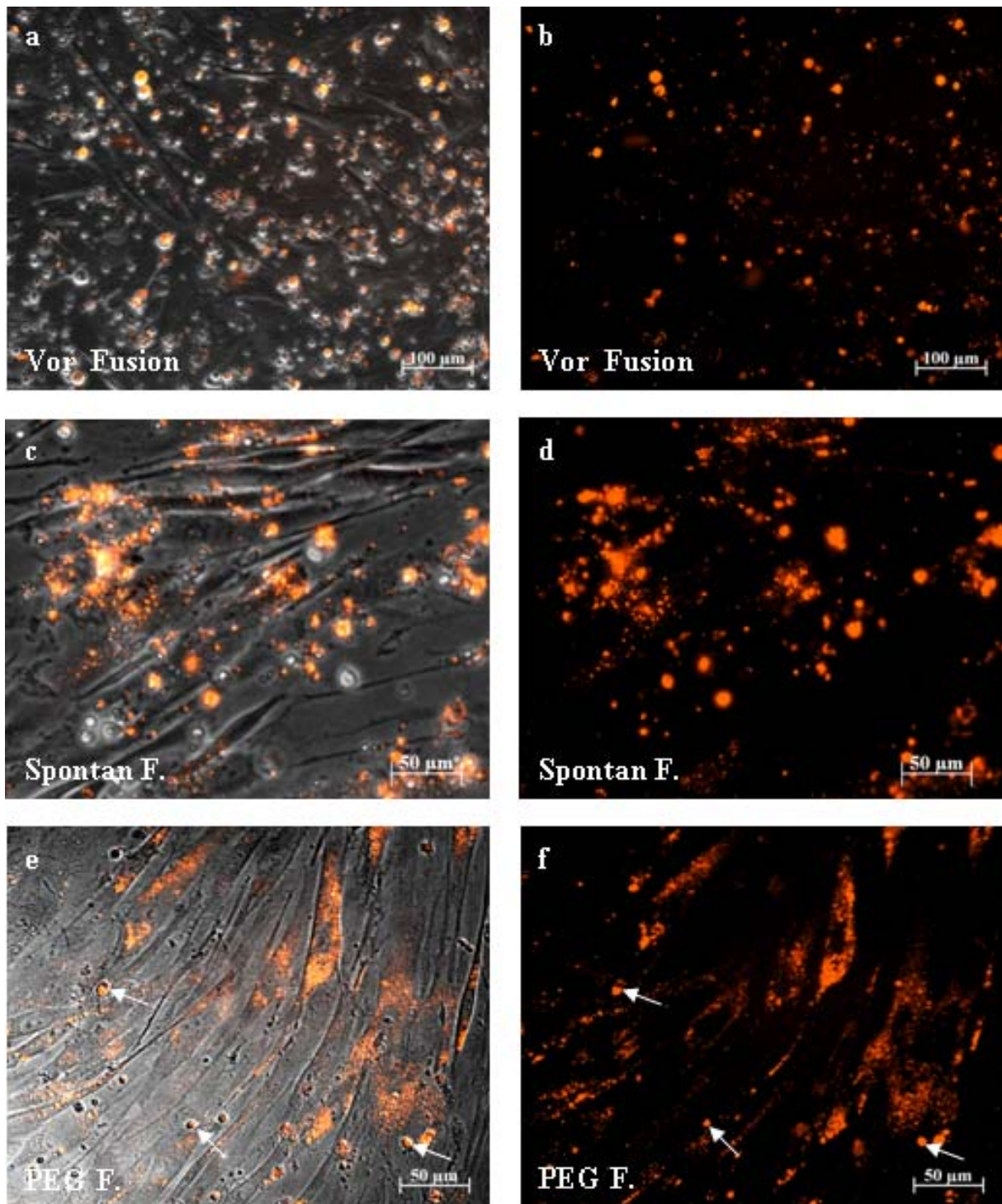


Abb. 16: Vergleich der Spontanfusion vs. PEG-Fusion von hMSC- mit mESC-Zytoplasma.

Dargestellt sind hMSCs und mESC-Zytoplasmafragmente nach Inkubation über Nacht (a, b), nach zwei Tagen Spontanfusion (c, d) und nach PEG-Applikation (e, f). Rot fluoreszierende Zytoplasmafragmente liegen vor Fusion auf hMSCs auf (a, b). Nach Spontanfusion zeigt sich eine nur geringe Fusionsrate (<5%). Rot fluoreszierende Zytoplasmafragmente wurden nach PEG-Applikation in das Zytoplasma von hMSCs integriert (c-f). Einzelne Fragmente kamen jedoch nicht zur Fusion (Pfeil). PEG vermittelte Fusion zeigte eine Effizienz von 40 Prozent. Größenstandard: 100 µm (a, b), 50 µm (c-f).

Die so gewonnenen FMCs wurden für fünf bis sieben Tage weiter kultiviert und dann auf MEFs umgesetzt. Nach Fusion veränderten die mFMCs leicht ihre Morphologie, indem die initial flach-spindelförmigen mFMCs zu einer kompakt-spindelförmigen Morphologie wurden. Bei hFMCs konnte diese morphologische Veränderung nicht registriert werden.

In der weiteren Kultivierung erschienen sowohl bei FMCs der Maus als auch bei FMCs des Menschen vereinzelt Kolonien von abgerundeten Zellen, die ein dreidimensionales Wachstumsverhalten zeigten (Abb. 17a). Diese sich neu gebildeten Kolonien waren mESCs ähnlich (Abb. 17b). Nach Auftauchen solcher Kolonien kam es nach drei bis sieben Tagen zu einem Wachstumsstopp dieser Zellen. Eine Weiterkultivierung und Vermehrung dieser Kolonien konnte nicht erreicht werden. Nach zwei bis drei Wochen starben diese Zellen ab.

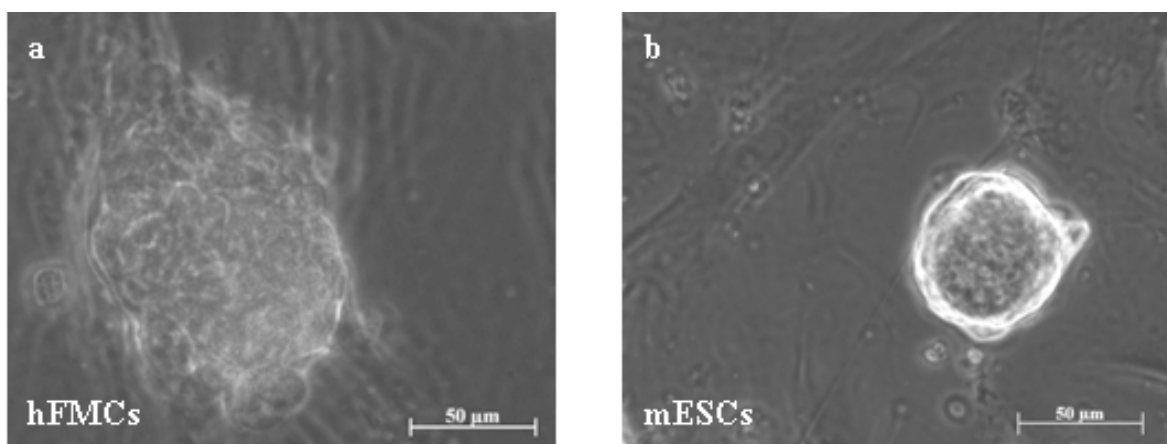


Abb. 17: Kolonie von fusionierten mesenchymalen Zellen (FMCs) im Vgl. zu mESCs.

Nach Fusion von mESC-Zytoplasma mit MSCs zeigten sich nach sechs Tagen bis drei Wochen vereinzelt Kolonien von abgerundeten Zellen (a), die eine embryonale Stammzell-ähnliche Morphologie aufwiesen. Als Vergleich ist eine mESC-Kolonie abgebildet (b). Größenstandard: 50 µm.

Zur Charakterisierung der FMCs erfolgte die Expressionsanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR. Hierfür wurden MSCs und den nach Fusion mit Zytoplasmafragmenten aus ihnen hervorgegangenen FMCs gegenüber gestellt. Für mFMCs wurden die Gene *Oct4*, *Nanog*, *Utf1*, *Nestin* und *Brachyury* untersucht. Weder die mFMCs noch die mMSCs exprimierten die ESC-Marker *Oct4*, *Nanog*, *Utf1* oder *Brachyury* (Abb. 18a). Für *Nestin* konnte eine leichte Zunahme der Expression bei mFMCs gegenüber mMSCs verzeichnet werden, welche allerdings nach Abgleich mit dem internen Standard *Gapdh* im *t-Test* bei insgesamt sechs Proben statistisch nicht signifikant war (Abb. 18b)

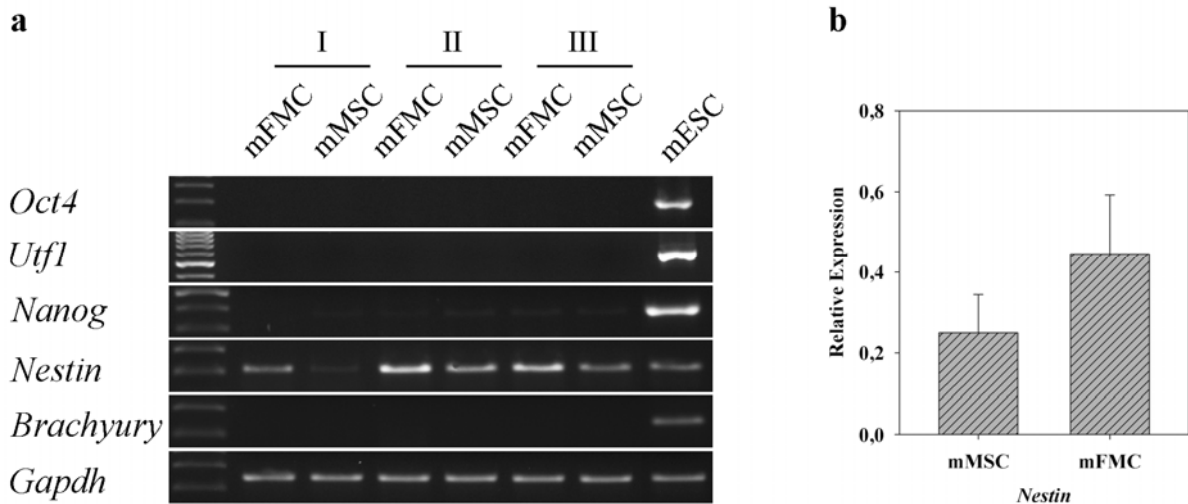


Abb. 18: Genexpression von mFMCs im Vergleich zu mMSCs.

Dargestellt sind mFMCs und deren Ursprungs-mMSCs (I, II, III). Die Pluripotenzmarker *Oct4*, *Utf1* und *Nanog*, sowie *Brachyury* wurden weder in mFMCs noch in mMSCs exprimiert, wohingegen die Expression von *Nestin* in mFMCs leicht erhöht ist (a). Diese Erhöhung zeigte bei n=6 keine statistische Signifikanz (b). *Gapdh* wurde als interner Standard verwendet. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Humane FMCs wurden hinsichtlich der Genexpression von *OCT4*, *NANOG*, *Nestin* und *Osteopontin* untersucht (Abb. 19). Hier zeigte sich sowohl in den hMSCs als auch bei hFMCs eine deutliche Expression von *OCT4* und *Nestin* allerdings ohne statistische Signifikanz im *t-Test* (n=6) (Abb. 19a, b). Eine variable Expression von *Osteopontin* bei hFMCs gegenüber hMSCs konnte in sechs Proben ohne statistische Signifikanz beobachtet werden (Abb. 19a, b).

