

**Myokardinfarktregeneration unter
Verwendung kardiovaskulärer
Vorläuferzellen aus murinen und humanen
pluripotenten Stammzellen**

Dissertation
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen
Doktorgrades
„Doctor rerum naturalium“
der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie
der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von
Daniela Hübscher

aus Wedel/Holstein
Göttingen 2012

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Jürgen Wienands
Zelluläre und Molekulare Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Nils Brose
Molekulare Neurobiologie, Max-Planck Institut für Experimentelle Medizin,
Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. Jürgen Wienands, Zelluläre und Molekulare
Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen

Korreferent/in: Prof. Dr. Nils Brose, Molekulare Neurobiologie,
Max-Planck Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Dr. Viacheslav Nikolaev
Kardiologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Göttingen

Prof. Dr. Martin Oppermann
Zelluläre und Molekulare Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Lutz Walter
Primatengenetik, Deutsches Primaten Zentrum, Göttingen

Prof. Dr. Michael Zeisberg
Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2012

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

„Myokardinfarktregeneration unter Verwendung kardiovaskulärer Vorläuferzellen aus murinen und humanen pluripotenten Stammzellen“

selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Mittel und Referenzen angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Göttingen, November 2012

Daniela Hübscher

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Myokardinfarkt und Therapiemöglichkeiten	1
1.2 Definition und Eigenschaften von Stammzellen.....	3
1.2.1 Embryonale Stammzellen.....	5
1.2.2 Adulte Stammzellen	6
1.2.3 Multipotente adulte Keimbahnstammzellen.....	7
1.2.4 Induzierte pluripotente Stammzellen.....	8
1.3 Myokardinfarktregeneration mittels Stammzellen	10
1.3.1 Adulte Knochenmarkstammzellen	11
1.3.2 Adulte kardiale Stammzellen	13
1.3.3 Pluripotente Stammzellen.....	13
1.3.4 FLK1 positive kardiovaskuläre Vorläuferzellen	14
1.4 Tumorigenität und immunologische Aspekte bei Zelltransplantationen	17
1.4.1 Immunsystem	17
1.4.2 Tumorbildung durch Zelltransplantation und Abstoßung von Zelltransplantaten	19
1.5 Ziel dieser Arbeit.....	23
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Versuchstiere	24
2.1.2 Zelllinien.....	25
2.1.3 Oligonukleotide	26
2.1.4 Antikörper.....	27
2.1.5 Medien, Lösungen und Substanzen	29
2.1.5.1 <i>Medien, Lösungen und Faktoren für die Zellkultur</i>	<i>29</i>
2.1.5.2 <i>Lösungen und Substanzen für molekularbiologische Methoden.....</i>	<i>32</i>

2.1.5.3	<i>Lösungen und Substanzen im Tierversuch</i>	32
2.1.5.4	<i>Lösungen und Substanzen für histologische Untersuchungen</i>	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Tierverpaarung und Genotypisierung	34
2.2.2	Zellkultur	34
2.2.2.1	<i>Kultivierung von mausembryonalen Fibroblasten</i>	35
2.2.2.2	<i>Kultivierung von OP9 Stromazellen</i>	35
2.2.2.3	<i>Kultivierung von hESCs</i>	35
2.2.2.4	<i>Isolierung von SSCs</i>	36
2.2.2.5	<i>Kultivierung von SSCs</i>	36
2.2.2.6	<i>Isolierung von Mausschwanzfibroblasten</i>	37
2.2.2.7	<i>Reprogrammierung von murinen SSCs in pluripotente Stammzellen</i>	37
2.2.2.8	<i>Reprogrammierung von murinen Fibroblasten in pluripotente Stammzellen</i>	38
2.2.2.9	<i>Kultivierung von undifferenzierten maGSCs/miPSCs</i>	38
2.2.3	Pluripotenznachweise	39
2.2.3.1	<i>Alkalische Phosphatasefärbung</i>	39
2.2.3.2	<i>Epigenetische Analysen</i>	39
2.2.3.3	<i>In vitro Differenzierung von murinen iPSCs mittels hanging drop</i>	40
2.2.4	Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in kardiovaskuläre Vorläuferzellen	41
2.2.4.1	<i>In vitro Differenzierung von iPSCs/hESCs via Cokultur auf OP9 Stromazellen</i>	41
2.2.4.2	<i>In vitro Differenzierung von hESCs mittels mass culture</i>	42
2.2.5	Durchflusszytometrie und <i>Fluorescence activated cell sorting</i> (FACS)	42
2.2.6	Immunfluoreszenzfärbungen	43
2.2.7	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktions (RT-PCR)-analyse	44
2.2.7.1	<i>RNA-Isolierung</i>	44
2.2.7.2	<i>Reverse Transkription (RT)</i>	45
2.2.7.3	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	46
2.2.7.4	<i>Gelelektrophorese</i>	47
2.2.8	<i>In vivo</i> Tiermodelle	47
2.2.8.1	<i>Induktion eines Myokardinfarkts</i>	47

2.2.8.2	<i>Intrakardiale Zellinjektion</i>	48
2.2.8.3	<i>Teratombildungsanalysen durch subkutane Zellinjektion</i>	49
2.2.8.4	<i>Entnahme von Analysespräparaten</i>	50
2.2.8.5	<i>Echokardiografie</i>	50
2.2.9	Histologische Analysen	51
2.2.9.1	<i>Herstellung von Gewebeschnitten</i>	51
2.2.9.2	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	52
2.2.9.3	<i>Masson Goldner-Färbung</i>	52
2.2.10	Immunologische Analysen	53
2.2.11	Statistische Auswertungen.....	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Generierung von iPSCs aus murinen SSCs	54
3.1.1	Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von SSCs aus murinen Testis.....	55
3.1.2	Reprogrammierung von NE4 Zellen via Überexpression von OCT4	59
3.1.3	Charakterisierung der NE4O1 Zellen im Vergleich zu NE4 Zellen... 60	
3.1.3.1	<i>Morphologie und alkalische Phosphataseaktivität</i>	60
3.1.3.2	<i>Gen- und Proteinexpressionen pluripotenter Marker</i>	61
3.1.3.3	<i>In vitro Untersuchungen zum Differenzierungspotential</i>	63
3.1.3.4	<i>Teratombildung in immundefizienten Mäusen</i>	66
3.2	Generierung einer kardiovaskulären Vorläuferpopulation aus NE4O1 Zellen	67
3.2.1	Differenzierung von NE4O1 Zellen zu kardiovaskulären Vorläuferzellen mittels Cokultivierung auf OP9 Zellen.....	68
3.2.2	Separierung der FLK1 positiven Zellen mittels FACS-Technik.....	70
3.2.2.1	<i>In vitro Differenzierung von FLK1 positiven kardiovaskulären Vorläuferzellen</i>	71
3.3	In vivo Myokardinfarkt (MI)-Mausmodell	72
3.3.1	Etablierung des Myokardinfarkts und der intrakardialen Zellinjektion in der Maus	72
3.3.2	Therapeutischer Effekt von injizierten kardialen Vorläuferzellen im infarzierten Mausmyokard.....	78
3.3.2.1	<i>Histologische Untersuchungen</i>	78
3.3.2.2	<i>Echokardiografische Untersuchungen</i>	82
3.4	Immunogenitätsuntersuchungen nach allogener Zelltransplantation ..	86
3.4.1	Teratombildung nach Injektion von FLK1 positiven Zellen in immundefiziente Mäuse	86

3.4.2	Suszeptibilität von tumorigenen Zellen gegenüber natürlichen Killerzellen	87
3.4.3	Einfluss von Ciclosporin A auf die Tumorigenität.....	91
3.5	Tumorigenitätspotential von viral induzierten miPSCs.....	96
3.5.1	Generierung von miPSCs aus Schwanzfibroblasten und Prüfung der Pluripotenz.....	96
3.5.2	Teratombildung von viralen miPSCs nach autologer und syngener Transplantation	100
3.6	Kardiale Differenzierung von hESCs.....	103
4	Diskussion	107
4.1	Durch Überexpression von OCT4 induzierte Pluripotenz in adulten murinen SSCs	108
4.2	Stammzellbasierende Regeneration von Myokardinfarkten	111
4.3	Kardiovaskuläre Vorläuferzellen als Zellpopulation zur Myokardinfarktregeneration	114
4.3.1	Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in kardiovaskuläre Vorläuferzellen	114
4.3.2	Regenerationsanalysen von infarzierten Herzen mittels kardialer Vorläuferzellen	116
4.3.3	Tumorigenität von FLK1 positiven Vorläuferzellen	119
4.3.4	<i>In vivo</i> Zellenachweis nach Transplantation	120
4.4	Tumorigene Stammzellen sind ein sukzessives Ziel für allogene NK-Zellen.....	122
4.5	Einfluss von CsA in der Zelltransplantation	125
4.6	ViPSCs sind in syngener und autologer Situation nicht immunogen .	128
4.7	Ausblick	130
5	Zusammenfassung.....	132
6	Literaturverzeichnis.....	136

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
ACE:	<i>angiotensin converting enzyme</i>
AFP:	α -Fetoprotein
ATP:	Adenosintriphosphat
BMSCs:	Knochenmarkstammzellen (<i>bone marrow stem cells</i>)
BSA:	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BW:	Körpergewicht (<i>body weight</i>)
ca.:	circa
CD:	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA:	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
c-KIT:	<i>tyrosine-protein kinase Kit (CD 117)</i>
CM-DiI:	Chlormethylbenzamidoderivat des Dioctadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorats
CsA:	Ciclosporin A
cTNT:	kardiales Troponin T (<i>cardiac Troponin T</i>)
Cy3:	Indocarbocyanin
DAPI:	4',6- diamidino-2-phenylindol
DAZL:	<i>deleted in azoospermia-like</i>
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase:	Desoxyribonuklease
dNTPs:	Desoxynucleosidtriphosphate
E:	<i>embryonic day</i>
EB:	<i>embryoid body</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV:	enddiastolisches Volumen
EF:	Ejektionsfraktion (<i>ejection fraction</i>)
EGF:	<i>epidermal growth factor</i>
eGFP:	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
EHT:	<i>engineered heart tissue</i>
EiPSCs:	episomale induzierte pluripotente Stammzellen (<i>episomal induced pluripotent stem cells</i>)
ESCs:	embryonale Stammzellen (<i>embryonic stem cells</i>)

ESV:	endsystolisches Volumen
E:T:	Effektor-Target-Verhältnis
<i>et al.:</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EtOH:	Ethanol
f:	vorwärts (<i>forward</i>)
F:	Fragmentlänge
FACS:	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FITC:	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS:	fetales Kälberserum
FL:	<i>Feeder layer</i>
FLK1:	fetale Leberkinase 1
FS:	Verkürzungsfunktion (<i>fractional shortening</i>)
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFR1 α :	<i>glial cell-line-derived neurotropic factor receptor alpha</i>
hbFGF:	humaner Hauptfibroblastenwachstumsfaktor (<i>human basic fibroblast growth factor</i>)
HBSS:	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HD:	<i>hanging drop</i>
HE:	Hämatoxylin-Eosin
HW:	Herzgewicht (<i>heart weight</i>)
hESCs:	humane embryonale Stammzellen (<i>human embryonic stem cells</i>)
IgG:	Immunglobulin G
IgM:	Immunglobulin M
i.p.:	intraperitoneal
iPSCs:	induzierte pluripotente Stammzellen (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
KDR:	<i>kinase domain region</i>
KLF4:	<i>krueppel-like factor 4</i>
LDL:	<i>low density lipoprotein</i>
LIF:	Leukämiezellen inhibierender Faktor
LIN28:	<i>cell lineage abnormal 28</i>
LVEDD:	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVESD:	linksventrikulärer endsystolischer Diameter
MASH1:	<i>Achaete-scute complex-like 1</i>
maGSCs:	multipotente adulte Keimbahnstammzellen (<i>multipotent adult germline stem cells</i>)
M-CSF:	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MEFs:	murine embryonale Fibroblasten

mESCs:	murine embryonale Stammzellen (<i>murine embryonic stem cells</i>)
MF20:	sarkomeres Myosin
MG:	Masson Goldner
mGDNF:	<i>murine glial-derived neurotrophic factor</i>
MHC:	<i>Myosin heavy chain</i>
MHC- Klasse I/II:	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I/II (<i>major histocompatibility complex class I/II</i>)
MI:	Myokardinfarkt
miPSCs:	murine induzierte pluripotente Stammzellen (<i>murine induced pluripotent stem cells</i>)
MMC:	Mitomycin C
MOI:	Multiplizität der Infektion
mRNA:	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MSCs:	mesenchymale Stammzellen
MTG:	α -Monothioglycerol
NADH:	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NEAA:	Nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non-essential amino acids</i>)
NEO:	Neomycinresistenzgen
NFAT:	<i>nuclear factor of activating T cells</i>
NK-Zellen:	natürliche Killerzellen
NSCs:	neurale Stammzellen (<i>neural stem cells</i>)
OCT4:	Octamer 4
p:	Passage
DPBS:	Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR:	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE:	Phycoerythrin
PLZF:	<i>promyelocytic leukaemia zinc finger</i>
r:	rückwärts (<i>reverse</i>)
RNA:	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase:	Ribonuklease
RT-PCR:	reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
SCA1:	<i>stem cell antigen-1</i>
SCID:	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SOX2:	<i>sex determining region Y (SRY)-box2</i>
SSCs:	spermatogoniale Stammzellen (<i>spermatogonial stem cells</i>)
SSEA1:	<i>stage-specific embryonic antigen 1</i>

SSEA4:	<i>stage-specific embryonic antigen 4</i>
STRA8:	<i>stimulated by retinoic acid gene 8</i>
T _A :	Annealingtemperatur
TAC:	<i>transaortic constriction</i>
Taq:	<i>thermus aquaticus</i>
Tris:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vs.:	gegen (<i>versus</i>)
ViPSCs:	viral induzierte pluripotente Stammzellen (<i>viral induced pluripotent stem cells</i>)
Z:	Zyklenanzahl
ZTE:	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen
α -SMA:	<i>α- smooth muscle actin</i>
β -ME:	β -Mercaptoethanol

Einheiten

bp:	Basenpaare
cm:	Zentimeter
d:	Tag (<i>day</i>)
g:	Gramm
g:	Erdbeschleunigung
IE:	Injektionseinheiten
kb:	Kilobasen
kg:	Kilogramm
mg:	Milligramm
min:	Minuten
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
mM:	Millimol
ng:	Nanogramm
sek:	Sekunden
U:	Unit
V:	Volt
μ g:	Mikrogramm
μ l:	Mikroliter
μ M:	Mikromol
°C:	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Schematische Darstellung des Differenzierungspotentials von Stammzellen während der Embryonalentwicklung	4
Abb.2:	Schematische Darstellung der mesodermalen Entwicklungsstadien von kardiovaskulären Zellen.....	16
Abb.3:	Beispiel einer Genotypisierungs-PCR-Analyse	54
Abb.4:	Morphologische Struktur der isolierten SSCs unterschiedlicher Passagen....	55
Abb.5:	Genexpressionsanalysen der isolierten SSCs.....	56
Abb.6:	Proteinexpressionsanalysen der isolierten SSCs.....	57
Abb.7:	Epigenetische Analysen.....	58
Abb.8:	Überprüfung der chromosomalen Integration von <i>Oct4</i>	60
Abb.9:	Morphologie und alkalische Phosphataseaktivität der NE4, NE4O1 und maGSCs	61
Abb.10:	Vergleichende Genexpressionsanalysen von NE4O1, NE4, maGSCs und MEFs.....	62
Abb.11:	Immunfluoreszenzfärbungen zur Charakterisierung der NE4O1 Zellen	63
Abb.12:	Genexpressionsanalysen zur Differenzierung der NE4O1 Zellen	64
Abb.13:	Immunfluoreszenzfärbungen zum Differenzierungspotential der NE4O1 Zellen	65
Abb.14:	Grün fluoreszierender schlagender Zellverband nach G418 Selektion.....	66
Abb.15:	Teratombildung von NE4O1 Zellen nach subkutaner Injektion in immundefiziente RAGC Mäuse.....	67
Abb.16:	Morphologie der NE4O1 Zellen während der Differenzierung auf OP9.....	68
Abb.17:	Durchflusszytometrieanalysen zur Etablierung des Protokolls der Cokultivierung von NE4O1 Zellen auf OP9.....	69
Abb.18:	Immunfluoreszenzfärbungen einer differenzierten NE4O1 Kolonie an Tag sechs.....	70
Abb.19:	Separierung der differenzierten FLK1 positiven Zellen an Tag sechs mittels FACS-Technik	70
Abb.20:	Weiterführende Differenzierung der FLK1 positiven sortierten Zellen	71
Abb.21:	Anzahl der α -SMA, cTNT und MF20 positiven Zellen an Tag neun der Differenzierung nach Replattierung der FLK1 Positiv- und Negativpopulation	72
Abb.22:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Herzschnitten mit NaCl-Injektion	73
Abb.23:	Masson Goldner-Färbung von Herzschnitten mit NaCl-Injektion.....	74
Abb.24:	Echokardiografische Analysen von SHAM und MI-induzierten Mäuseherzen.....	76
Abb.25:	Zellansammlungen und Fluoreszenzen von injizierten Zellen im Myokard...	77
Abb.26:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Herzschnitten mit Zellinjektion.....	79
Abb.27:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Zellansammlungen im Myokard	79
Abb.28:	Masson Goldner-Färbung von Herzschnitten mit Zellinjektion	80
Abb.29:	Darstellung des Fibrosegrades im Vergleich zur Gesamtfläche des Herzens. 81	

Abb.30:	Echokardiografische Analysen der Myokardinfarktstudie- Ejektionsfraktion.....	82
Abb.31:	Echokardiografische Analysen der Myokardinfarktstudie- Verkürzungsfraktion	84
Abb.32:	Echokardiografische Analysen der Myokardinfarktstudie- Herzgewicht/Körpergewicht	85
Abb.33:	Teratombildung von FLK1 positiven Zellen nach subkutaner Injektion in immundefiziente RAGC Mäuse.....	87
Abb.34:	Intrakardiale Teratombildung nach Injektion von undifferenzierten maGSCs in immundefiziente RAGN Mäuse	88
Abb.35:	Immunologische Analyse der NK-Zellaktivität auf maGSCs.....	90
Abb.36:	Teratombildung von undifferenzierten maGSCs in immundefizienten Mäusen mit und ohne CsA-Behandlung.....	92
Abb.37:	Immunologische Analyse der NK-Zellaktivität auf maGSCs mit und ohne CsA-Behandlung.....	94
Abb.38:	Anzahl der isolierten Splenozyten	95
Abb.39:	Morphologie der isolierten Fibroblasten und der generierten iPSCs.....	96
Abb.40:	Genexpressionsanalysen der generierten iPSCs aus murinen Schwanzfibroblasten.....	97
Abb.41:	Immunfluoreszenzfärbungen der generierten iPSCs aus murinen Schwanzfibroblasten.....	98
Abb.42:	Genexpressionsanalysen während der Differenzierung der generierten iPSCs.....	99
Abb.43:	Teratombildung von generierten iPSCs aus murinen Schwanzfibroblasten nach subkutaner Injektion in immundefiziente RAGN Mäuse.....	100
Abb.44:	Teratombildung von generierten iPSCs aus Schwanzfibroblasten nach autologer subkutaner Injektion in Donor-Wildtypmäuse.....	101
Abb.45:	NK-Zellaktivitätsanalysen der autolog injizierten Versuchstiere	102
Abb.46:	Morphologie einer undifferenzierten humanen embryonalen Stammzell- kolonie	103
Abb.47:	Morphologie der hESCs während der unterschiedlichen Differenzierungs- verfahren	104
Abb.48:	Durchflusszytometrieanalysen zu den humanen Differenzierungs- verfahren	105
Abb.49:	Immunfluoreszenzfärbungen von differenzierten hESCs	105

Tabellenverzeichnis

Tab.1:	Oligonukleotide	26
Tab.2:	Primärantikörper	27
Tab.3:	Sekundärantikörper	28
Tab.4:	Reverse Transkriptions (RT)-Ansatz	45
Tab.5:	PCR-Ansatz	46

1 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind eine der Haupttodesursachen in den industrialisierten Ländern. Laut des deutschen Statistikamtes sind im Jahr 2010 in Deutschland 353.000 Menschen an den Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen gestorben (www.destatis.de, 07.07.2012). Zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen neben rheumatischen Erkrankungen, Hypertonie, pulmonale und zerebrovaskuläre Krankheiten und Erkrankungen des Gefäßsystems auch die ischämischen Herzkrankheiten (ICD-10-WHO Version 2011: www.dimdi.de, 27.07.2012). Den ischämischen Herzerkrankungen werden koronare Herzkrankheiten zugeordnet, die aufgrund eines verminderten Sauerstoffangebots häufig in einem Myokardinfarkt resultieren. 6,5% der Patienten, die im Jahr 2010 den Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen erlagen, starben aufgrund eines akuten Myokardinfarkts. Der Anteil von männlichen Personen (7,5%) ist hierbei höher ausgeprägt als der von Frauen (5,5%), wobei hauptsächlich ältere Menschen betroffen sind. Im Jahr 2010 starben in der Altersgruppe 70-75 Jahre 14.392 Patienten an einer ischämischen Herzerkrankung. Der Wert der 65-70 Jährigen lag bei 7.882 Personen. Die Zahl der Erkrankten unter 65 Jahre nimmt jedoch stetig zu (www.destatis.de, 07.07.2012). Studien zeigten, dass 30-40% der Patienten innerhalb des ersten Jahres nach Diagnose ihrer Herz-Kreislauf-Erkrankung erlagen. 60-70% der Patienten starben in den darauf folgenden fünf Jahren (Bleumink *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 1993; Lloyd-Jones *et al.*, 2002; McMurray und Pfeffer, 2005). Da viele koronare Herzerkrankungen in einem Herzinfarkt resultieren, stellt dieser eine der Haupttodesursachen neben einem Hirnschlag dar.

1.1 Myokardinfarkt und Therapiemöglichkeiten

Ein Myokardinfarkt resultiert aus der Verengung oder dem Verschluss von Herzkranzgefäßen. Die Verengung der Gefäße erfolgt durch Blutgerinnselbildungen (Koronarthrombosen) oder Koronarspasmen. Aufgrund des Verschlusses von Herzkranzgefäßen kommt es zu einer Minderdurchblutung von Herzgewebereichen. Zu den Risikofaktoren für das Auftreten eines Myokardinfarkts zählen Nikotinkonsum, Diabetes mellitus, Störung des

Fettstoffwechsels (meist eine erhöhte LDL-Konzentration), erbliche Vorbelastung und Hypertonie (Yusuf *et al.*, 2004). Symptomatisch zeichnet sich ein Myokardinfarkt durch ein retrosternales Druckgefühl aus, welches sich in Schmerzen über den gesamten Oberkörper ausbreiten kann. Der vom Blutkreislauf abgeschnittene Gewebereich wird angesichts der mangelnden Blutzufuhr nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt. Dies führt zu Unterbrechungen energieliefernder mitochondrialer Vorgänge, wie der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung, welche in einem mitochondrialen Anstieg des Coenzym NADH resultieren. Im Gegenzug nimmt die ATP-Konzentration in den Kardiomyozyten ab, welches zu einer gesteigerten Glykogenolyse führt. Durch die gesteigerte Glykogenolyse kann der Abfall des myokardialen ATPs zunächst verlangsamt werden. Der Grad der Myokarddegeneration basiert auf der Dauer der Minderdurchblutung. Erst ca. 30 Minuten nach Verschluss des Herzgefäßes liegen nur noch 10% des Normalwerts an ATP vor. Durch die hohe vorliegende NADH Konzentration (beeinflusst die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase) kann die Glykogenolyse jedoch nur ein Viertel der Geschwindigkeit erreichen, die unter aeroben Bedingungen vorliegt. Ebenfalls können die entstandenen Stoffwechselprodukte nicht abtransportiert werden (Löffler, 2007). In den minderdurchbluteten Bereichen kommt es auch zu lokalen Cytokinausschüttungen, welche die Apoptose stimulieren und zu einer Degradation der myokardialen Matrix führen (Olivetti *et al.*, 1997; Saraste *et al.*, 1997; Wilson, 2003). Durch inflammatorische Reaktionen, wie Makrophageninfiltration oder Narbengewebsbildung, kommt es zur Nekrose von Myokardzellen. Die Apoptose und Nekrose der Kardiomyozyten führt zu einer verminderten Pumpleistung des Herzens, welche in einer ventrikulären Dilatation resultiert (Anversa *et al.*, 1996; Dickstein *et al.*, 2008; Diwan und Dorn, 2007; Dorn und Force, 2005; Nadal-Ginard *et al.*, 2003; Sadoshima *et al.*, 1993).

Zur Diagnose eines Myokardinfarkts werden Elektrokardiogramme (im Akutfall ST-Strecken-Hebungen), Echokardiografien (Wandbewegungsstörungen) und Analysen von Biomarkern im Blut durchgeführt. Durch absterbende Kardiomyozyten werden spezifische Proteine freigesetzt wie kardiales Troponin, Kreatin Kinase MB oder Glykogenphosphorylase BB.

Zur Therapie eines Myokardinfarkts gibt es verschiedene Ansatzpunkte. Zum einen kann in der frühen Phase des Infarkts eine Reperfusionstherapie erfolgen, bei der

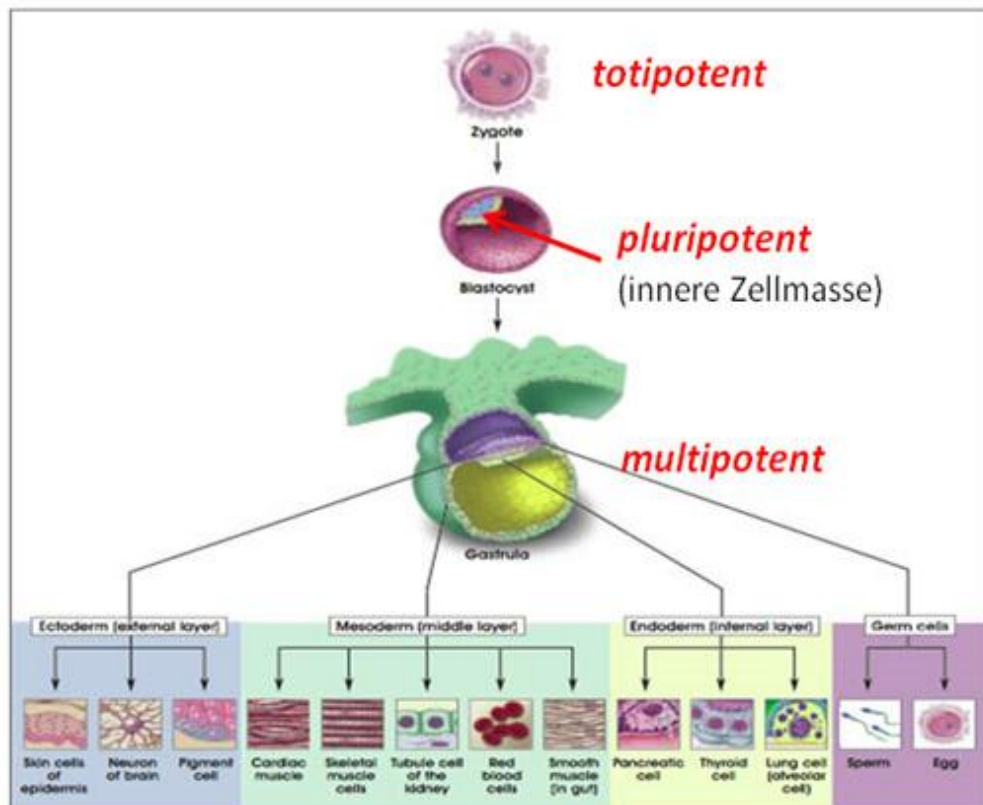
durch eine Revaskularisierung des verengten Gefäßes die Durchblutung wiederhergestellt wird. Hierbei wird die Eröffnung durch eine Ballondilatation oder Stentimplantation aufrechterhalten oder durch Gabe eines Lysemittels eine Auflösung des Gerinnsels hervorgerufen. Je länger der Verschluss eines Koronargefäßes andauert, desto größer ist die Apoptoserate der Kardiomyozyten. Die erhöhte Degradation von Kardiomyozyten führt zu einer Vernarbung des Myokards, die häufig in einer starken Herzinsuffizienz resultiert. Demzufolge werden Myokardinfarktpatienten lebenslang mit Medikamenten therapiert, um resultierende Erkrankungen, wie Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz zu behandeln. Zu dieser Medikation zählen Blutdrucksenker (ACE-Hemmer), Betablocker, Lipidsenker (Statine) und Gerinnungshemmer (Smith *et al.*, 2011). Durch die verminderte Pumpfunktion des Herzens nach einem Infarkt und der daraus resultierenden körperlichen Einschränkung sind die Patienten in ihrem Alltag sehr limitiert.

Eine weitere Möglichkeit der Therapie besteht in der Herztransplantation, wobei die Anzahl der zur Verfügung stehenden Spenderorgane sehr gering ist. Aus diesem Grund sind neue Therapieansätze von Nöten. Seit den 90er Jahren gibt es Versuche die Regeneration infarzierten Gewebes mittels Stammzellen anzuregen, um ein Organversagen zu verhindern.

1.2 Definition und Eigenschaften von Stammzellen

Stammzellen sind sowohl durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, als auch durch ihr Potential zur Differenzierung in ausgereifte Zellen charakterisiert. Es gibt verschiedene Arten von Stammzellen, die sich durch ihr ontogenetisches Alter und ihr Differenzierungspotential unterscheiden. Je nach Alter unterscheidet man embryonale, fetale oder adulte Stammzellen. Das Differenzierungspotential lässt sich in totipotent, pluripotent, multipotent und unipotent unterteilen (Abb. 1). Totipotente (lat. *totus* = ganz, voll, in vollem Umfang) Stammzellen besitzen die Fähigkeit sich zu eigenständigen Individuen zu entwickeln (Nagy *et al.*, 1993). Zu diesen Zellen werden die Zygote und die Blastomere bis zum Achtzellstadium gezählt. Pluripotente (lat. *plures* = mehr, mehrere) Stammzellen befinden sich in der inneren Zellmasse der Blastozysten und sind in der Lage in alle Zellarten der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) und in Keimbahnzellen zu differenzieren

(Mountford *et al.*, 1998). Extraembryonales Gewebe zur Bildung eines neuen Organismus kann jedoch nicht gebildet werden. Diese Definition trifft beispielsweise auf die embryonalen Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESCs) zu, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden.



Modifiziert, de.academic.ru/.../67/Cell_differentiation 2010/05

Abb. 1: Schematische Darstellung des Differenzierungspotentials von Stammzellen während der Embryonalentwicklung. Das Differenzierungspotential der Stammzellen nimmt im Laufe der Entwicklung ab. Die Zygote bis zum Achtzellstadium wird als totipotent bezeichnet. Stammzellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste sind pluripotent. Multipotente Stammzellen sind in ihrem Differenzierungspotential soweit eingeschränkt, dass nur noch einige unterschiedliche Zelllinien gebildet werden können. Unipotente Stammzellen sind auf die Differenzierung von Zellen einer Zelllinie beschränkt. Adulte Stammzellen sind in ihrem Differenzierungspotential den multipotenten oder unipotenten Stammzellen zuzuordnen.

Multipotente (lat. *multi* = viel) Stammzellen weisen ein begrenztes entwicklungsbiologisches Potential auf und können nur verschiedene Abkömmlinge der drei Keimblätter bilden, jedoch nicht in alle Zellarten der drei Keimblätter differenzieren (z.B. hämatopoietische Stammzellen). Unipotente Stammzellen haben lediglich die Fähigkeit Zellen einer spezifischen Zelllinie zu bilden. Ein Beispiel

hierfür bilden die spermatogonialen Stammzellen (*spermatogonial stem cells*, SSCs) (Wobus und Boheler, 2005). Adulte Stammzellen besitzen ein unipotentes oder multipotentes Differenzierungspotential.

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESCs) werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen. 1981 wurden erstmals ESCs aus Mausblastozysten isoliert (Evans und Kaufman, 1981). 1998 wurden die ersten humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) gewonnen (Thomson *et al.*, 1998). Durch geeignete Kulturbedingungen konnten ESCs *in vitro* nahezu unbegrenzt vermehrt und im pluripotenten Status gehalten werden, da sich undifferenzierte ESCs durch eine hohe alkalische Phosphatase- und Telomerase-Aktivität auszeichnen (Scholer *et al.*, 1989). Im Gegensatz dazu stellen primäre Körperzellen ihre Teilungsaktivität *in vitro* aufgrund der replikativen Seneszenz rasch ein.

Die Pluripotenz von Stammzellen basiert auf einem komplexen System von Signalmolekülen und Gennetzwerken (Medvedev *et al.*, 2010). Das Zentrum dieser Netzwerke nehmen die Transkriptionsfaktoren OCT4 (*Octamer binding transcription factor 4*), SOX2 (*sex determining region Y (SRY)-box 2*) und NANOG (Homöoboxprotein) ein (Boyer *et al.*, 2005; Liu, *et al.*, 2007; Loh *et al.*, 2006). OCT4 wird in undifferenzierten toti- und pluripotenten Zellen exprimiert und ist für die Erhaltung der Pluripotenz wichtig (Scholer *et al.*, 1989). Als weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor wird SOX2 in pluri- und multipotenten Stammzellen gebildet. SOX2 ist mit für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung der Stammzellen verantwortlich und fördert zusammen mit OCT3/4 die Pluripotenz. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, NANOG, wird vor allem in pluripotenten Zellen exprimiert (Chambers *et al.*, 2003; Ying *et al.*, 2003). Ebenfalls präsentieren pluripotente Stammzellen das Oberflächenantigen SSEA1 (*stage specific embryonic antigen 1*) in der Maus und SSEA3/4 (*stage specific embryonic antigen 3/4*) in humanen Organismen. Pluripotente Stammzellen zeichnen sich durch ein spezifisches Expressionsmuster und einen charakteristischen epigenetischen Status aus (Medvedev *et al.*, 2010).

Das pluripotente Differenzierungspotential der ESCs wurde *in vitro* bereits in vielen Arbeiten nachgewiesen. So gelang es Wobus *et al.* ESCs in Herzmuskelzellen zu

differenzieren (Wobus *et al.*, 1991). Rohwedel *et al.* zeigten die Differenzierung in Skelettmuskelzellen (Rohwedel *et al.*, 1994). Auch die Differenzierung in neuronale Zellen und Hepatozyten gelang (Bain *et al.*, 1995; Teratani *et al.*, 2005).

Eine weitere Eigenschaft von pluripotenten Zellen ist die Entwicklung von Teratomen bei Injektion in immundefiziente Tiere (Thomson *et al.*, 1998). Hierbei entwickeln die injizierten Zellen Teratome, die Zellen des Endoderms, des Mesoderms und des Ektoderms beinhalten. Für murine Stammzellen kann ebenfalls die Chimärenbildung als Nachweis der Pluripotenz herangezogen werden. Hierbei werden die Stammzellen mit einem frühen Embryo im Status der Furchung oder der Blastozyste verschmolzen. Die hieraus entstehenden Nachkommen weisen Charakteristika beider Ursprungsembryonen bzw. Zellen auf, die sogenannten Chimäre (Nagy *et al.*, 1990; Nagy *et al.*, 1993).

HESCs führen aufgrund der ethischen Kontroverse und des Embryonenschutzgesetzes in Deutschland zu Problemen in der Gewinnung und Therapie. In Deutschland ist die Forschung mit hESCs streng reguliert. Die Gewinnung von hESCs aus generierten Embryonen ist untersagt. Auf Antrag und Prüfung durch die zentrale Ethik-Kommission für Stammzellforschung können hESCs aus dem Ausland importiert werden. Diese Stammzellen dürfen jedoch nicht nach dem 1. Mai 2007 gewonnen worden sein. Um die Ethikproblematik der hESCs zu umgehen wird nach anderen Zellursprüngen für die stammzellbasierte Therapie gesucht.

1.2.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen kommen im Körper in sogenannten Nischen vor, um körpereigene Zellen zu regenerieren. Diese Nischen befinden sich unter anderem im Knochenmark, im Verdauungstrakt in den Darmkrypten oder in der Epidermis der Haut (Alonso und Fuchs, 2003; Becker *et al.*, 1963; Bjerknes und Cheng, 1981). Die adulten Stammzellen haben den Vorteil, dass der Zelldonor ebenfalls Akzeptor sein kann, weisen jedoch nur ein eingeschränktes Differenzierungspotential auf. Um den ethischen Konflikt der Embryonen verbrauchenden Forschung zu umgehen und dennoch das Potential der regenerativen Zellen auszuschöpfen, sind postembryonale Stammzellen mit dem Differenzierungspotential von ESCs für die regenerative Therapie interessant. Ebenso könnten Immunreaktionen bzw. die permanente

Einnahme von Immunsuppressiva nach einer Transplantation durch eine autologe Behandlung mit diesen Zellen möglicherweise umgangen werden.

Lange Zeit wurde angenommen, dass adulte Stammzellen organspezifisch und somit in Forschungsprojekten nur eingeschränkt nutzbar sind. Allerdings wurden sowohl Transdifferenzierungen von adulten Stammzellen über die Gewebe- und Organgrenze hinaus (Grimaldi *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2002; Sarig *et al.*, 2010; Toma *et al.*, 2001) als auch Reprogrammierungen in pluripotente Stammzellen gezeigt (Guan *et al.*, 2006; Takahashi und Yamanaka, 2006).

1.2.3 Multipotente adulte Keimbahnstammzellen

Guan *et al.* gelang es undifferenzierte unipotente SSCs aus adulten Mäusehoden zu isolieren, die physiologisch für die Bildung der Spermien verantwortlich sind (Guan *et al.*, 2006). SSCs sind an der Basalmembran der Testistubuli lokalisiert und bilden einen Anteil von 0,02-0,03% des Gesamthodengewebes (Tegelenbosch und de Rooij, 1993). SSCs exprimieren keimbahnspezifische Markerproteine (Castrillion *et al.*, 2000; Costoya *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2010; Oulad-Abdelghani *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 2007), wie das promyelozytische leukämische Zinkfingerprotein (PLZF), den *glial cell-line-derived neurotrophic factor alpha* Rezeptor (GFR1 α), das *stimulated by retinoic acid gene 8* (STRA8), VASA und das *deleted in azoospermia-like protein* (DAZL).

Durch spezifische Kultivierungsbedingungen konnten diese Zellen spontan in einen pluripotenten Zustand reprogrammiert werden. Diese Zellen besitzen ein Regenerationspotential und sind in der Lage, die Pluripotenz von ESCs zu erreichen. Diese Zellen werden auch als multipotente adulte Keimbahnstammzellen (*multipotent adult germline stem cells*, maGSCs) bezeichnet. Die maGSCs sind alkalische Phosphatase positiv und exprimieren Pluripotenzmarker wie den Transkriptionsfaktor OCT4. Werden maGSCs in immundefiziente Mäuse injiziert, kommt es zur Bildung von Teratomen. *In vitro* konnte über *embryoid bodies* (EBs), eine spontane Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter (Guan *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2007; Streckfuss-Bomeke *et al.*, 2009) und männliche Keimbahnzellen (Nolte *et al.*, 2010) hervorgerufen werden.

Auch anderen Arbeitsgruppen gelang es SSCs zu isolieren und spontan durch Kultivierung in einen pluripotenten Status zu konvertieren. Ko *et al.* gelang es

unipotente adulte und neonatale Keimbahnstammzellen der Maus in pluripotente Stammzellen durch Kultivierungsbedingungen zu konvertieren (Ko *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2010). Testikuläre Zellen aus neonatalen Mäusen führten ebenfalls zu pluripotenten Stammzellen (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004), den sogenannten multipotenten Keimbahnstammzellen. Ebenfalls konnten SSCs aus bis zu einem Jahr alten Mäusen isoliert und spontan reprogrammiert werden (Seandel *et al.*, 2007).

Auch aus humanem Testisgewebe wurden bereits SSCs isoliert und spontan in pluripotente Stammzellen konvertiert (Conrad *et al.*, 2008; Golestaneh *et al.*, 2009; Kossack *et al.*, 2009; Mizrak *et al.*, 2010). Tapia *et al.* überprüften und verglichen diese Ergebnisse und stellten fest, dass die angegebenen Zellen von Conrad *et al.*, Kossack *et al.*, Golestaneh *et al.* und Mizrak *et al.* nicht eindeutig als pluripotent bezeichnet werden konnten (Tapia *et al.*, 2011). Tapia *et al.* kritisierten die durchgeführten Genexpressionen und zeigten in Microarray-Analysen, dass die als pluripotent angegebenen humanen Zellen in der Genanalyse eher humanen testikulären Fibroblasten ähneln. Ebenfalls zeigte keiner der oben genannten Arbeitsgruppen eine eindeutig erfolgreiche Teratombildung dieser Zellen in immundefizienten Tieren. Die injizierten Zellen zeigten häufig keine oder nur eine geringe Proliferation auf, und schienen somit nicht vollständig reprogrammiert vorzuliegen. Ebenso ist der Ursprung dieser angegebenen pluripotenten Zellen unklar, da meist keine reine SSC-Linie konvertiert wurde, sondern häufig eine Mehrzahl testikulärer Zellen (Golestaneh *et al.*, 2009; Kossack *et al.*, 2009; Mizrak *et al.*, 2010). Zur Übertragung der gewonnenen Ergebnisse der murinen etablierten pluripotenten Stammzellen aus den SSCs auf den Menschen müssten noch weitere Analysen durchgeführt und die Kultur einer humanen stabilen SSC-Linie etabliert werden.