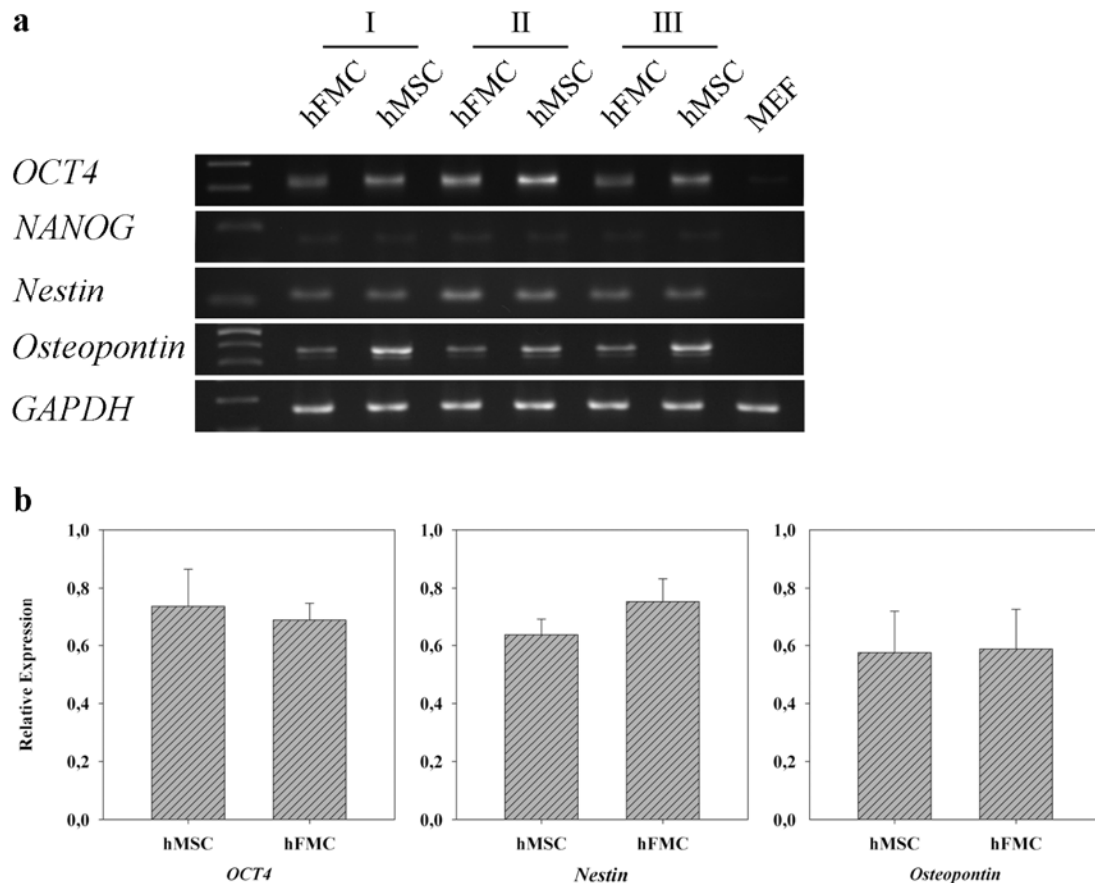


Abb. 19: Genexpression von hFMCs im Vergleich zu hMSCs

Dargestellt sind hFMCs und deren Ursprungs-hMSCs (I, II, III in a, relative Expression in b). Der Pluripotenzmarker *NANOG* wurde weder in hFMCs noch in hMSCs exprimiert (a), wohingegen es zu einer leichten Expression von *OCT4* und *Nestin* ohne signifikanten Unterschieden kam. Ein leichter Abfall der *Osteopontin*-Expression in hFMCs gegenüber hMSCs konnte in weiteren Proben (n=6) nicht bestätigt werden (b). *GAPDH* wurde als interner Standard verwendet. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Zur weiteren Charakterisierung der FMCs wurden Immunfluoreszenzanalysen von fusionierten und unfusionierten MSCs mit derselben Herkunft gegenüber gestellt. Die Auswertung erfolgte bei mFMCs an drei, bei hFMCs an zwei unabhängigen Versuchen. Es zeigte sich bei mFMCs ein Anstieg der Anzahl Oct4- (9,4% auf 11,3%), Nestin- (7,6% auf 21,6%) und Ki67-positiver Zellen (11,3% auf 17,2%). SSEA3 (0,5% auf 0,7%) blieb unverändert. Eine SSEA1 Expression konnte bei mFMCs sowie bei mMSCs nicht beobachtet werden (Abb. 20). Die Abweichung der Expression von Markerproteinen bei mFMCs gegenüber mMSCs wurde mit dem *t-Test* auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

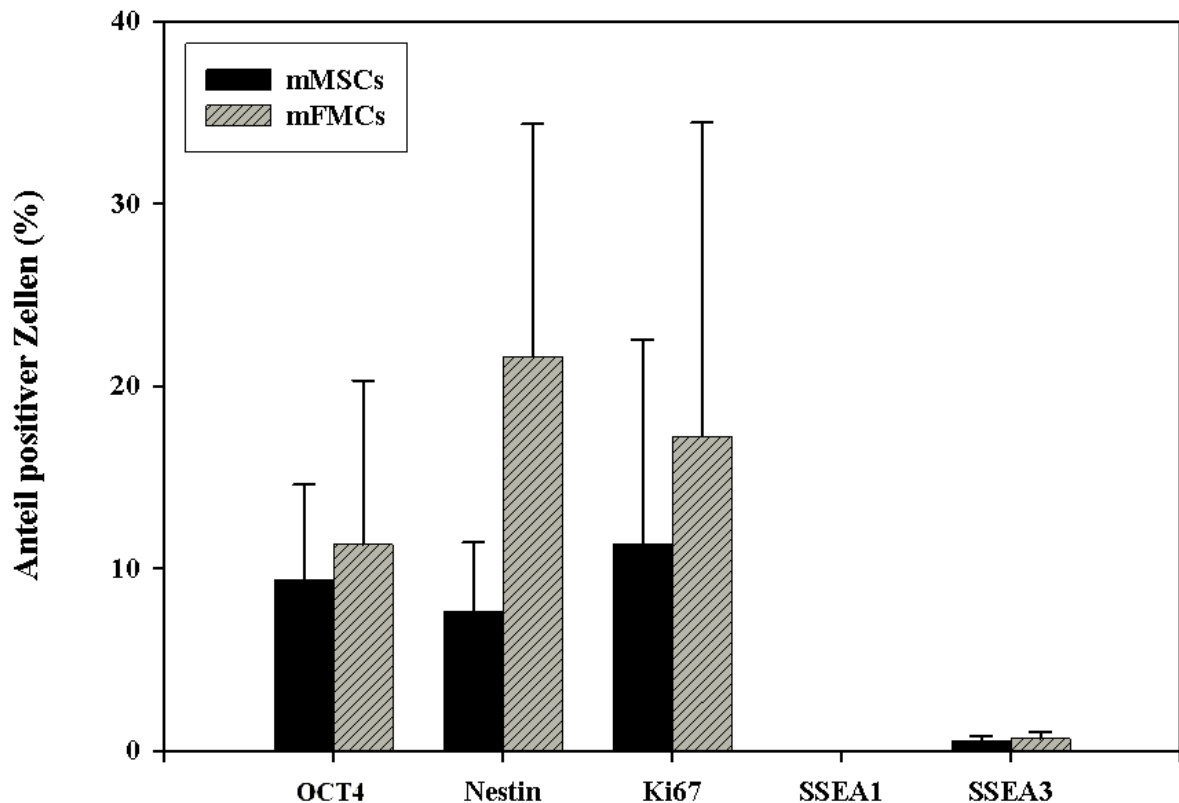


Abb. 20: Prozentualer Anteil von Markerproteinen bei mMSCs vs. mFMCs mittels Immunfluoreszenz.

Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen OCT4, Nestin, Ki67, SSEA1 und SSEA3 behandelt und mittels Immunfluoreszenz ausgewertet. Die Darstellung erfolgte als prozentualer Anteil von positiven Markerproteinen auf 100 Zellen. Die Daten wurden an drei unabhängigen Versuchen erhoben. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Eine Signifikanz konnte im *t-Test* nicht nachgewiesen werden.

Die Analyse der Expression von Markerproteinen bei hFMCs zeigte einen mittleren Anstieg gegenüber hMSCs von OCT4 (0% auf 2,2%) und Nestin (0,8% auf 1,9%), eine Abnahme von Ki67 (2,9% auf 2,5%), sowie gleich bleibende Werte von SSEA1 (0%) und SSEA3 (0%) (Abb. 21).

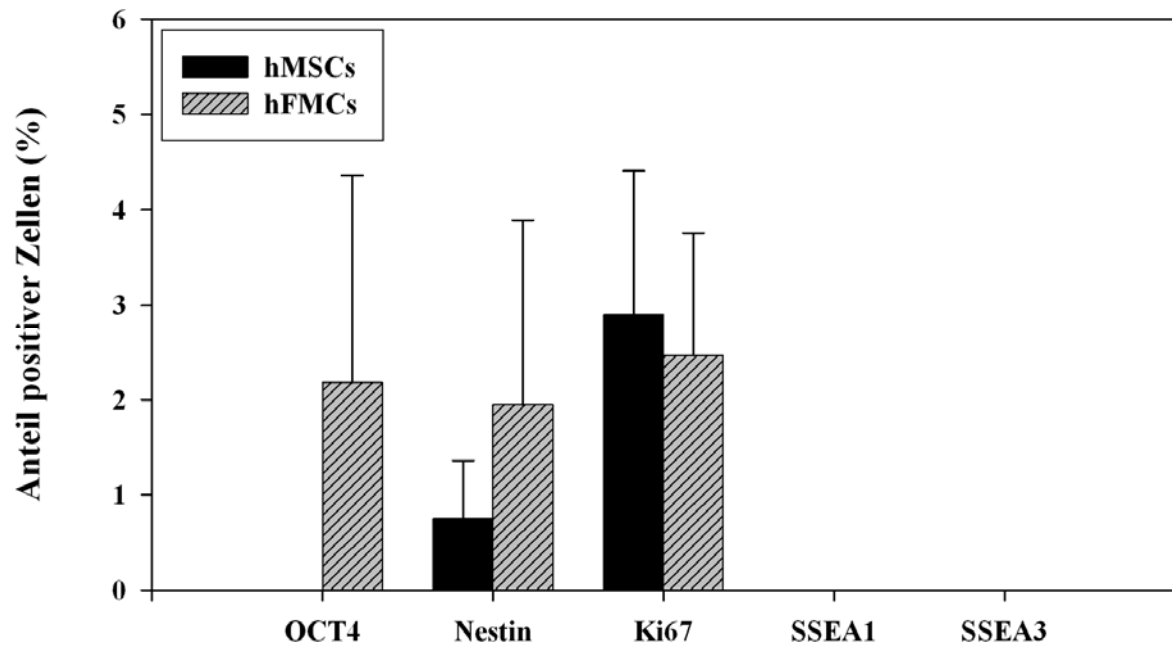


Abb. 21: Analyse der Expression von Markerproteinen bei hMSCs vs. hFMCs mittels Immunfluoreszenz.

Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen OCT4, Nestin, Ki67, SSEA1 und SSEA3 behandelt und mittels Immunfluoreszenz ausgewertet. Die Darstellung erfolgte als prozentualer Anteil von positiven Markerproteinen auf 100 Zellen. Die Daten wurden an zwei unabhängigen Versuchen erhoben. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ESC-Zytoplasmafragmente erfolgreich gewonnen und mit MSCs fusioniert werden können. Eine Reprogrammierung in pluripotente Stammzellen konnte allerdings nicht gezeigt werden.

3.2. Gewinnung von pluripotenten Stammzellen aus adulten SSCs der Maus

3.2.1. Isolation und Kultivierung von mSSCs

Für die Isolation von adulten mSSCs und die spätere Gewinnung von pluripotenten Stammzellen aus adulten SSCs wurde ein Verfahrensprotokoll aufgestellt. Dieses ist in Abb. 22 schematisch dargestellt.

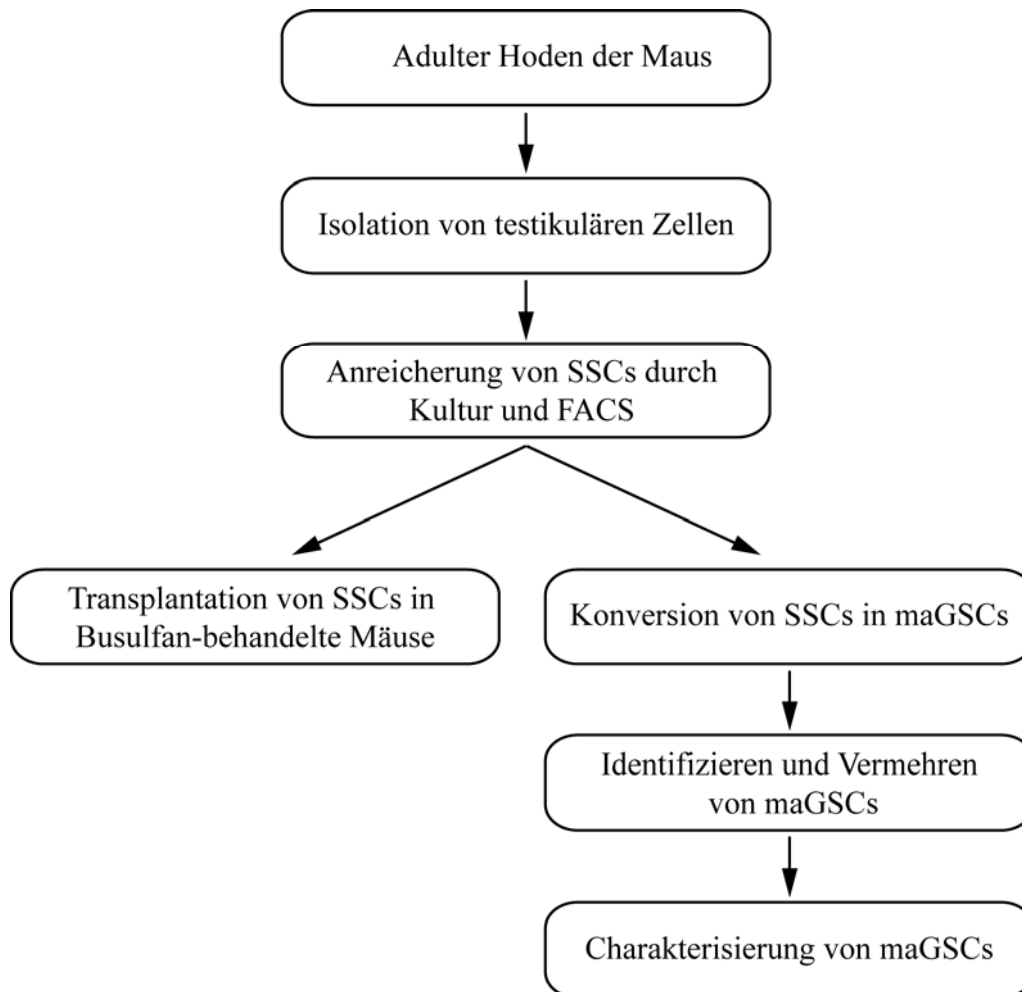


Abb. 22: Schematische Darstellung der Isolation von SSCs und maGSCs

Hoden von vier bis sechs Wochen alten Mäusen wurden zur Isolation von testikulären Zellen verwendet. Die sich in der testikulären Zellpopulation befindlichen mSSCs wurden durch Kultivierung und FACS angereichert. Die gewonnenen adulten mSSCs standen zur Überprüfung der Spermatogenesefähigkeit in Busulfan-behandelten Mäusen sowie für die Generierung von pluripotenten Stammzellen (maGSCs) zur Verfügung.

Für die Isolation von SSCs aus adulten Hoden wurden transgene Mäuse verwendet, die den Spermatogonien-spezifischen Marker Stra8 an ein eGFP gekoppelt enthielten. Die Isolation der testikulären Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Bellvé (Bellvé, 1993). Hierbei konnten nach enzymatischem Verdau testikuläre Zellen auf Einzelzellebene

gewonnen werden. Um eine Anreicherung der SSCs nach Isolation zu erreichen, wurden sie für ein bis zwei Wochen in Kulturmedium V mit 4ng/ml GDNF auf Gelatine-beschichtete Schalen kultiviert. Innerhalb dieser Zeit formten sich kleine, runde Zellkolonien (Abb. 23) mit typischer SSC-Morphologie.

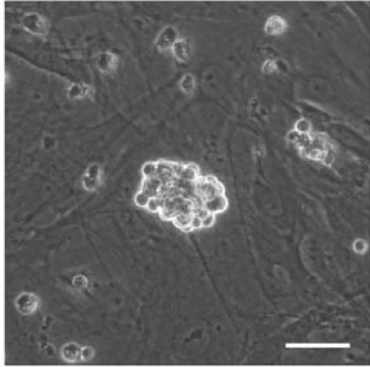


Abb. 23: Typische SSC-Kolonie nach Isolation.

Dargestellt ist eine typische SSC-Kolonie 11 Tage nach Isolation auf MEFs. Die Zellen wachsen in traubenartigen Kolonien, wobei einzelne Zellen noch abgrenzbar sind und ein leuchtendes Erscheinungsbild zeigen. Größenstandard: 50 μm .

Um eine weitere Anreicherung der SSCs zu erzielen, wurden diese Zellen nach dem Spermatoγονien-spezifischen Marker Stra8 mittels FACS anhand des transgenen Stra8-eGFP sortiert. Somit konnte eine hoch angereicherte SSC-Population erhalten werden. Zur eindeutigen Identifizierung der so gewonnenen Zellen als SSCs wurde die Spermatoγονese-fähigkeit überprüft. Hierfür wurden die Zellen in Busulfan-behandelte Mäuse und damit SSC-depletierte Hoden injiziert (In Kooperation mit Prof. Dr. Engel aus der Abtl. Humangenetik unserer Universität). Dabei konnte die Wiederherstellung der Spermatoγονese gezeigt und damit das Vorliegen von funktionellen SSCs bestätigt werden (Guan et al., 2006; Guan et al., 2009).

Diese Zellen wurden als Ausgangspunkt für die weitere Kultivierung und Generierung von pluripotenten Keimbahnstammzellen verwendet.

3.2.1. Etablierung und Charakterisierung von maGSCs

Zur Etablierung eines Protokolls zur Generierung von pluripotenten Stammzellen aus adulten SSCs wurden vier verschiedene Kulturbedingungen getestet. Hierbei zeigte sich unter Kulturmedium V (Kondition 1) eine epiblastenähnliche Morphologie (Abb. 24a). Wurden die Zellen jedoch unter Kulturmedium V versetzt mit LIF kultiviert (Kondition 2), zeigten sich nach zwei bis drei Passagen eng in einer Kolonie zusammenliegende Zellen (Abb. 24b), die morphologisch mESCs sehr ähnlich sind. Die gleiche Morphologie erhielt man unter der Kultivierung mit Kulturmedium V auf MMC-behandelten MEFs (Kondition 3). Ebenfalls konnten unter der Kondition 4, Kulturmedium V mit LIF + MEFs, wie bei Kondition 2 und 3 ESC-ähnliche Morphologien beobachtet werden (Abb. 24c, d). Unter dieser Kondition

wurden die Zellen bei einer Verdünnung von 1:3 bis 1:6 pro Tag sehr gut expandiert. Mittels dieses Protokolls haben wir drei Zelllinien (SSC5, SSC6, und SSC10) aus zehn Mäusen gewonnen, woraus sich eine Effizienz von 30% ergibt.

Um die so gewonnenen Zellen weiter zu charakterisieren, wurden alkalische Phosphatase-(AP) Färbungen angefertigt. Hierbei zeigte sich bei den unter Kondition 1 gewonnenen Zellen schwach AP positive Signale (Abb. 24e). Unter Kondition 2 und 3 (MEF bzw. LIF Kultivierung) kam es zu einem deutlichen Anstieg der AP in Teilen der Kolonien (Abb. 24f, g). Die stärkste AP Expression konnte bei der Kultivierung der Zellen auf MEFs mit LIF-Substitution (Kondition 4) beobachtet werden (Abb. 24h).

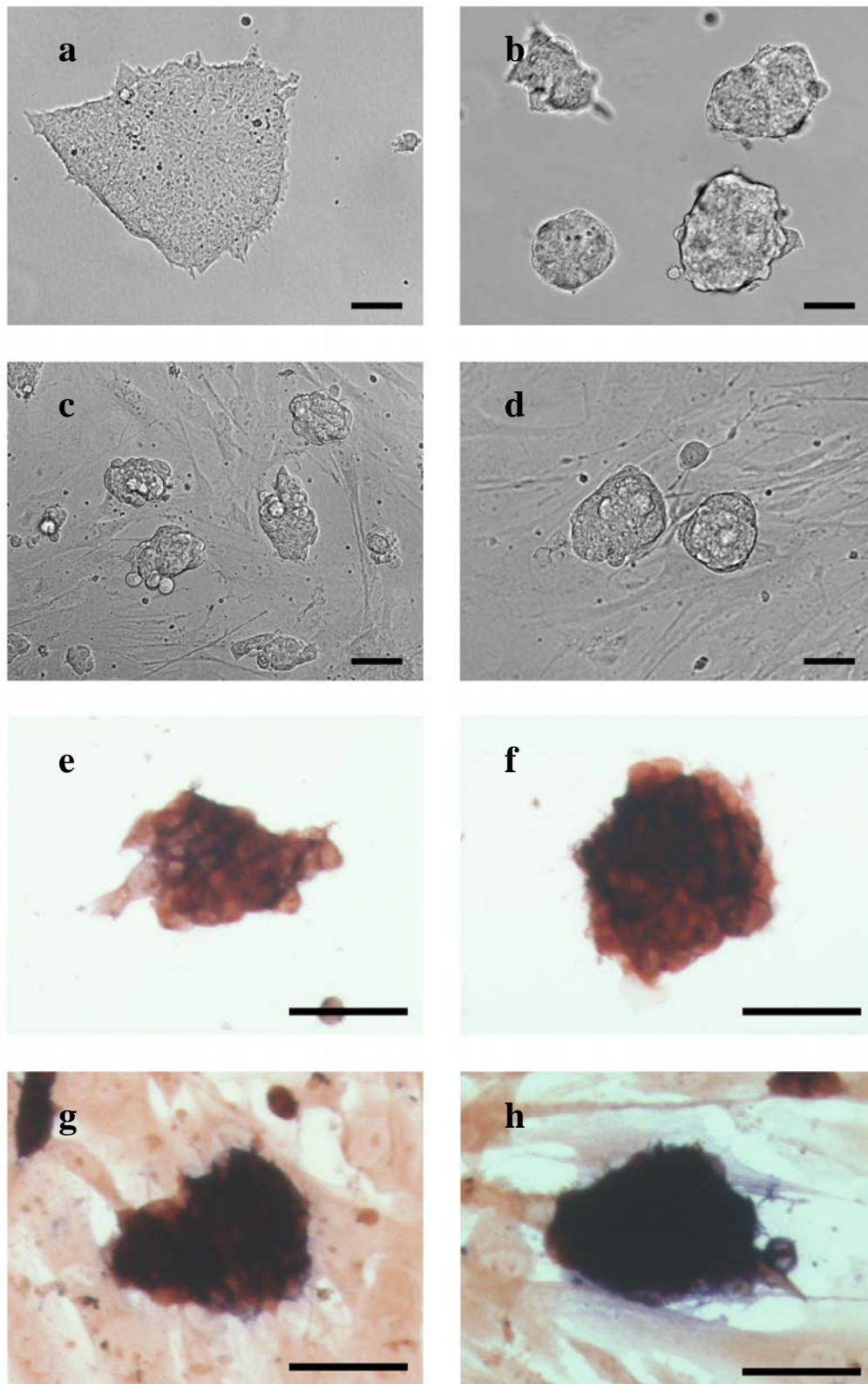


Abb. 24: Morphologie und alkalische Phosphataseaktivität von SSCs unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Epiblasten-ähnliche Kolonie unter basalem Kulturmedium (Kondition 1, a), ESC-ähnliche Kolonien unter Kondition 2, 3 und 4 (b-d), Typische Kolonie unter Kondition 4 nach Passage 30 (d), e-h: Alkalische Phosphatasefärbung von SSCs unter Kondition 4 mit stark positivem Signal (h), SSCs unter Kondition 2 und 3 mit gemischter Aktivität (f, g) und unter Kondition 1 mit schwach positiver Aktivität (e). Größenstandard: 50 µm.

Weiterhin wurden Genexpressionsanalysen von Zellen, die unter den beschriebenen vier verschiedenen Kulturbedingungen wuchsen, im Vergleich zu mESCs und MEFs durchgeführt. Es wurden wichtige Transkriptionsfaktoren für undifferenzierte ESCs untersucht. Eine ähnlich starke Expression von *Oct4*, *Nanog*, *Utf1*, *Esg1* und *Rex1* wie in mESCs zeigte sich für alle eGFP⁺-SSCs. Hingegen wurde *Stra8* in eGFP⁺ SSCs unter LIF (Kondition 2 und 4) stärker exprimiert als unter den Konditionen 1 und 3 (Abb. 25).

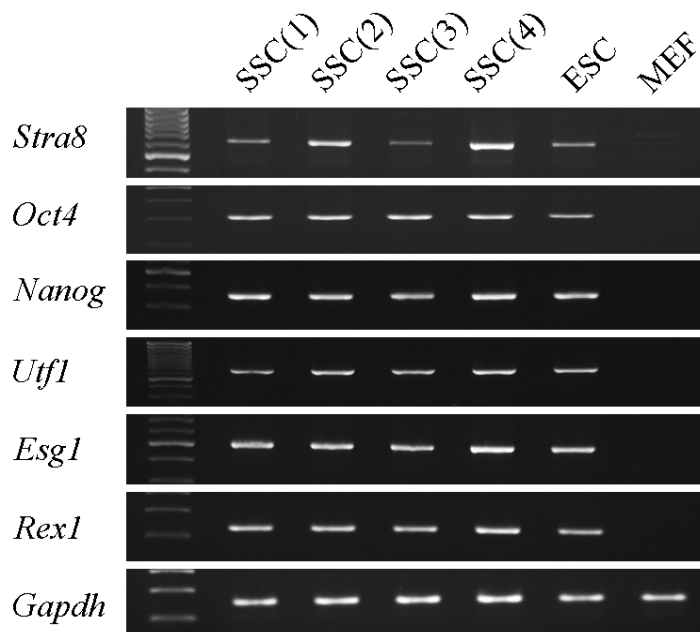


Abb. 25: RT-PCR-Analyse von SSCs unter verschiedenen Kulturbedingungen.

RT-PCR-Analyse von Pluripotenzmarkern in SSCs unter Kulturbedingung 1-4 sowie ESCs und MEFs. Wichtige Pluripotenzmarker wurden bei SSCs (1-4) ähnlich wie bei ESCs exprimiert. Als Negativkontrolle wurden MEFs verwendet.

Anschließend wurde die Proteinexpression von eGFP⁺ SSCs, die unter Kondition 4 kultiviert wurden, mittels Immunfluoreszenz untersucht. Hierbei wurden Färbungen gegen GFP, SSEA1, OCT4, SOX2 und NANOG angefertigt. Dabei konnte *Stra8* indirekt über die Expression von eGFP nachgewiesen werden (Abb. 26a, c). Auch zeigte sich eine deutliche Expression für SSEA1, welches auf der Oberfläche der unter Kondition 4 kultivierten Zellen exprimiert wurde (Abb. 26b, c). SSEA3 konnte unter Kondition 4 nicht detektiert werden, war jedoch unter Kondition 2 und 3 vereinzelt nachweisbar (Abb. 26d-f). Die als Schlüsselregulatoren der Pluripotenz geltenden Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2 und NANOG konnten bei den so kultivierten SSCs im Kern nachgewiesen werden (Abb. 26g-o).