1.2.4 Induzierte pluripotente Stammzellen

Die induzierten pluripotenten Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) stellen eine weitere pluripotente Stammzellart dar. Diese werden aus somatischen Körperzellen durch Anregung von pluripotenzspezifischen Transkriptionsfaktoren generiert. Die ektopische Überexprimierung der Pluripotenzgene kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. 2006 zeigten Takahashi und Yamanaka erstmals die Reprogrammierung von murinen Fibroblasten mittels viraler Transduktion durch

einen Gencocktail von *c-Myc*, *Oct4*, *Klf4* (*krueppel-like factor 4*) und *Sox2* (Takahashi und Yamanaka, 2006). Die Ergebnisse von Takahashi und Yamanaka wurden von anderen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Ausgangszellen bestätigt (Maherali *et al.*, 2007; Okita *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007). Yu *et al.* etablierten 2007 die virale Reprogrammierung mit der Genkombination von *Nanog*, *Lin28* (*cell lineage abnormal 28*), *Oct4* und *Sox2* (Yu *et al.*, 2007). Somit wurden erstmals die protoonkogenen Faktoren wie c-MYC und KLF4 vernachlässigt (Medvedev *et al.*, 2010; Okita *et al.*, 2007). LIN28 ist in der zeitlichen Steuerung der Embryonalentwicklung beteiligt.

Vielfältige Methoden zur Reprogrammierung von adulten Zellen sind mittlerweile etabliert. Neben Retro- oder Adenoviren werden mittlerweile auch Plasmide (Stadtfeld *et al.*, 2008) und rekombinante Proteine (Zhou *et al.*, 2009) verwendet. Ein Vorteil der Induktion mittels Proteinen besteht in der unveränderten Erbstruktur der Akzeptorzellen. Die Effizienz dieser Methoden ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Durch Zugabe von chemischen Substanzen wie DNA Methyltransferase, Histon Deacetylase und Valproinsäure, konnte die Effizienz der Reprogrammierung erhöht werden (Huangfu *et al.*, 2008a; Huangfu *et al.*, 2008b).

Kim *et al.* zeigten, dass je nach Ausgangszellart auf verschiedene Transkriptionsfaktoren bei der Reprogrammierung verzichtet werden konnte, da die zu reprogrammierenden Zellen bereits eine hohe endogene Expression der nicht verwendeten Transkriptionsfaktoren aufwiesen. Murine und humane neurale Stammzellen konnten durch ektopische Expression von *Oct4* und *Klf4* und später auch durch den Transkriptionsfaktor *Oct4* allein reprogrammiert werden (Kim *et al.*, 2009a; Kim *et al.*, 2009b; Kim *et al.*, 2008). Die Gene *c-Myc*, *Klf4* und *Sox2* werden auch in vielen adulten Geweben exprimiert, und können somit durch andere Orthologe zur Reprogrammierung ersetzt werden (Hochedlinger und Plath, 2009; Nakagawa *et al.*, 2008).

Durch die Reprogrammierung von somatischen Körperzellen wie Keratinozyten oder Fibroblasten besteht die Möglichkeit patientenspezifische iPSCs herzustellen (Bellin *et al.*, 2012; Dimos *et al.*, 2008; Ebert *et al.*, 2009; Novak *et al.*, 2012; Streckfuss-Bomeke *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012). Diese Zellen weisen einen hohen Stellenwert in der medizinischen Forschung auf, da so Krankheitsmodelle, Therapiemöglichkeiten und immunologische Aspekte, durch autologe Zellanalysen, besser untersucht werden können.

1.3 Myokardinfarktregeneration mittels Stammzellen

Schätzungen zur Folge führt ein starker Myokardinfarkt zu einem Verlust von ein bis zwei Milliarden funktionellen Kardiomyozyten. Einige Studien zeigten, dass nach einer Schädigung des Herzens residente kardiale Zellen die Fähigkeit zur Selbstregeneration aufweisen (Choi *et al.*, 2012). Studien an Zebrafischen und Molchen befassten sich mit der Teilungsrate von kardialen Zellen. Im gesunden Myokard ist die Teilungsrate von Kardiomyozyten gering, bei Verletzungen dagegen nimmt die Teilungsrate stark zu (Borchardt und Braun, 2007; Oberpriller *et al.*, 1974, Poss *et al.*; 2002, Poss, 2007). Die endogene Fähigkeit zur Regeneration des Herzens ist in Säugetieren limitiert (Porello *et al.*, 2011). Porello *et al.* zeigten, dass Herzen von einem Tag alten neonatalen Mäusen in der Lage sind sich nach einer chirurgischen Teilresektion zu regenerieren (Porello *et al.*, 2011). Diese Fähigkeit ist jedoch sieben Tage nach der Geburt nicht mehr vorhanden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Herz von Säugetieren nur eine kurze Zeit nach der Geburt noch die Fähigkeit zur Regeneration besitzt. Studien fanden heraus, dass die Erneuerungsrate der Kardiomyozyten in adulten Mausherzen bei 1,095% pro Jahr beträgt (Soonpaa *et al.*, 1997). Bergmann *et al.* zeigten, dass die mitotische Erneuerungsrate der Kardiomyozyten im humanen Herz bei 1% im Alter von 25 Jahren und 0,45% im Alter von 75 Jahren liegt. Die Teilungsrate lässt darauf schließen, dass die meisten Kardiomyozyten während eines Lebens nicht erneuert werden (Bergmann *et al.*, 2009).

Um durch ischämisches Herzleiden geschädigtes Herzgewebe zu regenerieren, wurden bislang eine Vielzahl verschiedener Zellarten in zellbasierenden Studien eingesetzt, wie fetale und neonatale Kardiomyozyten, residente skelettale Myoblasten, Knochenmarkstammzellen bzw. Vorläuferzellen und aus ESCs differenzierte Kardiomyozyten (Guan und Hasenfuss, 2007; Rubart *et al.*, 2008). Hierbei wurden die Zellen im Grenzbereich zum infarzierten Gewebe in das Myokard injiziert, durch perkutane koronare Intervention ins Herz geleitet oder intravenös appliziert. Die intravenöse Applikation hat den Vorteil der geringen Invasivität, die genaue Applikation und die genaue Zellzahl kann durch die Verbreitung durch den Blutkreislauf jedoch nicht gewährleistet werden (Templin *et al.*, 2011).

Studien mit fetalen und neonatalen Kardiomyozyten zeigten, dass kardial injizierte exogene Zellen in der Lage sind strukturell und funktionell mit dem Wirtmyokard zu integrieren (Rubart *et al.*, 2003). Für die humane regenerative Therapie sind diese Zellen jedoch aufgrund des ethischen und immunologischen Aspekts nicht verfügbar. Transplantationen von skelettalen Myoblasten in geschädigtes Herzgewebe führten zu Funktionssteigerungen des Herzens. Das Fehlen von *gap junctions* zwischen den injizierten Zellen und den Wirtmyokard stellt jedoch, durch Blockierung der Weiterleitung und Bildung von proarrhythmogenen Faktoren, einen entscheidenden Nachteil dar (Gepstein *et al.*, 2010; Henning, 2011).

1.3.1 Adulte Knochenmarkstammzellen

Knochenmarkstammzellen (*bone marrow stem cells*, BMSCs) gehören zu den am besten charakterisierten Stammzellen (Choi *et al.*, 2012). Eine Vielzahl von Studien zeigten einen positiven Effekt bei der Behandlung von Herzkrankheiten mit BMSCs (Kajstura *et al.*, 2005; Orlic *et al.*, 2001c; Yoon *et al.*, 2005). Die BMSCs stellen jedoch keine homologe Population dar. Sie beinhalten verschiedene Zelllinien wie die hämatopoietischen Stammzellen. Isolierte c-KIT (*tyrosine-protein kinase kit*) positive Zellpopulationen führten nach Injektion im Tiermodell zu einer verbesserten Herzfunktion (Orlic *et al.*, 2001c; Templin *et al.*, 2008). Auch CD133 (*cluster of differentiation 133*) positive hämatopoietische Stammzellen zeigten eine Erhöhung der linksventrikulären Ejektionsfraktion nach Transplantation (Mansour *et al.*, 2010). Eine weitere Linie der Knochenmarkzellen stellen die endothelialen Vorläuferzellen dar. Diese Zellen sind nicht in der Lage zu Kardiomyozyten zu differenzieren. Trotzdem führte eine Transplantation dieser Zellen zu einer verbesserten Herzfunktion (Gruh *et al.*, 2006; Jujo *et al.*, 2008; Leone *et al.*, 2008). Dieser Effekt beruhte auf der Förderung von Angiogenese, durch parakrin ausgesandte angionetische Cytokine und Versorgung des Herzens mit Sauerstoff und spezifischen Nährstoffen zur Anregung und Teilung von Wirtkardiomyozyten (Choi *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2005). Es wurden bereits verschiedene klinische Studien durchgeführt. In einer randomisierten Studie wurden Knochenmarkvorläuferzellen autolog in Patienten, die unter einem akuten Myokardinfarkt litten, appliziert. Hierbei konnte sechs Monate nach der Behandlung eine Funktionsverbesserung der links ventrikulären Ejektionsfraktion diagnostiziert werden (Wollert *et al.*, 2004). Eine

weitere Studie von 204 Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigte ebenfalls, dass nach einer Applikation der BMSCs eine Erhöhung der linksventrikulären Ejektionsfraktion und eine Reduktion der Infarktgröße auftrat (Schachinger *et al.*, 2006a). Auch 12 Monate nach dieser intrakoronaren Injektion von BMSCs konnte eine Abnahme der Inzidenz des Myokardinfarkts oder Revaskularisierung beobachtet werden (Schachinger *et al.*, 2006b). Andere klinische Studien zeigten keine signifikanten Verbesserungen der links ventrikulären Ejektionsfraktion (Tendera *et al.*, 2009).

Mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSCs) konnten ebenfalls aus dem Knochenmark, aus Fettgewebe und anderen Organen (Uccelli *et al.*, 2008) isoliert werden. Die Fähigkeit *in vivo* in Kardiomyozyten zu differenzieren war gering (Makino *et al.*, 1999; Shiota *et al.*, 2007). Nach einer Transplantation in infarzierte Herzen zeigten die MSCs jedoch parakrine Effekte durch Cytokinsekretion. Hierbei wurde das Überleben, das Wachstum und/oder die Differenzierung von anderen Zellen im infarzierten Bereich unterstützt (Caplan und Dennis, 2006).

Eine Meta-Analyse aus 13 randomisierten Experimenten zur Transplantation von Knochenmarkstammzellen nach akutem Myokardinfarkt zeigte sechs Monate nach der Behandlung eine signifikante Erhöhung der linksventrikulären Ejektionsfraktion um 2,99% gegenüber der Kontrollgruppe (Martin-Rendon *et al.*, 2008). Allerdings zeigte eine sogenannte BOOST-Studie (*BOne marrOw ST-elevation*), bei der Knochenmarkstammzellen in infarzierte Herzen injiziert wurden, ebenfalls eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion nach 18 Monaten, die jedoch keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies (Meyer *et al.*, 2009). In einer weiteren Studie wurden Verkapselungen im Herzen nach intrakardialer Injektion von BMSCs in infarzierte Herzen beobachtet. Diese Verkapselungen beinhalteten Verkalkungen und Verknöcherungen (Breitbach *et al.*, 2007).

Die beobachteten kardialen Funktionssteigerungen durch Injektion von BMSCs sind lediglich gering ausgeprägt und meist nicht stärker als durch medikamentöse Behandlung. Ein weiterer Nachteil der BMSCs ist, dass es bisher nicht möglich war funktionelle Kardiomyozyten *in vivo* zu generieren (Shiota *et al.*, 2007).

1.3.2 Adulte kardiale Stammzellen

Die residenten Stammzellen des Herzens können in die fürs Herz drei wichtigsten Zellarten differenzieren. Dazu gehören Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und endotheliale Zellen (Beltrami *et al.*, 2003; Kattman *et al.*, 2006; Laugwitz *et al.*, 2005; Linke *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006). Studien zeigten, dass verschiedene Zellpopulationen, wie SCA1 (*stem cell antigen1*), ISLET 1 (*insulin gene enhancer, ISL1*) und c-KIT positive Zellen, aus adulten Herzgewebe isoliert werden konnten. C-KIT positive Zellen sind in kleinen Klustern innerhalb der Ventrikel und der Vorhöfe des adulten Herzens lokalisiert. Diese Zellen können sowohl in endotheliale Zellen, glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten differenzieren. SCA1 positive Zellen exprimieren einige der frühen regulatorische Faktoren der Kardiogenese (Boudoulas *et al.*, 2009). Nach Transplantation *in vivo* dieser Zellpopulationen wurden Verbesserungen von Herzfunktionen festgestellt (Beltrami *et al.*, 2003; Bergmann *et al.*, 2009; Laugwitz *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). Trotz der Teilungsfähigkeit von residenten Stammzellen ist dieser intrinsische Mechanismus nicht ausreichend um die Regeneration des Herzens nach einem Myokardinfarkt zu erreichen.

1.3.3 Pluripotente Stammzellen

Viele Studien haben bewiesen, dass sich ESCs zu Kardiomyozyten differenzieren lassen (Behfar *et al.*, 2002; Hodgson *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2002). Xue *et al.* zeigten in Tierversuchen, dass aus ESCs differenzierte kardiale Zellen, nach Transplantation ins Herzgewebe, integrieren und mit den Rezipientenzellen elektrophysiologisch und funktionell interagieren (Xue *et al.*, 2005). Ebenso wurde in einem Myokardinfarktmodell gezeigt, dass eine Injektion von aus ESCs differenzierte Kardiomyozyten eine Erhöhung der, durch einen Myokardinfarkt verminderten, Verkürzungsfraction auslöst (Caspi *et al.*, 2007). Jedoch ist der kontraktile Anteil der differenzierten Kardiomyozyten gering (Mignone *et al.*, 2010). Min *et al.* berichteten, dass es nach einer Injektion von murinen embryonalen Stammzellen (*murine embryonic stem cells, mESCs*) in infarzierte Rattenherzen zu einer Langzeitverbesserung der kardialen Funktionen kam (Min *et al.*, 2002). Es wurde in Tiermodellen gezeigt, dass humane Kardiomyozyten aus hESCs nach der

Transplantation in Herzen von Schweinen und Ratten funktionell integrierten (Kehat *et al.*, 2004; Laflamme *et al.*, 2005).

Bei der Analyse von hESCs zur regenerativen Therapie eines Myokardinfarkts mittels Stammzellinjektion trat ein weiteres Problem der Teratombildung auf. Zudem konnte die Injektion von hESCs in Tiermodellen zu Arrhythmien führen (Zhang *et al.*, 2002). In Studien wurde eine fehlende Integration von Kardiomyozyten ins Wirtmyokard sowie Teratombildungen beschrieben (Leor *et al.*, 2007).

Auch generierte Kardiomyozyten aus iPSCs wurden auf ihr therapeutisches Potential untersucht. Nelson *et al.* zeigten im Mausmodell, dass generierte murine Kardiomyozyten zu einer kardialen Funktionssteigerung bei ischämischen Herzkrankheiten führten (Nelson *et al.*, 2009). Um die mechanische, elektrophysiologische und funktionale Integration der transplantierten Zellen zu verbessern, wurden inzwischen Versuche mit Gewebekonstruktionen (*tissue engineering*) durchgeführt (Naito *et al.*, 2006; Stevens *et al.*, 2009). Zimmermann *et al.* isolierten Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten. Die zu transplantierenden Zellen wurden in spezifische Matrices integriert um hieraus künstliches Herzgewebe (*engineered heart tissue*, EHT) zu generieren. Dieses wurde als gesamtes Konstrukt auf den infarzierten Bereich im Herzen appliziert. Es wurde gezeigt, dass sich das künstliche Herzgewebe integrierte und eine Verbesserung der Verkürzungsfraktion im infarzierten Bereich auftrat (Zimmermann *et al.*, 2006).

Der Nachteil der aus pluripotenten Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten für die regenerative Therapie liegt in der geringen Effizienz, da die ausdifferenzierten Kardiomyozyten nur eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit aufweisen.

1.3.4 FLK1 positive kardiovaskuläre Vorläuferzellen

Stammzellen die für therapeutische Zwecke eingesetzt werden, sollten eine Balance zwischen einer möglichst geringen Tumorigenität und dem Differenzierungspotential bilden. Die verwendeten Zellen sollten ein soweit ausgeprägtes Differenzierungspotential aufweisen, dass sie sich noch in verschiedene Zielzellen entwickeln können. Der Differenzierungsstatus allerdings muss möglichst fortgeschritten sein, um eine Teratombildung zu vermeiden. Somit wird angenommen, dass für therapeutische Zwecke Vorläuferzellen eine große Rolle spielen (Knoepfler, 2009).

Bei FLK1 (*fetal liver kinase 1*) oder auch VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*) handelt es sich um eine Rezeptor-Tyrosinkinase. In humanen Organismen gilt die Bezeichnung KDR (*kinase domain region*) (Eichmann *et al.*, 1997). FLK1 wird nicht nur in endokardialen Zellen exprimiert sondern ist auch an der embryonalen Entwicklung der kardialen Muskulatur beteiligt (Takahashi *et al.*, 1999). Untersuchungen zur Embryonalentwicklung zeigten, dass FLK1 *knockout* Embryonen im 6-8 Somitenpaarstadium verstarben (Shalaby *et al.*, 1995). Es konnten bereits FLK1 positive kardiale Vorläuferzellen aus murinen ESCs (Christoforou *et al.*, 2008), iPSCs (Narazaki *et al.*, 2008) und maGSCs (Cheng *et al.*, 2012) gewonnen werden, die später zu kardiovaskulären Zellen differenziert werden konnten. Studien zeigten, dass Zellpopulationen, die den Oberflächenmarker FLK1 exprimieren, sich im mesodermalen Vorläuferstadium befinden und in der weiteren Differenzierung sowohl Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und endotheliale Zellen bilden (Kattman *et al.*, 2006; Moretti *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006).

Die einzelnen Entwicklungsstadien des kardialen Mesoderms sind durch spezifische Markerexpressionen charakterisiert (Abb. 2). Transientes präkardiales Mesoderm exprimiert den Marker Brachyury (BRY). Frühes kardiales Mesoderm ist durch eine hohe MESP1 (*mesoderm posterior 1*)-Konzentration und schwachen BRY und ISL1 Konzentrationen gekennzeichnet. Auch diese Zellpopulationen sind transient. Im Laufe der weiteren Entwicklung bilden sich kardiovaskuläre Vorläuferzellen die neben FLK1 auch NKX2.5 und ISL1 exprimieren. Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich sowohl die Muskel-Vorläuferzellen (positiv für NKX2.5 und ISL1) als auch vaskuläre Vorläuferzellen (positiv für ISL und FLK1). Aus den Muskel-Vorläuferzellen entwickeln sich ausgereifte Kardiomyozyten (positiv für kardiales *cardiac troponin T*, cTNT) und glatte Muskelzellen (positiv für *α -smooth muscle actin*, α -SMA und *smooth muscle myosin heavy chain*, SM-MHC). Vaskuläre Vorläuferzellen bilden in der weiteren Entwicklung endotheliale Zellen (Lam *et al.*, 2009).

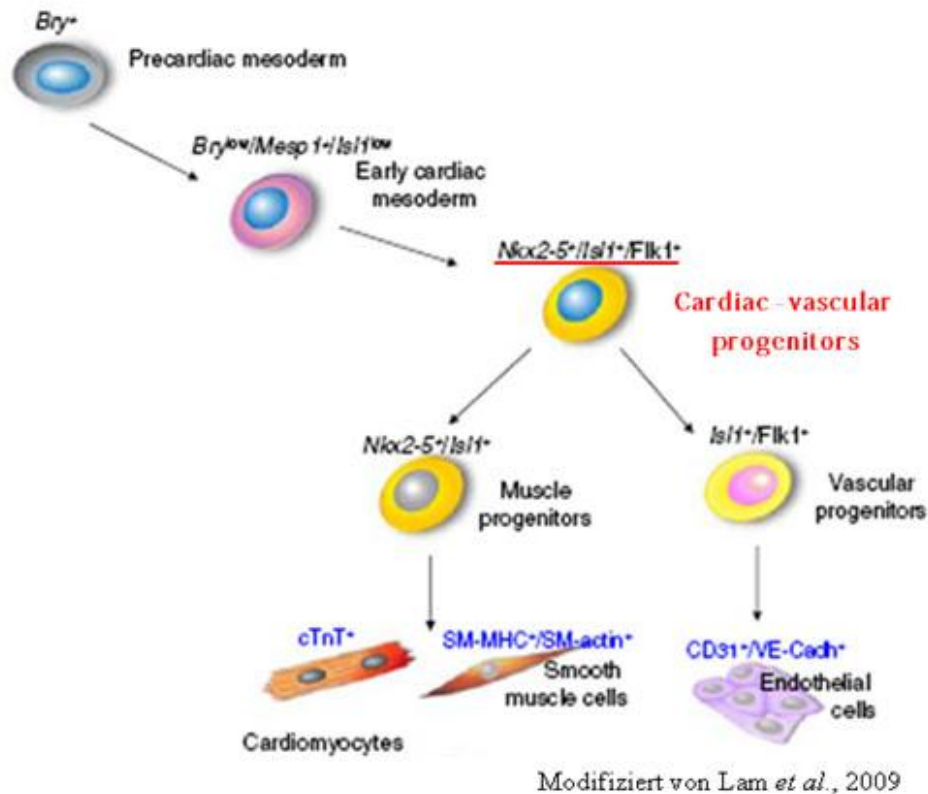


Abb. 2: Schematische Darstellung der mesodermalen Entwicklungsstadien von kardiovaskulären Zellen. Diese Abbildung (modifiziert, Lam *et al.*, 2009) zeigt die Entwicklungsstadien von präkardialen Mesoderm bis zu ausgereiften Zellarten mit spezifischen Markerexpressionen an. Präkardiales Mesoderm (*precardiac mesoderm*) exprimiert Brachyury (BRY). Frühes kardiomesoderm (*early cardiac mesoderm*) ist durch eine hohe MESP1-Konzentration und schwachen BRY und ISLET 1 (ISL1) Konzentrationen gekennzeichnet. Im Laufe der weiteren Entwicklung bilden sich kardiovaskuläre Vorläuferzellen (*cardiac-vascular progenitors*) die neben FLK1 auch NKX2.5 und ISL1 exprimieren. Aus diesen Vorläuferzellen entwickeln sich sowohl die Muskel-Vorläuferzellen (*muscle progenitors*, positiv für NKX 2.5 und ISL1) als auch vaskuläre Vorläuferzellen (*vascular progenitors*, positiv für ISL1 und FLK1). Aus den Muskel-Vorläuferzellen entwickeln sich Kardiomyozyten (*cardiomyocytes*, positiv für cTNT) und glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells*, positiv für SMA und SM-MHC). Vaskuläre Vorläuferzellen bilden in der weiteren Entwicklung CD31 und VE-Cadherin (VE-CADH) positive endotheliale Zellen.

Die Differenzierung in kardiome Vorläuferzellen kann spontan mittels der Bildung von *embryoid bodies* (EBs) über die *hanging drop* oder *mass culture* Methode (Cerdan *et al.*, 2007; Fuegemann *et al.*, 2010; Guan *et al.*, 2007; Kurosawa, 2007; Streckfuss-Bomeke *et al.*, 2012) erfolgen. Eine andere Möglichkeit stellt die gerichtete Differenzierung durch Zugabe von charakteristischen Wachstumsfaktoren

oder durch Cokultivierung auf spezifischen Versorgerzellen, wie beispielsweise der OP9 Zellen dar (Zhang *et al.*, 2005).

Da für die Regeneration eines infarzierten Gewebes neben den ausgereiften Kardiomyozyten auch glatte Muskel- und endotheliale Zellen eine Rolle spielen, stellen die FLK1 positiven Vorläuferzellen eine optimale Ausgangszellpopulation dar (Baba *et al.*, 2007; Ema *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008).

2010 gelang es Iwasa *et al.* FLK1 positive Zellen aus maGSCs von neonatalen murinen Testis zu generieren. Nach einer kardialen Injektion in ischämische Mausherzen wurde eine verbesserte linksventrikuläre Ejektionsfraktion und eine Zunahme der Wanddicke des linken Ventrikels beobachtet (Iwasa *et al.*, 2010).

Die Gefahr der Teratombildung bei Injektion von undifferenzierten Stammzellen in einen Organismus ist relativ hoch. Um diesen Umstand der Teratombildung zu umgehen nehmen Vorläuferzellen einen immer größer werdenden Stand in der Zelltherapieforschung ein.

1.4 Tumorigenität und immunologische Aspekte bei Zelltransplantationen

1.4.1 Immunsystem

Ein Organismus besitzt verschiedene Abwehrmechanismen. Das Immunsystem basiert auf einer unspezifischen und einer spezifischen Abwehr, die jeweils aus einem humoralen und einem zellulären System bestehen, die parallel wirken und dennoch eng miteinander verbunden sind.

Bei der unspezifischen Abwehr ist kein Erstkontakt mit einem fremden Antigen zur Vernichtung nötig. Die Mechanismen dieser Immunantwort sind angeboren. Zur humoralen Antwort der unspezifischen Abwehr gehören das Komplementsystem, das Lysozym, Interferone und Akut-Phase-Proteine. Das Komplementsystem basiert auf durch Antigen-Antikörper-Komplexen oder Oberflächenstrukturen von Fremdorganismen (wie beispielsweise Bakterien) aktivierbaren Glykoproteinen, die zumeist aus Makrophagen und Leberzellen synthetisiert werden. Zu den biologischen Leistungen des Komplementsystems gehören die Erregerabwehr (Virusneutralisation, Opsonierung und Zytolyse) und die Entzündungsvermittlung.

Lysozym wird beim Zerfall von phagozytierenden Zellen freigesetzt und ähnelt der Wirkung des Komplementsystems. Interferone wirken antiviral, antiproliferativ und immunmodulierend. Unter Akut-Phase-Proteinen versteht man Anti-Entzündungsproteine, die Lipide zerstörer Zellen abbauen und als Proteinaseinhibitoren wirken (Faller, 1999; Mutschler *et al.*, 2001).

Zu dem entsprechenden zellulären System gehören neben den Phagozyten (neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) auch die natürlichen Killer (NK)-Zellen. Bei den NK-Zellen handelt es sich um große granulierten Lymphozyten, die vor allem durch einen Virus infizierte Zellen und Tumorzellen zerstören. Diese Zellen setzen Interferone frei, durch die die NK-Zellen angelockt werden. Durch Perforine und Proteasen kann die Zellmembran der fremden Zellen so permeabilisiert werden, dass es zu einer Apoptose dieser Zellen kommt. Die NK-Zellen entstehen im Knochenmark aus lymphatischen Vorläuferzellen. Ihre zytotoxische Aktivität wird durch aktivierende und inhibierende Oberflächenrezeptoren reguliert. Diese Rezeptoren interagieren mit Molekülen des *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse I auf der Oberfläche der Zielzellen. Ebenso sind sie in der Lage Zellen zu erkennen, die eine verminderte Expression von MHC-Klasse I-Komplexen aufweisen und somit nicht von T-Lymphozyten erkannt werden können (Faller, 1999; Mutschler *et al.*, 2001).

Bei der spezifischen Immunantwort handelt es sich um eine erworbene Immunität. Die spezifische Immunantwort basiert zunächst auf einem Erstkontakt mit dem Antigen. Daraufhin werden spezifische Antikörper gebildet. Durch Makrophagen werden Antigene phagozytierter fremder Zellen in Komplexen mit körpereigenen Proteinen (MHC-Klasse I/II) präsentiert. Diese Antigenpräsentation führt dazu, dass diese fremden Antigene von den Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten, zelluläre Abwehr) erkannt werden und spezifische Antikörper (humorale Abwehr) gegen diese Antigene gebildet werden können. Um ihre Immunkompetenz zu erlangen, müssen die Lymphozyten einen Reifungsprozess durchlaufen. T-Lymphozyten reifen im Thymus wogegen B-Lymphozyten im Knochenmark heranreifen. T- und B-Lymphozyten besitzen an ihrer Oberfläche strukturspezifische Rezeptoren. Trägt eine körperfremde Zelle ein Antigen-MHC-Klasse I-Komplex wird diese von CD8 positiven T-Lymphozyten erkannt. Zu dieser Gruppe gehören die cytotoxischen T-Zellen (T-Killerzellen). Diese führen nach Bindung an der Zielzelle und durch Stimulation von T-Helferzellen zur Apoptose oder Lyse dieser Zellen. CD4 positiven

T-Lymphozyten erkennen Antigene in einem MHC-Klasse II-Komplex. Zu diesen Zellen gehören die T-Helferzellen, die durch Sezernierung von Cytokinen sich selbst, B- und andere T-Lymphozyten aktivieren.

Spezifische Antikörper werden von Plasmazellen gebildet, die durch einen Antigenkontakt der B-Lymphozyten durch Proliferation und Differenzierung entstehen. Dieser Prozess wird auch von T-Helferzellen durch Interleukinausschüttung unterstützt. Neben den Plasmazellen kommt es auch zur Bildung von sogenannten Gedächtniszellen, die im Blut zirkulieren und bei einer Zweitinfektion desselben Antigens zu einer schnellen Immunantwort führen (Berg *et al.*, 2003; Faller, 1999; Mutschler *et al.*, 2001).

Das unspezifische Immunsystem allein reicht nicht aus einen Organismus vollständig zu schützen. Vielmehr ist die spezifische Abwehr der B- und T-Lymphozyten von entscheidender Bedeutung, da hier auch langfristig durch Bildung von Antikörpern und Gedächtniszellen eine schnelle Immunantwort ausgelöst werden kann. Somit wird nach Zelltransplantationen meist dauerhaft ein Immunsuppressivum verabreicht, welches die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten unterdrückt.

1.4.2 Tumorbildung durch Zelltransplantation und Abstoßung von Zelltransplantaten

Das Immunsystem spielt bei Zelltransplantationen eine entscheidende Rolle. Hierbei ist einerseits der Differenzierungsstand der injizierten Zellen als auch der Donor- und Akzeptororganismus von Bedeutung. Die Gefahr der Abstoßung bei nicht autologen Transplantationen oder der Teratombildung durch undifferenzierte Zellen ist relativ hoch.

Pluripotente Stammzellen zeichnen sich durch die Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter aus. Die Teratombildung in immundefizienten Mäusen ist einer der Hauptbeweise der Pluripotenz (Brivanlou *et al.*, 2003). Die so generierten Teratome sind meist nicht maligne unreife oder ausgereifte Teratome (Blum und Benvenisty, 2009; Gertow *et al.*, 2004; Lensch *et al.*, 2007). Es wurden auch invasive oder metastatische Tumore beobachtet, so dass ebenso maligne Teratokarzinome auftreten können (Erdo *et al.*, 2003). Diese entstehen meist durch eine genetische Alteration während der Kultivierung (Hussein *et al.*, 2011). Teratokarzinome bestehen außer aus Zellen der drei Keimblätter auch aus malignen Karzinomzellen

(Damjanov, 1993). Somit ist die Tumorigenität ein entscheidender Faktor bei der therapeutischen Anwendung pluripotenter Stammzellen (Anisimov *et al.*, 2010; Blum und Benvenisty, 2008; Blum und Benvenisty, 2009; Fong *et al.*, 2010; Halme und Kessler, 2006).

Auch eine syngene Zellinjektion in Mäuse kann zu Teratombildungen führen (Dressel *et al.*, 2008; Kolossov *et al.*, 2006; Lawrenz *et al.*, 2004; Nussbaum *et al.*, 2007, Wobus *et al.*, 1984). Dressel *et al.* verglichen die Tumorigenität von mESCs in syngener und immundefizienter Injektion. Es zeigte sich in beiden Fällen eine ähnliche Teratombildungsrate. Immundefiziente SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäuse bildeten zu 100% Teratome. SCID-*beige* Mäuse zeigten eine Teratombildungsrate von 93% und die syngene Injektion führte zu 96% Teratombildungen (Dressel *et al.*, 2008). Die Frequenz der Teratombildung war ähnlich, doch in der Geschwindigkeit des Wachstums kam es zu Unterschieden. In den SCID-*beige* Mäusen wuchsen die Teratome schneller als in den SCID und syngenen Mäusen (Dressel *et al.*, 2008). Lawrenz *et al.* untersuchten ebenfalls die Tumorigenität von mESCs in syngener und immundefizienter Situation. Es wurde gezeigt, dass das Tumorwachstum in der syngenen Situation im Vergleich zur Injektion in immundefiziente Mäuse verzögert eintrat (Lawrenz *et al.*, 2004). Außerdem wurde beobachtet, dass das Immunsystem der syngenen Tiere in der Lage war eine kleinere Anzahl von Zellen abzustößen. Das Immunsystem der syngenen Tiere scheint somit die Fähigkeit zu besitzen eine gewisse Anzahl von pluripotenten Zellen abzustößen oder das Teratomwachstum zu reduzieren. Ebenso wurden auch Tiere ermittelt, die nach syngener Injektion keine Teratombildung aufwiesen (Dressel, 2011).

Allogene Injektionen von undifferenzierten Stammzellen führten zu unterschiedlichen Ergebnissen (Dressel *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2008; Kolossov *et al.*, 2006; Nussbaum *et al.*, 2007; Swijnenburg *et al.*, 2008a; Wu *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass Histokompatibilitätsantigene in der Lage sind ein Teratomwachstum zu unterdrücken, dies jedoch nicht in jeder allogenen Transplantationssituation der Fall ist (Dressel, 2011). Dressel *et al.* zeigten beispielsweise bei einer Injektion von mESCs in allogene C57B/6J Tiere (n = 19) und C3H-Mäuse (n = 13), dass keine Teratombildung auftrat. Dieselbe Zelllinie nur mit männlichem Hintergrund führte durch Injektion in weibliche allogene Mäuse jedoch zu Teratombildung (Dressel *et al.*, 2008). Diese und weitere Studien zeigten,

dass das minor Histokompatibilitätsantigen ausreichende Fähigkeiten besitzt eine Teratombildung zu verhindern, wenn ESCs in Akzeptortiere injiziert wurden, die den selben Haupthistokompatibilitätsort aufwiesen, obwohl ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund vorlag (Dressel *et al.*, 2008; Nussbaum *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2007).

Xenogene Injektionen von pluripotenten Stammzellen führten meist zu keiner Teratombildung, da hier das Immunsystem der xenogenen Rezeptortiere zu einer Abstoßung der als fremd identifizierten Zellen führte (Dressel *et al.*, 2008; Drukker *et al.*, 2006; Grinnemo *et al.*, 2008; Swijnenburg *et al.*, 2008b).

Elemente des Immunsystems, wie die NK-Zellen und das Komplementsystem, welches auch in syngen Akzeptortieren vorhanden ist, zeigen oft eine Abstoßung von undifferenzierten Zelltransplantaten (Dressel, 2011). Dressel *et al.* zeigten, dass ESC-Linien Zielzellen für die NK-Zellen darstellen, da diese Liganden des NKG2D-Rezeptors (*natural killer group 2 member D*) aufweisen (Dressel *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse wurden auch für weitere pluripotente Stammzellen bestätigt. Die Expression der spezifischen NK-Liganden ist abhängig vom Differenzierungsgrad. Je differenzierter die Zellen vorliegen, desto geringer ist das Maß der NK-Liganden (Dressel *et al.*, 2008; Frenzel *et al.*, 2009). Ebenfalls wurde häufig der aktivierende Rezeptorligand DNAM-1 auf der Oberfläche von pluripotenten Stammzellen identifiziert. Dieser Rezeptorligand nimmt eine entscheidende Rolle in der Lymphozytenaktivierung und Lymphokinsekretion durch so genannte cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) und NK-Zellen (Dressel *et al.*, 2010) ein. Dressel *et al.* zeigten, dass verschiedene pluripotente Stammzelllinie, wie auch maGSCs, durch CTLs angegriffen wurden (Dressel *et al.*, 2009).

Auch MHC-Moleküle besitzen, wie oben bereits erwähnt, eine entscheidende Rolle in den immunologischen Abstoßungsreaktionen. MHC-Klasse I-Moleküle wurden allerdings nicht oder nur im geringen Maße auf den untersuchten maGSCs identifiziert. Doch neben den MHC-Molekülen sind auch weitere Komponenten des Immunsystems für Abstoßungen von Zelltransplantaten verantwortlich (Tang *et al.*, 2011). Trotz vollständiger MHC-Molekül-Übereinstimmung könnten unzureichende Präsentationen von immunologischen Signalen, unzulänglichen Gen-*Silencing* oder aberrante Antigenproduktion eine Immunantwort auslösen.

Ebenfalls ist die Art der transplantierten Zellen entscheidend. Zhao *et al.* zeigten, dass viral induzierte murine iPSCs (ViPSCs) nach Injektion in syngen Mäusen

keine Teratombildung aufwiesen. Episomal hergestellte iPSCs (EiPSCs) wiesen dagegen eine Teratombildung von 60-80% auf. ESCs zeigten im Vergleich eine fast vollständige Teratombildung. Zhao *et al.* vermuteten, dass aufgrund einer eventuell auftretenden genetischen Veränderung, als Resultat der viralen Transduktion, die ViPSCs vom Immunsystem der syngen Mäuse abgestoßen wurden. Die EiPSCs hingegen, die keiner genetischen Beeinflussung durch virale Vektoren unterlagen, stellten ebenso Immunogene des Immunsystems der Versuchstiere dar, wiesen jedoch mit einer Teratombildung mit einem prozentualen Anteil von 60-80% eine wesentlich geringere Immunogenität auf (Zhao *et al.*, 2011).

Somit ist die Reinheit, die Art und der Differenzierungsstand der transplantierten Zellen von besonderer Bedeutung (Bieberich *et al.*, 2004; Brederlau *et al.*, 2006; Choo *et al.*, 2008; Fukuda *et al.*, 2006; Klug *et al.*, 1996; Kolossov *et al.*, 2006; Schuldiner *et al.*, 2003). Auf muriner Ebene sind eine Vielzahl von Daten zur Immunogenität und Tumorbildung von Zellinjektionen vorhanden. Die Übertragung auf den menschlichen Organismus ist durch fehlende experimentelle Daten schwierig. Einen interessanten Ansatz nimmt hierbei auch die autologe Situation ein. Durch autologe Zellinjektionen könnten immunologische Abstoßungen eventuell umgangen werden. Autologe Experimente mit induzierten pluripotenten Stammzellen wurden bisher jedoch weder auf muriner noch humaner Ebene durchgeführt.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es eine FLK1 bzw. KDR positive kardiovaskuläre Zellpopulation aus murinen und humanen pluripotenten Stammzellen zu generieren. Des Weiteren sollte das therapeutische Potential dieser murinen Zellen in einem Mausmyokardinfarktmodell analysiert werden. Dafür wurden zunächst SSCs aus einem transgenen Mausmodell isoliert und in pluripotente Stammzellen reprogrammiert. Aus dieser generierten Zelllinie wurden FLK1 positive Zellen differenziert und auf ihr therapeutisches Potential durch Injektion in ein Mausmyokardinfarktmodell untersucht. Ebenso wurde die Tumorigenität der generierten FLK1 positiven Zellen analysiert. Auch der Einfluss des Immunsystems und des Immunsuppressivums CsA auf die Tumorigenität von Zellen wurde untersucht. Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasste sich mit den immunologischen Aspekten von allogenen, syngenen und auch autologen Zelinjektionen von iPSCs in Mäusen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Alle durchgeführten Tierversuche in dieser Arbeit wurden von der Tierschutzbehörde des Landes Niedersachsens geprüft, kontrolliert und genehmigt (Tierschutzanträge: 33.9.42502-04-060/09 und 33.14.42502-04-113/09). Die Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Laut Vorschrift erhielten die Mäuse speziesspezifisches Futter und Wasser.

Als Versuchstiere dienten Mäuse folgender Linien:

MHC-NEO/MHC-eGFP

transgene Mauslinie: Eine Neomycin-Antibiotikaresistenz (*Neo*) und ein fluoreszierender Marker (*enhanced green fluorescence protein, eGfp*) sind über einen kardialen Promoter (*myosin heavy chain, Mhc*) reguliert. Diese Tiere weisen einen DBA Hintergrund auf. Die transgenen Mäuse wurden von Prof. Dr. Loren J. Field (Indiana University School of Medicine, Indianapolis, USA) zur Verfügung gestellt.

C57BL/6J

Wildttyp Mauslinie: Die Tiere wurden aus der eigenen Zucht der ZTE entnommen oder von der Firma Janvier erworben.

RAG^{-/-}cyc^{-/-} Mauslinie: Diese Tiere weisen weder B-, T- noch NK-Zellaktivität auf (Koch *et al.*, 2006). Diese Tiere besitzen einen C3H-Hintergrund und wurden von Prof. Dr. Ralf Dressel aus der Immunologie der Georg-August Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Im Folgenden wurden diese Tiere als RAGC Mäuse bezeichnet.

RAG^{-/-} Mauslinie: Diese Tiere weisen ebenfalls keine B- und T-Zellaktivität auf. NK-Zellen sind jedoch weiterhin vorhanden (Robertson *et al.*, 2007). Diese Tiere wurden von der Firma Taconic (Germantown, NY, USA) erworben. Im Folgenden wurden diese Tiere als RAGN Mäuse bezeichnet.

2.1.2 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammten, wenn nicht anders vermerkt, aus dem Stammzelllabor der Abteilung Kardiologie/Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen.

NE4: In dieser Arbeit generierte spermatogoniale Stammzelllinie, isoliert aus den Testis von *Mhc-Neo/Mhc-eGfp* transgenen Mäusen.

NE4O1: In dieser Arbeit generierte pluripotente Stammzelllinie, gewonnen aus NE4 Zellen mittels viraler Überexpression des Transkriptionsfaktors OCT4.

SSC5: MaGSCs Linie 5, isoliert aus Testis adulter transgener Stra8-eGFP/Rosa26 Mäuse (Guan *et al.*, 2006). Über Kulturbedingungen spontan reprogrammiert.

HES-3: Humane embryonale Stammzellen Linie 3, erworben über die *National Stem Cell Bank /USA*. Als Zellanbieter fungierte *ES Cell International* aus Singapur (Passier *et al.*, 2005).

OP9: Stromazelllinie (Riken BRC Cell Bank, RCB1124), isoliert aus dem Schädeldach von osteopetrotischen op/op-Mäusen mit einer Mutation im *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF)-Gen, wodurch kein funktionsfähiges M-CSF exprimiert wird (Nakano *et al.*, 1994).

2.1.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG Eurofins Operon bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden in Aqua dest. gelöst und bei -20°C gelagert. Die Vorwärts- und Rückwärtssequenzen (*forward* = f, *reverse* = r), Annealingtemperaturen (T_A), Zyklenanzahl (Z) und Fragmentlängen (F) wurden in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Oligonukleotide

Gen	Vorwärts- und Rückwärtssequenzen	T_A [°C]	F [bp]	Z
<i>α-Fetoprotein (Afp)</i>	f F91: 5'-CCC ACC CTT CCA GTT TCC-3' r F92: 5'-TCG TAC TGA GCA GCC AAG G-3'	58	150	37
<i>β-Aktin</i>	f A13: 5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3' r A14: 5'-CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3'	60	247	28
<i>Dazl</i>	f B87: 5'-CTG CTG GAG AGC AGA GGA GT -3' r B88: 5'-TAA GCA CTG CCC GAC TTC TT-3'	60	291	40
<i>eGfp (Genotypisierung)</i>	f B32: 5'-ATC GAC CTG AAG GGC ATC GAC TTC AAG GAG-3' r B33: 5'-CTC CAG CAG GAC CAT GTG ATC GCG CTT CTC-3'	60	320	35
<i>Flk1</i>	f F79: 5'-CCT ACC CCA CAC ATT ACA TGG-3' r F80: 5'-TTT TCC TGG GCA CCT TCT ATT-3'	55	200	35
<i>Gapdh</i>	f A79: 5'-GCA GTG GCA AAG TGG AGA TT-3' r A80: 5'-TCT CCA TGG TGG TGA AGA CA-3'	56	249	31
<i>Gfp</i>	f B102: 5'-ACG TAA ACG GCC ACA AGT TC-3' r B103: 5'-AAG TCG TGC TGC TTC ATG TG -3'	54	185	35
<i>Gfr1α</i>	f B91: 5'-AGA AGC AGT TTC ACC CAG-3' r B92: 5'-ATC ATC ACC ACC ACC ATC-3'	60	208	44
<i>Klf4</i>	f B128: 5'-CAC TAC CGC AAA CAC ACA GG-3' r B137: 5'-TTC ACA AGC TGA CTT GCT GG-3'	58	254	44
<i>Lin28</i>	f B130: 5'-TCC TCC TGT GTC TCC CAT TC-3' r B131: 5'-AGA GTG AGG CCC TGT CTC AA-3'	59	214	36
<i>Achaete-scute complex-like 1 (Mash1)</i>	f F131: 5'-CTC GTC CTC TCC GGA ACT GAT G-3' r F132: 5'-CGA CAG GAC GCC GCG CTG AAA G-3'	64	301	38
<i>α-Mhc</i>	f F51: 5'-CTG CTG GAG AGG TTA TTC CTC G-3' r F52: 5'-GGA AGA GTG AGC GGC GCA TCA AGG-3'	64	301	32
<i>Nanog</i>	f F41: 5'-AGG GTC TGC TAC TGA GAT GCT CTG-3' r F42: 5'-CAA CCA CTG GTT TTT CTG CCA CCG-3'	66	363	34
<i>Neo</i>	f B34: 5'-TCC TGC CGA GAA AGT ATC CAT CATGGC TGA -3' r B35: 5'-ATT CGC CGC CAA GCT CTT CAG CAA TAT CAC-3'	60	400	35
<i>Oct4</i>	f F37: 5'-GGC GTT CTC TTT GGA AAG GTG TTC-3' r F38: 5'-CTC GAA CCA CAT CCT TCT CT-3'	61	312	38
<i>Oct4 exogen</i>	PCR1: f B106: 5'-AGA GGA ACT GCT TCC TTC ACG ACA-3' r B107: 5'-TCA AGC CTC AGA CAG TGG TTC-3'	54	656	40

	PCR2: f K54: 5'-TTC TGG CGC CGG TTA CAG AAC CA-3' r B107: 5'-TCA AGC CTC AGA CAG TGG TTC-3'			
Plzf	f B93: 5'-AAC GGT TCC TGG ACA GTT TG-3' r B94: 5'-CCC ACA CAG CAG ACA GAA GA-3'	58	173	33
Sox2	f F145: 5'-GGC GGC AAC CAG AAG AAC AG-3' r F146: 5'-GCT TGG CCT CG TCG ATG AAC-3'	61	195	39
Sox2 endogen	f A109: 5'-ATG CAC CGC TAC GAC CTG A-3' r A110: 5'-CTT TTG CAC CCC TCC CAT TT-3'	56	437	43
Stra8	f F65: 5'-GCC AGA ATG TAT TCC GAG AA-3' r F66: 5'-CTC ACT CTT GTC CAG GAA AC-3'	60	649	38
Synaptophysin	f F55: 5'-GCC TGT CTC CTT GAA CAC GAA C-3' r F56: 5'-TAC CGA GAG AAC AAC AAA GGG C-3'	60	287	37
Vasa	f B85: 5'-TCC CAT TGT ATT AGC AGG-3' r B86: 5'-AAG GGT TTG GCG TTG TTC-3'	51	478	36

2.1.4 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind mit ihren spezifischen Epitopen, der eingesetzten Verdünnung und der Herkunft in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt. Die Daten sind sowohl für die Durchflusszytometrie als auch für die Immunfluoreszenz-Analysen tabelliert.

Tabelle 2: Primärantikörper

Antigen	Klon	Spezies/Isotyp	Herkunft	Verdünnung	
				Durchflusszytometrie	Immunfluoreszenz
AFP	----	Polyklonal Kaninchen	DAKO Cytomation A0008	----	1:300
cTNT	----	Maus IgG2b	Abcam ab10214	1:100	----
DAZL	----	Polyklonal Kaninchen IgG	Abcam ab34139	----	1:200
FLK	Avas 12α1	Ratte IgG2a	BD Pharmingen 555307	----	1:100
FLK-PE	Avas 12α1	Ratte IgG2a	BD Pharmingen 555308	1:100	----
GFR1α	----	Ziege IgG	R+D Systems AF714	----	1:50

KDR	89115	Maus IgG	R+D Systems MAB3571	----	1:100
KDR-PE	89106	Maus IgG	R+D Systems FAB357P	1:100	----
LIN28	----	Goat IgG	R+D YFC 01	----	1:100
SARKO- MERES MYOSIN (MF20)	----	Maus IgG2b	DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank)	1:5	1:5
NANOG	----	Ziege IgG	R+D Systems AF2729	----	1:200
PLZF	2A9	Maus mAb	Calbiochem OP128	----	1:30
α-SMA	1A4	Maus IgG	Sigma A2547	1:2000	----
SOX2	----	Polyklonal Kaninchen	Millipore AB5603	----	1:1500
SSEA1	MC- 480	Maus IgM	DSHB MC480	----	unverdünnt
STRA8	----	Polyklonal Kaninchen	Abcam ab49602	----	1:200
β-III Tubulin	TUJ1	Maus IgG2a	Babco MMS-435P	----	1:500
VASA	----	Polyklonal Kaninchen IgG	Abcam Ab13840	----	1:200

Tabelle 3: Sekundärantikörper

	Typ	Herkunft	Verdünnung	
			Durchfluss- zytometrie	Immun- fluoreszenz
CY3	Affe anti Ziege IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories	----	1:600
CY3	Ziege anti Kaninchen IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories	----	1:600
CY3	Ziege anti Maus IgG+IgM (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories	----	1:600

FITC	Ziege anti Kaninchen IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories	----	1:200
FITC	Ziege anti Maus IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories	----	1:200
PE	Affe anti Maus IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories	1:200	----

2.1.5 Medien, Lösungen und Substanzen

2.1.5.1 Medien, Lösungen und Faktoren für die Zellkultur

DPBS:	Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung 1x (DPBS; life technologies, 14190)
DMEM:	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium mit 4,5 g/L Glucose (life technologies, 11960)
DMEM/F12:	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium/F12 + GlutaMAX™ (life technologies, 32331)
HBSS:	Hanks Balanced Salt Solution 1x (life technologies, 00963)
0,1% Gelatinelösung:	1% Gelatine (Fluka Biochemica, 48720) in <i>Aqua dest.</i> , autoklaviert und 1:10 mit <i>Aqua dest.</i> verdünnt
0,2% Trypsin-Lösung:	2 g Trypsin (life technologies, 27250-018) in 1000 ml DPBS gelöst, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
50x EDTA-Lösung:	1 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Sigma, E6758) in 100 ml DPBS gelöst, pH = 7,0, sterilfiltriert, Lagerung 4°C
0,1% Trypsin/0,01% EDTA-Lösung (100 ml):	50 ml 0,2%-ige Trypsin-Lösung, 49 ml DPBS, 1 ml 50x EDTA-Lösung
0,05% Trypsin/0,005% EDTA-Lösung (100 ml):	50 ml 0,1% Trypsin/0,01% EDTA-Lösung, 50 ml DPBS

Collagenase IV

(Passagieren von hESCs): Collagenase IV (Worthington Biochemical Corporation, LS064189) angesetzt in DMEM/F12 (2000 U/ml), aliquotiert, Lagerung bei -20°C.
Zum Gebrauch: Stocklösung 2000 U/ml verdünnt auf 200 U/ml mit DMEM/F12

Collagenase IV

(SSC-Isolierung): 1 mg Collagenase IV in 1 ml HBSS gelöst
Dispase Lösung: 2 mg Dispase (life technologies, 17105-041) in 1 ml DPBS gelöst

100x β -ME-Stammlösung: 7 μ l β -Mercaptoethanol (β -ME; Promega, Z523C) in 10 ml 1x DPBS, sterilfiltriert

hbFGF: *human basic fibroblast growth factor* (hbFGF, Peprotech, 100-18), Stocklösung: 10 μ g hbFGF in 200 μ l 0,1%-igem BSA gelöst, aliquotiert, Lagerung bei -20°C
Zum Gebrauch Aliquot auf 5 ng/ μ l in 0,1%-igem BSA verdünnt

hEGF: *human epidermal growth factor* (hEGF, Peprotech, 100-15), Stocklösung: 0,1 mg hEGF in 100 μ l 0,1%-igem BSA gelöst, aliquotiert, Lagerung bei -20°C
Zum Gebrauch Aliquot auf 10 ng/ μ l in 0,1%-igem BSA verdünnt

mGDNF: *mouse glial-derived neurotrophic factor* (mGDNF, Peprotech, 450-44), Stocklösung: 10 μ g mGDNF in 100 μ l *Aqua dest.* gelöst, aliquotiert, Lagerung bei -20°C

FL-Medium: DMEM mit 15% fetalem Kälberserum (FKS; Lonza, F-6SB0011, durch Hitze für 30 min bei 56°C inaktiviert), 1x Glutamin (life technologies, 25030)

α -MEM-Medium: MEM Alpha Medium (life technologies, 22561) mit 20% FKS, 1x β -ME

mES-Medium:	DMEM mit 15% FKS, 1x Glutamin, 1x nicht essentielle Aminosäuren (NEAA; life technologies, 11140-035), 1x β -ME, 10^3 U/ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF; Chemicon, 1107)
hES-Medium:	DMEM/F12 mit 20% <i>knockout serum replacement</i> (KOSR; life technologies, 10828), 1x NEAA, 1x β -ME, 10 ng/ml hbFGF
MTG-Stammlösung (450 μ M):	1 ml Iscove-Medium mit 13 μ l Monothioglycerol (MTG, Sigma, M-6145), sterilfiltriert
Iscove-Medium:	Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium (IMDM) + GlutaMAX TM mit 20% FKS, 1x NEAA. Zu 1 ml Iscove-Medium wurden 3 μ l von der MTG-Stammlösung gegeben
FIII-Medium:	MEM Alpha Medium mit 4,5% FKS, 4,5% KOSR, 1x β -ME, 0,35% D-(+)-Glucose (SIGMA, G8769), 10^3 U/ml LIF
KMSZ-Medium:	DMEM/F12 mit 10% FKS, 1x N2 Supplement (life technologies, 1134670), 1x β -ME, 1x NEAA, 1x Penicillin/Streptomycin (life technologies, 15140-122), 0,3 μ g/ml Hydrocortison (SIGMA, H2882), 10 ng/ml hEGF, 10 ng/ml hbFGF
100x Penicillin/Streptomycin Lösung:	Sigma (P4333), Gebrauchskonzentration im gewünschte Medium 1x - 2x
4% PFA-Lösung:	4% Paraformaldehyd (Sigma, P6148) unter Hitze gelöst in DPBS
BSA-Lösung:	7,5% Rinderserumalbumin (BSA; Gibco,15260-037) mit 1x DPBS auf gewünschte Prozentzahl (0,1 - 4%) verdünnt
MMC-Lösung (200 μ g/ml):	2 mg Mitomycin C (MMC; Serva, 29805.02) in 10 ml DPBS gelöst, aliquotiert, Lagerung bei -20°C

Zum Gebrauch: 300 µl MMC mit 6 ml Medium gemischt, Endkonzentration von 10 ng/ml

CM-DiI-Lösung: Chlormethylbenzamidoderivat des 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyaninperchlorats (CM-DiI; Molecular Probes, C-7000), 0,25 mg/ml gelöst in DMSO

2.1.5.2 *Lösungen und Substanzen für molekularbiologische Methoden*

6 x DNA-Ladepuffer: 0,25% Bromphenolblau (Sigma, B7021), 0,25% Xylencyanol (Sigma, X4126) und 30% Glycerin (Sigma, G7043) in *Aqua dest.*

RNA-Lysis-Puffer (10 ml): 9,8 ml RNA Lysis Puffer (Promega, Z305E) mit 200 µl 48,7%-iges β-ME (Promega, Z523C)

5 x TB-Puffer (1000 ml): 54 g Tris (Roth, 5429.3), 27,5 g Borsäure (Sigma, 15663) in *Aqua dest.*

2.1.5.3 *Lösungen und Substanzen im Tierversuch*

Ciclosporin A-Lösung: 50 mg/ml Stocklösung (Sandimmun®; Novartis); verdünnt mit 0,9% NaCl-Lösung (Braun) auf 2,5 mg/ml, Lagerung bei -20°C

Heparin-Lösung: LiqueminN® 25000 IE (Roth, 19101121), Gebrauchslösung: 6,25 IE verdünnt mit 0,9%-iger NaCl-Lösung

Verdaulösung für die Genotypisierung (100 ml): 10 ml PCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 25 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml Gelatine), 0,05 µl 10%-iges Natriumdodecylsulfat (Serva, 20763), 20 ml 0,1%-iges Dithiothreitol (Roth, 6908.1), 2 ml Proteinase K (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, P2308), 68 ml nukleasefreies Wasser (Ambicon, AM9938)

2.1.5.4 *Lösungen und Substanzen für histologische Untersuchungen*

Anilinblaulösung:	2% Anilinblau (Roth, CI42780), 2,5% Essigsäure (Merck, 1.00063) in <i>Aqua dest.</i>
Eisenhämatoxylin nach Weigert:	Lösung A und B zu gleichen Teilen gemischt und filtriert. Lösung A: 1% Hämatoxylin (Fluka, 51260) in Ethanol (Chemie-Vertrieb Hannover, 603-002-005); Lösung B: 1,16% Eisen(III)-chlorid-hexahydrat-Lösung (Roth, P742.1), 0,37% Salzsäure (Fluka, 84422) in <i>Aqua dest.</i>
Formalin-Fixierungspuffer (100 ml):	Phosphatpuffer (1000 ml): 4,6 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, 1.06346) + 6,5 g Dinatriumhydrogenphosphat (Calbiochem, 567547) in <i>Aqua dest.</i> . Vor Gebrauch: 89,2 ml Phosphatpuffer mit 10,8 ml Formalin (37%, Roth, 7398.2) vermischt, Lagerung bei 4°C
Hämalaun nach Mayer (1000 ml):	1 g Hämatoxylin mit 0,2 g Natriumiodat (Merck, 1.06525) und 50 g Aluminiumkaliumsulfat-dodecahydrat (Merck, 1.01047) in <i>Aqua dest.</i> , über Nacht gelöst. Dann Zugabe von 50 g Chloralhydrat (Merck, 1.0245) und 1 g Citronensäure-Monohydrat (Merck, 1.00244) für 6 Wochen gereift
Ponceaulösung:	1% Ponceau Xylidin (Sigma, P2395), 1% Essigsäure in <i>Aqua dest.</i>

2.2 Methoden

2.2.1 Tierverpaarung und Genotypisierung

Transgene männliche MHC-NEO/MHC-eGFP Mäuse wurden mit C3H-Weibchen verpaart. Da es sich bei C3H-Weibchen im Vergleich zu DBA-Weibchen (Hintergrund der transgenen Mauslinie) um bessere Muttertiere handelt, wurden diese Tiere für die Verpaarungen ausgewählt. Der Nachwuchs wurde zur Bestimmung des genetischen Hintergrunds genotypisiert. Hierfür wurden zunächst Schwanzbiopsien genommen.

Zur Generierung von murinen Schwanzbiopsien wurden die Tiere im Fixierungsgriff gehalten, das Schwanzende mit Desinfektionsmittel gereinigt und ca. 0,3 - 0,5 cm der Schwanzspitze mit einer sterilen Schere abgetrennt und in ein Eppendorfgefäß mit DMEM überführt. Hierbei lag das Alter der biopsierten Mäuse zwischen ein bis zwei Wochen. Die Schwanzbiopsien der zu untersuchenden Mäuse wurden zunächst in 150 µl Verdaulösung für die Genotypisierung bei 55°C über Nacht schüttelnd verdaut, um die enthaltene DNA freizusetzen. Die Proben wurden zur Inaktivierung der Proteinase K nach dem Verdau bei -20°C eingefroren. Zur Bestimmung des genetischen Hintergrunds wurden nun PCR-Analysen mit eGFP- und Neomycin-Primern durchgeführt (siehe Tabelle 1).

2.2.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Umluft-Sterilbank (Heraeus Instruments) und unter Benutzung von sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator der Firma Heraeus Instruments bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% Kohlenstoffdioxid. Die Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 445g für murine Zellen und bei 200g für humane Zellen 5 min zentrifugiert. Eine mikroskopische Beurteilung der Zellen in Bezug auf Morphologie, Dichte und Differenzierungsgrad wurde täglich durchgeführt. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop (Zeiss Axio Observer A1) mittels des digitalen Bildverarbeitungsprogramms Axio Vision 4.6 erstellt.

2.2.2.1 Kultivierung von mausembryonalen Fibroblasten

Die mausembryonalen Fibroblasten (MEFs) wurden im Entwicklungsstadium E14,5-16 aus Embryonen von NMRI-Mäusen isoliert und in FL-Medium auf Zellkulturschalen kultiviert. Zur Verwendung als Versorgerschicht der Stammzellen wurde die Proliferationsfähigkeit der Fibroblasten mit dem Zellspindelgift MMC (10 µg/ml) für 3 Stunden bei 37°C inhibiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Fibroblasten durch dreimaliges Waschen mit DPBS vom MMC befreit, mit 0,2%-igem Trypsin abgelöst und auf 60 x 15 mm mit Gelatine (0,1%) beschichtete Zellkulturschalen (pro cm² Wachstumsfläche 0,1 ml Gelatinelösung bei 4°C über Nacht) umgesetzt. Die so inaktivierten MEFs wurden maximal zwei Tage verwendet.

2.2.2.2 Kultivierung von OP9 Stromazellen

Die OP9 Zellen wurden als Monolayer auf 100 x 20 mm Gelatine beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Alle 48-72 Stunden erfolgte eine Passagierung. Die Zellen wurden zweimal mit 0,1% Trypsin/0,01% EDTA-Lösung behandelt und auf neue Gelatine beschichtete Zellkulturschalen überführt. Als Kultivierungsmedium diente das α -MEM-Medium. Für Differenzierungsversuche wurden die OP9 Zellen, die eine Konfluenz von 50-60% aufwiesen, mit MMC für 3 Stunden bei 37°C in ihrer Proliferationsaktivität gestoppt. Die Zellen wurden dreimal mit DPBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in α -MEM-Medium kultiviert.

2.2.2.3 Kultivierung von hESCs

Die hESCs wurden auf inaktivierten MEFs kultiviert. Als Kultivierungsmedium diente das hES-Medium. Die Zellen wurden alle 4-5 Tage passagiert. Nach einmaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen mit Hilfe einer Collagenase IV-Lösung (200 U/ml) für 5-7 min bei 37°C anverdaut. Die Collagenaselösung wurde entfernt und die Zellen zweimal mit DMEM/F12 gewaschen. Die Zellkolonien wurden mit Zellkulturschabern in kleine Bereiche separiert, vorsichtig mit einer Glaspipette in hES-Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturschalen mit inaktivierten MEFs transferiert. Um eine homogene Kultur zu gewährleisten wurden

differenzierte Bereiche oder gesamte Kolonien aus der Kultur mit Hilfe einer fein gezogenen Glaspipette herausgepickt.

2.2.2.4 Isolierung von SSCs

Zur Isolierung der SSCs aus den Testis von Mäusen wurden die Tiere mittels einer zervikalen Dislokation getötet, in Alkohol desinfiziert und unter der Sterilbank in Rückenlage fixiert. Die Bauchhaut wurde durchtrennt und von der darunterliegenden Bauchdecke gelöst. Der Bauchraum wurde eröffnet und die Testis herauspräpariert. Diese wurden zunächst in DPBS gewaschen, bevor sie von der sie umgebenden Tunica albuginea befreit wurden. Die Testis wurden in eine Collagenase IV-Lösung (1 mg/ml) die mit 250 µg/ml DNase versetzt war überführt und zunächst manuell in kleinere Bereiche zerteilt. Die testikulären Gewebestücke wurden bei 37°C für 15 min inkubiert, wodurch es zu einer deutlichen Separierung der Testistubuli kam. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Suspension bei 200g für 3 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellgewebe zweimal mit HBSS gewaschen. Es folgte eine morphologische Begutachtung der freigesetzten Zellen. Lagen noch größere Zellaggregate vor wurden ein weiterer Verdauschritt mit 0,05% Trypsin/0,005% EDTA-Lösung mit 250 µg/ml DNase durchgeführt. Hierbei wurden 2 ml der Lösung zu der Zellsuspension gegeben und durch mehrmaliges auf und nieder pipettieren resuspendiert. Die Verdaureaktion wurde durch Zugabe von FL-Medium gestoppt und die Zellsuspension durch einen Zellfilter (70 µm Porengröße) gegeben. Die Zellen wurden erneut mit HBSS gewaschen bevor eine Zellzählung durchgeführt wurde. 2 bis 3*10⁶ Zellen wurden in FIII-Medium mit 10 ng/ml mGDNF auf eine 60 x 15 mm mit Gelatine beschichtete Zellkulturschale überführt und bei 37°C kultiviert. Für die ersten drei Tage der Kultivierung wurde dem Medium eine 1x Penicillin/Streptomycin-Mischung hinzugegeben, um eine mögliche Kontamination mit Bakterien vorzubeugen.

2.2.2.5 Kultivierung von SSCs

Die SSCs wurden auf 60 x 15 mm in der Proliferation gehemmte MEF-Schalen in FIII-Medium mit 10 ng/ml mGDNF kultiviert. Die Zellen wurden einmal pro Woche passagiert. Hierbei wurden die Kolonien mit 0,1% Trypsin/0,01% EDTA-Lösung

gewaschen und anschließend etwa 1 min in dieser Lösung inkubiert. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde entfernt, mit FIII-Medium versehen und die Kolonien mit Hilfe einer Glaspipette in der gewünschten Verdünnung auf neue MEF-Schalen transferiert.

2.2.2.6 *Isolierung von Mausschwanzfibroblasten*

Zur Gewinnung von Fibroblasten aus Schwanzbiopsien (Alter der Mäuse eine Woche), wurden die Mäuseschwanzspitzen zunächst in DPBS mit 2x Penicillin/Streptomycin gewaschen. Das Gewebe wurde manuell zerkleinert und mit einer Dispaselösung (2 mg/ml) für 20 min bei 37°C verdaut. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt mit DPBS gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellsuspension mit ca. 1 ml einer 0,05% Trypsin/0,005% EDTA-Lösung versetzt und für 20 min erneut bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden ca. 5-6 ml KMSZ-Medium hinzugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Probe wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in KMSZ-Medium aufgenommen und auf unbeschichtete Zellkulturschalen (Nunc) ausplattiert. Die Schalen wurden für etwa sieben Tage inkubiert, bevor erste Fibroblasten visuell dokumentiert werden konnten.

2.2.2.7 *Reprogrammierung von murinen SSCs in pluripotente Stammzellen*

Zur Reprogrammierung von murinen SSCs in pluripotente Stammzellen wurde eine Überexpression des Pluripotenzgens *Oct4* in den Zellen induziert. Dies geschah durch Transduktion mittels eines lentiviralen Systems. 2 bis $3 \cdot 10^4$ Zellen wurden auf einer 12-Well Zellkulturschale (Nunc) in FIII-Medium ausplattiert und am darauf folgenden Tag viral transduziert. Zur Transduktion der NE4 Zellen (murine SSCs) wurde der Lentivirus von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Martin aus Hannover verwendet (*pSIN-EF2-Oct4-Pur*), der das Pluripotenzgen *Oct4* überexprimiert. Die Multiplizität der Infektion (MOI) gibt das zahlenmäßige Verhältnis von Viruspartikeln zu den Zielzellen an. Für die Transduktion wurde eine MOI von 20 verwendet. In 700 μ l FIII-Medium pro Well der Zellkulturschale wurde die benötigte Menge Virus, 5 μ l/ml Polybrene (Hexadimethrinebromide, Sigma) und 1x Penicillin/Streptomycin-Lösung hinzugegeben. Die Zellen wurden mit dem Virus

für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Virus von den Zellen durch zweimaliges Waschen entfernt. Die Zellen wurden täglich auf ihre Morphologie und Proliferationsverhalten untersucht. Ebenso erfolgte ein täglicher Mediumwechsel. Ca. 5-7 Tage nach Zugabe des Virus wurden die Zellen auf inaktivierte MEF-Schalen mit Hilfe von 0,1% Trypsin/0,01% EDTA-Lösung passagiert. Das Medium wurde schrittweise auf mES-Medium umgestellt. Einzelne morphologisch spezifische reprogrammierte Kolonien wurden aus der Kultur herausgepickt, vermehrt und zu Zelllinien etabliert.

2.2.2.8 *Reprogrammierung von murinen Fibroblasten in pluripotente Stammzellen*

Zur Transduktion der isolierten Schwanzfibroblasten wurde auf den STEMCCA-Virus der Arbeitsgruppe Dr. Darrell Kotton der Universität Boston (pHAGE2-EF1 α Full-hOct4-F2A-hKlf4-IHRES-hSox2-P2A-hc-Myc-W-loxP) zurück gegriffen. Dieser umfasst die Sequenzen von *Oct4*, *Klf4*, *Sox2* und *cMyc*. Durch Transduktion wurden diese vier spezifischen Pluripotenzgene in Zellen überexprimiert. Die Transduktion erfolgte mit einer MOI von 1. Das Verfahren der Transduktion erfolgte wie unter 2.2.2.7 beschrieben.

2.2.2.9 *Kultivierung von undifferenzierten maGSCs/miPSCs*

Die undifferenzierten maGSCs/miPSCs wurden auf inaktivierte MEFs in mES-Medium kultiviert. Alle 24-48 Stunden erfolgte eine Passagierung auf frische MEFs. Hierfür wurde das mES-Medium entfernt und die maGSCs bzw. iPSCs zunächst mit 0,1% Trypsin/0,01% EDTA-Lösung gewaschen und schließlich in der Trypsin/EDTA-Lösung für einige Sekunden inkubiert. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde entfernt und die Zellen mit frischem mES-Medium resuspendiert und auf eine Zellkulturschale mit MEFs in der gewünschten Dichte umgesetzt.

2.2.3 Pluripotenznachweise

2.2.3.1 Alkalische Phosphatasefärbung

Ein Kennzeichen für undifferenzierte Stammzellen stellt die alkalische Phosphataseaktivität dar (Pease *et al.*, 1990). In undifferenzierten Zellen liegt eine hohe Aktivität dieses Enzyms vor. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphorsäureestern zu Phosphat und Alkoholen, welche mit Hilfe des murinen alkalischen Phosphatase-Kits der Firma Sigma eine Blaufärbung der Zellkolonien hervorruft.

Von einer bewachsenen Zellkulturschale wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit DPBS gewaschen und für 30 sek mit einer Fixierlösung (25,5% kitspezifischer Citratlösung, 66,3% Aceton (Roth), 8,2% 37%-iges Formaldehyd (Roth)) behandelt. Danach wurden die Zellen mit *Aqua dest.* gewaschen und für 15 min unter Lichtausschluss mit einer kitspezifischen Färbelösung inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit *Aqua dest.* gewaschen und schließlich für 10 sek mit *Neutral Red* gefärbt, bevor sie mit Leitungswasser gewaschen und die Schalen getrocknet wurden.

2.2.3.2 Epigenetische Analysen

Die Untersuchungen zum Methylierungsschema der Promotoren von *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* und *Klf4* der generierten Zelllinien wurden von der Firma Epigenomics AG durchgeführt. Dazu wurden jeweils drei DNA-Proben von zwei SSC-Linien und einer maGSC-Linie genommen und mit Natriumbisulfit behandelt. Spezifische Bereiche von Pluripotenzgenen wurden zur Analyse ausgewählt. Die Lage der aufgeführten Bereiche wurde zu dem Abstand des Startcodons angegeben. Die angegebenen Primer wurden für PCRs und zur Sequenzierung verwendet.

Oct4-Gen (NM_013633.2): 1. Abschnitt -1,8 kb bis -2 kb im Bereich des distalen Enhancer (DE) des Gesamttranskripts ENSMUST00000025271. Primer: 5' TTG GTT TTG GGA GGA AT 3', 5' AAA CCA TCT CTC TAA CCC TCT 3'.

2. Abschnitt -0,7 kb bis +0,1 kb im Minimalpromoter (MP) des Gesamttranskripts ENSMUST00000025271, beinhaltet den Startcodon des *Oct-4* Gens. Primer: 5'TAA GAA TTG AGG AGT GGT TTT 3', 5'AAA TCT AAA ACC AAA TAT CCA AC 3'.

Nanog-Gen (NM_028016.1): Abschnitt -0,3 kb bis -0,7kb im vorgelagerten Enhancer (*upstream enhancer*, UE) des Gesamttranskripts ENSMUST00000012540. Primer: 5'TTA AAG TAT GGA TTA ATT TAT TAA GGT 3', 5'CTA CAC CTC CAA ACC CTA A 3'.

Sox2-Gen (NM_011443.3): Abschnitt -0,4 kb bis zum Startcodon im MP des Gesamttranskripts ENSMUSG00000074637. Primer: 5'AAC AAC CAT CCA TAT AAT AAA AAC TA 3', 5'TTT TAT GTA TTT AAG AGA GAG TTA ATA TTT 3'.

Klf4-Gen (NM_010637.2): Abschnitt -0,1 kb bis -0,7 kb in der untranslatierten Region (5'UTR) des Gesamttranskripts ENSMUSG00000003032. Primer: 5'GAG TTT GTT TAT TTA GTT ATT ATG GTA A 3', 5'CTC TTA AAC TCA ACA ATA TCC C 3'.

2.2.3.3 *In vitro* Differenzierung von murinen iPSCs mittels hanging drop

Ein Verfahren zum Nachweis der Pluripotenz stellt die Methode der *in vitro* Differenzierung des „hängenden Tropfens“ (*hanging drop*) dar. Auf MEFs angewachsene murine iPSCs (miPSCs) wurden zunächst durch ein initiales *Preplating* von diesen getrennt. Hierbei wurden die Zellen trypsiniert, von der Zellkulturschale abgelöst und auf Gelatine beschichtete Zellkulturschalen überführt. Die miPSCs weisen eine geringere Adhärenz als die MEFs auf. Sie wurden nach etwa 45-60 min durch Abnahme des Überstands separiert. Die von der Versorgungsschicht getrennten miPSCs wurden in EBs zur spontanen Differenzierung angeregt. Dafür wurden die miPSCs in Iscove-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Auf den Deckel einer Bakterienkulturschale (100 x 20 mm,

Greiner) wurden 60-80 Tropfen á 20 µl mit je 300 Zellen pipettiert. Der Boden der Bakterienkulturschale wurde mit 10 ml DPBS gefüllt und der Deckel mit den Tropfen vorsichtig auf die Schale aufgelegt. Bei 37°C wurden die Zellen für zwei Tage inkubiert. In dieser Phase kam es zur Bildung von EBs. Diese wurden an Tag zwei mit 2 ml Iscove-Medium vom Deckel der Bakterienkulturschale gespült und in eine 60 x 15 mm unbeschichtete Bakterienkulturschale (Sarstedt) überführt. Das Medium wurde auf 5 ml aufgefüllt und die Zellen erneut bei 37°C inkubiert. An Tag fünf wurden die EBs auf mit Gelatine beschichtete Schalen ausplattiert. Die Zählweise begann ab diesem Tag neu (5+0, 5+1 usw.). Alle 48-72 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.4 Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in kardiovaskuläre Vorläuferzellen

2.2.4.1 *In vitro* Differenzierung von iPSCs/hESCs via Cokultur auf OP9 Stromazellen

Für eine Differenzierung der iPSCs/hESCs wurde das Verfahren der Cokultur mit OP9 Zellen etabliert. Hierfür wurden OP9 Zellen mit MMC in ihrer Proliferationsaktivität gestoppt. Am darauf folgenden Tag wurden die zu differenzierenden iPSCs einem *Preplating* (siehe 2.2.3.3) unterzogen. $3 \cdot 10^4$ Zellen pro 100 x 20 mm Zellkulturschale wurden auf die abgestoppten OP9 Zellen ausplattiert und in Iscove-Medium kultiviert.

Zur Differenzierung der hESCs wurden die Zellen von einer voll bewachsene Schale mit Collagenase IV verdaut, mit einem Zellkulturschaber von der Schale gelöst und auf drei 100 x 20 mm Zellkulturschalen mit in der Proliferation gehemmten OP9 Zellen überführt. Nach drei Tagen wurden 50% des Mediums durch frisches Iscove-Medium ersetzt.

An Tag sechs bzw. elf konnten durch die Differenzierung spezifische Zellpopulationen, wie FLK1/KDR positive und negative Zellen, mit Hilfe einer Fluoreszenz aktivierten Zellsortierung (FACS) gewonnen oder durch eine Durchflusszytometrieanalyse bestimmt werden.

Zur Weiterkultivierung nach der Sortierung wurden 500.000 Zellen der gewünschten Zellpopulation auf eine 60 x 15 mm Schale mit inaktivierten OP9 Zellen in Iscove-Medium replattiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

2.2.4.2 *In vitro* Differenzierung von hESCs mittels mass culture

Zur Differenzierung der hESCs wurde zusätzlich das Verfahren der *mass culture* verwendet. Hierfür wurden drei bis vier dicht bewachsene 60 mm x 15 mm hESC-Schalen mit Collagenase IV verdaut und mit Hilfe eines Zellschabers in kleine Zellbereiche separiert. Diese Zellbereiche von zwei Schalen wurden vereint und auf eine 60 mm x 15 mm Bakterienkulturschale (Greiner) in hES-Medium überführt. Die Bildung von EBs wurde somit initiiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in einem Falconröhrchen sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend in Iscove-Medium aufgenommen und auf eine neue Bakterienkulturschale überführt. Alle zwei Tage folgte ein Mediumwechsel. Am Tag acht wurden die gebildeten EBs auf Gelatine beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert. An verschiedenen Tagen der Differenzierung wurden PCR-Proben genommen oder Durchflusszytometrieanalysen und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

2.2.5 Durchflusszytometrie und *Fluorescence activated cell sorting* (FACS)

Die Durchflusszytometrieanalyse dient dem quantitativen Nachweis von fluoreszenzmarkierten Proteinen. Die zu untersuchenden Zellen wurden durch ein *Preplating* (siehe 2.2.3.3) von ihren Versorgerzellen getrennt und vereinzelt. Intrazelluläre Strukturproteine wie MF20, cTNT oder α -SMA wurden zunächst mit Methanol/Aceton im Verhältnis von 7/3 für 10 min bei -20°C fixiert. Um eine Einzelzellsuspension zu gewährleisten, wurden die Proben zwischendurch gevortext. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers (siehe Tabelle 2, 100 μl für $1 \cdot 10^6$ Zellen) in geeigneter Verdünnung in 0,5% BSA für 45 min bei 37°C . Die Zellen wurden anschließend dreimal mit DPBS gewaschen und schließlich für 45 min bei 37°C mit 100 μl des Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 3) in geeigneter Verdünnung in 0,5% BSA behandelt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit DPBS und einmaligen Waschen mit *Aqua dest.* wurden die Zellen in 400 μl 0,5%-iger BSA-Lösung aufgenommen und über einen 70 μm

Zellfilter (BD Bioscience) in ein Durchflusszytometrierröhrchen (Becton Dickinson) überführt.

Für Oberflächenmarker wie FLK1 und KDR folgte die Inkubation mit 100 µl des jeweiligen primären Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Antikörpers (siehe Tabelle 2) für 35 min bei 4°C. Die Zellen wurden dreimal mit DPBS gewaschen und über einen Zellfilter in ein Durchflusszytometrierröhrchen mit 0,5%-iger BSA-Lösung übertragen.

Die Messung der spezifischen Fluoreszenz erfolgte am FACS Canto von Becton-Dickinson mit der FACS-DIVA Software. Zusätzlich wurde für die Auswertung das Programm WinMDI 2.9 benutzt.

Zur Separierung spezifischerer Zellpopulationen, wie die jeweiligen positiven und negativen FLK1/KDR Zellpopulationen, wurde ein FACS durchgeführt. Hierfür wurden die differenzierten iPSCs wie für die Durchflusszytometriemessung vorbereitet. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit den spezifischen PE-gekoppelten Antikörpern mit DPBS gewaschen und in 0,5% BSA-Lösung mit 5% FKS aufgenommen und mit Hilfe des FACS Aria II (Becton-Dickinson) sortiert. Zur Eingrenzung der Zellpopulationen wurde ebenfalls die FACS-DIVA Software verwendet. Die separierten FLK1 positive Zellen konnten direkt für *in vivo* Analysen verwendet oder *in vitro* replattiert werden.

2.2.6 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Identifizierung von zellspezifischen Markerproteinen wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden vier Deckgläschen in eine 60 x 15 mm Zellkulturschale mit 4 ml 0,1%-iger Gelatine beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Die zu analysierenden Zellen wurden auf den Deckgläschen ausplattiert und zu spezifischen Zeitpunkten fixiert. Dafür wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zellen die auf spezifische Strukturproteine wie MF20 oder β -III TUBULIN analysiert wurden, wurden mit einer Methanol/Aceton-Lösung wie unter 2.2.5 beschrieben fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen mit 4 ml 1%-iger BSA-Lösung blockiert. Bis zur Färbung wurden die Zellen bei 4°C gelagert. Für kernlokalisierte Zielproteine, wie SOX2 und NANOG, wurde vor der Färbung eine Behandlung mit 0,1% TritonX-

100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma) für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt, um die Permeabilität der Zellwand zu erhöhen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 100 µl des primären Antikörpers (siehe Tabelle 2) auf ein Deckgläschen in geeigneter Verdünnung pipettiert. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen. Die Inkubation mit 200 µl des sekundären Antikörpers (siehe Tabelle 3), in geeigneter Verdünnung, erfolgte bei 37°C für 60 min. Dann wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit DPBS gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde der Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI 0,4 µg/ml, Sigma) für 10 min bei Raumtemperatur verwendet. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit DPBS und einmaligem Waschen mit *Aqua dest.* wurden die Zellen mit Vectashield Mounting Medium (VECTOR Laboratories) eingedeckt. Die Ränder des Deckgläschens wurden mit Nagellack versiegelt. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 von Zeiss. Als digitales Bildverarbeitungsprogramm diente die Zeisssoftware Axio Vision 4.6.