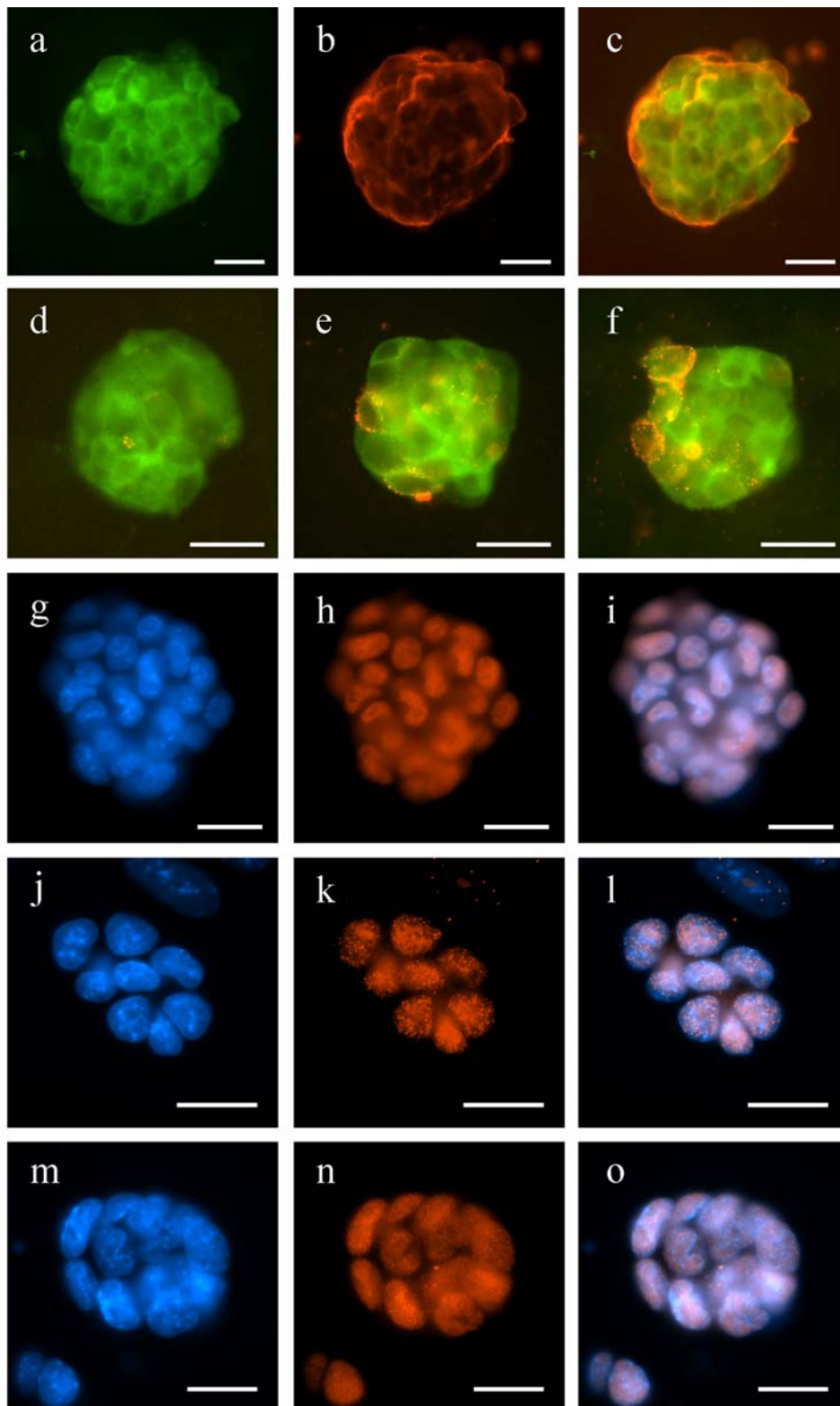


Abb. 26: Immunfluoreszenzfärbung von SSCs unter Kondition 4.

Indirekter Nachweis von Stra8 durch Antikörper gegen GFP (grün) von SSCs unter Kondition 4 (a, c, d), 2 (e) und 3 (f). SSCs unter Kondition 4 zeigen eine Färbung gegen SSEA1 (rot) (b, c) jedoch nicht gegen SSEA3 (d). Demgegenüber stehen SSCs unter Kondition 2 (e) und 3 (f) mit einer partiellen Färbung gegen SSEA3 (rot). Nachweis von OCT4 (h, i), NANOG (k, l) und SOX2 (n, o) bei SSCs unter Kondition 4. Zur Zellkerndetektion wurde DAPI (blau) eingesetzt (g, i, j, l, m, o). Größenstandard: 25 μ m.

Um vergleichende Aussagen auf Proteinebene treffen zu können, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen angefertigt. Hierbei wurden mESCs mit eGFP⁺-SSCs unter den vier Kulturbedingungen verglichen. Untersucht wurden die Marker eGFP, SSEA1, SSEA3, SSEA4, OCT4, c-kit, Thy1, Ter119, Sca-1 und CD34. Hierbei stellt eGFP einen indirekten Marker für Stra8 dar. Es zeigte sich eine kontinuierliche Expression von eGFP bei allen vier Kulturbedingungen gegenüber mESCs (Abb. 27a). Des Weiteren waren sowohl die mESCs als auch die eGFP⁺-SSCs unter allen vier Kulturbedingungen stark positiv für OCT4 und SSEA1, sowie leicht positiv für SSEA4 und den Lymphozytenmarker Sca-1. EGFP⁺ SSCs zeigten unter den Kulturbedingungen 3 und 4 wie mESCs keine SSEA3 Expression, jedoch konnten einzelne Zellen unter Kondition 1 und 2 als SSEA3 positiv detektiert werden. Der für differenzierende Spermatogonien charakteristische Marker c-kit konnte unter Kulturbedingung 1 und 2 stärker detektiert werden als unter Kondition 3 und 4. Der Oberflächenmarker Thy1 konnte nur auf Zellen detektiert werden, die ohne LIF kultiviert worden sind (Kondition 1 und 3). Unter allen vier Kulturbedingungen konnte bei mESCs sowie auch bei eGFP⁺ SSCs der Erythrozytenmarker Ter119 und der hämatopoetische Stammzellmarker CD34 nicht nachgewiesen werden (Abb. 27b).

Diese Daten zeigen, dass SSCs unter Kondition 4 morphologisch, auf mRNA und Proteinebene mESCs stark ähneln und somit Pluripotenz aufweisen. Diese Daten sind in Guan et al. 2006 publiziert (Guan et al., 2006).

Unter Kondition 4 kultivierte SSCs wurden in unserer Arbeitsgruppe weiter charakterisiert. *In vitro* konnte eine Differenzierung in funktionale Abkömmlinge aller drei Keimblätter belegt werden (Guan et al., 2006; Guan et al., 2007; Streckfuss-Bomeke et al., 2009). *In-vivo*-Versuche zeigten nach Injektion in immundefiziente Mäuse (SCID-Mäuse) eine Teratombildung mit mesodermalen, ektodermalen und endodermalen Abkömmlingen. Darüber hinaus kam es nach Blastozysteninjektion der Zellen zu einer Beteiligung in verschiedenen Organen sowie zur Keimbahntransmission (Guan et al., 2006). Somit zeigte sich, dass SSCs durch Kulturbedingungen in pluripotente Stammzellen reprogrammiert werden konnten.

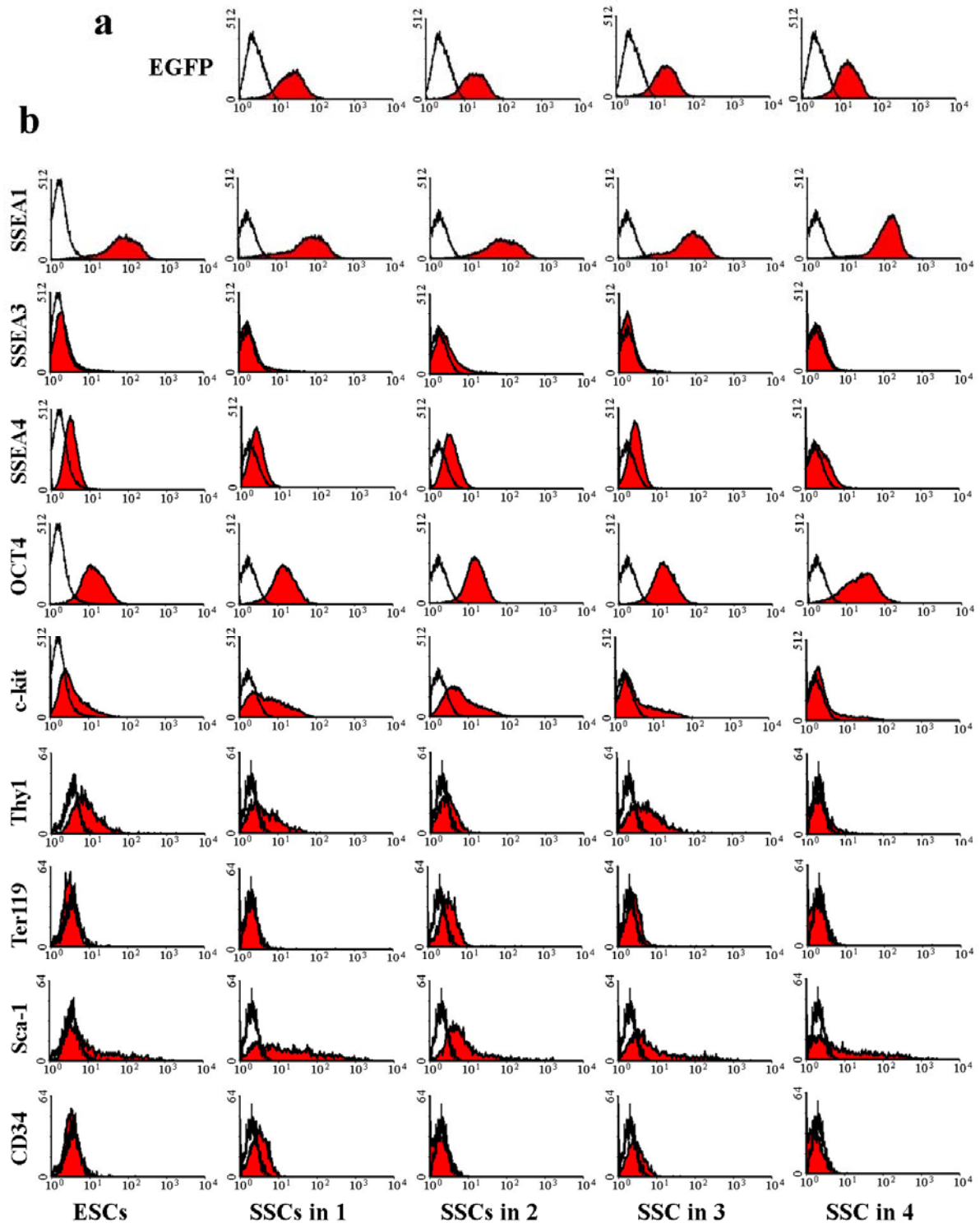


Abb. 27: Flowzytometrische Analyse von SSCs unter Kulturbedingungen 1-4 im Vergleich zu mESCs.

Dargestellt sind SSCs unter Kondition 1-4 im Vergleich zu ESCs gefärbt für die Marker SSEA1, 3 und 4, OCT4, c-kit, Thy1, Ter119, Sca-1 und CD34. Die analysierten Zellen sind entsprechend ihrer Intensität auf einer logarithmischen Skala aufgetragen und rot gekennzeichnet. Die Negativkontrolle ist transparent dargestellt.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene adulte Stammzellpopulationen untersucht und der Versuch der Reprogrammierung in einen pluripotent-ähnlichen Zustand unternommen.

Der erste Teil der Arbeit hat sich mit der Charakterisierung und Reprogrammierung von MSCs der Maus und des Menschen beschäftigt. Hierbei zeigte sich, dass MSCs sowohl erfolgreich aus Knochenmark der Maus als auch des Menschen isoliert und kultiviert werden konnten. Die gewonnenen Zellen zeigten typische Eigenschaften für MSCs. Eine eindeutige, kontinuierliche Expression von Pluripotenzmarkern konnte nicht nachgewiesen werden. Nach erfolgreicher Etablierung eines Protokolls zur Isolation von Zytoplasmafragmenten aus mESCs konnten diese mit MSCs fusioniert werden. Die so gewonnenen Zellen zeigten keine vollständige Reprogrammierung in pluripotente Zellen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten mSSCs in pluripotente Stammzellen reprogrammiert werden. Hierfür konnten mSSCs aus adulten Hoden isoliert und kultiviert werden. Nach erfolgreicher Kulturtestung konnte ein Protokoll zur Reprogrammierung von mSSCs in pluripotente Stammzellen etabliert werden. Die so gewonnenen Zelllinien waren positiv für alle untersuchten Pluripotenzmarker.

4.1. MSCs der Maus und des Menschen zeigen keine Pluripotenz

Zu Beginn der Arbeit wurden mMSCs hinsichtlich ihres Pluripotenzpotenzials im Vergleich zu mESCs charakterisiert. ESCs der Maus wurden erstmals 1981 hergestellt (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981) und sind seitdem eine gut untersuchte pluripotente Zellpopulation.

Die kultivierten mMSCs zeigten eine typische flache, spindelförmige Fibroblasten-ähnliche Morphologie im Vergleich zu mESCs, welche erhaben, in scharf begrenzten, kompakten, unter Phasenkontrast leuchtenden Kolonien wuchsen. Viele somatische Stammzellen zeigen im Gegensatz zu ESCs eine geringe Proliferationsrate und verbleiben zu einem Großteil in der Interphase des Zellzyklus (Tam und Lim, 2008). Dieses konnte auch bei mMSCs beobachtet werden. Hier zeigte sich eine Zellverdopplungsrate von ca. 0,5 pro Tag gegenüber den deutlich schneller proliferierenden ESCs mit 1,7 Zelldopplungen pro Tag. Diese Ergebnisse konnten durch immunzytochemische Färbungen gegen Ki67 bestätigt werden. Ki67 ist ein

nukleäres Protein, welches in den Zellzyklusphasen G₁, S, G₂ und M exprimiert wird und als Proliferationsmarker beschrieben ist (Gerdes et al., 1984; Scholzen und Gerdes, 2000). Hierbei zeigte sich eine deutlich erhöhte Aktivität in mESCs gegenüber mMSCs, was in der Durchflusszytometrie bestätigt werden konnte.