2.2.7 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktions (RT-PCR)-analyse

Für molekularbiologische Analysen wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst von eventuell vorhandenen Versorgerzellen durch ein *Preplating* getrennt, zweimal mit DPBS gewaschen und mit Hilfe eines Zelllysispuffers lysiert. Die so gewonnenen Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.7.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolation erfolgte mittels des SV Total RNA Isolations Systems der Firma Promega. 250 µl von Zelllysatproben wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl 95%-igem Ethanol vermischt. Die Lösung wurde in Filtersäulen (*spin basket assembly tubes*) überführt und bei 12000g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Es wurden 600 µl RNA Wash Solution zugegeben und erneut bei 12000g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut verworfen. Von dem DNA-Inkubations Mix (Pro Probe: 40 µl Yellow Core Puffer, 5 µl 0,09 M MnCl₂, 5 µl DNaseI von Promega) wurden je 50 µl

direkt auf den Filter der Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 200 µl DNase Stop Solution hinzugegeben und bei 12000g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nun wurden 600 µl RNA Wash Solution zu den Proben gegeben und erneut bei 12000g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Ein letzter Waschschrift erfolgte durch Zugabe von 250 µl RNA Wash Solution und einer Zentrifugation von 2 min bei 12000g. Die RNA wurde mit nucleasefreiem Wasser (100 µl) aus der Filtermembran durch 1-minütiges Zentrifugieren gespült und in einem neuen Gefäß aufgefangen. Zur Prüfung des isolierten RNA-Gehalts wurde die Konzentration durch Messung der Extinktion der jeweiligen Proben bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm am Photometer (Eppendorf) bestimmt. Der Nullabgleich wurde mit nucleasefreiem Wasser durchgeführt.

2.2.7.2 *Reverse Transkription (RT)*

Um spezifische Genabschnitte zu amplifizieren, musste die RNA zunächst in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben werden. Als Primer diente hier ein Oligo (dT) Primer, der spezifisch an den Poly-A-Schwanz von eukaryontischen mRNAs bindet. 200 ng der isolierten RNA wurden für die cDNA-Synthese in einem Volumen von 10,2 µl eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 20 µl (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Reverse Transkriptions (RT)-Ansatz. Die verschiedenen Substanzen (außer die dNTPs) wurden von der Firma Applied Biosystems hergestellt. Die dNTPs wurden von der Firma Bioline verwendet

Eingesetzte Substanzen	20 µl Endvolumen
200 ng RNA in H ₂ O	10,2 µl
10 x PCR-Puffer II	2 µl
25 mM Magnesiumchlorid	4 µl
100 mM dNTPs	0,8 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
Oligo (dT) ₁₆ (50 µM)	1 µl
Mul V reverse transcriptase (50 U/µl)	1 µl

Folgendes Programm wurde im Thermocycler (Sensoquest) durchlaufen:

10 min	22°C
50 min	42°C
10 min	95°C
unendlich	4°C

Die gewonnene cDNA konnte in unterschiedlichen Polymerasekettenreaktionen auf die Expression von verschiedenen Genen untersucht werden. Zur Lagerung wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

2.2.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in einem Thermocycler (SensoQuest) durchgeführt und umfasst drei Stufen. Zunächst wurde die doppelsträngige DNA bei 95°C denaturiert (einmalig für 3 min, vor jedem weiteren Zyklus für 15 sek). Eine Anlagerung (*annealing*) von spezifischen Primern an die einzelnen DNA-Stränge erfolgte für 25 sek bei ca. 52-60°C (primerspezifisch, siehe Tabelle 1). Am Ende jedes PCR-Zyklus erfolgte die Elongation, bei der die Einzelstränge beginnend bei dem Primer von der 5' zur 3' Richtung repliziert wurden (72°C für 30 sek). Dazu befanden sich in der Lösung Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) und Go-Taq-Polymerase. Diese drei Schritte wurden in 30-40 Zyklen (Anzahl ist primerspezifisch) wiederholt.

Tabelle 5: PCR-Ansatz. Die Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma Promega erworben. Das DEPC-Wasser und das DMSO wurden von der Firma Sigma bezogen.

Eingesetzte Substanzen	50 µl Endvolumen
cDNA bzw. DNA	2 µl
DEPC-Wasser	30,1 µl
5 x Go-Taq-Puffer I	4,8 µl
10 mM dNTPs	3,2 µl
Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl)	2 µl
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	2 µl
Go-Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
DMSO	0,5 µl

Zum Abschluss erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei 72°C bevor die Proben auf 4°C herab gekühlt wurden. Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 5 aufgeführt.

2.2.7.4 Gelelektrophorese

Das PCR-Ergebnis wurde mittels Gelelektrophorese analysiert. Hierzu wurde der 50 µl PCR-Ansatz mit 10 µl 6 x Loading-Puffer versetzt und auf einem 1,5%-igen Agargel (1,5 g DNA-Agar der Firma SERVA in 100 ml 1x TB-Puffer) bei 100 V für 45 min in einer Gelkammer von BioRad aufgetrennt. Durch Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Serva) in die Agarlösung konnten die Fragmente als Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Anhand eines Markers (*Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder Plus* von Fermentas, 0,5 µg/µl) konnten die Größen der cDNA-Amplifikate ermittelt werden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des MultiImage Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation) archiviert.

2.2.8 In vivo Tiermodelle

2.2.8.1 Induktion eines Myokardinfarkts

Eine Stunde vor Beginn des operativen Eingriffs wurde mit der Schmerztherapie der Mäuse begonnen. Die Tiere erhielten dazu eine interperitoneale (i.p.) Injektion von 0,1 mg/kg eines Opioidanalgetikums (Temgeseic®, Wirkstoff: Buprenorphin, Essex Pharma GmbH).

Zur Induktion des Myokardinfarkts wurde die Maus in Inhalationsnarkose unter 2% Isofluran (Forene®, Abbott) mit einer Durchflussrate von 1000 ml O₂/min gelegt. Die Maus wurde in Rückenlage gedreht, an den Extremitäten fixiert und am Thoraxbereich mit Elca® med (Asid Bonz GmbH) enthaart. Zur Induktion des Myokardinfarkts musste die Maus zunächst durch das Einführen eines Endotrachealtubus (Hugo-Sachs-Elektronik) mit einer Beatmungsmaschine (Minivent, Hugo-Sachs-Elektronik) verbunden werden. Zur Platzierung des Tubus unter Sicht wurde eine Inzision in der Mitte des Halses mit Freilegung der Trachea durchgeführt. Durch vorsichtiges Herausziehen der Zunge konnte der Tubus unter Sicht in die Trachea eingeführt werden. Die Maus wurde mit einer Frequenz von 150 min⁻¹ und einem Atemzugvolumen von ca. 150 µl beatmet. Durch die Freilegung

der Trachea im Halsbereich der Maus konnte die korrekte Position des Tubus über den gesamten operativen Eingriff hinweg kontrolliert werden. Die Narkosetiefe wurde durch gezielte Schmerzreize kontrolliert.

Die Maus wurde anschließend seitlich gelagert um einen guten Zugang zur linken lateralen Thoraxwand zu gewährleisten. Die oberste Hautschicht wurde mit einem ca. 1 cm langen Schnitt eröffnet. Diese wurde von der darunterliegenden Muskelschicht vorsichtig gelöst. Die Muskelschicht wurde im 45° Winkel versetzt zum Hautschnitt mit Pinzetten in natürlicher Faserung der Muskelstränge eröffnet und mit Haken aufgespreizt. Der Thorax wurde durch einen Schnitt durch einen Zwischenrippenraum eröffnet. Die Thoraxwand wurde aufgespreizt und mittels Haken fixiert. Das Herz wurde durch Öffnung des Perikards freigelegt. Zur Induktion eines Myokardinfarkts wurde eine Ligation der linken Koronararterie mittels eines chirurgischen Nahtmaterials (Ethicon, Ethilon 0-9) ca. 1 cm unterhalb des Vorhofes durchgeführt. Die Durchblutung des darunterliegenden Gewebes wurde somit blockiert, was durch eine deutliche Entfärbung des Myokards visualisiert werden konnte. Nach Zell- oder NaCl-Injektion wurde die Thoraxwand mit Einzelknopfnähten (Ethicon, Prolene 6-0) verschlossen und die Funktion der Lunge durch kurzes Blockieren des Abgangsluftstroms überprüft. Die Muskelschicht wurde in ihre Ausgangsposition zurück verschoben und die darüber liegende Hautschicht und auch die Eröffnung im Halsbereich durch Einzelknopfnähte verschlossen. Die Isofluranzufuhr wurde gestoppt. Bei Einsetzen einer selbstständigen regelmäßigen Atmung, wurde der Tubus entfernt und die Tiere auf einer Wärmeplatte weiter beobachtet.

2.2.8.2 Intrakardiale Zellinjektion

Die intrakardiale Zellinjektion erfolgte durch Aufnahme von $5 \cdot 10^5$ Zellen in 20 μ l Heparinlösung. Die Zellen wurden in vier Injektionspunkten zu je 5 μ l appliziert. Nach Induktion eines Myokardinfarkts wurden FLK1 positive Zellen nach der Sortierung in den farblich separierten Grenzbereich des Infarktes zum gesunden Myokard in der linksventrikulären Herzvorderwand der C57B/6J-Wildtypmäuse injiziert.

Für Teratombildungsanalysen wurden $3 \cdot 10^5$ undifferenzierte maGSCs ebenfalls in vier Injektionspunkten im Bereich der linksventrikulären Herzvorderwand von

immundefizienten RAGN Tieren injiziert. Die Kontrolltiere erhielten Injektionen mit 0,9%-iger NaCl-Lösung in der gleichen Weise.

Zur Identifizierung der intrakardial injizierten Zellen, konnten diese zuvor mit einem fluoreszierenden Zellfarbstoff (CM-DiI) markiert werden. Hierfür wurden die maGSCs vor der Injektion mit der CM-DiI-Färbelösung für 5 min bei 37°C inkubiert. Für $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden 60 µl Stockfärbelösung in 1 ml DMEM verwendet. Anschließend folgte eine weitere Inkubation für 15 min bei 4°C. Die Zelllösung wurde mit DMEM verdünnt und zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in DPBS gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und die gewünschte Zellzahl in einer Heparinlösung aufgenommen und den Mäusen intrakardial injiziert.

Zur Vermeidung einer Abstoßung der implantierten Zellen wurde den Mäusen der MI-Studie täglich im 24 Stunden Rhythmus das Immunsuppressivum CsA in einer Konzentration von 20 µg/kg Körpergewicht i.p. verabreicht.

Zur weiteren Schmerztherapie wurden die Tiere eine Woche mit Metamizol (Novaminsulfon Lichtenstein®, Wirkstoff: Metamizol-Natrium*H₂O, Stocklösung 500 mg/ml, Gebrauchskonzentration: 1 Tropfen auf 1 ml Trinkwasser) im Trinkwasser versorgt. Die Tiere wurden täglich auf ihren Gesundheitszustand untersucht. Bei deutlichem Schmerzempfinden wurde erneut eine i.p. Injektion von Buprenorphin verabreicht. Bei atypischen Verhalten oder starken Gewichtsverlust (mehr als 20% des Körpergewichtes) wurde ein Tierarzt hinzugezogen.

2.2.8.3 Teratombildungsanalysen durch subkutane Zellinjektion

Zur Untersuchung der Tumorigenität von undifferenzierten miPSCs und FLK1 positiven Zellen wurden die zu untersuchenden Zellen subkutan in die linke innere Flanke einer immundefizienten RAGC Maus injiziert. Dazu wurden die Zellen von ihrer Versorgerschicht durch ein *Preplating* (siehe 2.2.3.3) getrennt und gezählt. $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 100 µl DPBS aufgenommen. Die Maus wurde im Haltegriff fixiert und die Zellen subkutan injiziert. Für immunologische Untersuchungen wurden ebenfalls undifferenzierte miPSCs in immundefiziente RAGN Tiere, autolog und syngene in C57B/6J-Mäuse und allogene in SV129-Mäuse injiziert. Die so injizierten Tiere wurden bis zu 16 Wochen lang auf eine Tumorbildung untersucht.

Bei Bildung eines Tumors mit einem Durchmesser von etwa 1 cm, wurde dieser aus der Maus entnommen.

2.2.8.4 Entnahme von Analysespräparaten

Zur Untersuchung der *in vivo* durchgeführten Tierversuche wurden zu spezifischen Zeitpunkten Teratom- oder Organpräparate entnommen. Die gewünschten Tiere wurden via zervikaler Dislokation getötet, die zu analysierenden Organe und Teratome entnommen und in 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen. Bei der Herzentnahme wurde das Herz nach der Entnahme noch mit 0,9%-iger NaCl-Lösung perfundiert. Die entnommenen Tumore und Organe wurden in Formalinfixierlösung für 4h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C fixiert. Die Fixierlösung wurde durch mehrmaliges Waschen mit *Aqua dest.* entfernt. Bis zur weiteren histologischen Verwendung konnten die Präparate bei 4°C in wässriger Lösung für kurze Zeit gelagert werden.

Für immunologische Analysen wurden den Versuchstieren Milzbiopsien entnommen. Diese wurden nach der Entnahme in PBS gewaschen und direkt zur Isolierung von NK-Zellen weiter verwendet (siehe 2.2.10).

2.2.8.5 Echokardiografie

Zur Untersuchung und Charakterisierung des induzierten Myokardinfarkts wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten echokardiografische Analysen an den operierten Mäusen durchgeführt. An Tag 2, 14, 28 und 56 wurden die Tiere am Thoraxbereich enthaart, mittels 1% Isofluran sediert und echokardiografisch untersucht. Somit wurden wichtige Herzparameter bestimmt, die zur Analyse der Herzfunktion herangezogen wurden: Septumdicke, der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDD), der linksventrikuläre endsystolische Diameter (LVESD), das enddiastolische Volumen (EDV), das endsystolische Volumen (ESV) und die Herzfrequenz. Aus diesen Parametern wurden charakteristische Kenngrößen berechnet. Hierzu zählt die Ejektionsfraktion (EF) und die Verkürzungsfraktion (*fractional shortening*, FS).

Die EF bezeichnet die Menge des ausgeworfenen Blutes während der Kontraktion des Herzens. Sie lässt sich als Quotient des Schlagvolumens (SV) zum

Gesamtblutvolumen der Herzkammer darstellen. Das Schlagvolumen wurde aus der Differenz vom EDV zum ESV berechnet. Somit ergab sich folgende Formel:

$$EF = \frac{SV}{EDV} = \frac{(EDV-ESV)}{EDV}.$$

Die FS beschreibt die Pumpfunktion des linken Ventrikels. Sie beschreibt die Verkürzung des Herzens während des Pumpvorgangs. Folgende Formel diente zur Berechnung:

$$FS = \frac{(LVEDD-LVESD)}{LVEDD}.$$

Die Echokardiografien und die Auswertungen wurden in einem Blindversuch von Kirsten Koschel, Arbeitsgruppe Translationale Kardiologie, Abteilung Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.2.9 Histologische Analysen

2.2.9.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Für histologische Analysen wurden die in Formalinlösung fixierten und gewässerten Präparate in Einbettkassetten (Medite) überführt. In einem Gewebeeinfiltrationsautomat (Leica, *Benchtop Tissue Processor 1020*) wurde den Organen das Wasser durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 2x 96%, 2x 100% für jeweils 75 min) entzogen. Der Alkohol wurde im nächsten Schritt durch zweimaliges Waschen in Chloroform (Th. Geyer) für jeweils 75 min entzogen, um dann durch flüssiges Paraffin (Süsse, dreimaliges Waschen für jeweils 75 min) ersetzt zu werden. Somit konnten die Herzen vollständig mit flüssigem Paraffin infiltriert werden. Das paraffinierte Gewebe wurde schließlich manuell mit Hilfe einer Ausgießstation der Firma Leica in Paraffinblöcke gegossen. Für histologische Analysen konnten nun 6 µm feine Gewebeschnitte aus diesen Paraffinblöcken mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Leica) geschnitten werden. Diese Schnitte wurden zur Ausdehnung in ein Wasserbad (45°C) überführt und dann auf Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Scientific) gezogen. Diese wurden für 60 min bei 45°C im Wärmeschrank getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.9.2 *Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung basiert auf dem Prinzip der Elektroadsorption und dient durch die unterschiedlich eingesetzten Farbstoffe als Übersichtsfärbung zur Unterscheidung von Zellkernen und Zytoplasma. Die Färbung wurde in der Pathologie der Universitätsmedizin nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Entparaffinierung der Gewebeschnitte durch viermaliges Waschen für 2 min in Roticlear® (Roth), Bewässerung der Schnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100%, 2x 96%, 1x 75%, *Aqua dest.* für jeweils 2 min), dreimalige Zellkernfärbung mit Hämalaun für jeweils 2 min, Spülen mit fließendem Leitungswasser für 2 min zur Änderung des pH-Wertes, Zytoplasmafärbung mit Eosin für 2x 2 min und aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung (*Aqua dest.*, 2x 96%, 2x 100%, 3x Roticlear® für jeweils 2 min). Schließlich wurden die Gewebeschnitte mit Entellan® (Merck) eingedeckt.

2.2.9.3 *Masson Goldner-Färbung*

Bei der Masson Goldner (MG)-Färbung handelt es sich um eine Trichromfärbung zur Darstellung von fibrotischem Bindegewebe. Hierbei werden kollagene Fibrillen gegen Epithelgewebe und Muskelgewebe abgegrenzt. Zunächst wurden auch hier die Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Es folgte eine progressive Kernfärbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert für 10 sek. Nach kurzem Spülen in *Aqua dest.* und fließendem *Aqua dest.* für 5 min, folgte ein kurzes Waschen in 1%-iger Essigsäure, bevor nach einem erneuten Spülen in *Aqua dest.* die Muskulatur für 40-45 sek mit Ponceau Xylidin gefärbt wurde. Nach erneutem dreimaligen Spülen in *Aqua dest.* und einmaligen Spülen in 1%-iger Essigsäure erfolgte eine Beize für 7 min mit 1%-iger Phosphomolybdänsäure (Sigma). Die Schnitte wurden erneut in *Aqua dest.* und in 1%-iger Essigsäure gewaschen um anschließend für 50 sek mit dem Bindegewebsfarbstoff Anilinblau gefärbt zu werden. Nach erneutem Spülen der Schnitte in *Aqua dest.* und 1%-iger Essigsäure folgte eine 2-minütige Differenzierung in Essigsäure. Zur Entwässerung wurden die Gewebeschnitte für 2 min in 100% EtOH mit 1%-iger Essigsäure inkubiert. Schließlich folgte eine Behandlung für zweimal 5 min in Roticlear®, bevor die Schnitte in Entellan® eingedeckt wurden.

2.2.10 Immunologische Analysen

Die anfallenden immunologischen Analysen, wie die Isolierung der NK-Zellen aus murinen Milzbiopsien mittels magnetisch aktivierter Zellsortierungs (*magnetic activated cell sorting*, MACS)-Technik, Zellinkubationen und Chromfreisetzungstests wurden in der Immunologie der Georg August Universität Göttingen von Prof. Dr. Ralf Dressel durchgeführt. Hierzu wurden die aus den murinen Milzbiopsien gewonnenen NK-Zellen mit den selben Stammzellen (undifferenzierte maGSCs und miPSCs), die zuvor im Tierversuch in die Maus injiziert wurden, für vier Stunden inkubiert. Die Stammzellen wurden vor der Inkubation mit radioaktivem Chrom (^{51}Cr , Na_2CrO_4 , Hartmann Analytic) markiert. Nach beendeter Inkubation konnte die spezifische Lyse der maGSCs durch die spezifischen NK-Zellen der Akzeptormaus, mittels Zugabe eines Szintillators (Rotiszint® eco plus, Roth) und Messung durch einen Perkin Elmer Micro Beta Counters bestimmt werden.

2.2.11 Statistische Auswertungen

Aufgeführte Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Signifikanzangaben wurden bei mindestens drei unabhängigen Experimenten mittels dem *student's t-test* angegeben. Hierfür wurde das Programm Graph Pad Prism 4.0 zur Hilfe genommen. Zur Darstellung der Signifikanzen wurde folgendes Schema verwendet: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von iPSCs aus murinen SSCs

Um die gewünschte kardiale Differenzierung der Zellen für die weiteren Analysen gut verfolgen und detektieren zu können, wurde ein transgenes MHC-NEO/MHC-eGFP Mausmodell verwendet, welches ein Fluoreszenzgen (*eGfp*) über einen kardialen Promoter reguliert. Als Promoter fungiert *Myosin heavy chain (Mhc)*, welches einen Marker für ausgereifte Kardiomyozyten darstellt.

Ebenfalls wurde eine Antibiotikasequenz (Neomycin, *Neo*) über MHC reguliert, um die MHC positiven Zellen durch Antibiotikagabe (Geneticin, G418) zu selektieren. Dieses MHC-NEO/MHC-eGFP Mausmodell basiert auf einem DBA-Hintergrund. Zur Verpaarung wurden männliche transgene Mäuse mit C3H-Weibchen gekreuzt. Der entstandene Nachwuchs wurde zur Überprüfung des transgenen Hintergrunds genotypisiert (Abb. 3). Männliche Tiere die sowohl die *Neo*- als auch die *eGfp*-Gensequenz im Genom aufwiesen wurden zur Isolierung von SSCs verwendet.

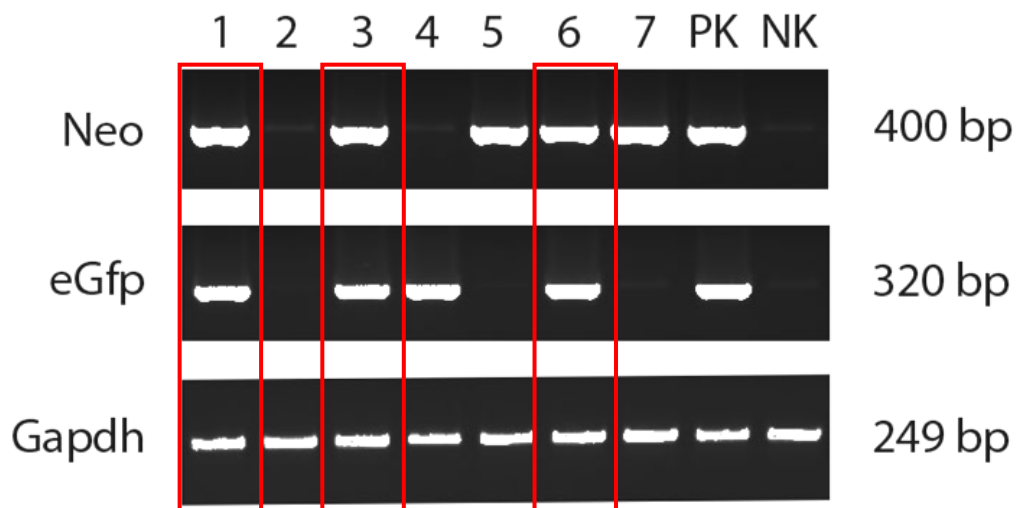


Abb. 3: Beispiel einer Genotypisierungs-PCR-Analyse. Diese Abbildung zeigt Ergebnisse einer PCR-Analyse zur Genotypisierung von Nachkommen der Verpaarung von männlichen transgenen MHC-NEO/MHC-eGFP-Mäusen mit C3H-Wildtyp Weibchen. Die Tiere 1, 3 und 6 weisen sowohl die *Neo*- als auch die *eGfp*-Gensequenz auf (rot umrandet). Als Positiv- und Negativkontrolle dienen entsprechende verdaute Schwanzbiopsien von Kontrolltieren. *Gapdh* dient als Kontrolle der eingesetzten DNA-Konzentration. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle, bp = Basenpaare.

3.1.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von SSCs aus murinen Testis

Zunächst wurden die SSCs aus den Testis von MHC-NEO/MHC-eGFP positiven Mäusen im Alter von vier Wochen isoliert. Im Durchschnitt wurden $7 \cdot 10^6$ testikuläre Zellen von einer Maus bei einer Isolation gewonnen. Durch spezifische Kultivierung auf unbeschichtete Zellkulturschalen wurden SSCs von somatischen Zellen separiert. Die somatischen Zellen lagerten sich adhärent an die Zellkulturschale an. Die SSCs befanden sich im Überstand oder hefteten leicht an den somatischen Zellen. Nach zwei Tagen Kultivierung hefteten zwischen 32% und 68% der isolierten Zellen an der Zellkulturschale. Die nicht gebundenen flotierenden Zellen wurden abgenommen und auf MEFs transferiert. Durch weitere Kultivierung und morphologische Begutachtung wurden SSCs generiert. Durch Zugabe von 10 ng/ml mGDNF und Kultivierung in FIII-Medium wurden stabile SSC-Linien etabliert. Die isolierten SSCs wiesen eine für sie typische Morphologie in „Weintrauben“-Struktur auf (Abb. 4). Es wurden fünf Mäuse zur Isolation verwendet. Aus jeder Maus konnten SSCs gewonnen werden. Die etablierten Zelllinien wurden als NE1 bis NE5 bezeichnet. Die Zelllinie NE4 wurde für die weiteren Experimente dieser Arbeit verwendet.

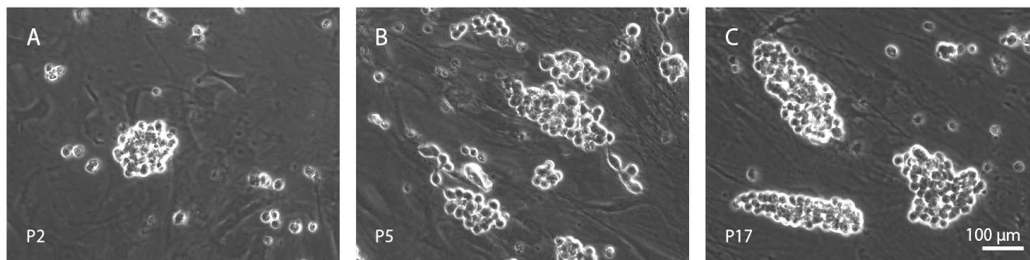


Abb. 4: Morphologische Struktur der isolierten SSCs unterschiedlicher Passagen. Bild A: Passage 2, Bild B: Passage 5 und Bild C: Passage 17. Deutlich ist die Entwicklung zur charakteristischen „Weintraubenstruktur“ der SSC-Kolonien zu erkennen. Skalierung: 100 µm.

Die generierten SSCs wurden auf ihre spezifische Genexpression analysiert. Als Vergleichszellen dienten neben den maGSCs auch testikuläre Zellen und MEFs (Abb. 5). Es wurden charakteristische SSC Marker, wie *Stra8*, *Plzf*, *Gfr1α*, *Dazl* und *Vasa* detektiert. SSCs zeigten eine höhere Expression dieser Marker gegenüber maGSCs. STRA8 und VASA sind keimbahnspezifische cytoplasmatische Proteine während DAZL ein keimbahnspezifisches RNA bindendes Protein darstellt. STRA8

wird für die meiotische Initiation der Keimzellen benötigt (Oulad-Abdelghani *et al.*, 1996). VASA, als Protein zur Aufrechterhaltung der Keimzellen und deren Funktion, wird vor allem in Spermatozyten exprimiert (Castrillion *et al.*, 2000). DAZL ist überwiegend für die Differenzierung der Keimzellen verantwortlich und in verschiedenen Stadien der Spermientwicklung exprimiert (Xu *et al.*, 2001). Der Transkriptionsfaktor PLZF und der GDNF-Rezeptor GFR1 α sind Marker für undifferenzierte SSCs und stark in den SSC-Linien im Vergleich zu den testikulären Zellen und den maGSCs exprimiert. Ebenso wurde eine leicht erhöhte Expression der spermatogonialen Marker gegenüber den testikulären Zellen detektiert. Die Expression in den maGSCs war nur schwach ausgeprägt.

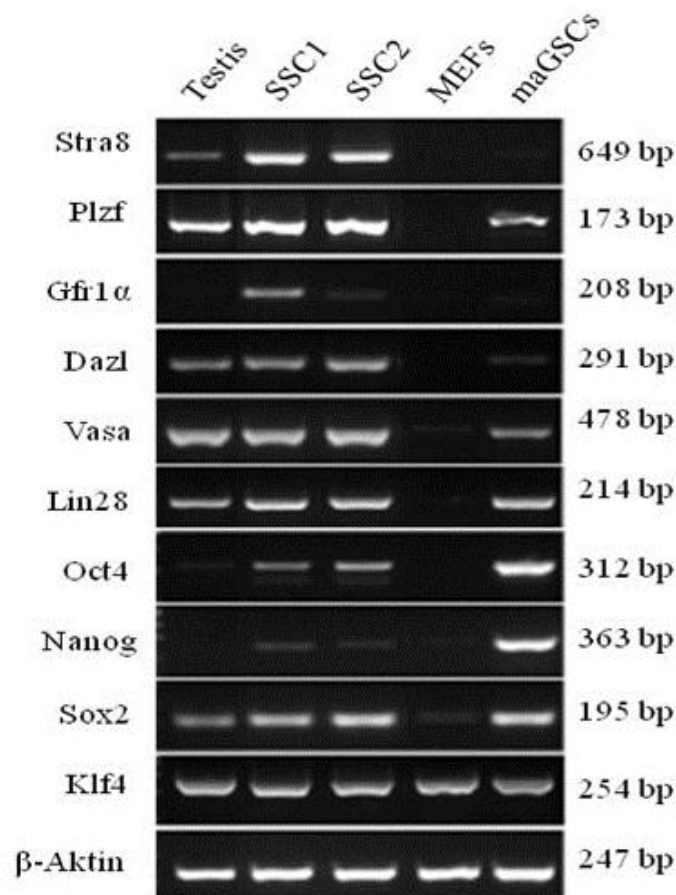


Abb. 5: Genexpressionsanalysen der isolierten SSCs. Diese Abbildung zeigt die durch RT-PCR detektierten Genexpressionsanalysen von spermatogonialen (*Stra8*, *Plzf*, *Gfr1 α* , *Dazl*, *Vasa* und *Lin28*) und Pluripotenz-Markern, wie *Lin28*, *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* und *Klf4*. Zwei SSC-Linien (SSC1+2) wurden im Vergleich zu testikulären Zellen (Testis), multipotenten adulten Stammzellen (maGSCs) und mausembryonalen Fibroblasten (MEFs) untersucht. *β -Aktin* gilt als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Konzentration. Bp = Basenpaare.

Lin28 als Pluripotenz- und auch als spermatogonialer Marker zeigte eine gleichmäßige Expression. *Lin28* wird auch in Spermatogonien Typ A exprimiert (Zheng *et al.*, 2009). Der Pluripotenzmarker *Oct4* wurde in SSCs im Vergleich zu maGSCs nur leicht detektiert. Die Expressionsstärke war jedoch im Vergleich zu den testikulären Zellen in den SSCs erhöht. *Nanog*, ebenfalls ein Marker der Pluripotenz, wurde in den SSCs nur sehr schwach detektiert. Die pluripotenten Marker *Klf4* und *Sox2* wurden gleichmäßig in den untersuchten Proben exprimiert.

Die generierten SSCs wurden ebenso auf ihre spezifische Proteinexpression analysiert (Abb. 6). Es wurden charakteristische spermatogoniale Marker, wie PLZF, STRA8, GFR1 α , DAZL und VASA in den Zellkolonien nachgewiesen.

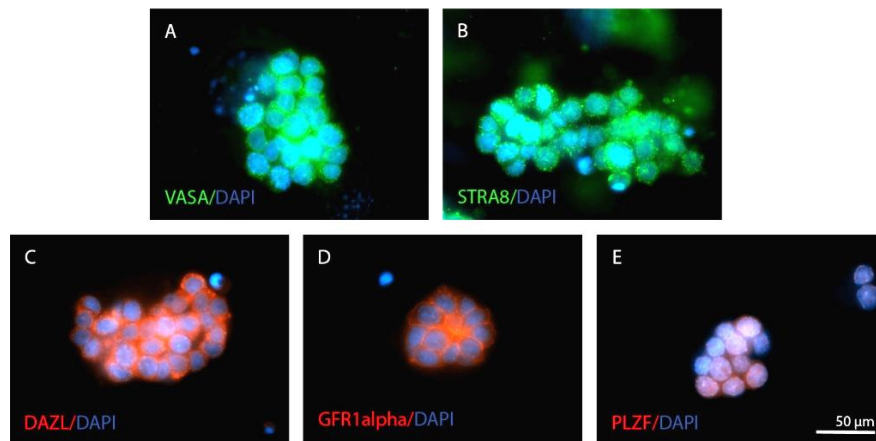


Abb. 6: Proteinexpressionsanalysen der isolierten SSCs. Diese Abbildung zeigt Immunfluoreszenzfärbungen der SSCs. Die SSC-Kolonien weisen deutlich die spermatogonialen Markerproteine VASA (A), STRA8 (B), DAZL (C), GFR1 α (D) und PLZF (E) auf. Skalierung: 50 μ m.

Durch Epigenetische Analysen von isolierten murinen SSC-Linien auf ihr Methylierungsschema in pluripotenten Markerpromotoren, wurden spezifische Methylierungsgrade im Vergleich zu den maGSCs ermittelt (Abb. 7). Regulatorische Bereiche des *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* und *Klf4*-Gens von SSCs wurden auf ihren Methylierungsgrad im Vergleich zu maGSCs untersucht.

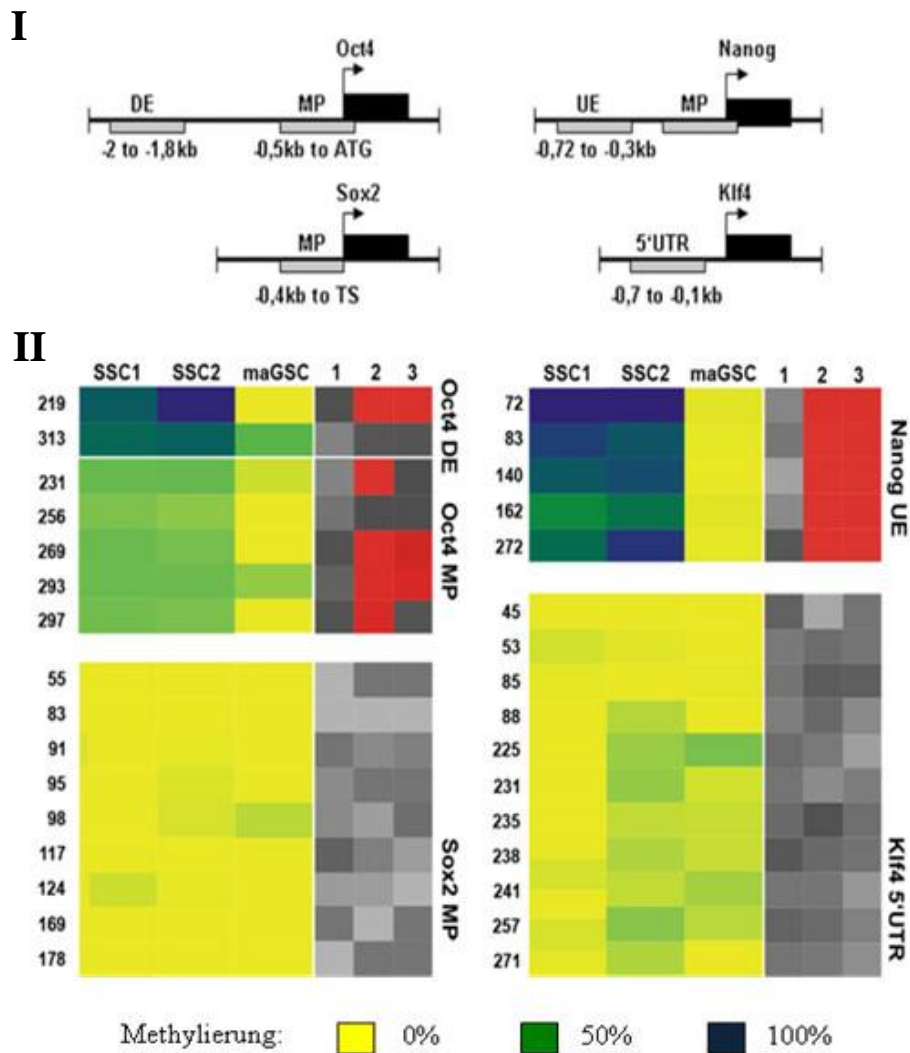


Abb. 7: Epigenetische Analysen. Abbildung 7/I zeigt die analysierten Genabschnitte pluripotenter Markerregionen. Für die Analysen des genetischen *Oct4*-Bereichs wurden zwei regulatorische Bereiche gewählt. Es wurden Gene aus dem distalen Enhancer (DE) und dem Minimalpromoter (MP) analysiert. Zur Analyse des Methylierungsgrades des regulatorischen Bereiches von *Nanog* wurde ein Bereich im *upstream enhancer* (UE) und für *Sox2* wurde ein Abschnitt des Minimalpromoters untersucht. Als charakteristischer Abschnitt des regulatorischen Bereiches von *Klf4* wurde ein Teil des 5'untranslatierten Bereichs (5'UTR) gewählt. Abbildung 7/II weist die Methylierungsgrade der zwei analysierten SSC-Linien (SSC1 und 2) im Vergleich zu den maGSCs auf. Unter den Spalten 1, 2 und 3 sind die Unterschiede der Methylierungen farblich aufgeführt. 1: SSC1 im Vergleich zu SSC2, 2: SSC1 im Vergleich zu den maGSCs, 3: SSC2 im Vergleich zu den maGSCs; hellgrau bis grau kein signifikanter Unterschied, rot signifikanter Unterschied. Daten erhoben durch die Firma Epigenomics AG.

In allen analysierten Bereichen wurde kein Unterschied zwischen den zwei unterschiedlichen SSC-Linien identifiziert. Der analysierte Genbereich im *Oct4* Promotor der SSC-Linien wies eine Semimethylierung auf, wohingegen der Genabschnitt der maGSCs demethyliert vorlag. Der untersuchte *Nanog* Genabschnitt der SSC-Linien zeigte im Gegensatz zu den demethylierten Bereichen der maGSCs eine fast 100%-ige Methylierung auf.

Bei den untersuchten Genabschnitten von *Sox2* und *Klf4* wurden keine Unterschiede im Methylierungsgrad zu den pluripotenten maGSCs ermittelt. Bei allen untersuchten Zelllinien lag eine fast vollständige Demethylierung vor, was einen aktiven Promoter widerspiegelt.

Die Ergebnisse dieser Analyse korrelieren mit den Genexpressionsanalysen der SSCs. Diese Beobachtungen führten zu der Ansicht, dass allein die Überexpression von OCT4 eine Reprogrammierung von SSCs in den pluripotenten Zustand erlauben würde.

3.1.2 Reprogrammierung von NE4 Zellen via Überexpression von OCT4

Zur Überprüfung, ob die unipotenten SSCs durch Überexpression von OCT4 allein in pluripotente iPSCs überführt werden können, wurde eine Transduktion der NE4 Zellen durchgeführt. Hierfür wurde zur Überexpression von OCT4 ein lentivirales System verwendet. NE4 Zellen wurden mit dem Virus pSin-EF2-Oct4-Pur, welcher als Transgen *Oct4* beinhaltet, für 24 Stunden inkubiert. Nach etwa drei Wochen wurden erste Kolonien beobachtet. Diese wurden einzeln aus der Kultur herausgepickt, kultiviert und als Zelllinie etabliert. Die für die weiterführenden Experimente verwendete iPS-Zelllinie wurde im Folgenden mit NE4O1 bezeichnet.

Die chromosomale Integration von *Oct4* wurde mittels DNA-Analyse kontrolliert. Deutlich ist eine Integration des Transgens in den NE4O1 Zellen im Vergleich zu den NE4 Zellen (SSCs) nachzuweisen (Abb. 8). Für die durchgeführten PCRs wurden exogene Primer verwendet. Als Negativkontrolle wurden maGSCs und embryonale Mausfibroblasten herangezogen. Das eingesetzte Plasmid diente als Positivkontrolle.

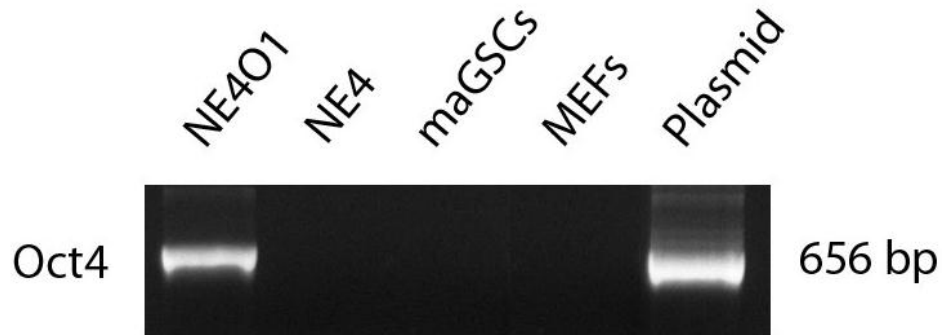


Abb. 8: Überprüfung der chromosomalen Integration von *Oct4*. Die PCR-Analyse zeigt die chromosomale Integration des *Oct4*-Transgens in den NE4O1 Zellen im Vergleich zu den NE4 Zellen auf DNA-Ebene. Als Negativkontrolle dienen maGSCs und MEFs. Als Positivkontrolle fungiert das virale Plasmid. Bp = Basenpaare.

3.1.3 Charakterisierung der NE4O1 Zellen im Vergleich zu NE4 Zellen

Zur Charakterisierung der generierten NE4O1 Zellen wurden die Zellen auf ihre Morphologie, alkalische Phosphataseaktivität, spezifische Gen- und Proteinexpressionen, ihr Differenzierungspotential und ihre Tumorigenität analysiert und mit den NE4 Zellen verglichen.

3.1.3.1 *Morphologie und alkalische Phosphataseaktivität*

Beim Vergleich der Morphologie der NE4 Zellen zu den NE4O1 Zellen konnte eine deutliche Änderung der Struktur nachgewiesen werden. Die für SSC typische „Weintrauben-Struktur“ war einer kompakten Zellkoloniestruktur gewichen. Diese Struktur ist ähnlich der maGSC-Morphologie einzuordnen (Abb. 9).

Pluripotente Stammzellen weisen eine starke alkalische Phosphataseaktivität auf. Diese kann somit als ein Marker der Pluripotenz herangezogen werden. Durch eine Farbreaktion werden alkalische Phosphatase positive Zellen blau und alkalische Phosphatase negative Zellen rot angefärbt. Die NE4 Zellen wiesen eine Mischung aus rot und blau gefärbten Zellen im Gegensatz zu den vollständig blau gefärbten NE4O1 Zellen auf. Die induzierten Stammzellen zeigten eine ähnlich starke alkalische Phosphataseaktivität wie maGSCs auf (Abb. 9).

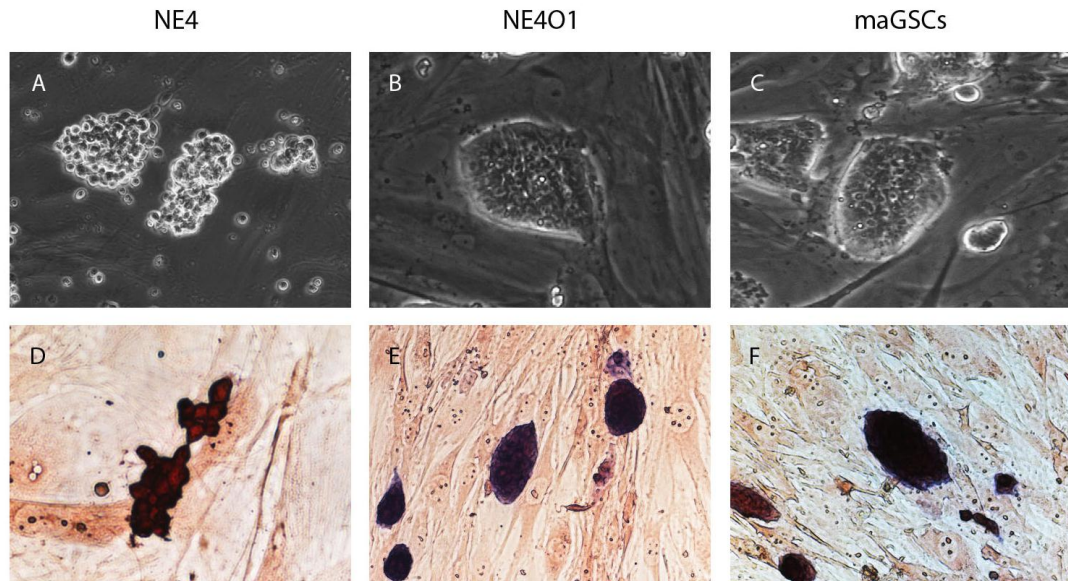


Abb. 9: Morphologie und alkalische Phosphataseaktivität der NE4, NE401 und maGSCs. Die Bilder A-C zeigen die Morphologie der analysierten Zellen. Die Bilder D-F veranschaulichen die alkalische Phosphataseaktivität. Eine Blaufärbung entspricht einer starken alkalischen Phosphataseaktivität. Rot gefärbte Zellen weisen keine oder nur eine geringe alkalische Phosphataseaktivität auf. Die NE4 (SSCs) sind in ihrer „Weintraubenstruktur“ (A) und der teilweisen roten alkalischen Phosphatasefärbung (B) zu erkennen. Die generierten NE401 (miPSCs) Zellen (B) und die maGSCs (C) weisen eine ähnliche kompakte Zellstruktur auf, die sich vollständig von der Zellmorphologie der SSCs unterscheidet. Beide Zellarten zeigen eine Blaufärbung der Zellkolonien auf (E und F).

3.1.3.2 Gen- und Proteinexpressionen pluripotenter Marker

Zur Überprüfung der erfolgreichen Reprogrammierung wurden die NE401 Zellen auf charakteristische Gen- und Proteinexpressionen analysiert. Die NE401 Zellen wiesen dasselbe Expressionsmuster wie maGSCs auf.

Pluripotenzmarker wie *Nanog* und *Sox2* waren in den NE401 Zellen wie in den maGSCs stark exprimiert. Spermatogoniale Marker wie *Dazl* und *Vasa*, die in den SSC-Zellen hoch reguliert waren, wurden in den induzierten NE401 Zellen sowie in den maGSCs nicht oder nur sehr schwach nachgewiesen (Abb. 10).

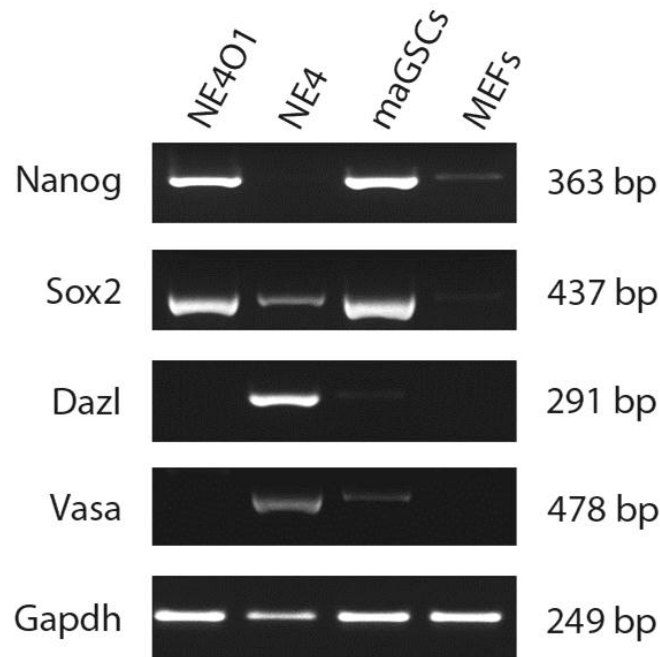


Abb. 10: Vergleichende Genexpressionsanalysen von NE4O1, NE4, maGSCs und MEFs. In dieser Abbildung sind Genexpressionsanalysen von Pluripotenz- (*Sox2* und *Nanog*) und spermatogonialen Markern, wie *Dazl* und *Vasa* aufgeführt. Dargestellt sind die Expressionen von den induzierten pluripotenten Stammzellen (NE4O1), den spermatogonialen Stammzellen (NE4), den maGSCs und den embryonalen Mausfibroblasten (MEFs). Die NE4O1 Zellen weisen dasselbe Expressionsmuster wie die maGSCs auf. Die spermatogonialen Marker sind nur in den NE4 Zellen hoch exprimiert. *Gapdh* gilt als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Konzentration. Bp=Basenpaare.

Durch Immunfluoreszenzfärbungen wurden die induzierten NE4O1 Zellen auf ihre Proteinexpression analysiert. Die pluripotenten Markerproteine SSEA1, NANOG und SOX2 wurden eindeutig nachgewiesen (Abb. 11). SSEA1 wurde deutlich an der Oberfläche der NE4O1 Zellen detektiert. Bei NANOG und SOX2 handelt es sich um kernlokalisierte Proteine.

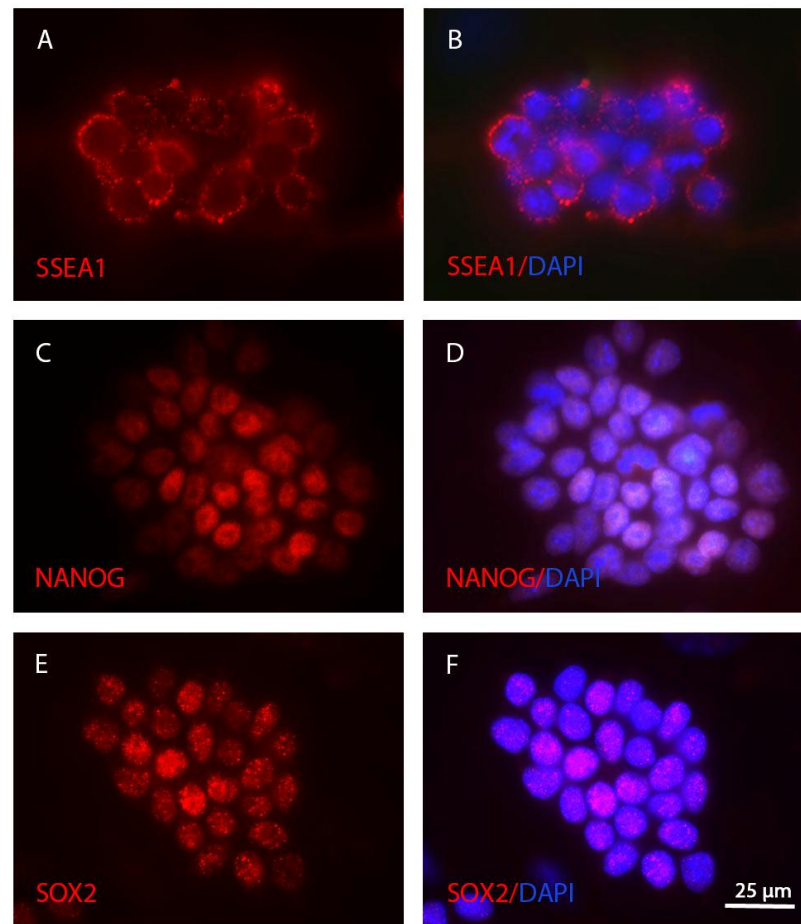


Abb. 11: Immunfluoreszenzfärbungen zur Charakterisierung der NE401 Zellen. Deutlich ist die Expression des Oberflächenmarkers SSEA1 (A), und der kernlokalisierten pluripotenten Markerproteine NANOG (C) und SOX2 (E) zu erkennen. Die Bilder B, D und F zeigen die proteinspezifischen Färbungen überlagert mit dem Kernfarbstoff DAPI. Skalierung: 25 µm.

3.1.3.3 *In vitro* Untersuchungen zum Differenzierungspotential

Mittels *hanging drop* Verfahrens wurden die NE401 Zellen auf ihr spontanes Differenzierungspotential und die Funktionalität des eingebrachten *Mhc-Neo/Mhc-eGfp*-Konstrukts untersucht. Auf mRNA-Ebene wurde die Differenzierung in alle drei Keimblätter nachgewiesen (Abb. 12). In allen durchgeführten Versuchen wurde deutlich ein Anstieg des endodermalen Markers α -Fetoprotein (*Afp*), als Vorläufermarker der Leberdifferenzierung, und des ektodermalen Markers wie dem Achaete-scute complex-like 1 (*Ascl1* oder *Mash1*) und *Synaptophysin* erkannt. *Mash1* und *Synaptophysin* werden bei der Entwicklung des Nervensystems stark exprimiert (Pyeon und Lee, 2012). Als mesodermale Marker zeigten *Flk1* als Vorläufermarker und α -*Mhc* als Marker von ausgereiften Kardiomyozyten eine

kardiale Differenzierung. Deutlich war die Verknüpfung zwischen α -Mhc und *Gfp* in der Genexpressionsanalyse zu erkennen.

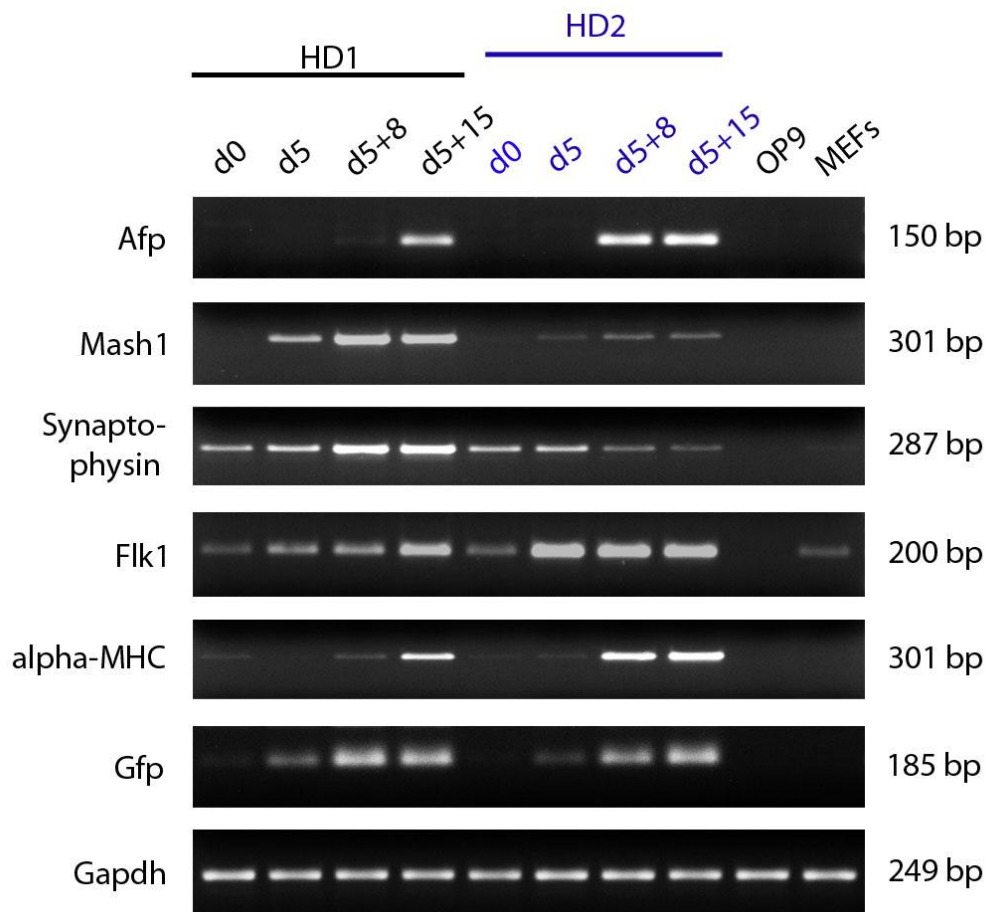


Abb. 12: Genexpressionsanalysen zur Differenzierung der NE401 Zellen. In dieser Abbildung sind PCR-Genexpressionsanalysen von zwei Differenzierungsversuchen (HD1 und HD2) dargestellt. Im Laufe der Differenzierung von d0 bis d5+15 sind deutlich die Anstiege der gewebespezifischen Marker zu erkennen. Aufgeführt sind als endodermaler Marker *Afp*, als ektodermaler Vertreter *Synaptophysin* und *Mash1* und als mesodermale Gene sowohl *Flk1* als auch α -Mhc. Ebenfalls ist *Gfp* gezeigt, welches aufgrund des transgenen Hintergrunds (*Mhc-Neo/Mhc-eGfp*) der NE401 Zellen an das α -Mhc gekoppelt ist. OP9 Zellen und MEFs werden als Negativkontrollen hinzugezogen. *Gapdh* gilt als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Konzentration. Bp = Basenpaare.

Auch auf Proteinebene wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen gewebespezifische Proteine identifiziert (Abb. 13). Als endodermaler Marker diente erneut der im Cytoplasma lokalisierte Marker AFP. Als ektodermaler Marker wurde das neuronale β -III TUBULIN verwendet. Die β -III TUBULIN Färbung zeigte deutlich neurale Strukturen. Sarkomeres Myosin wurde durch den Antikörper MF20 detektiert. Durch die MF20 Färbung konnten gestreifte Muskelzellen identifiziert werden.

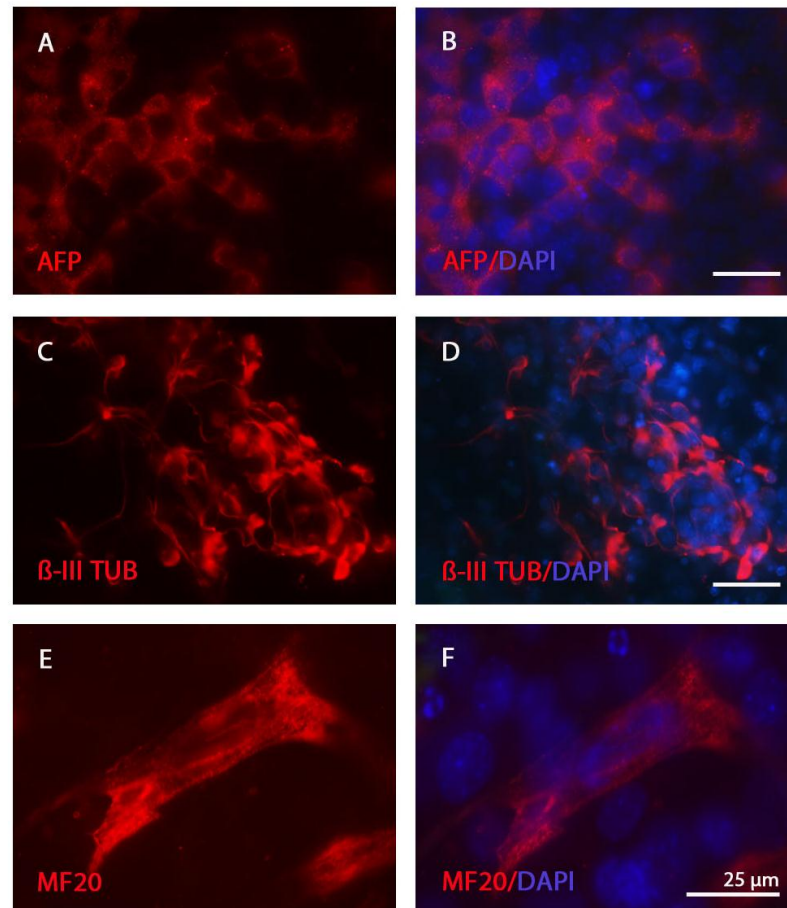


Abb. 13: Immunfluoreszenzfärbungen zum Differenzierungspotential der NE4O1 Zellen. Die Bilder A, C und E zeigen die einzelnen Fluoreszenzaufnahmen der spezifischen Gewebe-Markerproteine. In B, D und F sind die überlagerten Fluoreszenzen der spezifischen Proteine mit dem Kernfarbstoff DAPI dargestellt. AFP (A und B) als endodermaler cytoplasmatischer Marker und β -III TUBULIN (β -III TUB) als ektodermaler Marker wurden eindeutig nachgewiesen. Nervenstrukturen wurden durch β -III TUB in den Bildern C und D aufgezeigt. Deutlich wurden auch MF20 positive Zellen der mesodermalen Differenzierung detektiert (E und F). Skalierung: 25 μ m.

Morphologisch wurden grün fluoreszierende Kardiomyozyten nachgewiesen, welche sich zumeist in schlagenden Zellverbänden befanden. Durch Zugabe von Geneticin (G418 sulfat, Clontech, 300 μ g/ml) wurden diese grün fluoreszierenden Bereiche selektiert (Abb. 14). Die Funktionalität des transgenen Konstrukts in den NE4O1 Zellen wurde somit bestätigt.

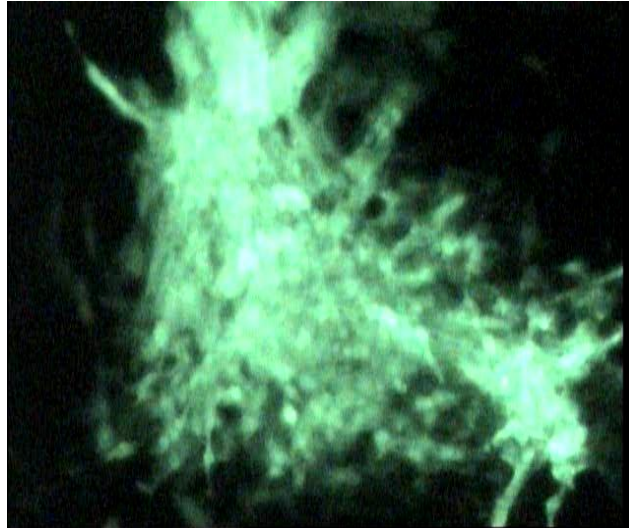


Abb. 14: Grün fluoreszierender schlagender Zellverband nach G418 Selektion. Die Differenzierung der NE401 Zellen via des *hanging drop* Verfahrens führte zu schlagenden grün fluoreszierenden Zellverbänden. Durch Selektion mit G418 wurden diese Zellverbände von den übrigen Zellen selektiert.

3.1.3.4 Teratombildung in immundefizienten Mäusen

Ein weiterer Nachweis der Pluripotenz ist die Teratombildung *in vivo*. Pluripotente Zellen sind in der Lage nach Injektion in immundefiziente Versuchstiere Teratome zu bilden, die sich durch das Auftreten von Zellen aller drei Keimblätter charakterisieren. Die induzierten NE401 Zellen wurden subkutan in immundefiziente RAGC Mäuse injiziert. Nach 20 Tagen wurden Tumore unter der Haut mit einem Durchmesser von einem Zentimeter ertastet. Die Tiere wurden getötet, die entstandenen Tumore entnommen und histologisch analysiert. Die Tumore wurden durch den Nachweis von Zellen aller drei Keimblätter, wie Knorpel- und Muskelzellen (Abb. 15, A und B), intestinales Gewebe (Abb. 15, C) sowie Nervenzellen (Abb. 15, D), als Teratome identifiziert.

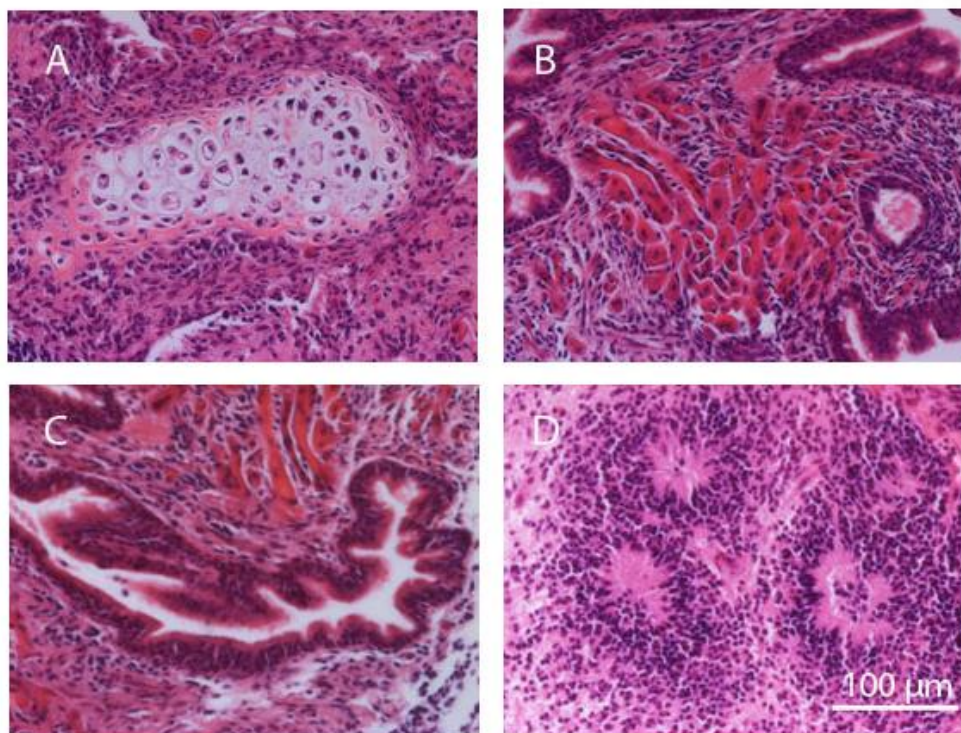


Abb. 15: Teratombildung von NE401 Zellen nach subkutaner Injektion in immundefiziente RAGC Mäuse. Auf den aufgeführten Bildern einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung sind Zellen aller drei Keimblätter zu erkennen. Bild A zeigt Knorpelgewebe. Muskelzellen sind auf Bild B zu beobachten. Intestinales Gewebe ist auf Bild C zu erkennen. Bild D zeigt die spezifische rosettenartige Struktur der Nervenzellen. Skalierung: 100 µm.

3.2 Generierung einer kardiovaskulären Vorläuferpopulation aus NE401 Zellen

Um den therapeutischen Effekt der aus testikulären Zellen generierten NE401 Zellen (miPSCs) zu ermitteln, wurden diese Zellen zunächst in kardiale Progenitorzellen differenziert. Für therapeutische Ansätze ist es von Vorteil Vorläuferzellen anstelle von ausgereiften Kardiomyozyten zu verwenden, um eine Proliferation und eine weitere Differenzierung in ausgereifte Kardiomyozyten, glatte Muskel- und endotheliale Zellen zu ermöglichen (Ema *et al.*, 2006; Kattman *et al.*, 2006).

3.2.1 Differenzierung von NE4O1 Zellen zu kardiovaskulären Vorläuferzellen mittels Cokultivierung auf OP9 Zellen

Um die Effizienz der Generierung von kardiovaskulären Vorläuferzellen zu erhöhen, wurde ein Protokoll zur gerichteten Differenzierung in kardiale Vorläuferzellen mittels Cokultivierung auf OP9 Zellen etabliert. Hierfür wurde ein für maGSCs etabliertes Differenzierungsprotokoll (Kaiser, 2010; Cheng *et al.*, 2012) für die NE4O1 Zellen abgewandelt.

Verschiedene Zellzahlen wurden für unterschiedliche Zeiträume auf in der Proliferation durch MMC gestoppte OP9 Zellen ausplattiert und in Differenzierungsmedium (Iscoe-Medium) kultiviert.

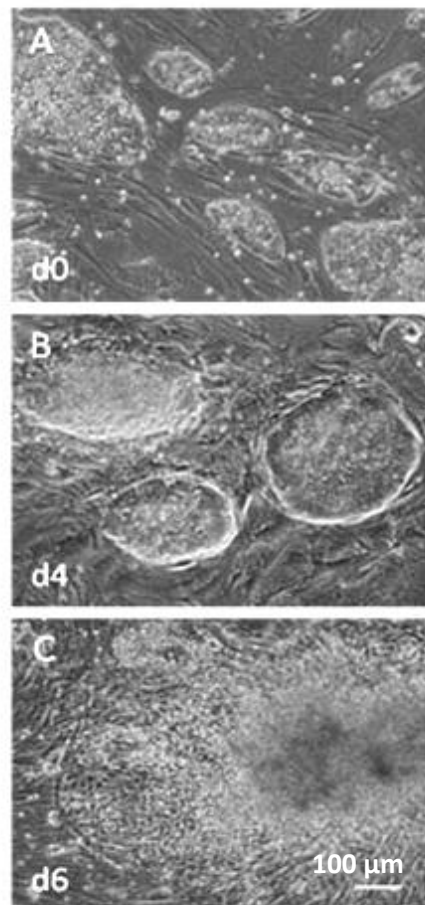


Abb. 16: Morphologie der NE4O1 Zellen während der Differenzierung auf OP9. Die Bilder A-C zeigen die sich differenzierenden NE4O1 Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag (d) 0, 4 und 6) des Differenzierungsprotokolls auf OP9 Zellen. Bild C lässt die aufgebrochene Zellkolonie mit der charakteristischen „Kopfsteinpflasterstruktur“ erkennen. Skalierung: 100 μm .

Die NE4O1 Zellen hefteten sich auf den OP9 Zellen an und begannen zu differenzieren. Nach sechs Tagen konnte eine spezifische „Kopfsteinpflasterstruktur“ identifiziert werden (Abb. 16). Als Marker der kardialen Vorläuferzellen wurde FLK1 verwendet (Kattman *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Die Menge an FLK1 positiven Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. Die höchsten Prozentsätze an FLK1 positiven Zellen wurde mit einer Ausgangszellzahl von 30000 NE4O1 Zellen und einer Versuchsdauer von sechs Tagen erzielt (Abb. 17) (Cheng *et al.*, 2012).

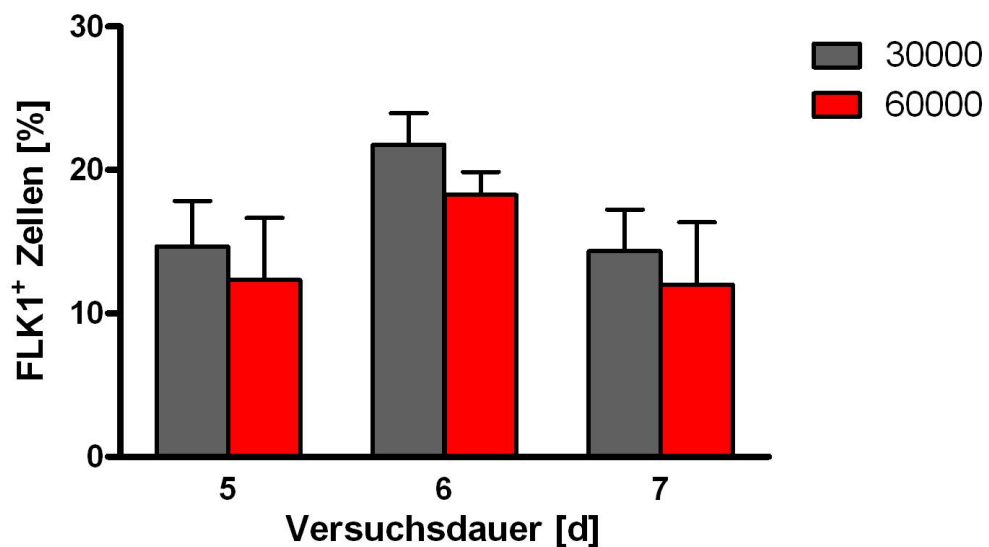


Abb. 17: Durchflusszytometrieanalysen zur Etablierung des Protokolls der Cokultivierung von NE4O1 Zellen auf OP9. Die Abbildung zeigt die prozentuale Anzahl der FLK1 positiven Zellen in Abhängigkeit zur Versuchsdauer in Tagen (d). Verglichen wurden die Anzahl der FLK1 positiven Zellen nach Differenzierung mit einer Ausgangszellzahl von 30000 Zellen (grau) und mit 60000 Zellen (rot). Die höchste Prozentzahl an FLK1 positiven Zellen konnte mit einer Ausgangszellzahl von 30000 und einem Differenzierungszeitraum von sechs Tagen nachgewiesen werden. Anzahl der Versuche (n) = 3.

Immunfluoreszenzfärbungen an Tag sechs der Differenzierung zeigten deutlich FLK1 positive Zellen. Diese konnten zum Teil innerhalb und vermehrt an den Randbereichen einer Kolonie identifiziert werden. Manche Kolonien wiesen auch grün fluoreszierende Bereiche auf. Bei diesen fluoreszierenden Zellen war die kardiale Differenzierung bereits fortgeschritten. Hier war der kardiale *Mhc*-Promoter angeschaltet, was aufgrund des eingebrachten Transgens zu einer Expressierung des GFP führte. Auch FLK/MHC doppelt positive Zellen wurden nachgewiesen (Abb. 18).

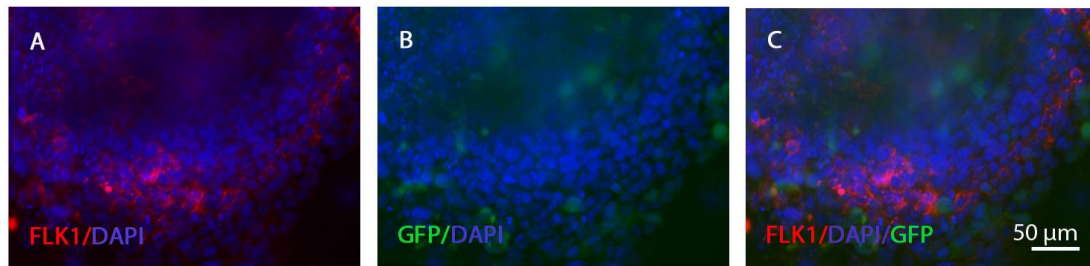


Abb. 18: Immunfluoreszenzfärbung einer differenzierten NE401 Kolonie an Tag sechs. FLK1 positive Zellen wurden mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff (A) gelabelt. MHC-positive Zellen fluoreszieren aufgrund des beinhaltenden Transgens ebenso grün (B). In Bild C sind die Fluoreszenzen überlagert dargestellt. Als blauer Kernfarbstoff diente DAPI. Deutlich wurden FLK1 positive Zellen im Randbereich der Kolonie nachgewiesen. Skalierung: 100 µm.

3.2.2 Separierung der FLK1 positiven Zellen mittels FACS-Technik

Die FLK1 positiven Zellen wurden mit Hilfe der FACS-Technik separiert (Abb. 19). Bei der Sortierung wurden um die 30% FLK1 positive Zellen gewonnen. Hierzu wurden sowohl die reinen FLK1 positiven als auch die FLK1/MHC doppelt positiven Zellen gezählt. Die Reinheit der FACS-Separierung betrug 98-99,9%. Die gewonnenen FLK1 positiven Zellen konnten im Folgenden *in vitro* replattiert oder direkt *in vivo* im Tierversuch eingesetzt werden.

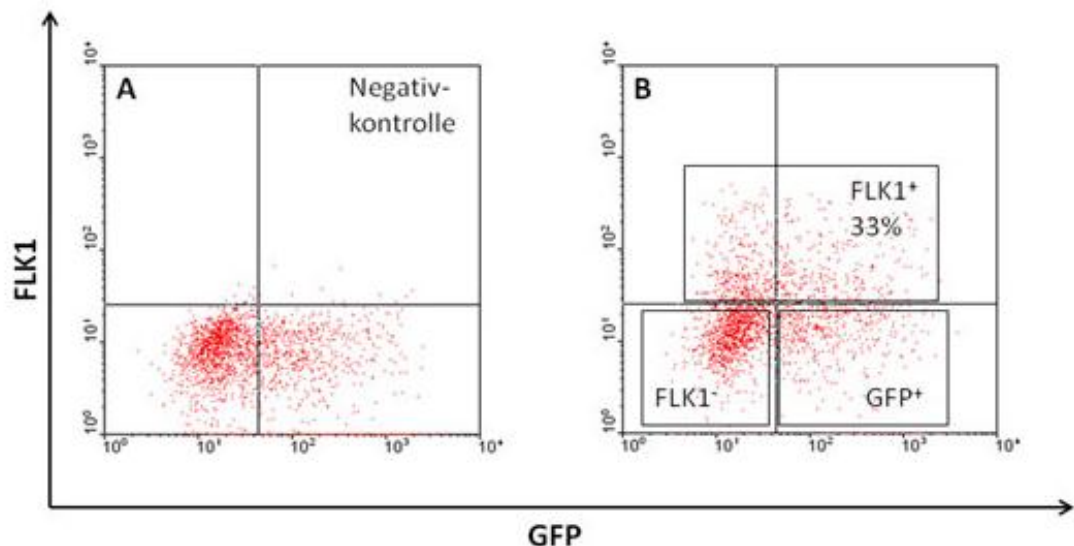


Abb. 19: Separierung der differenzierten FLK1 positiven Zellen an Tag sechs mittels FACS-Technik. Bild A zeigt die Negativkontrolle ohne Antikörperfärbung. Bild B gibt mit 33% den prozentualen Anteil der FLK1 positiven Zellen an.

3.2.2.1 *In vitro* Differenzierung von FLK1 positiven kardiovaskulären Vorläuferzellen

Zur Überprüfung der Vitalität der separierten Zellen nach der Sortierung, wurden separierte FLK1 positive und FLK1 negative Zellen auf, in der Proliferation gehemmte, OP9 Zellen replattiert. Nach neun Tagen weiterer Differenzierung in Iscove-Medium wurden grün fluoreszierende schlagende Kardiomyozyten in der Kultur der FLK1 positiven Zellen identifiziert (Abb. 20).

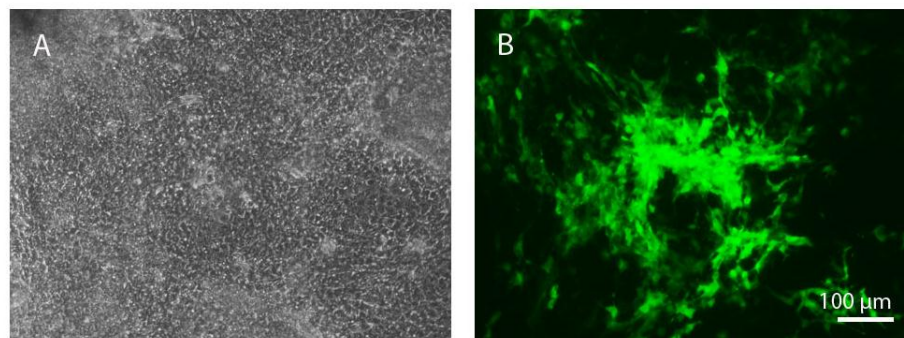


Abb. 20: Weiterführende Differenzierung der FLK1 positiven sortierten Zellen. Nach neuntägiger Differenzierung von separierten FLK1 positiven Zellen auf OP9 Zellen wurden grün fluoreszierende schlagende Zellkolonien nachgewiesen. Bild A zeigt die Durchlichtperspektive einer differenzierten Kolonie. Die GFP-Fluoreszenz ist in Bild B zu sehen. Skalierung: 100 μm .

Ebenfalls an Tag neun der weiteren Differenzierung wurden FLK1 positive und negative Zellkulturen auf ihren Gehalt an α -SMA, cTNT und MF20 positiven Zellen mittels Durchflusszytometrieanalysen untersucht. Die Marker cTNT und MF20 charakterisieren Kardiomyozyten, wogegen α -SMA von glatten Muskelzellen und frühen Kardiomyozyten exprimiert wird. Es wurde gezeigt, dass der Gehalt von α -SMA, cTNT und MF20 positiven Zellen in der Kultur der FLK1 Positivpopulation im Vergleich zur FLK1 Negativpopulation signifikant erhöht war (Abb. 21). Replattierte Zellen der FLK1 Positivpopulation zeigten um die 50% α -SMA positive Zellen im Gegensatz zur weiter differenzierten Negativpopulation, die im Durchschnitt 38% α -SMA positive Zellen aufwies. Im Vergleich zeigten die FLK1 Positivpopulation nach weiterer Differenzierung 18% cTNT positive Zellen. Differenzierte Zellen der Negativpopulation wiesen 5% cTNT positive Zellen auf. Die Analysen zu MF20 zeigten ebenfalls eine signifikante Erhöhung in der Kultur

der FLK1 Positivpopulation (25%) im Vergleich zu der FLK1 Negativpopulation (9%).

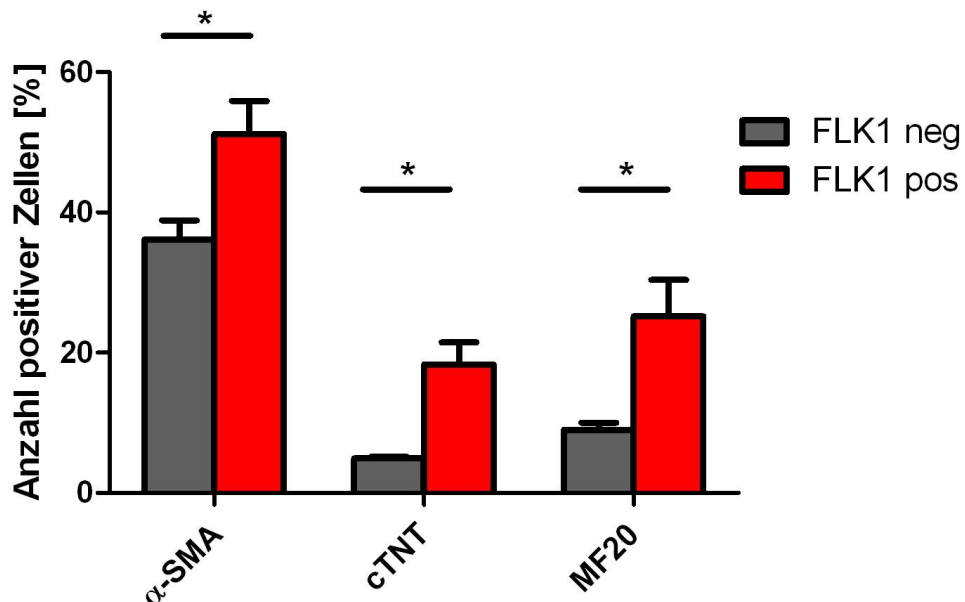


Abb. 21: Anzahl der α -SMA, cTNT und MF20 positiven Zellen an Tag neun der Differenzierung nach Replattierung der FLK1 Positiv- und Negativpopulation. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der α -SMA⁺, cTNT⁺ und MF20⁺-Zellen an Tag neun der weiterführenden Differenzierung der FLK1 Positiv- (rot) und FLK1 Negativpopulation (grau) auf OP9 Zellen in Iscove-Medium. Die Kultur der FLK1 Positivpopulation zeigt einen signifikant höheren Anteil an α -SMA, cTNT und MF20 positiven kardialen Markern im Vergleich zur Kultur der Negativpopulation (n = 3). Signifikanz wurde mittels des *student's t-Tests* mit *p ≤ 0,05 angegeben.

3.3 *In vivo* Myokardinfarkt (MI)-Mausmodell

Zur Untersuchung des therapeutischen Effekts der FLK1 positiven Zellen wurde das Modell des Myokardinfarkts gewählt. Die durch die FACS-Technik separierten FLK1 positiven Zellen wurden direkt nach der Sortierung in diesem Modell verwendet.