ESCs der Maus exprimieren eine Vielzahl von molekularen Markern der Pluripotenz wie SSEA1, OCT4, NANOG, SOX2, UTF1 (Solter und Knowles, 1978; Niwa et al., 2000; Loh et al., 2006). Im Vergleich zu mESCs konnte keine Expression von Pluripotenzmarkern in mMSCs nachgewiesen werden. Die untersuchten Transkriptionsfaktoren OCT4 und NANOG werden in Verbindung mit SOX2 als Schlüsselregulatoren der Pluripotenz angesehen, wobei OCT4 einer der wichtigsten Regulatoren der Pluripotenz ist (Scholer et al., 1990a; Scholer et al., 1990b). Dieser wird überwiegend in pluripotenten Zellen der frühen Entwicklung (ICM, PGC) und deren Abkömmlingen *in vitro* (ESC, EGC) exprimiert (Nichols et al., 1998; Pesce et al., 1998; Pesce und Scholer, 2001). In Verbindung mit SOX2 wirkt OCT4 auf den Homeodomain Transkriptionsfaktor NANOG ein, welcher wiederum OCT4, SOX2 und sich selbst reguliert (Boyer et al., 2005; Chew et al., 2005; Loh et al., 2006). NANOG spielt hier wie OCT4 eine zentrale Rolle in der Erhaltung der Pluripotenz (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Dieses fein abgestimmte Netzwerk der gegenseitigen Regulation ist Voraussetzung für die Erhaltung der Pluripotenz. Da weder *Oct4* noch *Nanog* in den untersuchten mMSCs detektiert werden konnte, scheinen mMSCs nicht pluripotent zu sein. Um die Ergebnisse der Genexpression von *Oct4* auf Proteinebene zu bestätigen, wurden immunzytochemische Färbungen und durchflusszytometrische Untersuchungen für OCT4 an mMSCs und mESCs durchgeführt. OCT4 wurde von einzelnen mMSCs in Abhängigkeit von der mMSC-Isolation schwach exprimiert im Vergleich zu einer starken Expression in mESCs. Niwa et al. berichteten, dass eine zu geringe Expression von OCT4 bei ESCs zum Verlust der Pluripotenz und zur Differenzierung der Zellen führt (Niwa et al., 2000). Ein weiterer für pluripotente Zellen bedeutender Transkriptionsfaktor stellt UTF1 dar (Okuda et al., 1998). UTF1 interagiert mit OCT4 und trägt damit zur Erhaltung der Pluripotenz bei (Nishimoto et al., 1999; Nishimoto et al., 2005). In den untersuchten mMSCs zeigte sich auch hierfür keine Expression, wohingegen mESCs stark positiv waren. Ebenso konnte mittels Durchflusszytometrie auf Proteinebene in mMSCs keine Expression des Pluripotenzmarkers SSEA1 und des frühen Differenzierungsmarkers SSEA3 detektiert werden. Zusammenfassend deuten alle Ergebnisse darauf hin, dass mMSCs kein Potenzial für Pluripotenz aufweisen. Die leichte Expression von OCT4 in der immunzytochemischen Färbung scheint nicht auszureichen, um das Netzwerk der gegenseitigen Regulation der Pluripotenz zu aktivieren.

Neben den Pluripotenzmarkern wurden die Zellen auf das intermediäre Filament *Nestin* und den Transkriptionsfaktor *Brachyury* untersucht. Im Vergleich zu der starken *Nestin*- und *Brachyury*-Expression von ESCs der Maus konnte bei mMSCs nur eine sehr schwache *Nestin* und keine *Brachyury*-Expression detektiert werden.

Nestin wird überwiegend als Marker für neuronale Vorläuferzellen beschrieben (Lendahl und McKay, 1990; Lendahl et al., 1990; Fraichard et al., 1995). Jedoch wird in letzter Zeit *Nestin* auch als ein „*multi-lineage progenitor*“ Marker diskutiert, der sowohl in nicht-ektodermalem embryonalem Gewebe als auch in regenerierendem adultem Gewebe exprimiert wird (Wiese et al., 2004). Auch konnte die Gruppe um Phinney eine Expression von *Nestin* bei mMSCs nachweisen (Baddoo et al., 2003). Auf die dargestellten Ergebnisse bezogen würden mMSCs „*multi-lineage progenitor*“ Potenziale aufweisen. Pittenger et al. unterstützten diese These, indem er zeigte, dass MSCs sich in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten differenzieren können (Pittenger et al., 1999). Die in dieser Arbeit kultivierten mMSCs exprimieren ebenfalls die typischen Marker von frühen Adipozyten und Osteozyten und bestätigen somit die These von Pittenger. Der frühe transiente mesodermale Marker *Brachyury*, welcher auch als ein kardialer Progenitormarker angesehen wird (Wu et al., 2006), konnte in mMSCs nicht nachgewiesen werden. Somit sind mMSCs keine frühen mesodermalen Zellen.

Um die Frage zu klären, ob es hinsichtlich von Pluripotenzeigenschaften einen Unterschied zwischen MSCs des Menschen und der Maus gibt, wurden hMSCs aus Knochenmark isoliert, kultiviert und anhand von Morphologie, Proliferation, mRNA- und Proteinexpression mit mMSCs verglichen. Wie zu erwarten zeigten sich hinsichtlich Morphologie und Proliferationsverhalten keine signifikanten Unterschiede. Die Bestätigung der Zellen als MSCs erfolgte über die Genexpression von frühen Osteogenese- und Adipozytenmarkern. Weiterhin konnten diese Zellen in reife Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten differenziert werden (nicht veröffentlichte Daten des Labors). Bei der Untersuchung bezüglich Pluripotenz auf mRNA-Ebene konnte eine geringe Expression für *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* und *LIN28* verzeichnet werden. Diese Expression ist jedoch um ein vielfaches geringer als bei pluripotenten hESCs. Für das Erlangen und Aufrechterhalten von Pluripotenz ist jedoch eine ausreichende Expression der Transkriptionsfaktoren notwendig (Niwa et al., 2000), sodass bei dem hier gesehenen Expressionslevel nicht von einer Pluripotenz auszugehen ist. Bei der weiteren Untersuchung des Transkriptionsfaktors *OCT4* auf Proteinebene konnte auch hier nur eine geringe Expression detektiert werden, die mit der mRNA-Expression korreliert. Eine Korrelation der Expression hinsichtlich des Alters und Geschlechtes der MSC-Spender konnte nicht beobachtet werden.

Eine leichte Expression von SSEA3 und 4 konnte bei hMSCs in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Durchflusszytometrische und quantitative Auszählungen der Immunfluoreszenz konnten diese Befunde bestätigen. Trotz tendenziell höherer Werte für hMSCs in der Durchflusszytometrie für SSEA4 gegenüber SSEA1 für mMSCs konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Auch zeigte der „*multi lineage Progenitor marker*“ Nestin eine kontinuierliche Expression auf RNA-Ebene und eine leichte und variable Expression auf Protein-Ebene in der Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass hMSCs partiell Marker der Pluripotenz mit geringem Niveau im Gegensatz zu mMSCs exprimieren. Jedoch sind diese zu gering, um einen Status der Pluripotenz zu erreichen. Somit können sowohl mMSCs als auch hMSCs als nicht pluripotente Zellen angesehen werden.

Trotz fehlender oder nur schwach ausgeprägter Pluripotenzmarker sollte das Differenzierungspotenzial der hMSCs in die kardiale Richtung untersucht werden. Dabei zeigten die hMSCs eine kontinuierliche Expression für den frühen Mesodermmarker *Brachyury* sowie eine variable Expression für die kardialen Transkriptionsfaktoren *NKX2.5* und *MEF2c*. Diese Transkriptionsfaktoren zusammen mit *GATA4*, *TBX* und *HAND* (Srivastava und Olson, 2000; Olson, 2006) sind die Schlüsselregulatoren für die frühe kardiale Entwicklung. Jedoch konnte eine Expression für *GATA4* nicht nachgewiesen werden. Weiterführende, über die Arbeit hinausgehende laborinterne Untersuchungen beschäftigten sich ebenso mit dem Differenzierungspotenzial für hMSCs *in vitro*. Dabei zeigten die Differenzierungsversuche durch „*Embryoid Bodies*“, Zytokinen und Kokultur mit neonatalen Rattenmyozyten keine kardiale Differenzierung (unpublizierte Daten des Labors). Andere Gruppen zeigten allerdings nach Transplantation von MSCs in infarzierte Herzen Zellen mit myokardialer Aktivität oder Funktionsverbesserungen (Toma et al., 2002; Kawada et al., 2004; Pochampally et al., 2004; Yoon et al., 2005). Auch die Gruppe um Dzau konnte eine verbesserte kardiale Funktion nachweisen (Mangi et al., 2003). Jedoch zeigte eine weitere Arbeit dieser Gruppe, dass die beobachtete Funktionsverbesserung eher auf einem parakrinen, antiapoptotischen Effekt der Spenderzellen gegenüber den geschädigten Kardiomyozyten als auf regeneratives Wachstum beruht (Gnecchi et al., 2005). Auch wird eine Zellfusion der Spenderzelle mit den Kardiomyozyten als Ursache der beschriebenen Differenzierung diskutiert (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002).

Somit bleibt das kardiale Differenzierungspotenzial von hMSCs umstritten. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass MSCs der Maus und des Menschen weder eine ausreichende Expression von Pluripotenzmarkern, noch ein Differenzierungspotenzial in

kardiale Zellen aufweisen. Eine Pluripotenz von MSCs der Maus und des Menschen konnte somit nicht nachgewiesen werden.

4.2. MSCs können nicht durch Fusion mit mESC-Zytoplasma in pluripotente Stammzellen reprogrammiert werden

Um die MSCs zu einer pluripotenten Zellpopulation reprogrammieren zu können, haben wir diese mit mESC-Zytoplasma fusioniert. Es ist bekannt, dass pluripotente Stammzellen ein kardiales Differenzierungspotenzial besitzen und für kardiale Regeneration verwendet werden können.

Es wurde gezeigt, dass somatische Zellen fusioniert mit ESCs sich wie pluripotente Zellen verhalten (Tada et al., 2001; Tada et al., 2003; Cowan et al., 2005). Hierbei wird der somatische Zellkern durch die ESCs reprogrammiert und zeigt Eigenschaften von einer pluripotenten Stammzelle (Tada et al., 2001; Tada et al., 2003; Cowan et al., 2005). Jedoch besitzen diese neu entstandenen Zellen einen tetraploiden Chromosomensatz. Dieses macht die Zellen ohne eine Entfernung des von der ESC stammenden Zellkerns für einen therapeutischen Einsatz ungeeignet. Ein anderer Ansatz ist der somatische Zellkerntransfer (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT), wobei ein somatischer Zellkern in eine zuvor entkernte Oozyte injiziert wird. Diese so neu entstandene Zelle besteht aus einem somatischen Zellkern und Oozytenzytoplasma und hat die Fähigkeit, sich wie eine normal befruchtete Eizelle zu entwickeln und einen Organismus oder ESCs hervorzubringen (Wilmut et al., 1997; Wakayama et al., 1998; Kawase et al., 2000; Munsie et al., 2000; Wakayama et al., 2001). Die Fähigkeit, den somatischen Zellkern zu reprogrammieren, scheint hierbei im Zytoplasma der Oozyte zu liegen. Jedoch ist diese Technik stark oozytenverbrauchend. In der vorliegenden Arbeit sollten diese beiden Techniken der Reprogrammierung miteinander verbunden werden. Ausgehend von der Hypothese, dass die reprogrammierenden Mechanismen aus dem Zytoplasma der Oozyte beziehungsweise der ESCs stammen, wurden ESCs entkernt und mit MSCs der Maus und des Menschen fusioniert. Da ESCs nur wenig Zytoplasma im Verhältnis zum Zellkern aufweisen, musste ein anderes Verfahren als das bei SCNT verwendete etabliert werden. Das zu diesem Zweck in der Arbeit entwickelte Verfahren basiert auf einem zuvor beschriebenen Protokoll (Wigler und Weinstein, 1975). Die nach Fusion mit ESC-Zytoplasmafragmenten gewonnenen fusionierten mesenchymalen Zellen wurden hinsichtlich einer Erhöhung der Pluripotenz untersucht. Weitere untersuchte Pluripotenzmarker auf RNA- und Proteinebene bei FMCs der Maus und des Menschen zeigten keine signifikante

Änderung. Jedoch konnte ein tendenzieller Anstieg in der Proteinexpression für OCT4, Nestin, Ki67 bei mFMCs und OCT4 und Nestin bei hFMCs beobachtet werden. Auch konnten vereinzelt Kolonien mit ESC-ähnlicher Morphologie beobachtet werden. Diese Zellen konnten nur bis zu sieben Tagen proliferieren. Daraufhin kam es zu einem Zellarrest. Insgesamt konnte keine Zellpopulation mit pluripotenten Eigenschaften generiert werden, was folgende Gründe haben könnte: Zur Zellkernextrusion wurden mESCs mit dem Agens Cytochalasin B behandelt, was zu einer Blockierung kontraktile Mikrofilamente führt (Carter, 1967; Krishan, 1972; Prescott et al., 1972). Durch auftretende Scherkräfte einer sich anschließenden Ultrazentrifugation konnten Zellkerne und Zytoplasma voneinander getrennt werden. Hierbei ist denkbar, dass durch die Applikation von Cytochalasin B wichtige zytoplasmatische Strukturen geschädigt worden sind. Ältere Publikationen gehen jedoch von einem reversiblen Effekt des Cytochalasin B auf das Zytoskelett aus (Copeland, 1974). Auch könnten durch die Ultrazentrifugation wichtige Strukturen beschädigt worden sein. Bei früheren Untersuchungen zur Zytoplasmagewinnung wurden Zellen mit einem höheren Zytoplasma/Zellkernverhältnis verwendet. Hierbei konnten größere und kompaktere Zytoplasmafragmente gewonnen werden (Roos et al., 1983). Besonders das für SCNT verwendete Zytoplasma aus Oozyten war aufgrund des hohen Zytoplasma/Zellkernverhältnisses und der daraus resultierenden Methode in seiner Struktur gut erhalten (Wilmut et al., 1997; Wakayama et al., 1998). Somit könnte ein fraktioniertes, geschädigtes Zytoplasma eine Ursache für die nicht erfolgte Reprogrammierung darstellen.

Um eine Verunreinigung der zu 95% aufgereinigten Zytoplasmafraktion nach Ultrazentrifugation mit nicht entkernten ESCs zu vermeiden, führten wir zuvor eine Behandlung der ESCs mit MMC durch. Dieses ist ein DNA-interkalierendes Agens und führt damit zu einer Hemmung der DNA-Synthese und Zellteilung (Tomasz et al., 1987; Tomasz, 1995). Eine zuvor angenommene spezifische Interkalierung ausschließlich in die nukleäre DNA wird in den letzten Jahren in Frage gestellt. Neuere Untersuchungen deuten daraufhin, dass MMC darüber hinaus einen Effekt auf mitochondriale DNA aufweist und zu einer Reduktion des ATP-Haushaltes der Zelle führt (Pritsos und Briggs, 1996; Pritsos et al., 1997). Eine weitere Schädigung und negative Beeinflussung des Zytoplasmas durch MMC ist somit nicht auszuschließen.

Somit liegt es nahe, dass ein wichtiger Grund für eine fehlende Reprogrammierung in der Qualität des gewonnenen Zytoplasmas liegt. Eine bessere Güte des Zytoplasmas sollte für nachfolgende Arbeiten angestrebt werden. Hierfür sollten technische Verfahren zur

Gewinnung eines höheren Zytoplasmaanteils und deren Reinheit entwickelt und ein Verzicht auf MMC erzielt werden.

Neben der Qualität des Zytoplasmas könnten eine zu geringe Fusionsrate sowie ein zu geringes Zytoplasma/Zellkern Verhältnisse als Ursache angesehen werden. Um die Effizienz der Spontanfusion bei mMSCs (>70%) und hMSCs (< 5%) zu erhöhen, wurden die Zellen und Zytoplasmafragmente mit PEG, einem Fusionsagens behandelt (Davidson und Gerald, 1976). Dadurch konnte die Fusionseffizienz bei hMSCs auf 40-50% erhöht werden. Eine deutliche Erhöhung der Fusionsrate konnte jedoch bei mMSCs durch PEG Behandlung nicht erzielt werden. Jedoch konnte auch unter dieser Methode keine Reprogrammierung beobachtet werden.

Dennoch wurden in den Kulturen einzelne Kolonien mit einer ESC-ähnlichen Morphologie beobachtet, die jedoch in einer geringen Häufigkeit auftraten. Andere Berichte über die Reprogrammierung mittels Zellfusion oder Zellextrakten beschreiben jedoch eine ähnlich geringe Effizienz (Cowan et al., 2005; Neri et al., 2007). Allerdings konnten diese ESC-ähnlichen Kolonien nicht weiter vermehrt werden.

Andererseits ist die Bedeutung des ESC-Zellkerns bei Reprogrammierung durch Zellfusion nicht abschließend geklärt. Do und Schöler zeigten, dass ESC-Karyoplasten Neurosphären (partiell) reprogrammieren können. Jedoch konnte eine Reprogrammierung mittels entkerntem ESC-Zytoplasma nicht erzielt werden (Do und Schöler, 2004). Sie schlossen daraus, dass das Chromatin von ESCs für eine Reprogrammierung notwendig ist. Egli et al. postulierten, dass die für die Reprogrammierung wichtigen Faktoren in der Interphase des Zellzyklus im Zellkern gebunden sind, jedoch durch das Aufbrechen der Zellkernhülle in der Metaphase frei im Zytoplasma vorliegen (Egli et al., 2007). Diese Theorie steht im Einklang mit zuvor berichteten Ergebnissen von SCNT-Versuchen. In diesen konnte eine erfolgreiche Reprogrammierung nur in Metaphase-Oozyten gezeigt werden, wo nukleäre Faktoren frei im Zytoplasma vorkommen (Wakayama et al., 2000).

Somit bestünde die Möglichkeit der Reprogrammierung von somatischen Zellen nur durch Verwendung von in der Metaphase arretiertem ESC-Zytoplasma, nicht aber in Phasen mit intakter Zellkernhülle. In der vorliegenden Arbeit wurden ESCs vor der Zytoplasmagewinnung mit Mitomycin C behandelt. Jedoch führt Mitomycin C vorwiegend zu einem Arrest der Zelle in der S- und G₂-Phase des Zellzyklus. In dieser Phase liegt eine intakte Zellkernhülle vor und nukleäre Faktoren sind nicht frei im Zytoplasma verfügbar, welches eine Ursache für eine fehlende Reprogrammierung darstellen könnte.

Die Verwendung von ESCs, die in der Metaphase arretiert sind, könnte für nachfolgende Projekte eine vielversprechende Modifikation der beschriebenen Arbeit darstellen. Eine Alternative zur beschriebenen mechanischen Elimination stellt die genetische dar. Matsumura et al. beschreibt ein Cre-basiertes Modell zur Elimination von einzelnen Chromosomen nach Fusion. Hierbei kommt es durch Rekombination innerhalb der Schwester-Chromatiden zu abnormalen Chromosomen, welche spontan während des weiteren Zellzyklus entfernt werden (Matsumura et al., 2007). Jedoch konnte Matsumura et al. nur die Elimination eines einzelnen Chromosoms zeigen.

4.3. Adulte SSCs der Maus können durch Kulturbedingungen zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert werden

Embryonale Vorläuferzellen der Gameten, sogenannte PGCs und neonatale Keimbahnzellen haben das Potenzial, unter definierten Kulturbedingungen *in vitro* einen pluripotenten Status zu erhalten (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992; Kanatsu-Shinohara et al., 2004a). Bislang ist jedoch ungeklärt, ob auch adulte Keimbahnzellen in pluripotente Stammzellen reprogrammiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass SSCs *in vitro* in pluripotente Stammzellen konvertiert werden können. Hierbei zeigte sich, dass die Kulturbedingungen einen wichtigen Einfluss auf die Reprogrammierung haben, so dass die Konversion in pluripotente Stammzellen nur auf MEFs in Kombination mit LIF stattfindet.

Um zu untersuchen, ob adulte SSCs die Fähigkeit zur Reprogrammierung in pluripotente Stammzellen besitzen, wurden verschiedene Kulturbedingungen getestet. Hierfür wurden SSCs der Stra8-eGFP transgenen Maus verwendet. Diese wurden aus vier bis sechs Wochen alten Mäusen isoliert und nach eGFP sortiert. Stra8 ist ein Spermatogonien-spezifischer Marker, welcher in den sich entwickelnden Gonaden der Maus am Tag 14.5 dpc erstmalig exprimiert wird und anschließend kontinuierlich aktiv ist (Oulad-Abdelghani et al., 1996). Zur Überprüfung der spermatogonialen Stammzeleigenschaften der isolierten und nach eGFP sortierten Zellen wurden diese in Busulfan behandelte Mäuse injiziert (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Engel, Humangenetik). Durch die Regeneration der Spermatogenese der zuvor depletierten Hoden konnten die verwendeten Zellen als SSCs bestätigt werden.

Frühere Untersuchungen zeigten eine Konversion von neonatalen SSCs in pluripotente Stammzellen. Jedoch war es ihnen nicht möglich, aus adulten Hoden ESC-ähnliche Zellen zu gewinnen (Kanatsu-Shinohara et al., 2004a). Wir verwendeten Stra8-eGFP transgene Tiere

zur genetischen Selektion. Dieses Verfahren ist mit einer bis zu 700-fachen Anreicherung von undifferenzierten SSCs (Giuli et al., 2002) deutlich effizienter gegenüber der CD9-Antikörperselektion (Kanatsu-Shinohara et al., 2004a; Kanatsu-Shinohara et al., 2004b). Auch verwendeten wir gegenüber früheren Untersuchungen in der Initialphase der Kultivierung der testikulären Zellen keine Wachstumsfaktoren wie bFGF, den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) oder LIF, welche ein Überwachsen der Kultur mit Fibroblasten, Endothelzellen oder Sertoliezellen hervorrufen könnte. Trotz der wichtigen Bedeutung von GDNF für die Selbsterneuerung von SSCs (Meng et al., 2000) zeigte sich, dass nach initialer Kultivierung der SSCs unter GDNF diese für die weitere Generierung von maGSCs entbehrlich war. Stattdessen war die Kultivierung LIF-abhängig.

Um eine zeitnahe Aussage über den Effekt der getesteten Kulturbedingungen zu erhalten, beobachteten wir die Morphologie und AP-Aktivität der untersuchten Zellen. Wir postulierten, dass eine Konversion der SSCs in einen pluripotenten Status mit einer Änderung der Morphologie in ein ESC-ähnliches Erscheinungsbild und einer Zunahme der AP-Aktivität einhergeht. Hierfür sprechen verschiedene pluripotente Stammzellpopulationen unterschiedlichen Ursprungs, wie mGSCs, ntESCs, PGCs, und iPSCs (Matsui et al., 1992; Eggan et al., 2004; Kanatsu-Shinohara et al., 2004a; Takahashi und Yamanaka, 2006).

Bei den so angewendeten Kriterien zeigten sich unter Kondition 1 eine Epiblasten-ähnliche Morphologie und eine geringe AP-Aktivität. Wurden die Zellen jedoch mit LIF substituiert (Kondition 2) oder auf MEFs kultiviert (Kondition 3) zeigte sich eine ESC-ähnliche Morphologie und eine in den Kolonien partiell erhöhte AP-Aktivität. Unter Kondition 4 (LIF und MEFs) zeigte sich wie bei Kondition 2 und 3 eine ESC-ähnliche Morphologie mit einer starken AP-Aktivität in der Kolonie. Unter dieser Kondition konnten die Zellen kontinuierlich kultiviert werden und mussten im Durchschnitt täglich im Verhältnis 1:3 passagiert werden. Mittels dieser Kulturbedingungen gelang es uns, aus zehn Mäusen drei Zelllinien zu etablieren, was einer Effizienz von 30% entspricht.

Somit konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp der SSCs von den Kulturbedingungen abhängt. SSCs, die unter den Bedingungen 1-4 kultiviert wurden, zeigten in der Durchflusszytometrie positive SSEA1 und OCT4-Signale. Beide Marker werden von undifferenzierten mESCs exprimiert und sind ein Hinweis auf pluripotente Stammzellen (Solter und Knowles, 1978; Nichols et al., 1998). SSCs, die unter Kondition 3 und 4 kultiviert wurden, exprimierten wie mESCs kein SSEA3, jedoch zeigten einzelne Zellen unter Kondition 1 und 2 positive Signale. Ebenso waren mehr c-kit -positive Zellen unter Kondition 1 und 2 zu detektieren als unter den Kulturbedingungen mit MEFs. C-kit wird als ein Marker

für differenzierende Spermatogonien angesehen und wird nicht in undifferenzierten SSCs exprimiert (Rossi et al., 2000). Thy1 ist ein Oberflächenmarker für SSCs (Kubota et al., 2004b) und wird auch auf ESCs exprimiert (Ling und Neben, 1997). SSCs kultiviert unter LIF zeigten im Vergleich zu Kulturen ohne LIF eine Abnahme der Thy1-Expression. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass SSCs durch äußere Kulturbedingungen beeinflussbar sind. Dieses steht im Einklang mit Arbeiten der Gruppe um Brinster (Nagano et al., 2003; Kubota et al., 2004a). Unter ESC-Kulturbedingungen nahmen SSCs ESC-Eigenschaften an. Sie zeigten morphologische, zytochemische und proliferative Ähnlichkeiten zu mESCs. Wir nannten diese Zellen multipotente adulte Keimbahnstammzellen (*multipotent adult germline stem cell*, maGSCs), um sie von SSCs abzugrenzen. Weiterhin konnte ihre Pluripotenz auf mRNA Ebene bestätigt werden. Hierbei zeigte sich für alle vier Kulturbedingungen sowie für mESCs eine Expression der mit Pluripotenz einhergehenden Transkriptionsfaktoren *Oct4*, *Nanog*, *Utf1*, *Esg1* und *Rex1* (Scholer et al., 1990b; Ben-Shushan et al., 1998; Okuda et al., 1998; Tanaka et al., 2002; Mitsui et al., 2003). Weiterhin konnte eine *Stra8*-Expression bei mESCs und mSSCs unter allen vier Kulturbedingungen detektiert werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch eine Expressionszunahme unter Konditionen mit LIF Substitution (2 und 4). Somit ist anzunehmen, dass *Stra8* direkt oder indirekt durch LIF zu beeinflussen ist. Jedoch sind mechanistische Erklärungsmodelle bis jetzt nicht bekannt. Eine Bestätigung der RT-PCR-Ergebnisse auf Proteinebene konnte mittels Immunfluoreszenz von maGSCs erbracht werden. Hierbei zeigten sich die Zellen für die Schlüsselregulatoren der Pluripotenz, OCT4, NANOG und SOX2 sowie den Oberflächenmarker SSEA1 positiv (Boyer et al., 2005; Chew et al., 2005; Loh et al., 2006). Auch konnte *Stra8* über eine indirekte Färbung der transgenen *Stra8*-eGFP-Zellen nachgewiesen werden.