3.3.1 Etablierung des Myokardinfarkts und der intrakardialen Zellinjektion in der Maus

Das Mausmodell des Myokardinfarkts wurde zunächst im Labor etabliert. Der Myokardinfarkt wurde in C57BL/6J-Wildtypmäusen durch permanente Ligation der

linken Koronararterie induziert. Durch histologische Färbungen der Herzschnitte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (d2, d14, d28 und d56) nach der Induktion wurde die erfolgreiche Durchführung der Myokardinfarktinduktion morphologisch verifiziert. Durch den induzierten Infarkt kam es zur Degeneration des Myokardgewebes, was in einer Abnahme der Wandstärke des Ventrikels und im Nachweis erhöhter Fibrose zu erkennen war. Um die Auswirkungen einer Injektion in das Myokard zu untersuchen, wurden ebenfalls NaCl-Injektionen in gesunde und infarzierte Herzen durchgeführt.

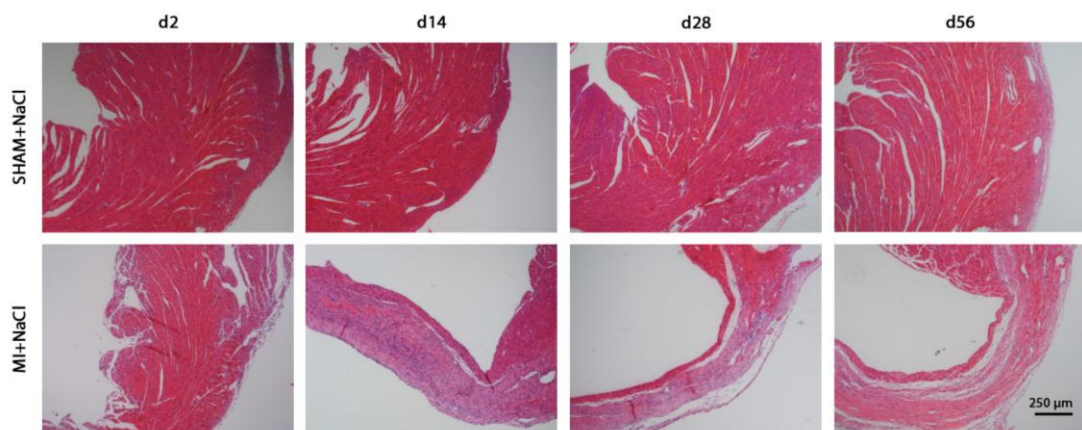


Abb. 22: Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Herzchnitten mit NaCl-Injektion. In dieser Abbildung sind Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen von Herzchnitten von gesunden Mäusen (SHAM+NaCl) und Myokardinfarkt induzierten Tieren (MI+NaCl) mit NaCl-Injektion zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten (d2, d14, d28 und d56) zu sehen. Die gesunden Herzen (SHAM) weisen charakteristische geordnete Strukturen des Myokards auf. Eine Infarktinduktion (MI) führt ab Tag 2 zu einer deutlichen Reduktion der Wandstärke des linken Ventrikels. Die geordnete Myokardstruktur ist in diesem Bereich nicht mehr zu erkennen. Die verbliebenen Muskelzellen liegen ungeordnet vor. Skalierung: 250 µm, d = Tage.

Die HE-Färbung zeigte, eine charakteristisch geordnete Struktur der Muskelzellen im gesunden Myokard (Abb. 22). Deutlich konnte eine Querstreifung dieser Zellen beobachtet werden. Durch eine MI-Induktion wurde ab Tag zwei eine beginnende Abnahme der Wandstärke des linken Ventrikels beobachtet. Ab Tag 14 wurde eine deutliche Reduktion der Wanddicke festgestellt, die bis Tag 56 nachgewiesen werden konnte. Durch die MI-Induktion wurde die geordnete Struktur des Zellverbandes im infarzierten Bereich zerstört. Die verbliebenen Muskelzellen lagen unorganisiert in diesem Bereich vor. Eine NaCl-Injektion von 20 µl in insgesamt vier Injektionspunkten ins Myokard zeigte keine Auswirkungen. Lediglich die

Injektionsstelle konnte durch geringe Dislokation der Muskelzellen in diesem Bereich identifiziert werden.

Eine MG-Färbung von Herzschnitten zeigte, dass in den gesunden Herzen nur ein geringes Maß an Fibrose zu erkennen war (Abb. 23). Ein geringes Maß an Bindegewebe ist in gesunden Herzen immer vorhanden. Als Stützfunktion ist das Bindegewebe im Myokard vor allem in Bereich der Gefäße lokalisiert.

Infarzierte Herzen zeigten ab Tag 14 deutlich, dass der infarzierte Bereich mit fibrotischen Bindegewebe durchzogen war. Bis Tag 56 wurden spezifische fibrotische Bindegewebsfärbungen im infarzierten Bereich des linken Ventrikels beobachtet. An den Injektionsstellen des NaCl wurde nur eine geringe Fibrose beobachtet, die lediglich durch den Einstich hervorgerufen wurde.

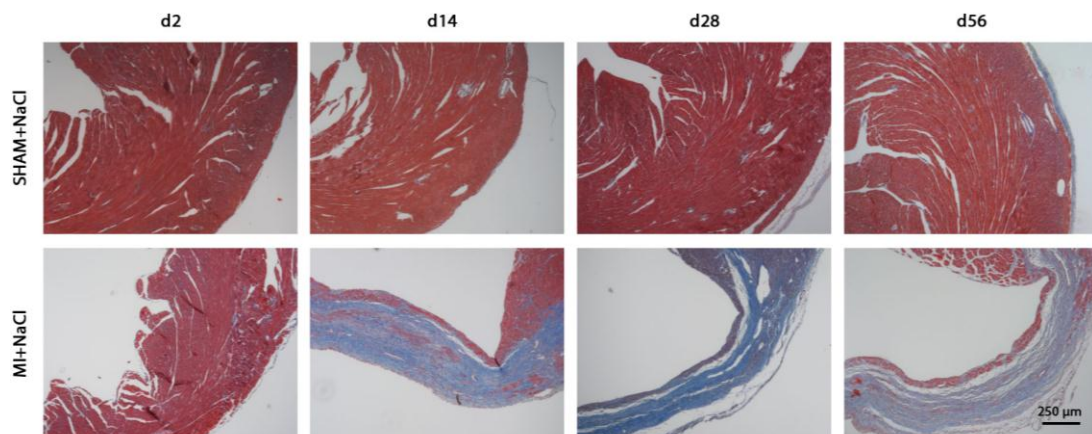


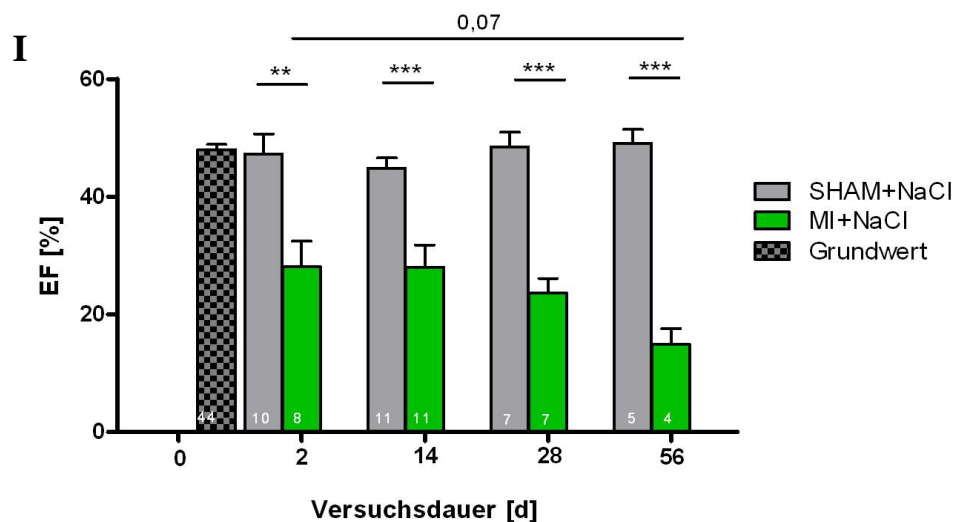
Abb. 23: Masson Goldner-Färbungen von Herzschnitten mit NaCl-Injektion. In dieser Abbildung sind Masson Goldner (MG)-Färbungen von Herzschnitten von gesunden Mäusen (SHAM+NaCl) und Myokardinfarkt induzierten Tieren (MI+NaCl) mit NaCl-Injektion zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten (d2, d14, d28 und d56) zu sehen. Die MG-Färbung färbt fibrotisches Bindegewebe blau. Die gesunden Herzen (SHAM) weisen einen geringen Bindegewebsanteil auf, der zumeist am Rand von Gefäßen in gesunden Herzen lokalisiert ist. In den infarzierten Herzen ist deutlich zu erkennen, dass ab Tag14 der reduzierte Herzwandbereich mit fibrotischen Bindegewebe (blaue Färbung) durchzogen ist. Skalierung: 250 µm, d = Tage.

Um die Funktion der infarzierten Herzen genauer zu analysieren, wurden echokardiografische Untersuchungen durchgeführt. Zu den unterschiedlichen Analysezeitpunkten wurden die entsprechenden Mäuse echokardiografisch in einem Blindversuch untersucht. Aus den gewonnenen Messwerten wurden charakteristische Kenngrößen der Herzfunktion berechnet.

Anhand der Ejektionsfraktion (EF) wird die Blutausschüttung des Herzens angegeben. Über die gesamte Versuchsdauer zeigte die SHAM+NaCl Gruppe keinen Unterschied zum Grundwert, der bei ca. 50% lag. Die infarzierten Herzen zeigten eine signifikante Reduktion der EF von 50% auf etwa 15% an Tag 56 im Gegensatz zu den gesunden Herzen (SHAM+NaCl) (Abb. 24/I). Mit einem Wert von $p = 0,07$ ist ein Trend in der Reduktion der EF von Tag zwei (30%) zu Tag 56 (15%) in der MI-NaCl Gruppe zu erkennen.

Die Verkürzungsfraktion (*fractional shortening*, FS) des linken Ventrikels der SHAM+NaCl Gruppe zeigte keine signifikante Änderung während der Versuchszeit im Vergleich zum Grundwert (etwa 22%). Die FS nahm im Laufe der Versuchsdauer in den infarzierten Herzen im Vergleich zu der korrespondierenden SHAM-NaCl Werten signifikant ab (Abb. 24/II). Von Tag zwei bis Tag 56 konnte kein signifikanter Unterschied innerhalb der MI+NaCl Gruppe für die FS beobachtet werden.

Zum Ausgleich von unterschiedlichen Körpergewichten der Versuchstiere wurden die Herzgewichte in Abhängigkeit der Körpergewichte ermittelt. Für den Quotient aus dem Herzgewicht (HW) zum Körpergewicht (BW) wurde gezeigt, dass auch hier kein signifikanter Unterschied der SHAM+NaCl Gruppe im zeitlichen Verlauf zum Grundwert mit etwa 3,8 mg/g beobachtet werden konnte. An Tag zwei war noch keine signifikante Steigerung des HW/BW in den infarzierten Versuchstieren zu erkennen. Im Gegenzug erhöhte sich der HW/BW-Wert der MI+NaCl Gruppe (Abb. 24/III) ab Tag 14. Auch an Tag 28 und 56 wurden signifikante Steigerungen des HW/BW der infarzierten Tiere im Vergleich zur SHAM-Gruppe ermittelt.



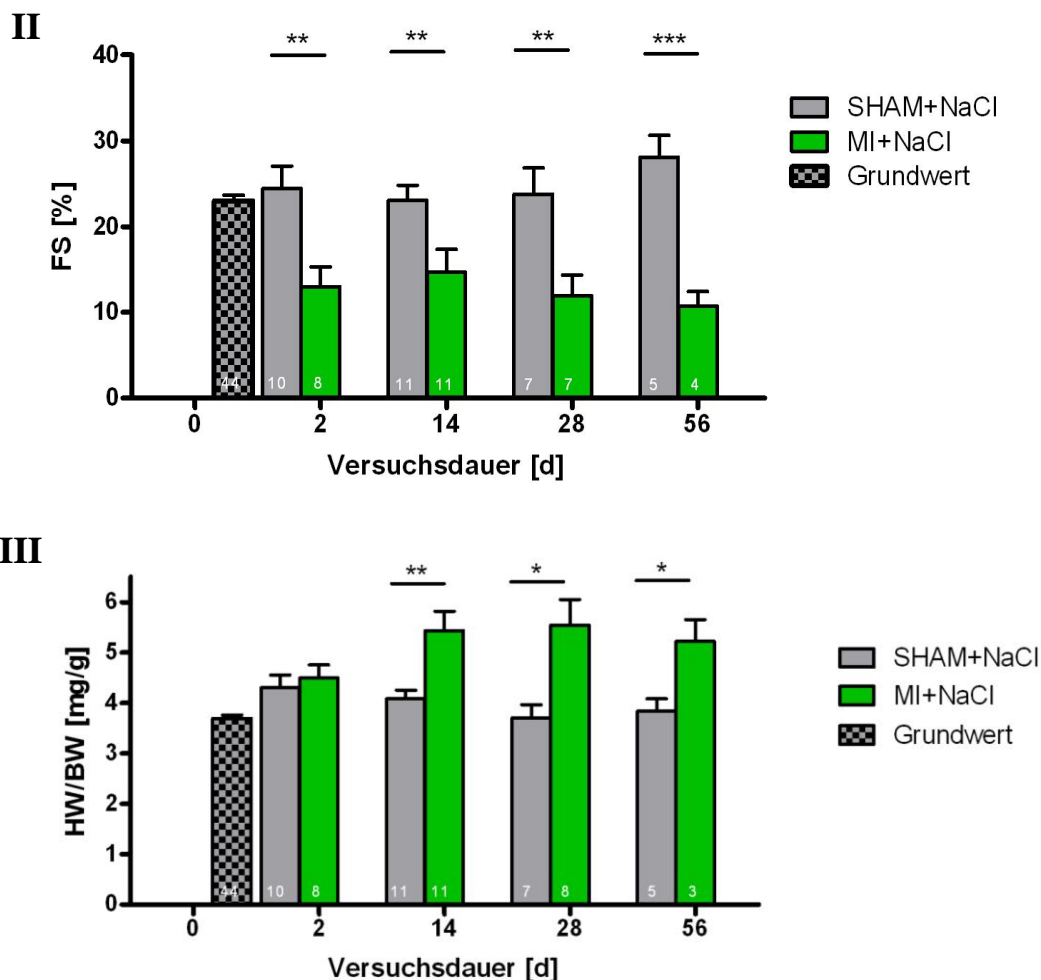


Abb. 24: Echokardiografische Analysen von SHAM und MI-induzierten Mäuseherzen. In dieser Abbildung sind die echokardiografischen Analysen der gesunden Mäuseherzen (SHAM+NaCl) im Vergleich zu den infarzierten Herzen ohne Zellinjektion (MI+NaCl) dargestellt. Abbildung 24/I zeigt die gemessenen Werte der Ejektionsfraktion (EF). Die EF reduziert sich stark signifikant in der MI+NaCl Gruppe im Vergleich zur SHAM+NaCl Gruppe. Abbildung 24/II zeigt die Werte der Verkürzungsfraktion (FS). Auch hier ist eine signifikante Reduktion der FS in den infarzierten Herzen zur SHAM-Gruppe zu erkennen. Abbildung 24/III präsentiert den Quotienten des Herzgewichts (HW) zum Körpergewicht (BW). Ab Tag 14 ist eine signifikante Erhöhung des HW/BW in der infarzierten Versuchsgruppe zu beobachten. Die untersuchte Tieranzahl (n) wurde in den jeweiligen Säulen aufgeführt. Signifikanzen wurden mittels des *student's t-tests* mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ angegeben, d = Tage.

Diese Daten wiesen darauf hin, dass die Herzleistung durch die Induktion eines Infarktes deutlich herabgesetzt wurde. Einen Einfluss der NaCl-Injektion auf die charakteristischen Herzparameter wurde nicht nachgewiesen.

Zur Etablierung der Zellinjektion wurden Fluoreszenz CM-DiI-markierte undifferenzierte maGSCs in das Myokard des linken Ventrikels *in vivo* injiziert. Es

wurden 500000 Zellen in insgesamt vier Injektionspunkten injiziert. Nach zwei Tagen konnten via HE-Färbung Zellansammlungen in der Herzwand zwischen den Muskelzellen identifiziert werden (Abb. 25/I). Die charakteristische Struktur der Wirtmyokardzellen wurde nicht oder nur sehr gering beeinflusst. Mittels der CM-DiI-Markierung konnten die injizierten Zellen zweifellos im Myokard identifiziert werden (Abb. 25/II). In der Durchlichtperspektive konnten deutlich beobachtet werden, dass die injizierten Zellen sich zwischen den Wirtmyokardzellen positionieren und die Struktur nicht stark beeinflussten.

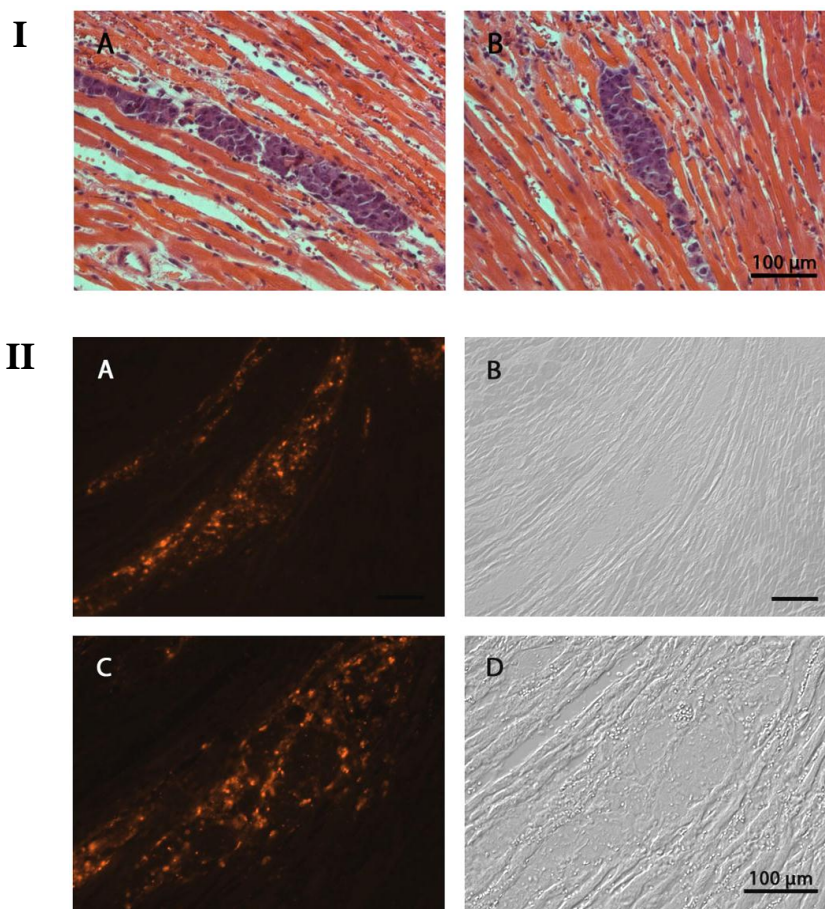


Abb. 25: Zellansammlungen und Fluoreszenzen von injizierten Zellen im Myokard. Abbildung 25/I zeigt eine HE-Färbung. Zwei Tage nach der Injektion von undifferenzierten maGSCs in das Mausmyokard sind deutliche Zellansammlungen der injizierten Zellen zu erkennen (A und B). In Abbildung 25/II wurde die erfolgreiche Injektion mittels CM-DiI positiver maGSCs in das Myokard an Tag zwei nach der Injektion belegt. Die Bilder A und C zeigen die CM-DiI-Fluoreszenz der injizierten Zellen, während die Bilder B und D eine Positionierung der injizierten Zellen zwischen den Wirtmyokardzellen aufweisen. Die injizierten Zellen weisen keine charakteristische Myokardstruktur auf. Skalierung: 100 µm.

Für längere Versuchszeiten ist die CM-DiI-Färbung nicht geeignet, da die Zellen diesen Farbstoff durch weitere Proliferation wieder verlieren. Guan *et al.* zeigten bereits, dass durch eine intrakardiale Injektion von maGSCs Zellansammlungen im Myokard aufgefunden werden konnten. Diese veränderten sich im Laufe des Versuchs morphologisch. Ein Monat nach Injektion wurden keine klar abgegrenzten Zellansammlungen durch HE-Färbung mehr detektiert (Guan *et al.*, 2007).

3.3.2 Therapeutischer Effekt von injizierten kardialen Vorläuferzellen im infarzierten Mausmyokard

Zur Analyse des therapeutischen Effekts der FLK1 positiven kardialen Vorläuferzellen wurden diese Zellen direkt nach der FACS-Separierung in das Mausmyokardinfarktmodell injiziert. Hierfür wurden weibliche C57BL/6J-Wildtypmäuse im Alter von 11-13 Wochen verwendet. Es wurden vier randomisierte Tiergruppen zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (d2, d14, d28 und d56) echokardiografisch und histologisch untersucht. Neben den bereits erwähnten SHAM und MI-Gruppen mit NaCl-Injektion wurden ebenso SHAM und MI-Gruppen mit kardiovaskulären FLK1 positiven Zellen injiziert.

Um eine Abstoßung der injizierten Zellen durch das Immunsystem der Versuchstiere zu verhindern, wurde den Tieren täglich das Immunsuppressivum CsA injiziert.

3.3.2.1 Histologische Untersuchungen

Die HE-Färbung für die Gruppen mit Zellinjektion (Abb. 26) zeigte ähnliche Ergebnisse wie die korrespondierenden Gruppen mit NaCl-Injektion (Abb. 22). Zwei Tage nach Induktion des Infarktes wurde ein deutlicher Beginn der Abnahme der Wandstärke des linken Herzventrikels in der MI+Zellen Gruppe beobachtet. Ab Tag 14 konnte eine starke Reduktion der Wanddicke erkannt werden. Auch in diesen Gruppen wurde eine Änderung der Myokardstruktur der infarzierten Bereiche beobachtet. Die Zellinjektion zeigte zunächst keinen offensichtlichen Einfluss auf das Ausmaß des infarzierten Gewebes.

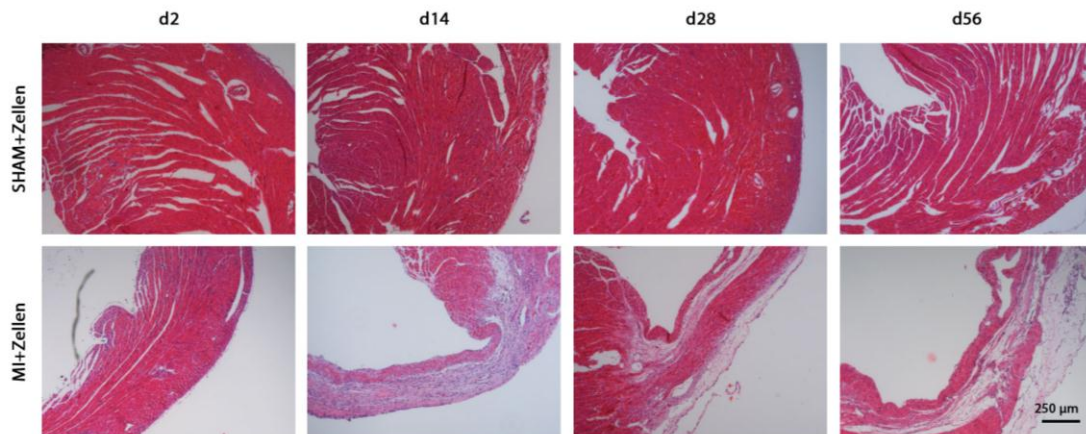


Abb. 26: Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Herzschnitten mit Zellinjektion. In dieser Abbildung sind Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen von Herzschnitten von gesunden Mäusen (SHAM+Zellen) und Myokardinfarkt induzierten Tieren (MI+Zellen) nach Injektion von FLK1 positiven kardiovaskulären Vorläuferzellen zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten (d2, d14, d28 und d56) zu sehen. Die gesunden Herzen (SHAM) weisen charakteristische geordnete Strukturen des Myokards auf. Eine Infarktinduktion (MI) führt ab Tag 2 zu einer deutlichen Reduktion der Wandstärke des linken Ventrikels. Die geordnete Myokardstruktur ist in diesem Bereich nicht mehr zu erkennen. Die verbliebenen Muskelzellen liegen ungeordnet vor. Die injizierten Zellen führen zu keinen offensichtlichen Veränderungen des infarzierten Bereichs. Skalierung: 250 µm, d = Tage.

Zu frühen Zeitpunkten des Versuchs konnten die injizierten Zellen mittels HE-Färbung durch Zellansammlungen im Myokard wieder aufgefunden werden (Abb. 27). Diese Zellansammlungen veränderten sich morphologisch. An Tag 14 lagen die Zellen noch kompakt ohne große morphologische Veränderungen der umliegenden Zellen im Myokard vor. An Tag 28 waren die Zellen weiter gestreut und die Struktur der umliegenden Zellen verändert.

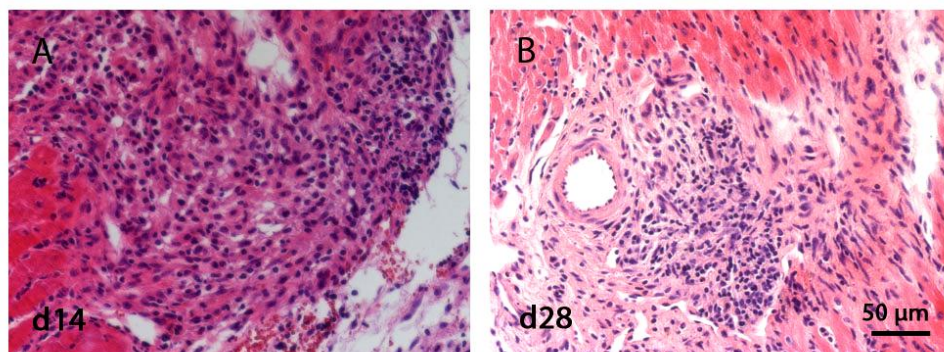


Abb. 27: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Zellansammlungen im Myokard. Diese Abbildung zeigt beispielhafte Bilder von Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen der SHAM+Zellen Gruppe an Tag 14 (A) und Tag 28 (B) der Versuchsdauer. Die injizierten Zellen sind durch Zellansammlungen im Myokard zu erkennen. Skalierung: 50 µm, d = Tage.

An Tag 56 konnten keine Zellansammlungen mehr im Myokard detektiert werden. Ebenso wurde über die gesamte Versuchszeit keine Teratombildung beobachtet.

Auch MG-Färbungen zeigten histologisch ähnliche Befunde der Zellinjektionsgruppen (Abb. 28) im Vergleich zu den Gruppen mit NaCl-Injektion (Abb. 23). An Tag zwei nach der Infarktinduktion wurde noch keine erhöhte Fibrose in den histologischen Schnitten beobachtet. 14 Tage nach der Induktion des Infarktes wurde deutlich blau gefärbtes fibrotisches Bindegewebe im infarzierten Bereich nachgewiesen. Herzschnitte von den SHAM operierten Tieren zeigten nur geringe Fibrose an kleineren Bereichen auf. Diese war meist an den Gefäßen, die das Myokard durchziehen, lokalisiert. Auch hierbei wurde kein offensichtlicher Einfluss durch die Injektion von Zellen ins Myokard beobachtet.

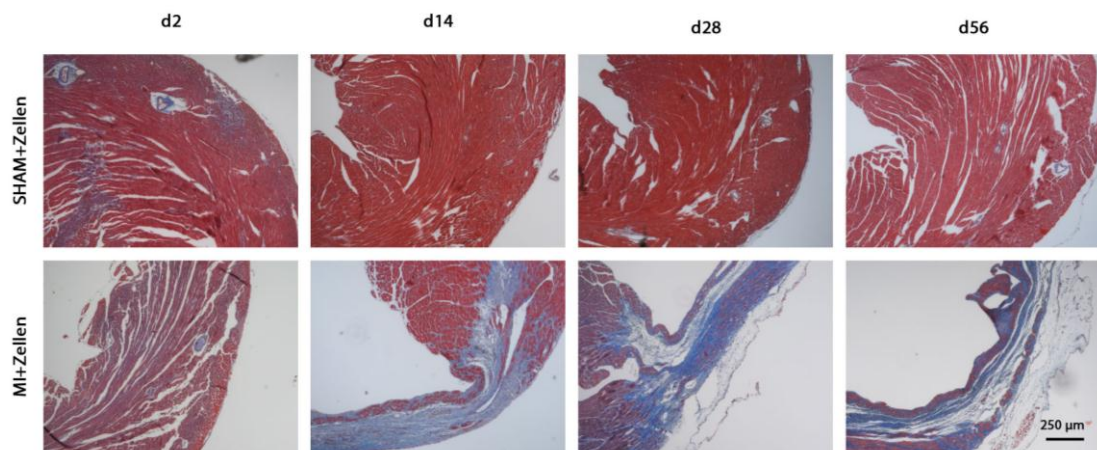


Abb. 28: Masson Goldner-Färbungen von Herzschnitten mit Zellinjektion. Diese Abbildung zeigt beispielhafte Bilder von Masson Goldner(MG)-Färbungen der vier Untersuchungsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Durch die Blaufärbung werden fibrotische Bereiche identifiziert. Deutlich ist nach 14 Tagen fibrotisches Bindegewebe im infarzierten Herzabschnitt zu erkennen, welches bis zum Versuchsende (d56) nachgewiesen wurde. Skalierung: 250 µm, d = Tage.

Um den Fibrosegrad der einzelnen Herzen zu bestimmen, wurden die Herzschnitte visuell auf das Maß der Fibrose untersucht (Abb. 29/I). Aus der Größe des fibrotischen Bereichs der jeweiligen Schnitte wurden in den einzelnen Gruppen Mittelwerte gebildet. Die Auswertung wurde semiquantitativ durchgeführt. An Tag zwei konnte noch kein erhöhter Fibrosegrad in den MI+NaCl und MI+Zellen Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 29/II). Bei genauerer Betrachtung des Fibrosegrades wurde ab Tag 14 zu jedem Zeitpunkt ein stark signifikanter Unterschied zwischen den MI-Gruppen zu der jeweiligen SHAM Gruppe aufgezeigt.

Die SHAM Gruppen wiesen einen Wert zwischen 0% und 10% auf. Die infarzierten Vergleichsgruppen zeigten ab Tag 14 Werte zwischen 30-45%. Zu keinem Zeitpunkt wurde ein signifikanter Unterschied in dem Fibrosegrad der MI+NaCl Gruppe zur MI+Zellen Gruppe beobachtet. Von Tag 28 zu Tag 56 war ein Trend im Rückgang des Fibrosegrades von 45% auf 35% in der MI+Zellen Gruppe zu beobachten. Mit einem Vergleichswert von $p = 0,1$ lag jedoch keine Signifikanz vor. Ebenso kein signifikanter Unterschied wurde zwischen den jeweiligen Kontroll (NaCl-Injektion)- und Zellgruppen nachgewiesen.

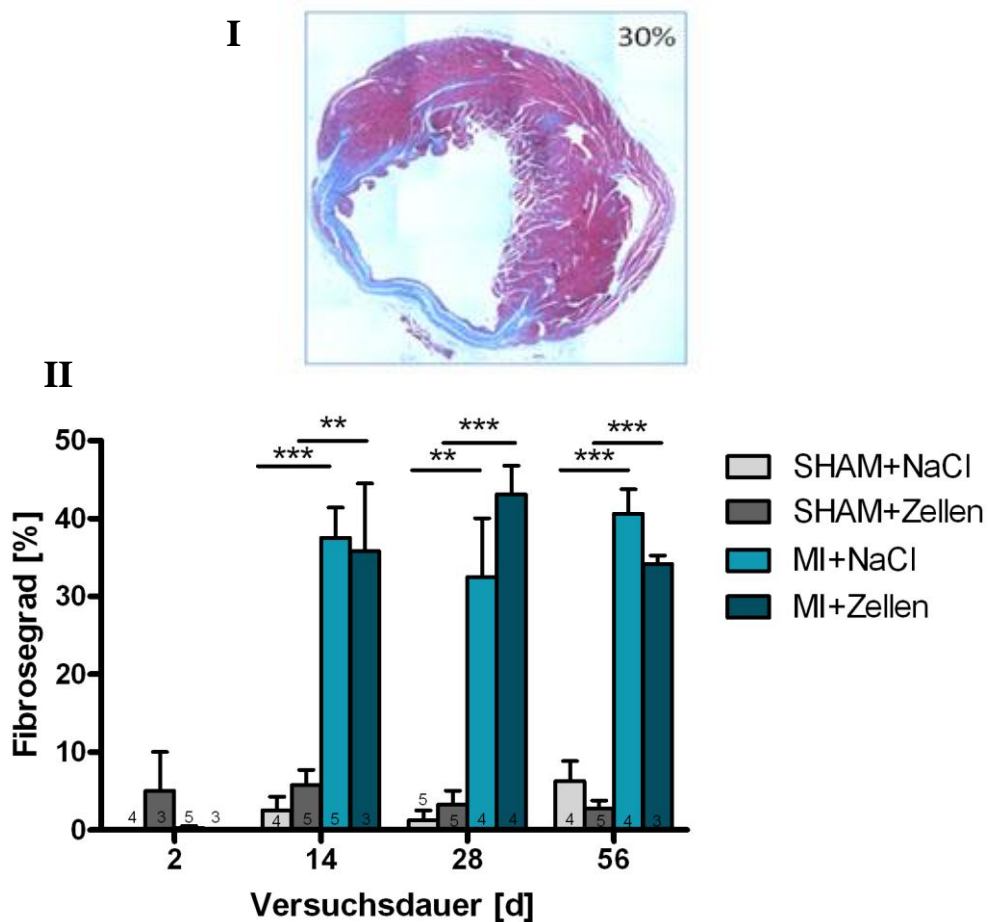


Abb. 29: Darstellung des Fibrosegrades im Vergleich zur Gesamtfläche des Herzens. Abbildung 29/I zeigt einen beispielhaften Herzschnitt mit einem fibrotischen Bindegewebsanteil von 30% des Gesamtherzbereichs. Abbildung 29/II stellt den Fibrosegrad in Abhängigkeit zur Versuchsdauer dar. Deutlich ist eine hochsignifikante Zunahme des Fibrosegrades ab Tag 14 zwischen den SHAM operierten Tieren und den infarzierten Mäuseherzen zu erkennen. Der Wert 0 steht für normale Bindegewebsverbreitung in gesunden Herzen. Der Wert 50 bezeichnet ein Maß an Fibrose von der Hälfte des begutachteten Herzschnitts. Die untersuchte Tieranzahl (n) wurde in den jeweiligen Säulen aufgeführt. Signifikanzen wurden mittels des *student's t-tests* mit $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$ angegeben.

3.3.2.2 Echokardiografische Untersuchungen

Zur weiteren Analyse des therapeutischen Effekts der FLK1 positiven Zellen wurden echokardiografische Untersuchungen durchgeführt.

Bei Untersuchungen zu der EF wurde gezeigt, dass ab Tag 14 eine leicht signifikante Abnahme der EF der SHAM+Zellen Gruppe im Vergleich zur SHAM+NaCl Gruppe auftrat (Abb. 30/I). Dies setzte sich bis Tag 56 fort.

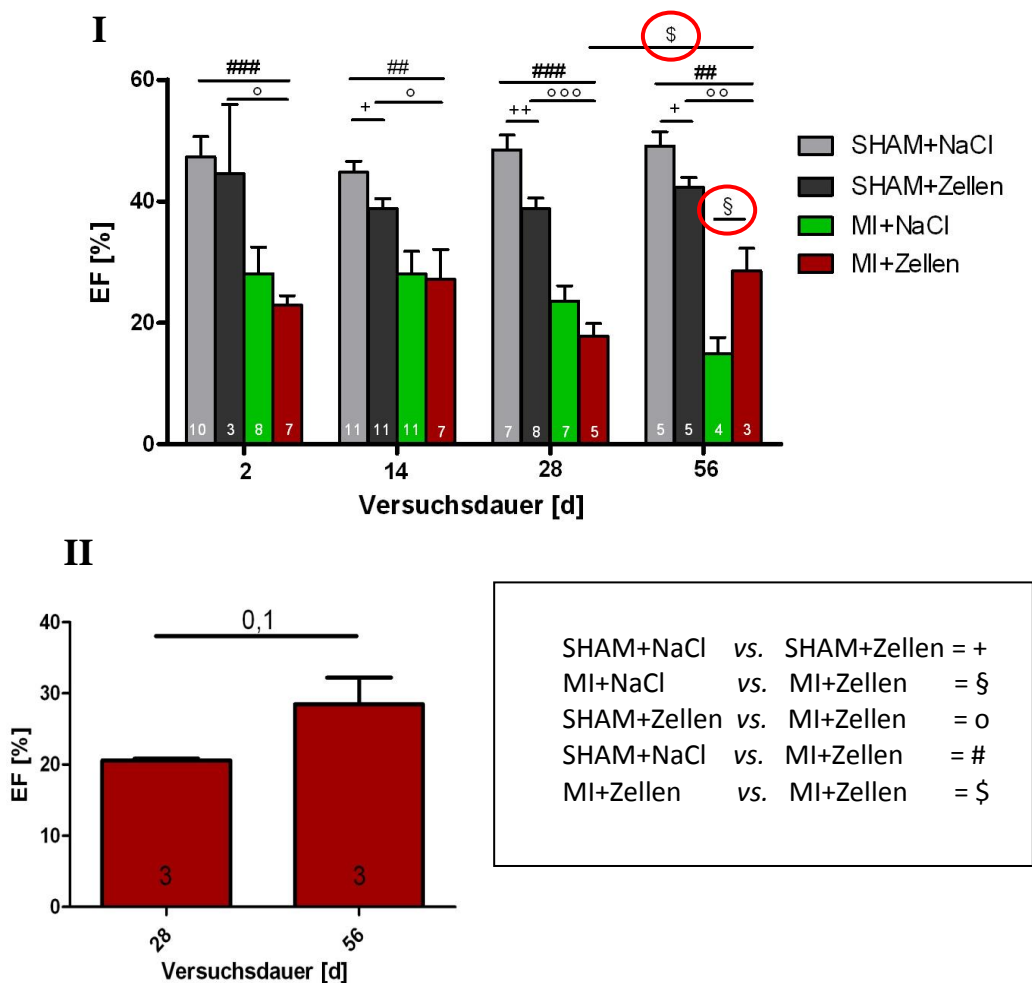


Abb. 30: Echokardiografische Analysen der Myokardinfarktstudie - Ejektionsfraktion. In Abbildung 30/I sind die Werte für die Ejektionsfraktion (EF) der echokardiografischen Analysen der gesunden Mäuseherzen (SHAM+NaCl und SHAM+Zellen) im Vergleich zu den infarzierten Herzen mit Zellinjektion (MI+Zellen) und ohne Zellinjektion (MI+NaCl) dargestellt. Abbildung 30/II zeigt die EF Werte der drei kontinuierlich analysierten Versuchstiere der MI+Zellen Gruppe zu den Untersuchungszeitpunkten Tag 28 und 56. Die untersuchte Tieranzahl (n) wurde in den jeweiligen Säulen aufgeführt. Signifikanzen wurden mittels des *student's t-tests* mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ angegeben.

Zwischen den infarzierten Gruppen (MI+NaCl und MI+Zellen) wurde zunächst kein signifikanter Unterschied ermittelt. An Tag 56 nach der Myokardinfarktinduktion war jedoch eine signifikante EF Erhöhung der MI+Zellen Gruppe im Vergleich zur MI+NaCl Gruppe von etwa 15% auf 30% zu erkennen. Ebenso wurde von Tag 28 auf Tag 56 ein signifikanter Anstieg der EF in der MI+Zellen Gruppe von durchschnittlich 18% auf 30% nachgewiesen. Die genauere Betrachtung der drei kontinuierlich untersuchten Versuchstiere zeigte, dass auch hier ein positiver Trend in der Erhöhung der EF von Tag 28 zu Tag 56 zu erkennen war (Abb. 30/II). Während der Versuchszeit nahm die EF in der MI+Zellen Gruppe stark signifikant im Vergleich zu den Kontrollgruppen (SHAM+Zellen und SHAM+NaCl) ab. Der EF-Wert reduzierte sich von 50% auf ungefähr 20% an Tag 28 nach der Induktion. Untersuchungen zur FS (Abb. 31/I) zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der SHAM+NaCl und SHAM+Zellen Gruppe. Zwischen den MI Gruppen mit NaCl und Zellinjektion wurde zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied ermittelt. Eine signifikante Reduktion der FS in der MI+Zellen im Vergleich zur SHAM+Zellen Gruppe wurde zu jedem Analysezeitpunkt beobachtet. Bei infarzierten Versuchstieren mit Zellinjektion kam es an Tag 28 zu einer Abnahme der FS auf etwa 10%. Von Tag 28 bis Tag 56 war jedoch ein Trend in der Erhöhung der FS von 10% auf 15% innerhalb der MI+Zellen Gruppe zu erkennen ($p = 0,06$). Auch die genauere Betrachtung der drei kontinuierlich untersuchten Versuchstiere zeigte, dass auch hier ein positiver Trend in der Erhöhung der FS von Tag 28 zu Tag 56 zu erkennen war (Abb. 31/II). Während der Versuchszeit nahm die FS in der MI+Zellen Gruppe stark signifikant im Vergleich zu den Kontrollgruppen (SHAM+Zellen und SHAM+NaCl) ab.

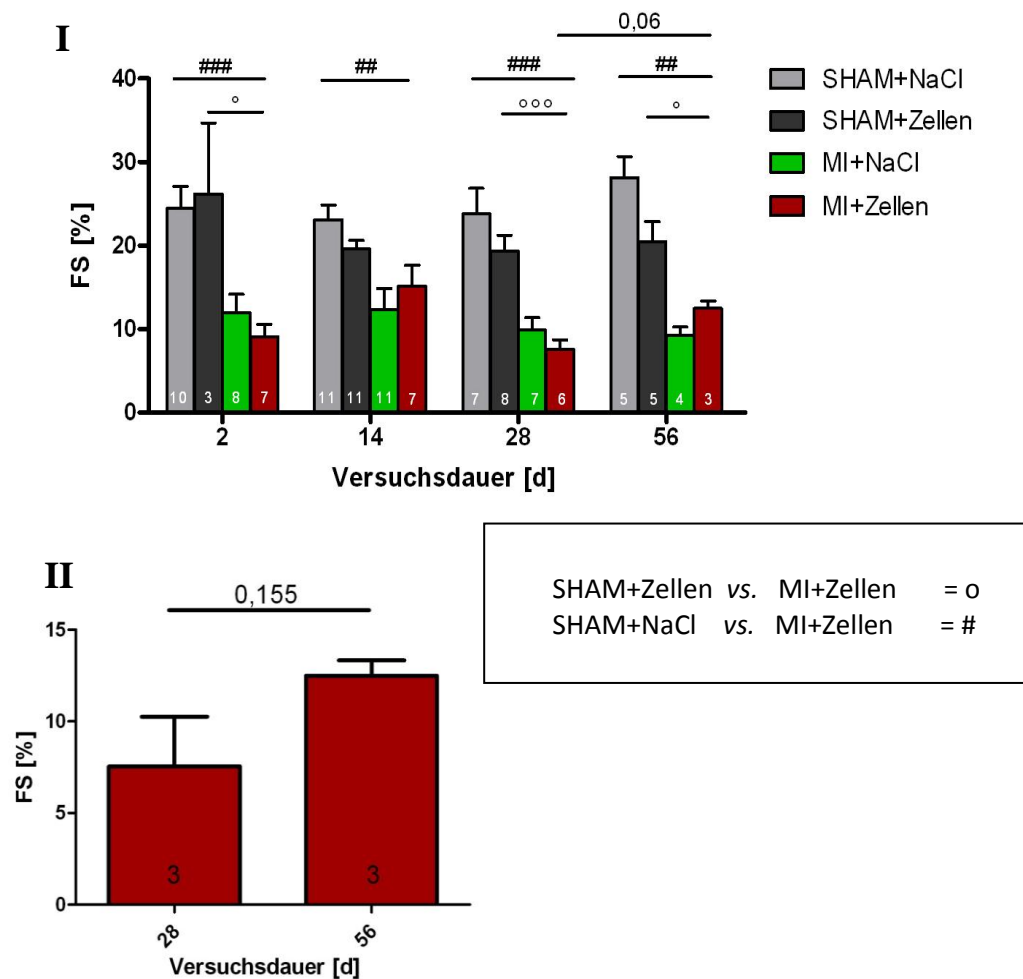


Abb. 31: Echokardiografische Analysen der Myokardinfarktstudie - Verkürzungsfraktion. In Abbildung 31/I sind die Werte für die Verkürzungsfraktion (FS) der echokardiografischen Analysen der gesunden Mäuseherzen (SHAM+NaCl und SHAM+Zellen) im Vergleich zu den infarzierten Herzen mit Zellinjektion (MI+Zellen) und ohne Zellinjektion (MI+NaCl) dargestellt. Abbildung 31/II zeigt die FS Werte der drei kontinuierlich analysierten Versuchstiere der MI+Zellen Gruppe zu den Untersuchungszeitpunkten Tag 28 und 56. Die untersuchte Tieranzahl (n) wurde in den jeweiligen Säulen aufgeführt. Signifikanzen wurden mittels des *student's t-tests* mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ angegeben.

Echokardiografische Untersuchungen des HW/BW zeigten an Tag zwei keine signifikanten Unterschiede in den vier Untersuchungsgruppen (Abb. 32/I). Zu keinem Untersuchungszeitpunkt wurden Unterschiede zwischen den Gruppen SHAM+NaCl und SHAM+Zellen beobachtet. Ebenfalls wurde kein Unterschied zwischen der MI+NaCl und MI+Zellen Gruppen ermittelt. Auch die Betrachtung der drei kontinuierlich untersuchten Versuchstiere der MI+Zellen Gruppe zeigte, dass kein signifikanter Unterschied des HW/BW von Tag 28 zu Tag 56 zu erkennen war (Abb. 32/II). Zu den Zeitpunkten 14 und 28 Tagen lag eine stark signifikante

Erhöhung des HW/BW in Vergleich zu den Kontrollgruppen (SHAM+NaCl und SHAM+Zellen) vor. An Tag 56 wurde kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den MI und SHAM operierten Tieren mit Zellinjektion beobachtet. An Tag 28 lag hier noch eine Signifikanz von $p \leq 0,01$ vor.

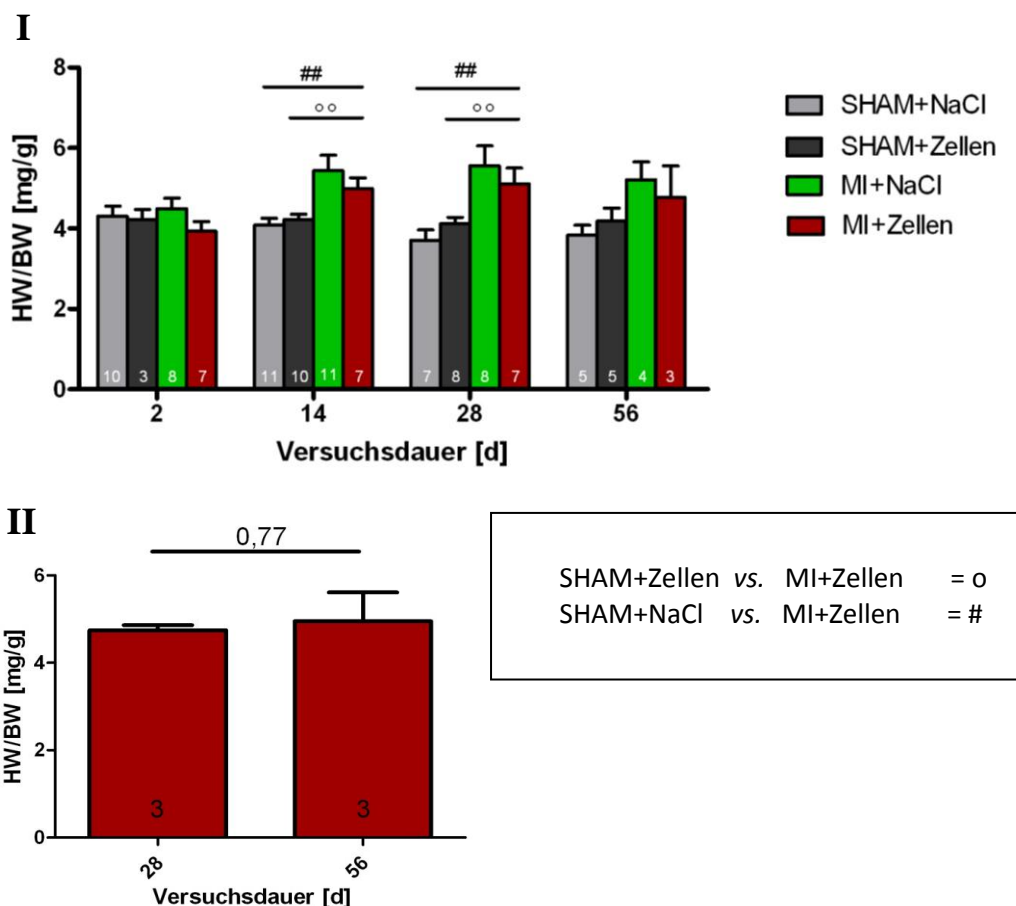


Abb. 32: Echokardiografische Analysen der Myokardinfarktstudie - Herzgewicht/Körpergewicht. In Abbildung 32/I sind die Werte für die den Quotienten des Herzgewicht/Körpergewicht (HW/BW) der echokardiografischen Analysen der gesunden Mäuseherzen (SHAM+NaCl und SHAM+Zellen) im Vergleich zu den infarzierten Herzen mit Zellinjektion (MI+Zellen) und ohne Zellinjektion (MI+NaCl) dargestellt. Abbildung 32/II zeigt die HW/BW Werte der drei kontinuierlich analysierten Versuchstiere der MI+Zellen Gruppe zu den Untersuchungszeitpunkten Tag 28 und 56. Die untersuchte Tieranzahl (n) wurde in den jeweiligen Säulen aufgeführt. Signifikanzen wurden mittels des *student's t-tests* mit $**p \leq 0,01$ angegeben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass kardiovaskuläre Vorläuferzellen aus den NE401 Zellen differenziert und mittels FACS separiert werden konnten. Ein MI-Mausmodell wurde erfolgreich etabliert. Bei der Injektion von FLK1 positiven Zellen in das Herzmyokard von infarzierten Herzen immunkompetenter

Wildtypmäuse mit CsA-Behandlung wurde im Laufe der Versuchszeit in der MI+Zellen Gruppe Trends und auch signifikante Änderungen in der Funktionssteigerung der untersuchten Parameter beobachtet. Die injizierten Zellen wurden jedoch nur zu frühen Zeitpunkten des Versuchs nachgewiesen. An Tag 56 wurden keine Zellen mehr detektiert. Ebenso wurde während der gesamten *in vivo* Studie zu keinem Analysezeitpunkt eine Teratombildung beobachtet.

3.4 Immunogenitätsuntersuchungen nach allogener Zelltransplantation

Aus den zuvor ermittelten Beobachtungen ergab sich die Frage, wodurch die fehlende Teratombildung in der *in vivo* Studie hervorgerufen wurde. Die injizierten FLK1 positiven Zellen könnten keine Tumorigenität aufweisen oder aktiv durch das Immunsystem der Wildtyp-Versuchstiere abgestoßen worden sein. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass die Mikroumgebung des Herzens oder die tägliche CsA-Gabe einen Einfluss auf die injizierten Zellen ausübte.

3.4.1 Teratombildung nach Injektion von FLK1 positiven Zellen in immundefiziente Mäuse

Zur Überprüfung der Tumorigenität der separierten FLK1 positiven Zellen wurden diese direkt nach der FACS-Separierung subkutan in die innere Flanke von immundefizienten RAGC Mäusen injiziert. Bei zwei von drei Tieren wurden Tumore generiert. Durchschnittlich 32,5 Tage nach der Injektion konnten kleine Tumore unter der Haut ertastet werden. Nach 40,5 Tagen wiesen die Tumore die entsprechende Größe (Durchmesser von etwa einem Zentimeter) zur Entnahme auf. Durch histologische HE-Färbungen konnten innerhalb dieser Tumore Zellen aller drei Keimblätter identifiziert werden. Die generierten Tumore wurden somit eindeutig als Teratome klassifiziert (Abb. 33).

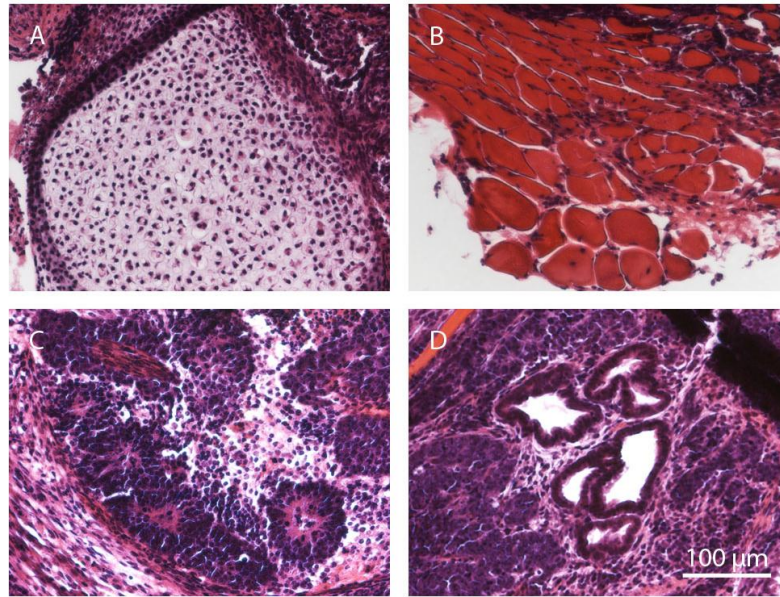


Abb. 33: Teratombildung von FLK1 positiven Zellen nach subkutaner Injektion in immundefiziente RAGC Mäuse. Diese Abbildung zeigt HE-Färbungen von Teratomschnitten. Die beobachteten Teratome weisen Zellen aller drei Keimblätter auf. Bild A zeigt Knorpelgewebe. Bild B dokumentiert Muskelgewebe. Spezifische rosettenartige Strukturen von Nervenzellen sind auf Bild C zu erkennen. Bild D zeigt intestinales Gewebe. Skalierung: 100 µm.

Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigten eine Tumorigenität der FLK1 positiven Zellen, die im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen (Tag 20) jedoch zu einer zeitlich späteren Teratombildung (Tag 40,5) nach Injektion in immundefiziente Mäuse führte. Diese Daten wiesen darauf hin, dass entweder das Immunsystem der Versuchstiere, die Mikroumgebung des Herzens und/oder die tägliche CsA-Gabe einen Einfluss auf die Teratombildung ausübten.

3.4.2 Suszeptibilität von tumorigenen Zellen gegenüber natürlichen Killerzellen

Um zu analysieren, ob das Immunsystem der Wildtypmäuse oder die Mikroumgebung des Herzens eine Rolle spielt, wurden in einer Versuchsreihe undifferenzierte maGSCs interkardial in immundefiziente RAGN und RAGC Mäuse injiziert. Die Injektion in RAGC Mäusen führte bei sieben von sieben Tieren zu einer Teratombildung nach 28 Tagen (Kaiser, 2010). In den RAGN Mäusen führte die intramyokardiale Injektion nach 28 Tagen bei fünf von sechs Tieren zu einer

Teratombildung im Herzen und/oder im Körper (Abb. 34). Die Körperteratome waren meist im Bereich des Darms oder der Niere lokalisiert.

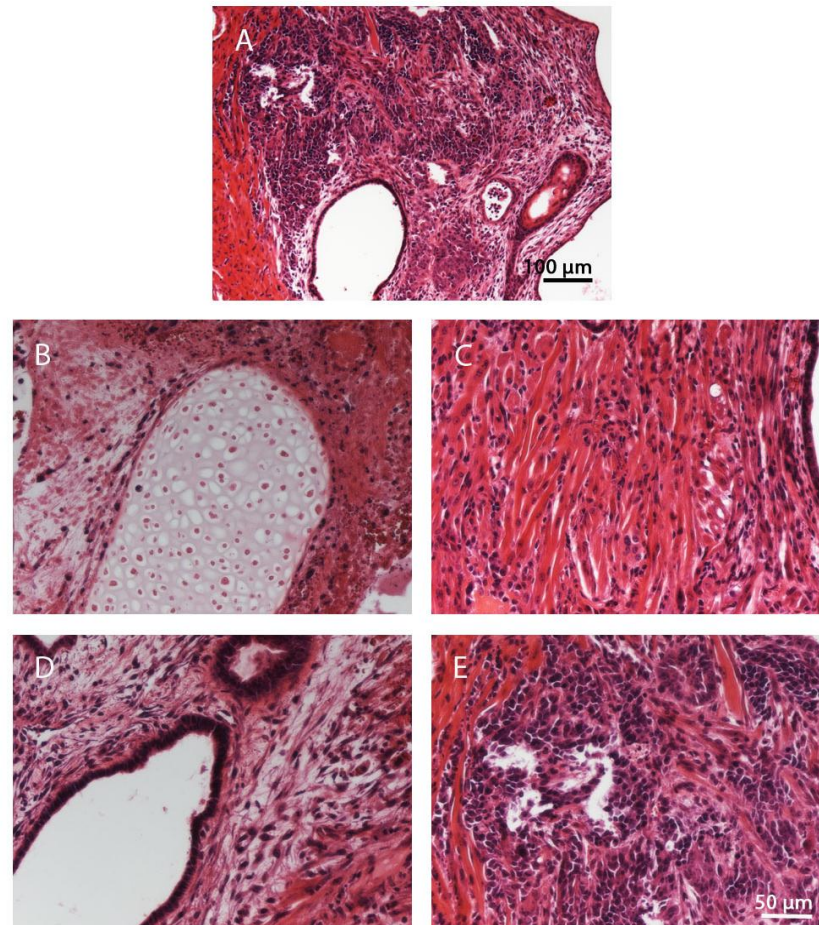


Abb. 34: Intrakardiale Teratombildung nach Injektion von undifferenzierten maGSCs in immundefiziente RAGN Mäuse. Auf den aufgeführten Bildern ist ein Herztumor dargestellt. Bild A stellt eine Übersicht dieses Teratoms eingelagert im Herzmuskel dar. Die Bilder B, C, D und E zeigen Zellen aller drei Keimblätter. Bild B zeigt Knorpelgewebe. Bild C dokumentiert Muskelzellen. Intestinales Gewebe ist auf Bild D zu sehen. Bild E lässt Nervenzellen erkennen. Skalierung Bild A: 100 µm, Skalierung Bilder B, C, D und E: 50 µm.

Die Teratomgrößen der RAGC Tiere waren deutlich höher ausgeprägt als die der RAGN Tiere. Mit einer durchschnittlichen Länge von 5,9 mm und einer Breite von 4,5 mm waren diese im Vergleich zu den RAGN Tieren mit einer durchschnittlichen Länge von 4 mm und einer Breite von 2,2 mm größer ausgeprägt.

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Mikroumgebung des Herzens keinen Einfluss auf die injizierten Zellen ausübte und dass das Immunsystem der Tiere ebenfalls eine Rolle spielen muss.

Zur weiteren Erueierung wurde im nächsten Schritt das Immunsystem von RAGN Mäusen nach der intrakardialen Injektion von undifferenzierten maGSCs untersucht (Daten wurden im Labor von Prof. Dr. Ralf Dressel erhoben). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3d, 7d, 14d und 28d) wurden die Tiere finalisiert und Milzbiopsien entnommen. Die immunologischen natürlichen Killerzellen (NK) wurden via MACS-Technik aus der Milz isoliert und mit maGSCs, die zuvor mit radioaktivem Chrom markiert wurden, kultiviert. Mittels eines Chromfreisetzungstests wurde die spezifische Lyse der maGSCs ermittelt. Als Kontrollzellen diente die Tumorzelllinie YAC1. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, welche ein natürliches Ziel der NK-Zellen darstellt. Für die Analyse wurden die NK-Zellen zu den maGSCs in spezifischen Effektor-Target-Verhältnissen eingesetzt.

Bei Tieren ohne Zellinjektion wurde bereits mit 12% für die maGSCs und 30% für die YAC1 Zellen eine Grundaktivität der NK-Zellen bei einem Effektor-Target-Verhältnis (E:T) von 24:1 nachgewiesen (Abb. 35). Bei Tieren mit Zellinjektion stieg die spezifische Lyse der maGSCs im Laufe des Versuchs bis Tag 14 von etwa 14% auf 31% (E:T = 24:1) an, um dann wieder etwas abzufallen (etwa 22%). Die Kontrollzellen zeigten ähnliche Ergebnisse. Auch hier war die stärkste spezifische Lyse an Tag 14 nach der Zellinjektion zu erkennen. Die Werte der spezifischen Lyse der YAC1 Zellen stiegen von etwa 30% auf 69% (E:T = 24:1) an Tag 14 an. An Tag 28 wurde ein Wert von 55% (E:T = 24:1) ermittelt.

Diese Daten zeigten, dass das Immunsystem der Versuchstiere eine entscheidende Rolle auf die Teratombildung ausübt. Die Zellinjektion führte zu einer Induktion der NK-Zellaktivität. Die injizierte Zellen könnten somit durch die vorhandenen NK-Zellen abgestoßen worden sein.

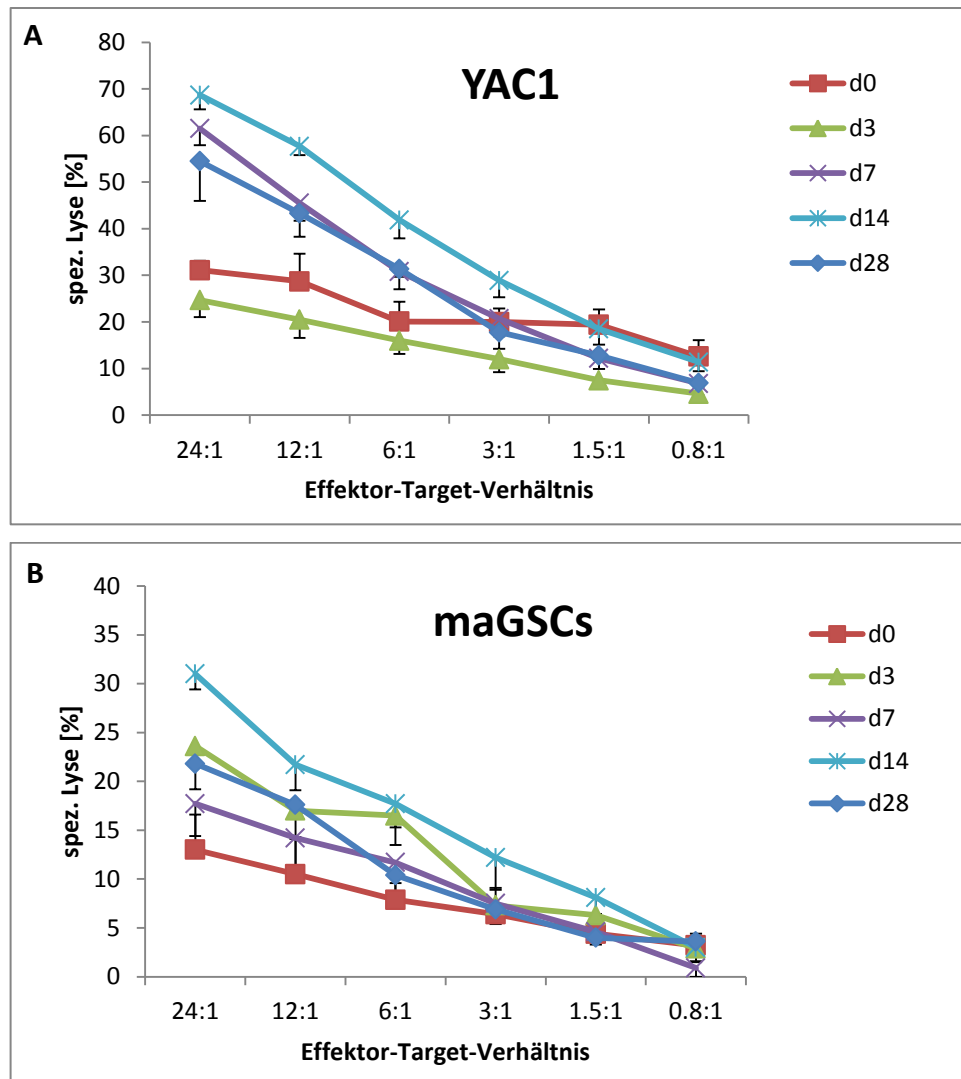


Abb. 35: Immunologische Analyse der NK-Zellaktivität auf maGSCs. Grafik A zeigt die ermittelten spezifischen Lysewerte eines Chromfreisetzungstests der YAC1 Zellen in Abhängigkeit zum Effektor-Target-Verhältnis zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. Grafik B gibt die korrespondierenden Werte für maGSCs wieder. Für beide Zellgruppen steigt die spezifische Lyse im Laufe des Versuchs zunächst an, während sie zu späteren Zeitpunkten wieder etwas abnimmt. Der höchste Wert der spezifischen Lyse wurde jeweils nach 14 Tagen ermittelt. Die Daten wurden im Labor von Prof. Dr. Ralf Dressel erhoben, d = Tage.

3.4.3 Einfluss von Ciclosporin A auf die Tumorigenität

Die *in vivo* Studien zur Myokardinfarktregeneration zeigten, dass eine Zellinjektion in immunkompetenten Wildtypmäusen unter CsA-Behandlung zu keiner Teratombildung führte.

Bei CsA handelt es sich um einen Calcineurin Inhibitor welcher den *nuclear factor of activating T cells* (NFAT) Signalweg beeinflusst und somit die Aktivität der T- und B-Zellen reduziert. Die Teratombildungsanalysen der RAGN Mäuse (die ebenfalls keine T- und B-Zellaktivität aufweisen jedoch über NK-Zellen verfügen) ohne CsA-Behandlung zeigten, dass es hier in fünf von sechs Tieren zu einer Teratombildung kam. Diese Daten wiesen darauf hin, dass auch das Immunsuppressivum CsA einen Einfluss auf die Teratombildung haben muss.

Zur Untersuchung eines CsA-Effekts wurden erneut undifferenzierte maGSCs in RAGN Tiere intrakardial injiziert. Diese Tiere wurden nun täglich mit CsA behandelt. Bei keinem der Versuchstiere (n = 5) wurde eine Teratombildung nach 28 Tagen beobachtet. Verglichen mit den Daten ohne CsA-Behandlung wurde nach 28 Tagen in den RAGN Tieren ein signifikanter Unterschied in der Teratombildung im Vergleich zu den mit CsA behandelten Versuchstieren beobachtet (Abb. 36). Bei den mit CsA behandelten Tieren wurde nur ein Herztumor bei einem von 3 Tieren an Tag 14 nachgewiesen, der jedoch noch klein und nicht ausgereift vorlag und somit keine eindeutige Klassifizierung als Teratom zuließ.

In den RAGN Tieren wurden ohne CsA-Behandlung zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten Teratombildungen beobachtet. Drei und sieben Tage nach der Injektion wurden keine Teratome festgestellt. Ab Tag 14 wurde erstmals ein Teratom bei einer von drei Mäusen im Herzen nachgewiesen. Körpertumore wurden erst nach 28 Tagen dokumentiert (zwei von sechs Mäusen). An Tag 28 bildeten fünf von sechs Mäusen der unbehandelten Versuchstiere ein intrakardiales Teratom.

Ergebnisse früherer Arbeiten mit RAGC Tieren zeigten ebenfalls eine Reduktion der Teratombildung durch eine tägliche CsA-Behandlung nach intrakardialer Zellinjektion (undifferenzierte maGSCs) an Tag 28. Tiere mit CsA-Behandlung wiesen keine oder sehr kleine Teratome auf (Abb. 36). Tiere ohne CsA-Behandlung zeigten dagegen signifikant vermehrte Teratombildung im Herzen sowie im gesamten Körper (Kaiser, 2010).

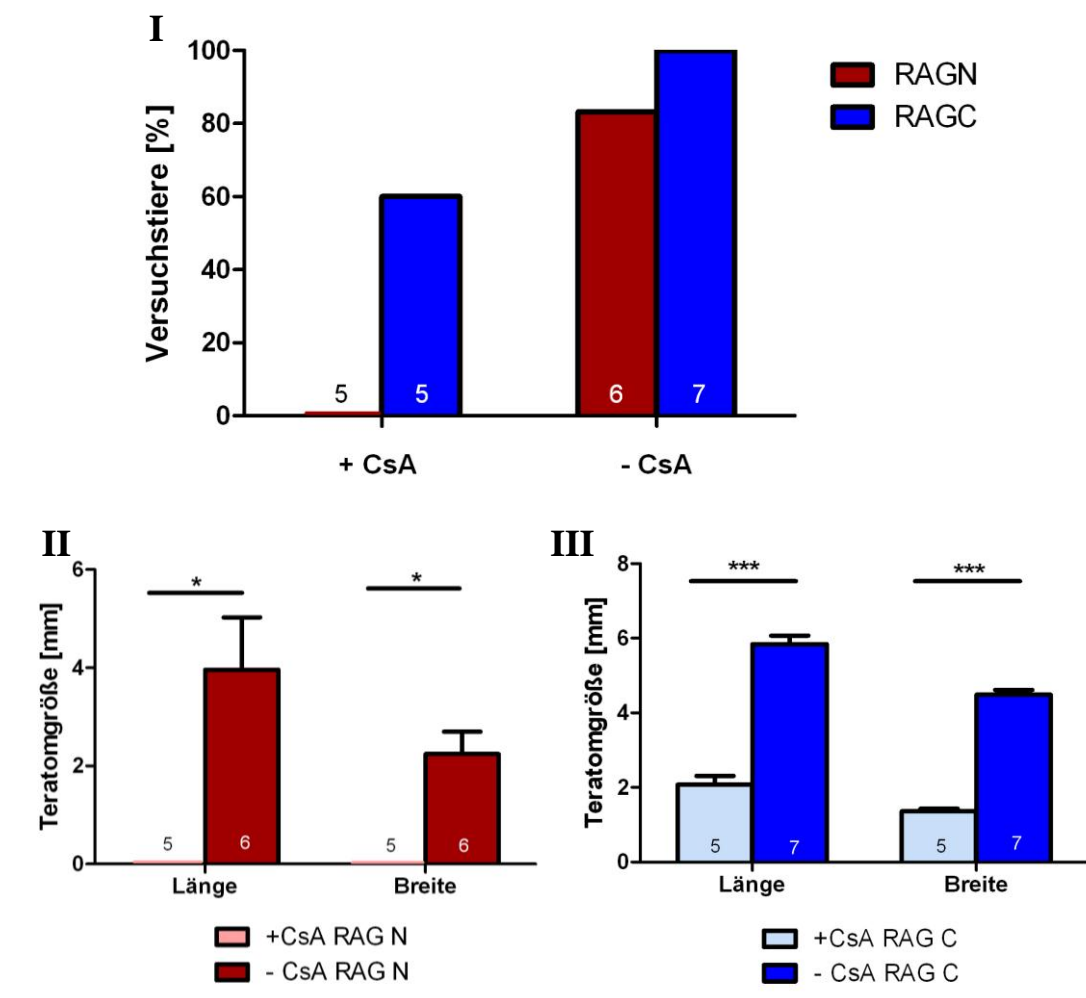


Abb. 36: Teratombildung von undifferenzierten maGSCs in immundefizienten Mäusen mit und ohne CsA-Behandlung. Abbildung 36/I zeigt den Anteil der Versuchstiere (RAGN und RAGC), bei denen eine Teratombildung an Tag 28 nach Injektion von undifferenzierten maGSCs mit und ohne CsA-Behandlung nachgewiesen wurde. Die Versuchstiere der Spezies RAGC (blau) zeigen eine häufigere Teratombildung als die Versuchstiere der Spezies RAGN (rot). Die Behandlung mit CsA führt in beiden Mausspezies zu verminderter Teratombildung im Vergleich zu den unbehandelten Versuchstieren. Die Anzahl der Versuchstiere (n) ist innerhalb der Säulen angegeben. Abbildung 36/II zeigt die beobachteten Teratomgrößen in den RAGN Mäusen mit CsA- (rosa Säulen) und ohne CsA-Behandlung (rote Säulen). Deutlich ist ein signifikanter Unterschied in der Länge und Breite der beobachteten Teratome nach 28 Tagen mit und ohne CsA-Behandlung zu erkennen. Abbildung 36/III zeigt die beobachteten Teratomgrößen in den RAGC Mäusen mit CsA- (hellblaue Säulen) und ohne CsA-Behandlung (blaue Säulen). Deutlich ist ein hoch signifikanter Unterschied in der Länge und Breite der beobachteten Teratome nach 28 Tagen mit und ohne CsA-Behandlung zu erkennen (Daten entnommen aus Kaiser, 2010). Signifikanzen wurden mittels des *student's t-tests* mit * $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$ angegeben.

Im Vergleich der kardialen Injektion von undifferenzierten maGSCs in RAGN und RAGC Tieren, wurden deutlich größere Teratome (Herz- und Körperteratome) in den RAGC Mäusen nach 28 Tagen beobachtet (Abb. 36/II und III). Dies traf sowohl auf die mit CsA behandelte Versuchsgruppe als auch auf die unbehandelte Kontrollgruppe zu.

Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss des CsA auf die NK-Zellaktivität der RAGN Mäuse untersucht. Die immunologischen Analysen der RAGN Mäuse zeigten erneut zu allen Untersuchungszeitpunkten, durch die nachgewiesene spezifische Zellyse, dass die isolierten NK-Zellen eine cytotoxische Aktivität gegen maGSCs aufwiesen (Abb. 37). Als Kontrollzellen dienten erneut YAC1 Zellen. Bei diesen Experimenten wurde kein signifikanter Unterschied in der spezifischen Lyse der maGSCs und YAC1 Zellen zwischen den Versuchsgruppen mit und ohne CsA-Behandlung detektiert. Die NK-Zellaktivität der mit CsA behandelten Tiere nahm im Laufe der Versuchszeit zunächst auch zu, wie bei den Tieren ohne CsA-Behandlung bereits beobachtet und zum Ende des Experiments wieder etwas ab.

Des Weiteren wurde bei der Isolierung der Splenozyten kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstieren mit und ohne CsA-Behandlung nachgewiesen. (Abb. 38). Die verminderte Anzahl der isolierten Splenozyten in beiden Gruppen an Tag 28, im Vergleich zu Tag sieben und 14, korrelierte mit den Ergebnissen der NK-Zellaktivitätsanalysen.

Diese Daten zeigten, dass die NK-Zellaktivität durch die CsA-Gabe nicht beeinflusst wurde.

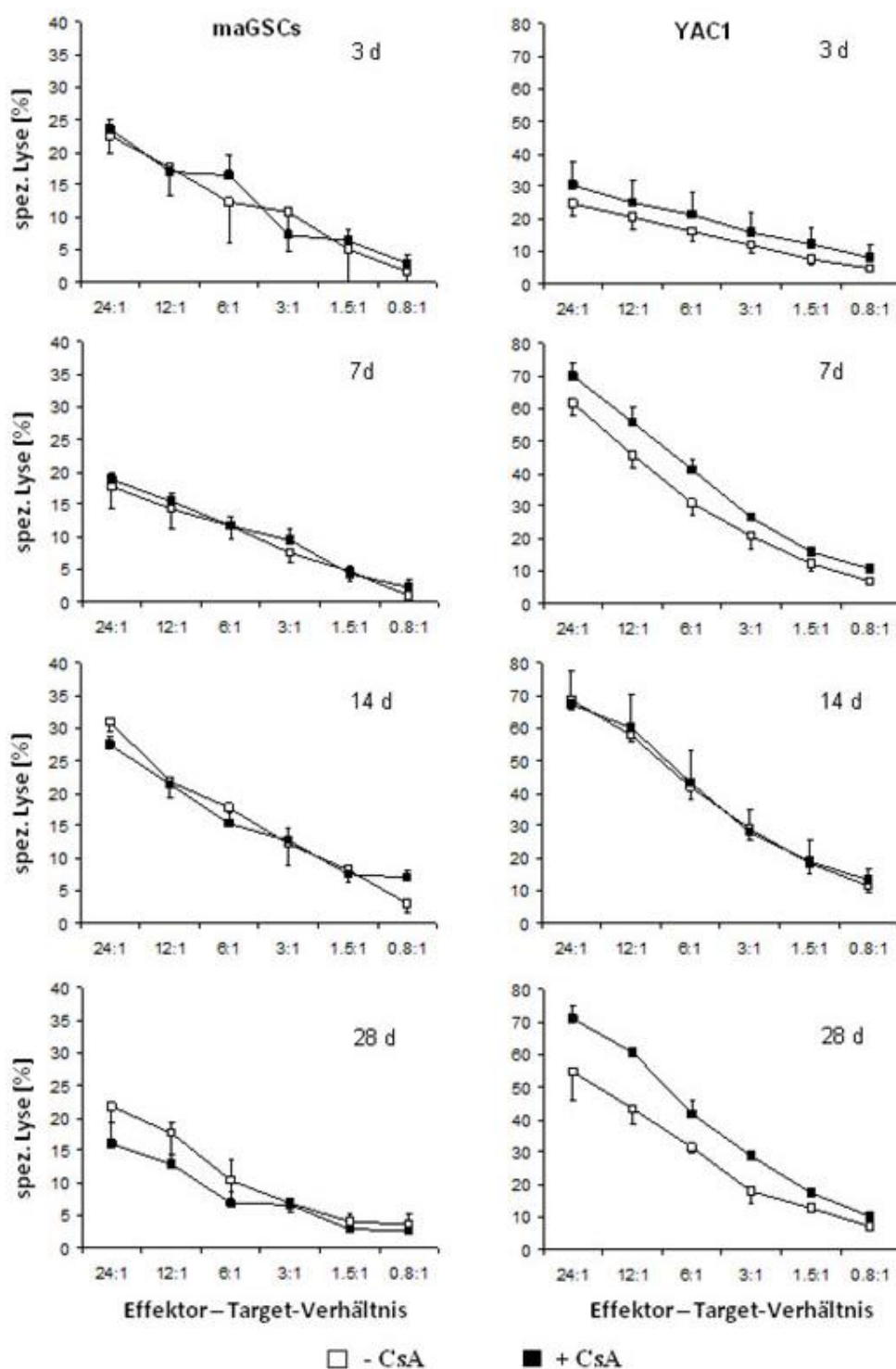


Abb. 37: Immunologische Analyse der NK-Zellaktivität auf maGSCs mit und ohne CsA-Behandlung. Diese Abbildung zeigt die ermittelten spezifischen Lysewerte der maGSCs in Abhängigkeit zum Effektor-Target-Verhältnis. Dargestellt sind die einzelnen Untersuchungszeitpunkte (d3, d7, d14 und d28) und die Behandlungsgruppen mit und ohne Ciclosporin A (CsA). Als Kontrolle dient die Tumorzelllinie YAC1. Die Daten wurden erhoben im Labor von Prof. Dr. Ralf Dressel, d = Tage.

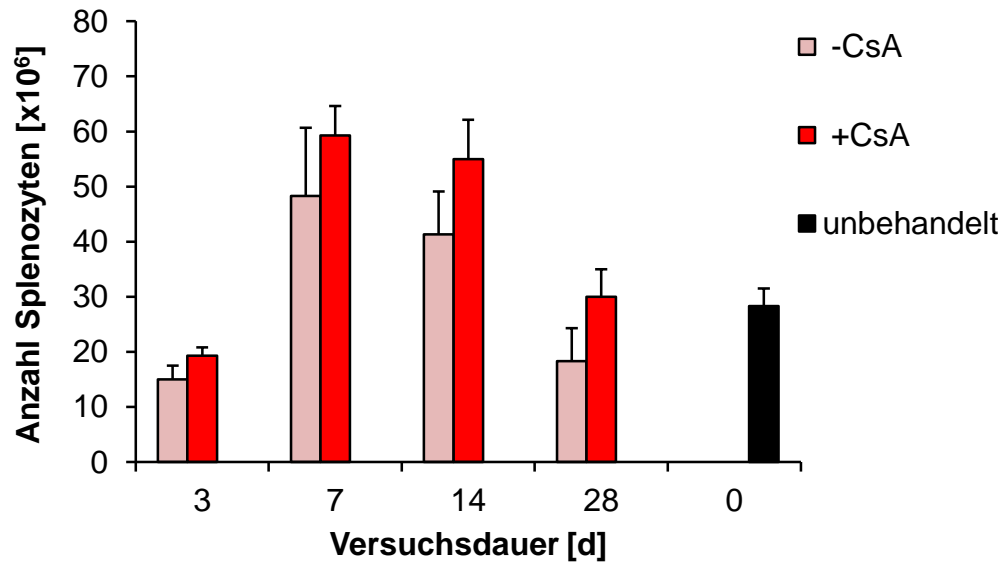


Abb. 38: Anzahl der isolierten Splenozyten. Diese Abbildung zeigt die Anzahl der isolierten Splenozyten in Abhängigkeit zur Versuchsdauer. Auch hier sind die Behandlungsgruppen mit CsA (rosa) und ohne CsA (rot) aufgezeigt. Unbehandelte Vergleichstiere sind an Tag 0 aufgeführt. Die Daten wurden erhoben im Labor von Prof. Dr. Ralf Dressel, d = Tage.

Zusammengefasst wurde durch die nachgewiesene intrakardiale Teratombildung nach Injektion von maGSCs der Einfluss der Herzumgebung als Grund für die fehlende Teratombildung in der MI-Studie ausgeschlossen. Die nachgewiesene Teratombildung in den Versuchstieren zeigte ebenfalls einen Einfluss des Immunsystems auf die injizierten Zellen. Der beobachtete signifikante Größenunterschied der Teratome in den RAGN und RAGC Tieren ohne CsA-Gabe im Vergleich zu den Versuchstieren mit CsA-Behandlung zeigte, dass CsA einen Einfluss auf die Teratombildung hat. Die NK-Zellaktivität wurde durch CsA jedoch nicht beeinflusst. Durch die Zelinjektion wurde jedoch eine Induktion der NK-Zellaktivität beobachtet.

3.5 Tumorigenitätspotential von viral induzierten miPSCs

Um zu untersuchen, ob eine viral induzierte Reprogrammierung zu einer solchen Veränderung der Zielzellen führt, dass diese als Immunogene des Donor-Immunsystems erkannt werden, wurden virale miPSCs in einer autologen Zellinjektionssituation analysiert.