Der Mechanismus der Konversion von SSCs zu pluripotenten Stammzellen ist momentan noch nicht geklärt. Denkbar wäre jedoch, dass die Generierung von maGSCs auf einer genetischen Reprogrammierung von SSCs beruht, wie es zuvor für die Methode des Klonens beschrieben wurde (Wilmut et al., 1997). Alternativ könnte man annehmen, dass SSCs multipotente Eigenschaften besitzen. Unter physiologischen Bedingungen *in vivo* befinden sich SSCs an der Basalmembran der *Tubuli seminiferi* in einer Nische. Diese Nische, zum Teil reguliert durch Sertolizellen, steuert die Selbsterneuerung der SSCs und gibt Zellen zur Spermatogenese frei (de Rooij, 2009). Diese Nische könnte eine Differenzierung der SSCs in Abkömmlinge der drei Keimblätter verhindern. Werden jedoch die SSCs wie in unserem Protokoll in Abwesenheit von Sertolizellen *in vitro* kultiviert, könnte es zu einem Wegfall der

durch die Nische hervorgerufenen Inhibition kommen und zu einer Konversion in pluripotenten Stammzellen führen. Dieses wäre ähnlich zu der Generierung von EGCs aus PGCs (Matsui et al., 1992).

Ein Abstammen dieser Zellen von testikulären Teratomen, welche wiederum von pluripotenten Stammzellen abstammen, ist nicht anzunehmen. Bei der Isolation der maGSCs aus Mäusehoden erzielten wir eine Konversionsrate von 30%. Testikuläre Teratome sind bei Maus-Zuchtstämmen selten und treten bei dem 129Sv Stamm spontan bei 1-5% der Fälle auf (Stevens und Hummel, 1957). Mäuse mit einem gemischten C57BL6/129Sv Hintergrund zeigen seltener einen Tumor-Suppressor-Gen Trp53-Defekt und entwickeln seltener testikuläre Tumoren verglichen mit reinen 129Sv Stämmen (Donehower et al., 1995). In unserer Untersuchung verwendeten wir einen FVB/C57BL6/129Sv gemischten Hintergrund und sahen bei zehn verwendeten Tieren keine testikulären Tumore.

Nachfolgende Arbeiten in unserem Labor belegten das Differenzierungspotenzial der maGSCs in Zellen aller drei Keimblätter *in vitro* und *in vivo* (Guan et al., 2006; Guan et al., 2007; Streckfuss-Bomeke et al., 2009). Wurden die Zellen mit der Methode des „Hängenden Tropfens“ differenziert, zeigten sich nach 13 Tagen spontan, sich rhythmisch kontrahierende Kardiomyozyten. Die Differenzierung spiegelte eine frühe kardiale Entwicklung wie bei ESCs wieder. Die so gewonnenen Zellen zeigten typische Eigenschaften von funktionellen Kardiomyozyten, wie funktionelle *gap junctions*. Weiterhin zeigten Aktionspotenzial-Analysen die Differenzierung in Schrittmacher-, Ventrikel-, Vorhof- und Purkinje-ähnliche Kardiomyozyten (Guan et al., 2007). Trotz der so erfolgreichen Differenzierung in funktionelle Kardiomyozyten muss vor einer therapeutischen Anwendung die Frage der Applikation geklärt werden. Pluripotente Stammzellen können nach Injektion in Herzen zu Tumorgenese führen (Nussbaum et al., 2007). Bevor es zu einer therapeutischen Anwendung kommen sollte, müssen Protokolle entwickelt werden, die eine Tumorgenese umgehen. Zu diesem Zweck könnten maGSCs z.B. in kardiale Vorläuferzelllinien differenziert, von pluripotenten Zellen befreit und appliziert werden. Eine mögliche Vorläuferpopulation könnten hierbei Flk1- oder Isl1-positive Zellen darstellen (Kattman et al., 2006; Moretti et al., 2006; Wu et al., 2006). Diese Zellen können sich nicht nur in Kardiomyozyten, sondern auch für die Revaskularisation wichtigen Endothel- und glatten Muskelzellen differenzieren.

Die vorliegende Arbeit konnte somit eine erfolgreiche Generierung von pluripotenten Stammzellen aus adultem Gewebe zeigen und damit einen Beitrag zur Gewinnung von autologen pluripotenten Stammzellen ohne ethische Bedenken aufzeigen. Die Isolation von maGSCs aus Hodenbiopsien würde eine Alternative zur Embryonen-verbrauchenden hESC-

Gewinnung darstellen, welche seit 2001 durch das Embryonenschutzgesetz in Deutschland verboten ist. Durch die Möglichkeit der autologen Anwendung könnten immunologische Probleme vermieden werden. Somit könnte auf eine lebenslange Immunsuppression verzichtet werden wie sie bei der heterologen Zellersatztherapie notwendig ist. Vor einer therapeutischen Anwendung müssen diese Ergebnisse jedoch auf den menschlichen Organismus übertragen sowie Strategien der sicheren Applikation entwickelt werden.

Die Entwicklung spezifischer Kulturbedingungen für die Generierung von humanen SSCs und maGSCs stellt eine herausragende Aufgabe für folgende Arbeiten dar. SSCs und maGSCs könnten von Hodenbiopsien gewonnen werden und stünden für die immunkompatible, autologe Transplantation zur Verfügung. Die aus der Generierung von maGSCs der Maus gewonnenen Ergebnisse und Erfahrungen könnten ggf. auf humane Zellen angewendet werden. Für die zu entwickelnden Regenerationsstrategien für humane maGSCs könnte auf Techniken zurückgegriffen werden, die von maGSCs der Maus sowie hESC stammen. Somit würden humane maGSCs eine ideale Zellpopulation für die regenerative Medizin darstellen.

Eine weitere vielversprechende Methode für die Herstellung pluripotenter Stammzellen stellt die Induktion von pluripotenten Stammzellen (iPSCs) durch die Überexpression von Transkriptionsfaktoren dar. Takahashi und Yamanaka konnten zeigen, dass die Überexpression von den vier Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc zu einer Reprogrammierung von Fibroblasten der Maus führt (Takahashi und Yamanaka, 2006). Diese Ergebnisse konnten kurze Zeit später auch auf humane Zellen übertragen werden (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Mehrere Untersuchungen zeigten die Ähnlichkeit zu ESCs hinsichtlich des Transkriptionsprofils, des epigenetischen Status und der Keimbahntransmission (Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). Auch konnten iPSCs aus genetisch intakten hMSCs mit sechs überexprimierten Transkriptionsfaktoren gewonnen werden (Park et al., 2008). Ein Nachteil dieser Zellen besteht z.B. in der Reaktivierung verwendeter Retroviren, welche für die Transfektion eingesetzt werden. Dieses könnte *in vivo* zu einer Tumorentstehung führen. Eine effiziente Gewinnung von iPSCs ohne Verwendung von Viren konnte für adulte, humane Zellen nicht gezeigt werden.

5. Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt mit Übergang in eine ischämische Herzkrankheit ist eine der häufigsten internistischen Erkrankungen und Todesursachen der westlichen Welt. Hierbei kommt es zu einem irreversiblen Verlust von funktionellen Kardiomyozyten und Bildung von Narbengewebe. Pluripotente Stammzellen stellen durch ihre Fähigkeit, sich in spezifische Zelltypen des Organismus zu differenzieren, eine mögliche Quelle für regenerative Therapieverfahren dar.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von adulten Stammzellpopulationen hinsichtlich ihrer Plastizität und Konversion in einen pluripotenten Zustand. Hierfür wurden MSCs der Maus und des Menschen charakterisiert und zum Zweck der Reprogrammierung mit mESC-Zytoplasma fusioniert. Als weitere Stammzellpopulation wurden SSCs der Maus kultiviert und ihr Konversionspotenzial in pluripotente Stammzellen untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass MSCs der Maus und des Menschen nicht die Kriterien der Pluripotenz erfüllen. Zwar zeigte sich bei der Analyse der Zellen, dass einzelne Pluripotenzmarker, wie z.B. OCT4, exprimiert wurden, was jedoch sehr schwach und variabel war. Auch konnte ein Differenzierungspotenzial in Kardiomyozyten nicht nachgewiesen werden. Weiterhin konnte ein Protokoll zur Isolation von mESC-Zytoplasma etabliert werden. Die Fusion des Zytoplasmas mit MSCs zeigte allerdings keine signifikante Erhöhung der Potenz. Jedoch konnten einzelne Kolonien mit ESC-Morphologie detektiert werden. Diese entzogen sich jedoch einer weiteren Kultivierung.

In dem sich anschließenden Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass SSCs der Maus durch Kulturbedingungen beeinflussbar sind und unter LIF und in Gegenwart von MEFs in einen pluripotenten Status konvertiert werden können. Die Pluripotenz dieser Zellen konnte auf mRNA und Proteinebene sowie in weiteren Arbeiten unseres Labors durch Differenzierung in alle drei Keimblätter *in vivo* und *in vitro* belegt werden. Die so gewonnenen Zellen wurden von uns als maGSCs bezeichnet.

Die erfolgreiche Isolation von maGSCs aus adulten Hoden im Rahmen dieser Arbeit eröffnet neue Perspektiven in der Stammzell-basierten, regenerativen Medizin. Hierbei stehen besonders die Vermeidung ethischer Probleme sowie die autologe Anwendungsmöglichkeit im Vordergrund. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die hier beschriebenen Ergebnisse auf die Isolation und Kultivierung von humanen maGSCs übertragbar sind und gegebenenfalls neue Protokolle entwickelt werden. Um eine klinische Anwendung z.B. nach

Myokardinfarkt zu ermöglichen, müssen gleichzeitig Verfahren zur Differenzierung, Aufreinigung und sicheren Applikation entwickelt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Airey JA, Almeida-Porada G, Colletti EJ, Porada CD, Chamberlain J, Movsesian M, Sutko JL, Zanjani ED (2004): Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart. *Circulation* 109, 1401-7.
- Al-Khalidi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K (2003): Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg* 75, 204-9.
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003): Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-73.
- Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG (2003): Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 89, 1235-49.
- Bagutti C, Wobus AM, Fassler R, Watt FM (1996): Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Dev Biol* 179, 184-96.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995): Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168, 342-57.
- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC (2004): Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-73.
- Bellve AR (1993): Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol* 225, 84-113.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, et al. (2003): Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-76.
- Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ, Bergman Y (1998): Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol* 18, 1866-78.
- Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM (2002): Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 91, 189-201.

- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, et al. (2005): Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-56.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000): From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-9.
- Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD (1999): Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285, 754-6.
- Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying QL, Smith A (2008): Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135, 1287-98.
- Burdon T, Chambers I, Stracey C, Niwa H, Smith A (1999): Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 165, 131-43.
- Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM (2001): Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* 7, 89-99.
- Carter SB (1967): Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 213, 261-4.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003): Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-55.
- Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, Li P, Ang YS, Lim B, Robson P, et al. (2005): Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 25, 6031-46.
- Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Arii S, Takase K, Sato C, et al. (2002): Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 36, 22-9.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9.
- Copeland M (1974): The cellular response to cytochalasin B: a critical overview. *Cytologia (Tokyo)* 39, 709-27.
- Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K (2005): Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309, 1369-73.

- Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G (1997): Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 110 (Pt 11), 1279-85.
- Davidson RL, Gerald PS (1976): Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol. *Somatic Cell Genet* 2, 165-76.
- de Rooij DG (2009): The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech* 72, 580-5.
- Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, et al. (2008): ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* 29, 2388-442.
- Do JT, Scholer HR (2004): Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells* 22, 941-9.
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985): The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87, 27-45.
- Donehower LA, Harvey M, Vogel H, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Park SH, Thompson T, Ford RJ, Bradley A (1995): Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice. *Mol Carcinog* 14, 16-22.
- Donovan PJ (2001): High Oct-ane fuel powers the stem cell. *Nat Genet* 29, 246-7.
- Eggan K, Baldwin K, Tackett M, Osborne J, Gogos J, Chess A, Axel R, Jaenisch R (2004): Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 428, 44-9.
- Egli D, Rosains J, Birkhoff G, Eggan K (2007): Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* 447, 679-85.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998): Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-30.
- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J (1995): In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 108 (Pt 10), 3181-8.

- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710-5.
- Gesetz zur Änderung des Stammzellgesetzes (2008). *Bundesgesetzblatt I* S.1708
- Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter MK, Itskovitz-Eldor J, et al. (2004): Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 269, 360-80.
- Ginsburg M, Snow MH, McLaren A (1990): Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521-8.
- Giuli G, Tomljenovic A, Labrecque N, Oulad-Abdelghani M, Rassoulzadegan M, Cuzin F (2002): Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state. *EMBO Rep* 3, 753-9.
- Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, et al. (2005): Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 11, 367-8.
- Guan K, Hasenfuss G (2007): Do stem cells in the heart truly differentiate into cardiomyocytes? *J Mol Cell Cardiol* 43, 377-87.
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, et al. (2006): Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440, 1199-203.
- Guan K, Wagner S, Unsold B, Maier LS, Kaiser D, Hemmerlein B, Nayernia K, Engel W, Hasenfuss G (2007): Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* 100, 1615-25.
- Guan K, Wolf F, Becker A, Engel W, Nayernia K, Hasenfuss G (2009): Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. *Nat Protoc* 4, 143-54.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC (1999): Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-4.
- He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ (2003): Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93, 32-9.
- Hegert C, Kramer J, Hargus G, Muller J, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J (2002): Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* 115, 4617-28.

- Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, 3rd, Boiani M, Scholer HR (2003): Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300, 1251-6.
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001): Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107, 1395-402.
- Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, Nurzynska D, Kasahara H, Zias E, Bonafe M, et al. (2005): Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 96, 127-37.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T (2003): Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 69, 612-6.
- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, et al. (2004a): Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119, 1001-12.
- Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T (2004b): CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod* 70, 70-5.
- Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T (2005): Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol Reprod* 72, 985-91.
- Kanatsu-Shinohara M, Lee J, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Ikawa M, Nakamura T, Ogura A, Shinohara T (2008): Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol Reprod* 78, 681-7.
- Kattman SJ, Huber TL, Keller GM (2006): Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* 11, 723-32.
- Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, et al. (2004): Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104, 3581-7.
- Kawase E, Yamazaki Y, Yagi T, Yanagimachi R, Pedersen RA (2000): Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts. *Genesis* 28, 156-63.

- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2001): Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108, 407-14.
- Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2004): Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 1282-9.
- Kirschstein R, Skirboll L: Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions. . National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, USA, Bethesda 2001.
- Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ (1996): Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98, 216-24.
- Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J (2000): Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 92, 193-205.
- Krishan A (1972): Cytochalasin-B: time-lapse cinematographic studies on its effects on cytokinesis. *J Cell Biol* 54, 657-64.
- Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD (2003): Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl* 9, 1094-9.
- Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004a): Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16489-94.
- Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004b): Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 71, 722-31.
- Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA (1999): Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 156, 333-44.
- Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, et al. (2005): Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433, 647-53.
- Lendahl U, McKay RD (1990): The use of cell lines in neurobiology. *Trends Neurosci* 13, 132-7.

- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990): CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-95.
- Li C, Yang Y, Gu J, Ma Y, Jin Y (2009): Derivation and transcriptional profiling analysis of pluripotent stem cell lines from rat blastocysts. *Cell Res* 19, 173-86.
- Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, et al. (2008): Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135, 1299-310.
- Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW (2000): Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6, 1282-6.
- Ling V, Neben S (1997): In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. *J Cell Physiol* 171, 104-15.
- Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakraborty S, Holekamp TF, McDonald JW (2000): Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6126-31.
- Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, et al. (2006): The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38, 431-40.
- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R (2001): Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292, 1389-94.
- Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, et al. (2007): Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55-70.
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM (1993): Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 44, 41-50.
- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ (2003): Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 9, 1195-201.
- Martin GR (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-8.

- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL (1992): Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-7.
- Matsumura H, Tada M, Otsuji T, Yasuchika K, Nakatsuji N, Surani A, Tada T (2007): Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. *Nat Methods* 4, 23-5.
- Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, et al. (2000): Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287, 1489-93.
- Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, et al. (2006): Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 113, 1287-94.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000): Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-82.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003): The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-42.
- Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, Qyang Y, Bu L, Sasaki M, Martin-Puig S, et al. (2006): Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127, 1151-65.
- Muller-Nordhorn J, Binting S, Roll S, Willich SN (2008): An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. *Eur Heart J* 29, 1316-26.
- Munsie MJ, Michalska AE, O'Brien CM, Trounson AO, Pera MF, Mountford PS (2000): Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol* 10, 989-92.
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, et al. (2004): Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-8.
- Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL (2003): Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod* 68, 2207-14.
- Nakano T, Kodama H, Honjo T (1996): In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science* 272, 722-4.

- Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, Dev A, Wulf G, Ehrmann IE, Elliott DJ, et al. (2006): In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 11, 125-32.
- Neri T, Monti M, Rebuzzini P, Merico V, Garagna S, Redi CA, Zuccotti M (2007): Mouse fibroblasts are reprogrammed to Oct-4 and Rex-1 gene expression and alkaline phosphatase activity by embryonic stem cell extracts. *Cloning Stem Cells* 9, 394-406.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-91.
- Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H (1998): Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125, 1747-57.
- Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, Muramatsu M (1999): The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol* 19, 5453-65.
- Nishimoto M, Miyagi S, Yamagishi T, Sakaguchi T, Niwa H, Muramatsu M, Okuda A (2005): Oct-3/4 maintains the proliferative embryonic stem cell state via specific binding to a variant octamer sequence in the regulatory region of the UTF1 locus. *Mol Cell Biol* 25, 5084-94.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-6.
- Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE (2007): Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J* 21, 1345-57.
- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE (2004): Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 10, 494-501.
- Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Shimada T, Hyakusoku H (2004a): Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 871-7.

- Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Hyakusoku H, Shimada T (2004b): Adipogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice-including relationship of sex differences. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 511-7.
- Ogawa T, Ohmura M, Tamura Y, Kita K, Ohbo K, Suda T, Kubota Y (2004): Derivation and morphological characterization of mouse spermatogonial stem cell lines. *Arch Histol Cytol* 67, 297-306.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, et al. (2003): Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12313-8.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007): Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-7.
- Okuda A, Fukushima A, Nishimoto M, Orimo A, Yamagishi T, Nabeshima Y, Kuro-o M, Nabeshima Y, Boon K, Keaveney M, et al. (1998): UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J* 17, 2019-32.
- Olson EN (2006): Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 313, 1922-7.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, et al. (2001): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-5.
- Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Decimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dolle P, Bronner S, Lutz Y, Chambon P (1996): Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol* 135, 469-77.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008): Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-6.
- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ (1995): Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4857-61.
- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H (1998): Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 71, 89-98.

- Pesce M, Scholer HR (2001): Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19, 271-8.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-7.
- Pochampally RR, Neville BT, Schwarz EJ, Li MM, Prockop DJ (2004): Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9282-5.
- Pontecorvo G (1975): Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genet* 1, 397-400.
- Prescott DM, Myerson D, Wallace J (1972): Enucleation of mammalian cells with cytochalasin B. *Exp Cell Res* 71, 480-5.
- Pritsos CA, Briggs LA (1996): Disruption of normal cellular bioenergetics in Balb/c mice by mitomycin C. *Br J Cancer Suppl* 27, S15-8.
- Pritsos CA, Briggs LA, Gustafson DL (1997): A new cellular target for mitomycin C: a case for mitochondrial DNA. *Oncol Res* 9, 333-7.
- Prockop DJ (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-4.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ (1992): Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359, 550-1.
- Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM (1994): Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 164, 87-101.
- Roos D, Voetman AA, Meerhof LJ (1983): Functional activity of enucleated human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 97, 368-77.
- Rossi P, Sette C, Dolci S, Geremia R (2000): Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J Endocrinol Invest* 23, 609-15.
- Rubart M, Field LJ (2008): Stem cell differentiation: cardiac repair. *Cells Tissues Organs* 188, 202-11.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, et al. (2000): Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164, 247-56.

- Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, et al. (2006): Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, 1210-21.
- Scholer HR, Dressler GR, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P (1990a): Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 9, 2185-95.
- Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P (1990b): New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344, 435-9.
- Scholzen T, Gerdes J (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311-22.
- Solter D, Knowles BB (1978): Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5565-9.
- Srivastava D, Olson EN (2000): A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 407, 221-6.
- Stammzellgesetz (2002). Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen. *Bundesgesetzblatt Jahrgang 2002 Teil I Nr. 42, S. 2277 vom 29. Juni 2002*,
- Statistisches Bundesamt (2010). Pressemitteilung Nr.371 zu den Todesursachen im Jahre 2009 vom 18.10.2010. Wiesbaden, Statistisches Bundesamt Deutschland, www.destatis.de
- Stevens LC, Hummel KP (1957): A description of spontaneous congenital testicular teratomas in strain 129 mice. *J Natl Cancer Inst* 18, 719-47.
- Streckfuss-Bomeke K, Vlasov A, Hulsmann S, Yin D, Nayernia K, Engel W, Hasenfuss G, Guan K (2009): Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germ-line stem cells. *Stem Cell Res* 2, 139-54.
- Strubing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM (1995): Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev* 53, 275-87.
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T (2001): Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11, 1553-8.
- Tada M, Morizane A, Kimura H, Kawasaki H, Ainscough JF, Sasai Y, Nakatsuji N, Tada T (2003): Pluripotency of reprogrammed somatic genomes in embryonic stem hybrid cells. *Dev Dyn* 227, 504-10.

- Takahashi K, Yamanaka S (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-76.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007): Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-72.
- Tam W-L, Lim B (2008). Genome-wide transcription factor localization and function in stem cells. *StemBook*. Bernstein BE. Harvard, <http://www.stembook.org/>.
- Tanaka TS, Kunath T, Kimber WL, Jaradat SA, Stagg CA, Usuda M, Yokota T, Niwa H, Rossant J, Ko MS (2002): Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res* 12, 1921-8.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002): Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-5.
- Thomson JA, Marshall VS (1998): Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* 38, 133-65.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP (1995): Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7844-8.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-7.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD (2002): Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93-8.
- Tomasz M, Lipman R, Chowdary D, Pawlak J, Verdine GL, Nakanishi K (1987): Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science* 235, 1204-8.
- Tomasz M (1995): Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol* 2, 575-9.
- Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ (1999): Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100, II247-56.

- Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y (2001): Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 413-9.
- Voss AK, Thomas T, Gruss P (1997): Germ line chimeras from female ES cells. *Exp Cell Res* 230, 45-9.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998): Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-74.
- Wakayama T, Tateno H, Mombaerts P, Yanagimachi R (2000): Nuclear transfer into mouse zygotes. *Nat Genet* 24, 108-9.
- Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P (2001): Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292, 740-3.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995): Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18, 1417-26.
- Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC (2000): Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120, 999-1005.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R (2007): In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-24.
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM (2004): Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61, 2510-22.
- Wigler MH, Weinstein IB (1975): A preparative method for obtaining enucleated mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 63, 669-74.
- Wiles MV, Keller G (1991): Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 111, 259-67.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988): Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-7.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-3.

- Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J (1984): Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152, 212-9.
- Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J (1991): Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 48, 173-82.
- Wobus AM, Rohwedel J, Maltsev V, Hescheler J (1995): Development of cardiomyocytes expressing cardiac-specific genes, action potentials, and ionic channels during embryonic stem cell-derived cardiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 752, 460-9.
- Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT (1994): Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer-dropping" method. *Anal Biochem* 223, 251-8.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000): Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61, 364-70.
- Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, Clapham DE, Lien CL, Schultheiss TM, Orkin SH (2006): Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell* 127, 1137-50.
- Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002): Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91, 501-8.
- Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang SY, Jones SP, Marban E, Tomaselli GF, Li RA (2005): Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 111, 11-20.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S (2000): Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408, 92-6.
- Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG (2002): Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-8.
- Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, et al. (2005): Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 115, 326-38.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, et al. (2007): Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-20.

Auszüge der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Als Poster:

- Wolf F, Streckfuss-Bömeke K, Dressel R, Maier L, Azizian A, Hasenfuss G, Guan K: "Generation of patient-specific induced pluripotent stem cells from bone marrow-derived mesenchymal stem cells", 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 2010, Mannheim
- Becker A, Wolf F, Streckfuss-Bömeke K, Field LJ, Hasenfuss G, Guan K: "Establishment of multipotent adult germline stem cell lines expressing selection and fate-mapping transgenes", 7th Dutch-German Joint Meeting of the Molecular Cardiology Groups der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 2009, Hamburg
- Wolf F, Engel W, Moreira AL, Papp JG, Hasenfuss G, Guan K: "Isolation of pluripotent stem cells from adult human testis tissue", 2nd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, 2008, Dresden

Als Vortrag:

- Wolf F: "Isolation of pluripotent stem cells from adult human testis tissue". "Mechanisms of Early Differentiation" Summer School, 2008, Barsinghausen

Als Abstract:

- Wolf F, Becker A, Streckfuss-Bömeke K, Hubscher D, Field LJ, Dressel R, Hasenfuss G, Guan K (2009): Characterization and maintenance of adult spermatogonial stem cell culture. Hum Gene Ther 20, 1406-1406.

Als Artikel:

- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, et al. (2006): Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. Nature 440, 1199-203.
- Guan K, Wolf F, Becker A, Engel W, Nayernia K, Hasenfuss G (2009): Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. Nat Protoc 4, 143-54.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. G. Hasenfuß für die freundliche Überlassung des Themas, die organisatorische Unterstützung und seine konstruktiven Anregungen. Weiterhin danke ich besonders Frau Dr. rer. nat. K. Guan, die diese Arbeit betreute und bei wichtigen Fragen stets ansprechbar war und weitergeholfen hat. Die Diskussion mit ihr hat diese Arbeit maßgeblich bereichert. Darüberhinaus danke ich den Mitarbeitern des Stammzell-Labors für die hilfsbereite Unterstützung und das kollegiale Miteinander. Für das kritische Lesen des Manuskripts möchte ich ganz besonders Frau Dr. rer.nat. K. Streckfuss-Bömeke danken.

Lebenslauf

Am 01. November 1977 wurde ich als dritter von drei Söhnen der Ärztin Dr. med. Christine Wolf, geb. Trübel, und des Diplomingenieurs Otto Wolf in Jena geboren.

Von 1984 bis 1997 besuchte ich die Grundschule und Integrierte Gesamtschule Grete-Unrein, die ich mit dem Abitur beendete. Von 1997-1998 besuchte ich die Internationale Sprachschule in Sydney, Australien. Nach Abschluss eines Kurses als Rettungssanitäter begann ich im Sommersemester 1999 mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen und absolvierte im März 2001 die ärztliche Vorprüfung, im März 2002 bestand ich den ersten Teil der ärztlichen Prüfung. Im September 2004 absolvierte ich den zweiten und im April 2006 den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Seit Juni 2002 arbeitete ich im Stammzelllabor der Abteilung Kardiologie und Pneumologie, wo die vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Seit dem 15. Oktober 2006 bin ich als Assistenzarzt in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie der Georg-August-Universität Göttingen tätig.