3.5.1 Generierung von miPSCs aus Schwanzfibroblasten und Prüfung der Pluripotenz

Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurden aus Schwanzbiopsien von C57BL/6J-Wildtypmäusen Fibroblasten isoliert, diese in iPSCs viral reprogrammiert und durch direkte autologe Injektion in die Donormaus die Immunantwort analysiert. Hierfür wurden zunächst von 11 Tage alten C57BL/6J-Wildtypmäusen (n = 4) Schwanzbiopsien genommen und daraus Fibroblasten isoliert. Diese wurden mit Hilfe des STEMCCA-Virus transduziert. Durch Überexpression der vier auf den Virus befindlichen Pluripotenzfaktoren *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* und *Klf4* wurden die Fibroblasten reprogrammiert. Die zuvor vorhandene längliche charakteristische Fibroblasten Struktur war durch die Reprogrammierung einer kompakten Zellkoloniestruktur gewichen. Die Morphologie dieser generierten iPSCs entsprach der der maGSCs. Auch eine alkalische Phosphataseaktivität wurde mittels einer Blaufärbung der iPSC-Zellkolonien nachgewiesen (Abb. 39).

Generierte Zellklone wurden separat herausgepickt und *in vitro* herangezogen. Die so gewonnenen viral induzierten Zellen wurden auf ihre Pluripotenz untersucht.

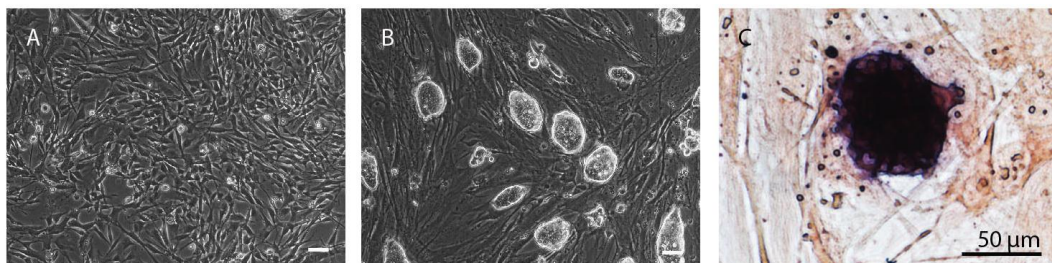


Abb. 39: Morphologie der isolierten Fibroblasten und der generierten iPSCs. Bild A zeigt die isolierten Fibroblasten aus den murinen Schwanzbiopsien. Die via Transduktion generierten iPSCs sind in Bild B dargestellt. Bild C zeigt die positive alkalische Phosphatasefärbung der iPSCs. Skalierung: 50 µm.

Mittels Gen- und Proteinexpressionsanalysen wurden pluripotente Marker nachgewiesen. Bei den Genexpressionsanalysen konnten deutlich die Pluripotenzmarker *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* und *Lin28* detektiert werden. Um auszuschließen, dass eine Expression durch das integrierte Virusplasmid die Ergebnisse verfälscht, wurde zur Bestimmung der Expressionen von *Oct4* und *Sox2* auf endogene Primer zurück gegriffen. Die Ausgangsfibroblasten zeigten keinerlei Expression dieser Marker (Abb. 40).

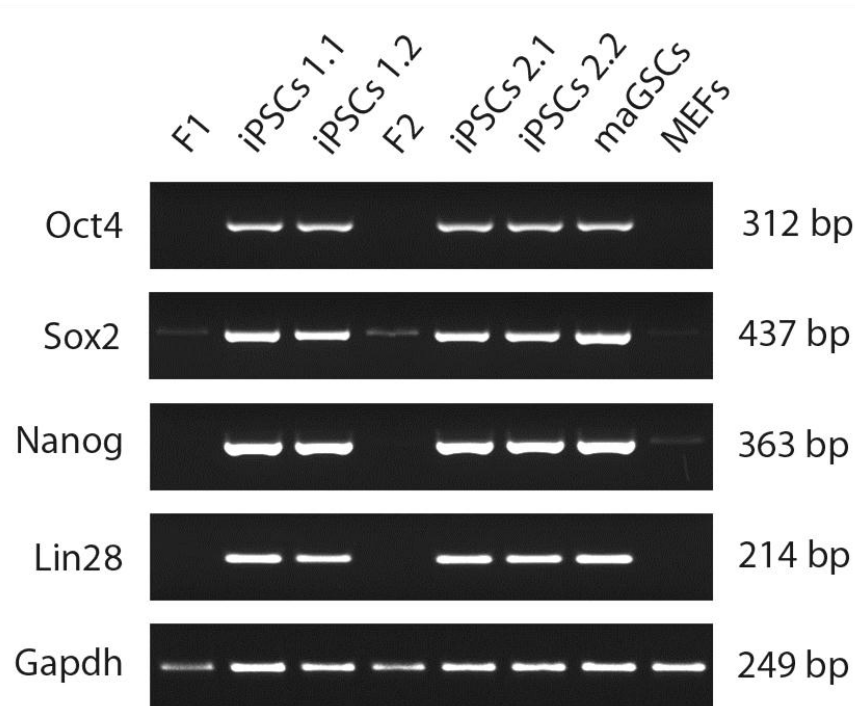


Abb. 40: Genexpressionsanalysen der generierten iPSCs aus murinen Schwanzfibroblasten. In dieser Abbildung sind Genexpressionen von pluripotenten Markern von jeweils zwei generierten iPSCs Klonen von zwei unterschiedlichen Mausdonoren (1 und 2) im Vergleich zu den Schwanzfibroblasten (F1 und F2), den maGSCs und MEFs dargestellt. Deutlich sind starke Expressionen der Pluripotenzmarker (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog* und *Lin28*) in den iPSCs genauso wie in den maGSCs nachzuweisen. Die untersuchten Ausgangsfibroblasten zeigen, wie die MEFs, keine oder nur sehr geringe Expressionen der untersuchten Gene. *Gapdh* gilt als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Konzentration. Bp = Basenpaare.

Auch durch Proteinexpressionsanalysen wurden pluripotente Markerproteine in den generierten iPSCs Kolonien nachgewiesen. Positive Signale von SSEA1, LIN28 und NANOG wurden eindeutig detektiert (Abb. 41).

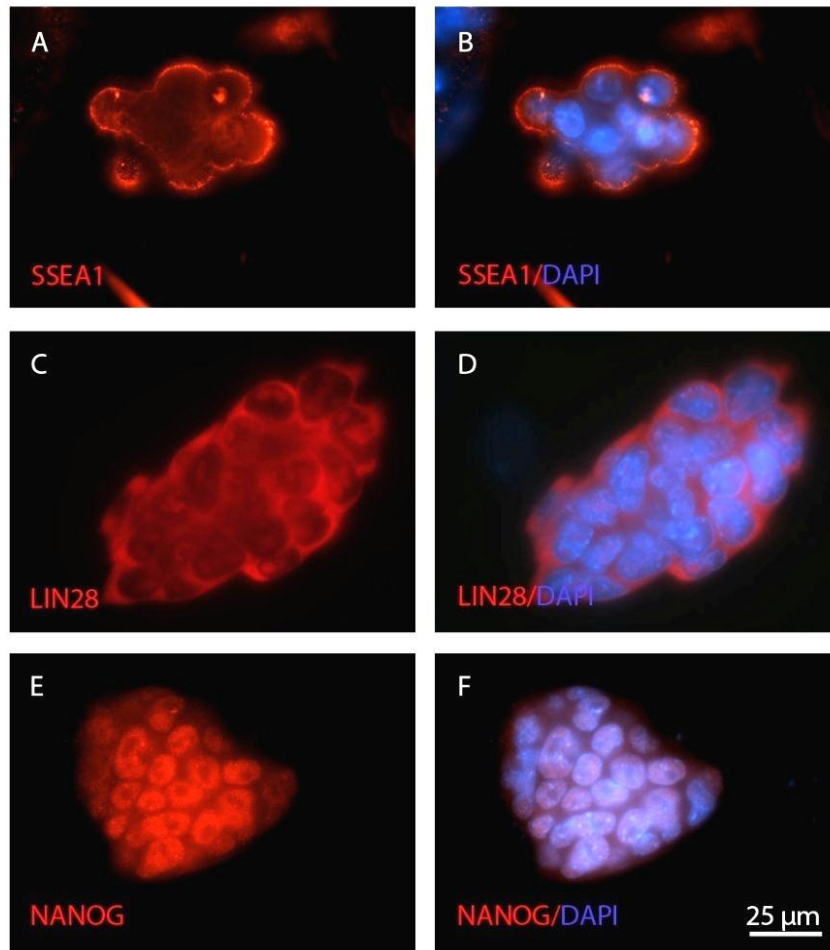


Abb. 41: Immunfluoreszenzfärbungen der generierten iPSCs aus murinen Schwanzfibroblasten. Kolonien der generierten iPSCs aus Schwanzfibroblasten sind deutlich positiv für pluripotente Markerproteine (SSEA1, LIN28 und NANOG). Die Bilder A, C und E zeigen Einzelfluoreszenzen der untersuchten Markerproteine. Auf den Bildern B, D und F sind Überlagerungen der jeweiligen Fluoreszenzen mit den Kernfarbstoff DAPI dargestellt. Skalierung: 25 µm.

Die generierten iPSCs wurden zur Untersuchung ihres Differenzierungspotentials mittels des *hanging drop* Verfahrens analysiert. Während der Differenzierung wurden auf mRNA-Ebene Genexpressionen von Markern aller drei Keimblätter detektiert (Abb. 42). Als Vertreter des Endoderms wurde eine *Afp*-Expression nachgewiesen. Da es sich hierbei um einen frühen Marker für Hepatozyten handelt, wurde eine Expressionssteigerung im Laufe der Differenzierung beobachtet. *Mash1* und *Synaptophysin*, als ektodermale Marker, wurden ebenfalls ansteigend während der Differenzierung detektiert. Dieses traf auch auf den mesodermalen Vorläufermarker *Flk1* und α -*Mhc* als Marker von ausgereiften Kardiomyozyten zu.

Die generierten iPSCs aus verschiedenen C57B/6J-Mäusen zeigten in allen durchgeführten Charakterisierungs- und Differenzierungsexperimenten ähnliche Ergebnisse.

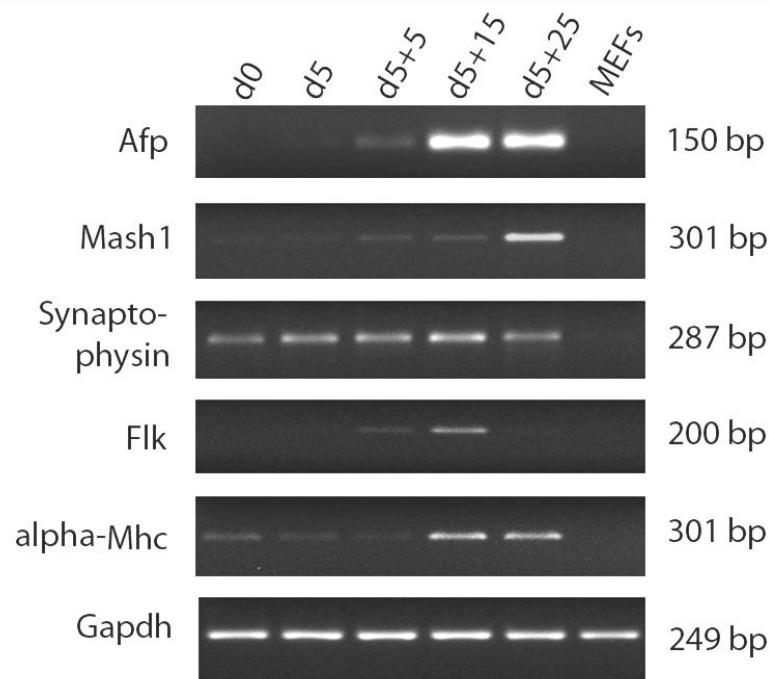


Abb. 42: Genexpressionsanalysen während der Differenzierung der generierten iPSCs. In dieser Abbildung sind beispielhaft Genexpressionen von einer generierten iPSC-Zelllinie während der Differenzierung mittels des *hanging drop* Verfahrens dargestellt. Im Laufe der Differenzierung von d0 bis d5+25 sind deutlich die Anstiege der gewebespezifischen Marker zu erkennen. Aufgeführt sind als endodermaler Marker *Afp*, als ektodermaler Vertreter *Synaptophysin* und *Mash1* sowie als mesodermale Gene *Flk1* und *α -Mhc*. MEFs dienen als Negativkontrolle. *Gapdh* gilt als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Konzentration. Bp = Basenpaare.

Auch nach subkutaner Injektion aller viralen iPSCs in immundefiziente RAGN Mäuse konnte für jede Zelllinie Teratombildungen beobachtet werden (Abb. 43). Die Pluripotenz dieser viral induzierten Zelllinien wurde somit bestätigt.

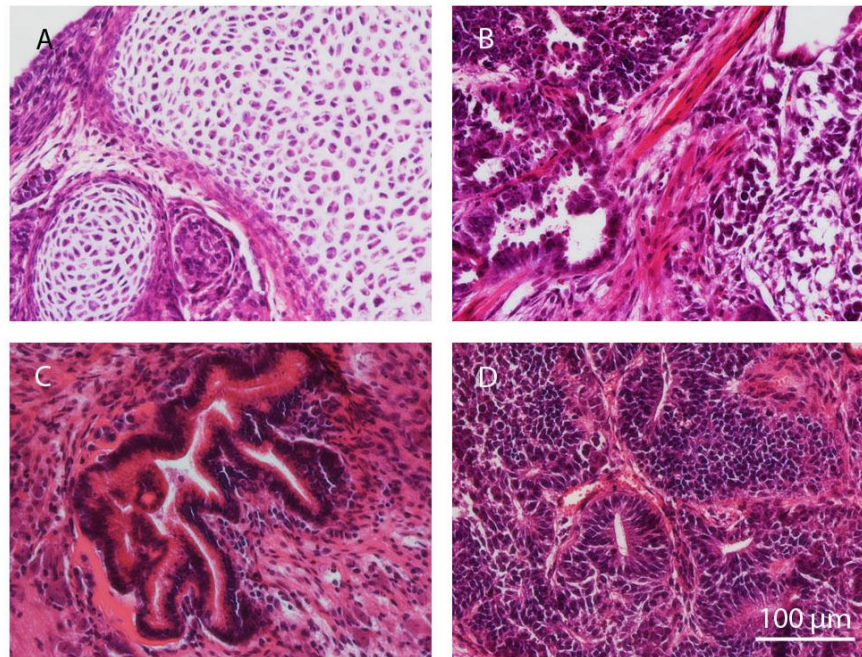


Abb. 43: Teratombildung von generierten iPSCs aus murinen Schwanzfibroblasten nach subkutaner Injektion in immundefiziente RAGN Mäuse. In dieser Abbildung ist die Teratombildung der generierten iPSCs in immundefizienten Mäusen beispielhaft für eine Zelllinie dargestellt. Auf den aufgeführten Bildern sind Zellen aller drei Keimblätter zu erkennen. Bild A zeigt Knorpelgewebe. Muskelzellen sind auf Bild B zu sehen. Intestinales Gewebe ist auf Bild C zu erkennen. Bild D zeigt die spezifische rosettenartige Struktur der Nervenzellen. Skalierung: 100 µm.

3.5.2 Teratombildung von viralen miPSCs nach autologer und syngener Transplantation

Die charakterisierten iPSCs wurden zur Analyse des autologen Tumorigenitätspotentials subkutan in die innere Flanke der Donormäuse der Schwanzbiopsien sowie syngen in C57BL/6J-Wildtypmäuse injiziert.

Bei den autolog injizierten Tieren wurden in drei von vier Tieren Tumore nach 20-60 Tagen entnommen. Mittels HE-Färbung wurden Zellen aller drei Keimblätter diagnostiziert und die Tumore somit eindeutig als Teratome klassifiziert (Abb. 44).

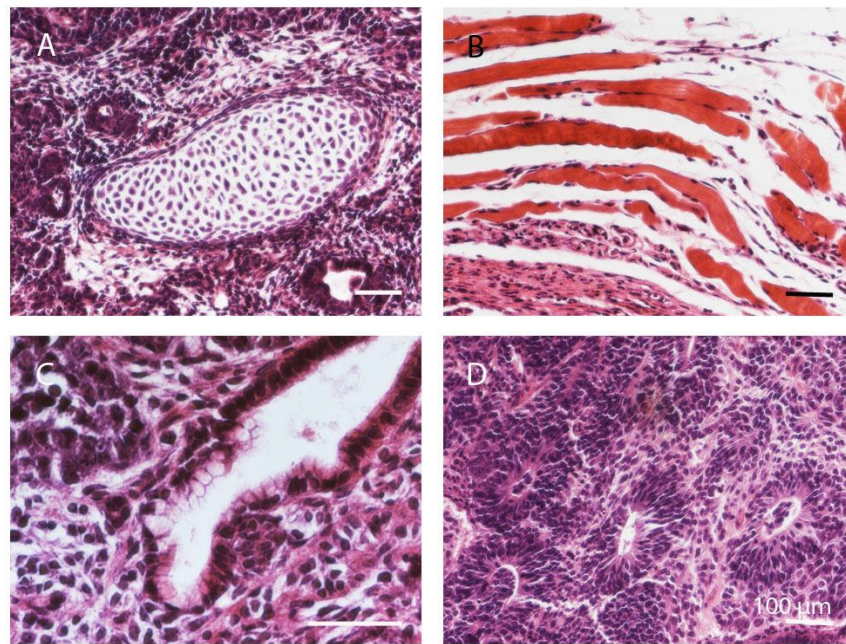


Abb. 44: Teratombildung von generierten iPSCs aus Schwanzfibroblasten nach autologer subkutaner Injektion in Donor-Wildtypmäuse. In dieser Abbildung ist die Teratombildung der generierten iPSCs in autologe Donormäusen beispielhaft für eine Zelllinie dargestellt. Auf den aufgeführten Bildern sind Zellen aller drei Keimblätter zu erkennen. Bild A zeigt Knorpelgewebe. Muskelzellen sind auf Bild B zu sehen. Intestinales Gewebe ist auf Bild C zu erkennen. Bild D zeigt die spezifische rosettenartige Struktur der Nervenzellen. Skalierung: 100 µm.

Ebenfalls wurden immunologische Analysen zur NK-Zellaktivität von autologen Injektionen durchgeführt (Daten erhoben im Labor von Prof. Dr. Ralf Dressel). Hierzu wurden NK-Zellen aus Milzbiopsien von den autolog injizierten Versuchstieren entnommen und in einem Chromfreisetzungstest auf ihre Aktivität auf die jeweiligen iPSCs untersucht. Hierbei wurde sowohl eine Maus mit Teratombildung als auch die Maus ohne Teratombildung analysiert. Die Ergebnisse zeigten keine NK-Zellaktivität gegen die iPSCs in der teratombildenden Maus. Auch die Maus die nach Injektion der autologen Zellen zu keiner Teratombildung führte wies keine NK-Zellaktivität auf (Abb. 45). Es wurde kein Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne Teratombildung nach autologer Zellinjektion in Bezug auf die NK-Zellaktivität beobachtet.

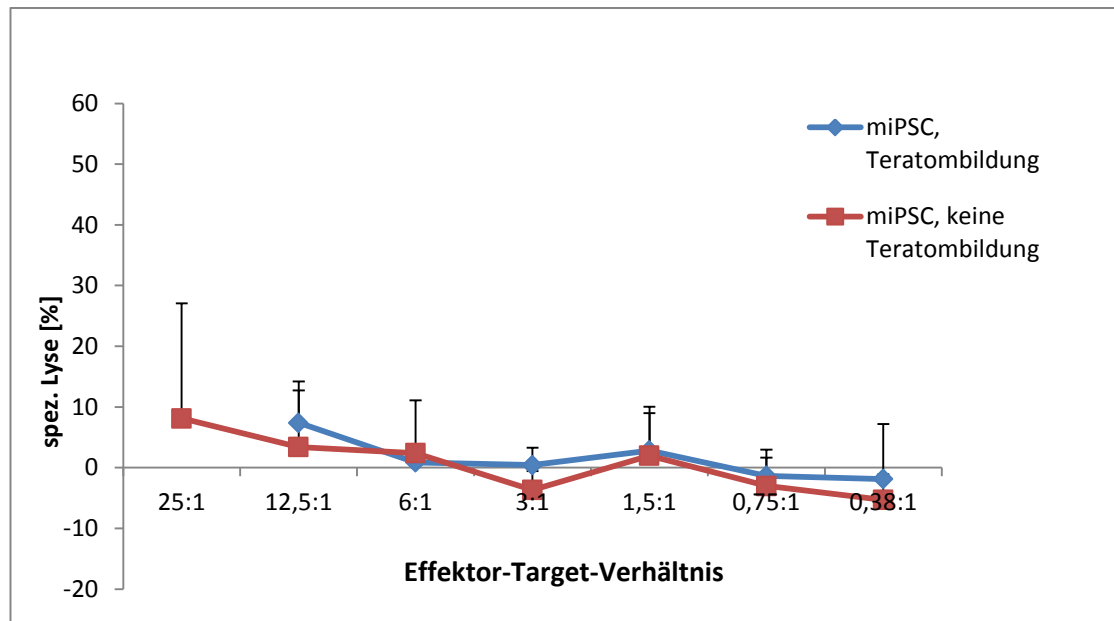


Abb. 45: NK-Zellaktivitätsanalysen der autolog injizierten Versuchstiere. In diesem Diagramm ist die spezifische Lyse der iPSCs in einer der autolog injizierten Versuchstiere mit Teratombildung (blau) und in einer der autolog injizierten Maus ohne Teratombildung in Abhängigkeit zum Effektor-Target-Verhältnis dargestellt. Die Abbildung zeigt für beide Mäuse keine NK-Zellaktivität auf. Daten erhoben im Labor von Prof. Dr. Ralf Dressel.

Ebenfalls wurden die miPSCs auch syngen in C57BL/6J Wildtypmäusen (jeweils n = 4) injiziert. Hierbei wurden nur bei der Hälfte der injizierten Mäuse einer Zelllinie Teratome (Tag 30-60 nach Injektion) gewonnen.

In dieser Arbeit zeigten die viral induzierten iPSCs sowohl in syngener als auch in autologer Zellinjektionssituation Teratombildungen.

Als Kontrolle wurden die miPSCs auch allogenen in SV129-Mäuse (jeweils n = 3) injiziert. Die SV129-Mäuse zeigten bis zur Abgabe dieser Arbeit (Tag 45 nach Injektion) keine Teratombildung. Die allogenen injizierten Zellen scheinen vollständig durch das Immunsystem der Akzeptormäuse abgestoßen zu sein.

3.6 Kardiale Differenzierung von hESCs

Zur Analyse, ob kardiale Vorläuferzellen auch aus humanen ESCs (Abb. 46) effizient generiert werden können, wurden diese in *kinase domain receptor* (KDR) positive kardiovaskuläre Vorläuferzellen (analog zu FLK1 in der Maus) differenziert. Undifferenzierte hESCs wiesen eine kompakte Zellkoloniestruktur auf, welche sich durch einen klar abgegrenzten Randbereich auszeichnete (Abb. 46).

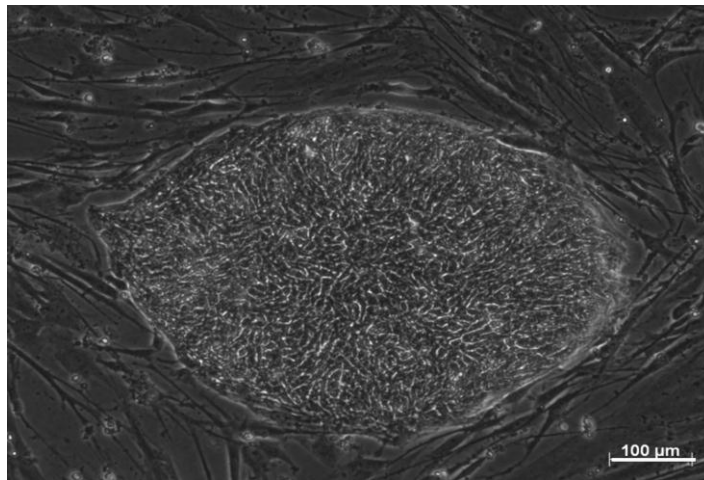


Abb. 46: Morphologie einer undifferenzierten humanen embryonalen Stammzellkolonie. Skalierung: 100 μm .

Zur Differenzierung wurde sowohl das Verfahren der Cokultur auf OP9 Zellen als auch das *mass culture* Verfahren verwendet. Durch beide Verfahren wurden KDR positive Zellen gewonnen. Das Verfahren der Cokultur auf OP9 Zellen wurde analog der FLK1 Differenzierung der murinen Zellen, nur mit verlängerter Kultivierungszeit (11 Tage) durchgeführt. Auch hierbei wurde die Differenzierung der Zellen in eine charakteristische „Kopfsteinpflasterstruktur“ analog den murinen Zellen beobachtet. Die Differenzierung über die *mass culture* beruht auf der spontanen Differenzierung von EBs. Die gebildeten EBs wuchsen in der Suspensionskultur zunächst, bevor sie an Tag 8 der Differenzierung ausplattiert wurden. Auch hier wurden charakteristische Strukturen beobachtet (Abb. 47).

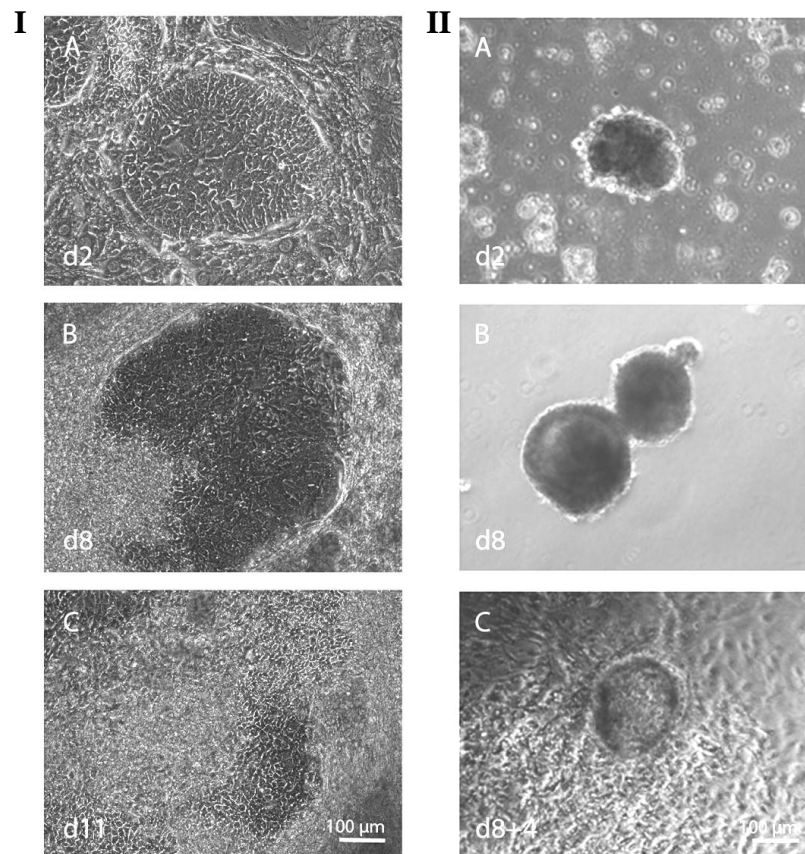


Abb. 47: Morphologie der hESCs während der unterschiedlichen Differenzierungsverfahren. Abbildung 47/I (Bilder A bis C) zeigt die Morphologie der hESCs während der Differenzierung mittels des Cokulturverfahrens. Die morphologische Änderung während der Differenzierung über die *mass culture* ist in den Bildern A bis C auf der Abbildung 47/II zu erkennen. Skalierung: 100 μm , d = Tage.

An Tag 11 der Cokultur und an Tag 8+4 der *mass culture* wurde der Gehalt an KDR positiven Zellen mittels Durchflusszytometrieanalysen bestimmt. Das Verfahren der *mass culture* lieferte hierbei eine höhere Ausbeute an KDR positiven Zellen an Tag 8+4 als durch die Cokultur an Tag 11. Bei der *mass culture* konnten um die 40-50% KDR positive Zellen gewonnen werden, während die Cokulturdifferenzierung eine Ausbeute von ca. 30% erzielte (Abb. 48).

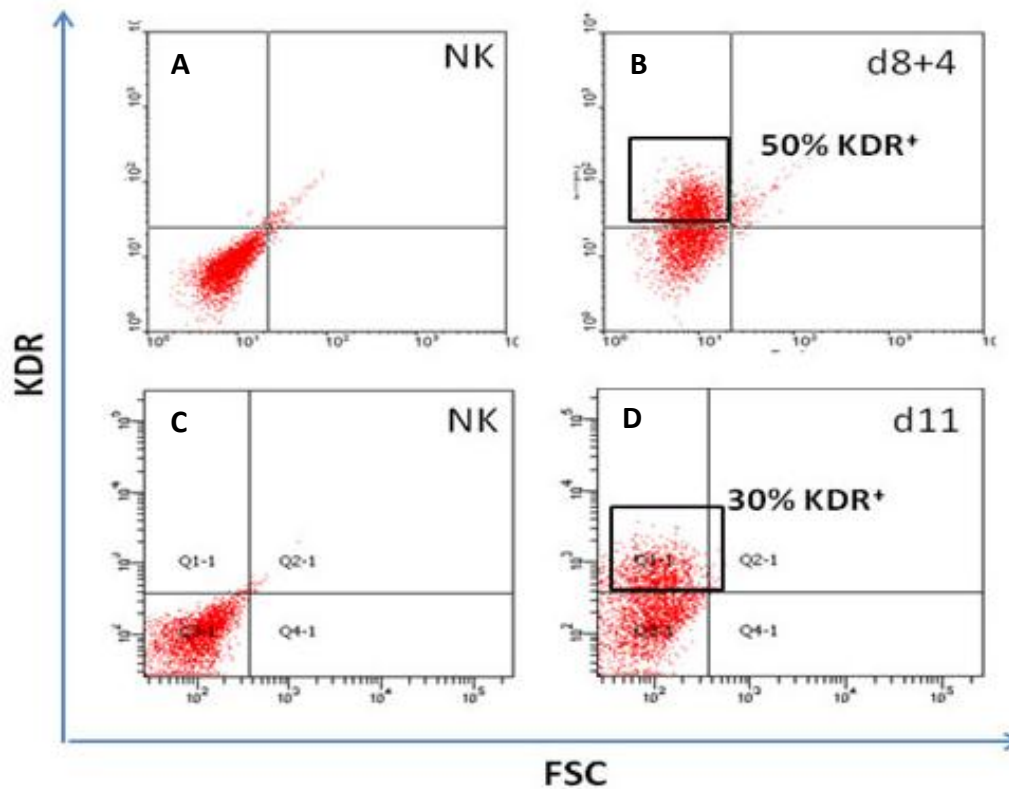


Abb. 48: Durchflusszytometrieanalysen zu den humanen Differenzierungsverfahren. In dieser Abbildung sind die Durchflusszytometrieanalysen der beiden Differenzierungsverfahren angegeben. Über das Verfahren der mass culture (A und B) können etwa 50% KDR positiven Zellen detektiert werden. Die Differenzierung über die Cokultur (C und D) führt zu etwa 30% KDR positive Zellen. NK = Negativkontrolle, FSC = Vorwärtsstreulicht (*forward-scattered light*), d = Tage.

Auch über Immunfluoreszenzfärbungen wurde der an der Zelloberfläche lokalisierte kardiale Vorläufermarker KDR über beide Differenzierungsmethoden detektiert (Abb. 49). Diese KDR positiven Zellen waren zumeist im Randbereich der Zellkolonien zu erkennen.

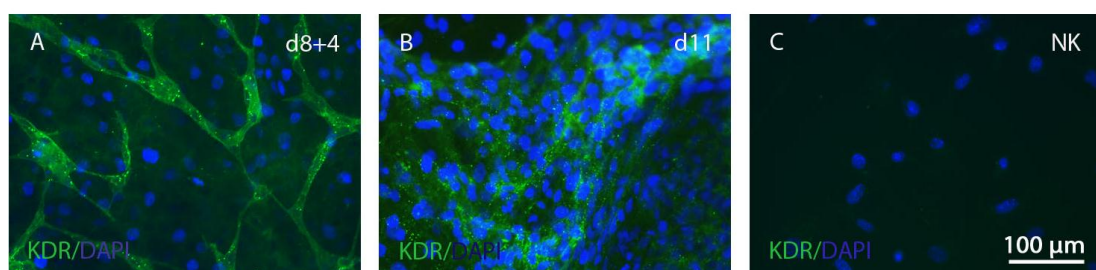


Abb. 49: Immunfluoreszenzfärbungen von differenzierten hESCs. Bild A weist KDR positive Zellen über *mass culture* Differenzierung an Tag 8+4 nach. Bild B zeigt KDR positive Zellen an d11 der Cokulturdifferenzierung. Auf Bild C ist eine Negativkontrolle (NK) zu sehen. Als blauer Kernfarbstoff dient DAPI. Skalierung: 100 μm , d = Tage.

Diese Ergebnisse zeigten, dass auch hESCs in KDR positive kardiovaskuläre Vorläuferzellen analog zu den murinen FLK1 positiven Zellen differenziert werden konnten. In weiterführenden Untersuchungen müssten *in vivo* Tumorigenitätsanalysen und Experimente zum therapeutischen Potential dieser Zellen durchgeführt werden, um zu einem eventuellen Einsatz dieser Zellen in einer klinischen Studie zu führen.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SSCs aus den Testis von Mäusen isoliert und mittels Überexpression von OCT4 allein in iPSCs reprogrammiert werden konnten. Zur kardialen Differenzierung in FLK1 positive Vorläuferzellen wurde ein Protokoll mittels Cokultur auf OP9 Zellen etabliert. Die FLK1 positiven Zellen wurden durch die FACS-Technik separiert und das therapeutische Potential in einem zuvor etablierten MI-Modell analysiert. Hierbei konnte eine signifikante Erhöhung der EF an Tag 56 nach der intrakardialen Injektion nachgewiesen werden. Auch die FS zeigte einen Trend in der Verbesserung der Herzfunktion nach 56 Tagen. Da bei diesen *in vivo* Analysen zu keiner Zeit eine Teratombildung beobachtet werden konnte, wurden immunologische Analysen durchgeführt. In Injektionsstudien mit FLK1 positiven kardiovaskulären Vorläuferzellen in immundefizienten Mäusen wurde gezeigt, dass die FLK1 positiven Zellen eine Tumorigenität aufweisen und somit nicht direkt für die regenerative Therapie einsetzbar sind. Ferner wurde gezeigt, dass die Injektion von tumorigenen Zellen in RAGN Mäuse zu einer NK-Zellaktivierung führte und diese von den NK-Zellen jedoch auch zerstört werden konnten. Es wurde gezeigt, dass die Teratombildungsrate und Teratomgrößen in den RAGC Mäusen höher ausgeprägt waren als in den RAGN Tieren. Eine CsA-Behandlung von immundefizienten RAGN Mäusen nach Zellinjektion von undifferenzierten maGSCs führte zu einer signifikanten Hemmung der Teratombildung im Vergleich zu unbehandelten Versuchstieren. CsA wies jedoch keinen Einfluss auf die NK-Zellaktivität auf. Bei Injektion von autologen ViPSCs in entsprechende Akzeptormäuse wurden Teratombildungen beobachtet. Ebenfalls zeigten die ViPSCs in autologer Situation keine Beeinflussung der NK-Zellaktivität auf. Die Zellen wurden vom Immunsystem der Tiere nicht abgestoßen. Die reine virale Reprogrammierung stellt somit kein eindeutiges Immunogen dar.

4.1 Durch Überexpression von OCT4 induzierte Pluripotenz in adulten murinen SSCs

Da hESCs aufgrund des ethischen Konflikts nur eingeschränkt für die Forschung verwendet werden können, stellen adulte Stammzellen, die das Differenzierungspotential von ESCs aufweisen, eine bedeutende Rolle dar. 2006 gelang es Guan *et al.* SSCs aus dem testikulären Gewebe von adulten Mäusen (C57B/6J, FVB und 129/Ola Mäuse) zu isolieren und durch Änderung der Kultivierungsmethoden eine spontane Reprogrammierung in maGSCs zu erreichen. Diese maGSCs wiesen Eigenschaften von ESCs auf (Guan *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2007). Auch Ko *et al.* gelang es unipotente adulte und neonatale Keimbahnstammzellen der Maus (SV-129, FVB und C57B/6J Mäuse) in pluripotente Stammzellen durch Kultivierungsbedingungen zu konvertieren (Ko *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2010). Seandel *et al.* isolierten SSCs aus bis zu einem Jahr alten Mäusen. Die gewonnenen pluripotenten Stammzellen wurden als multipotente adulte spermatogoniale Stammzellen bezeichnet (Seandel *et al.*, 2007).

Testikuläre Zellen aus neonatalen Mäusen (ddY und DBA/2) führten ebenfalls zu pluripotenten Stammzellen (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004), den sogenannten multipotenten Keimbahnstammzellen. Diese Methoden wiesen jedoch nur eine geringe Effizienz auf (Geijsen und Hochedlinger, 2009). Ko *et al.* zeigten, dass 0,01% der Zellen in den pluripotenten Status reprogrammiert werden konnten (Ko *et al.*, 2009). Guan *et al.* waren in der Lage vier pluripotente Zelllinien aus 15 Mäusen zu generieren (Guan *et al.*, 2006). Kanatsu-Shinohara *et al.* zeigten eine Reprogrammierungseffizienz der neonatalen SSCs von 0,000015% (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004).

Zur Generierung von pluripotenten Stammzellen in dieser Arbeit wurden zunächst SSCs aus den Testis von Mäusen, wie bereits von Guan *et al.* beschrieben, isoliert (Guan *et al.*, 2006). Die erfolgreich isolierten SSCs zeigten die charakteristische „Weintrauben“-Morphologie und sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnten spermatogoniale Markerexpressionen und Proteine nachgewiesen werden. VASA, STRA8, PLZF und GFR1 α wurden in den SSC Kulturen deutlich detektiert. Im Vergleich zu dem gesamten testikulären Gewebe ist auch eine Steigerung dieser Expressionen zu erkennen. Der Testis besteht nur zu 0,02-0,03% aus SSCs (Tegelenbosch und de Rooij, 1993), und auch in der Kultur kann die Reinheit der

SSCs erst nach mehreren Passagen unter spezifischen Kulturbedingungen gewährleistet werden. Pluripotente Gene, wie *Nanog* und *Oct4*, konnten im Vergleich zu maGSCs nicht oder nur sehr schwach detektiert werden. OCT4 ist auch in SSCs vertreten und dort mit für den Selbsterneuerungsprozess verantwortlich (Dann *et al.*, 2008). *Klf4* und *Sox2* wurden in allen untersuchten Proben nachgewiesen. *Lin28* ist ein Pluripotenzmarker, wird aber auch in den Spermatogonien Typ A exprimiert (Zheng *et al.*, 2009). *Lin28* konnte somit gleichmäßig in den Proben detektiert werden.

In dieser Arbeit wurde ein transgenes MHC-NEO/MHC-eGFP Mausmodell zur Kennzeichnung der kardialen Differenzierung verwendet. Dieses Mausmodell basiert auf einem DBA-Hintergrund. In unserem Labor war es bisher nicht möglich, SSC-Linien aus adulten Mäusen (n = 10) mit einem DBA-Hintergrund spontan in maGSCs zu konvertieren.

Aufgrund dieses Aspekts und auch wegen der geringen Effizienz in der Reprogrammierung über Kulturbedingungen wurde ein neues Verfahren der Reprogrammierung über eine viral induzierte Überexpression von Pluripotenzfaktoren verwendet. Dieses Prinzip wurde erstmals 2006 von Takahashi und Yamanaka gezeigt. Ihnen gelang es durch virale Überexpression von spezifischen Pluripotenzgenen (*Oct4*, *c-Myc*, *Klf4* und *Sox2*) iPSCs aus Mausfibroblasten zu generieren (Takahashi und Yamanaka, 2006). Seitdem wurden verschiedene iPSCs mit unterschiedlichen Genkombinationen und aus verschiedenen Ausgangszellarten hergestellt (Maherali *et al.*, 2007; Okita *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Aufgrund der chromosomalen Veränderungen und teilweise eingesetzter Überexpression von onkogenen Transkriptionsfaktoren ist die Gefahr der Teratombildung und der genetischen Dysfunktionen sehr hoch. Auch hier wurden bereits Studien veröffentlicht, die sich mit diesem Problem befassten. Durch Austausch der viralen Vektoren durch Proteine oder Plasmide (Stadtfeld *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009) und Vernachlässigung von onkogenen Transkriptionsfaktoren (Medvedev *et al.*, 2010; Okita *et al.*, 2007), konnten ebenfalls iPSCs gewonnen werden.

In dieser Arbeit zeigten epigenetische Analysen von SSC Kulturen unterschiedliche Methylierungsschema in regulatorischen Bereichen von Promotoren (*Oct4* und *Nanog*) im Vergleich zu maGSCs. Bei Analyse des regulatorischen *Nanog*-Bereichs zeigten die Kulturen der SSCs eine vollständige Methylierung, wohingegen der

untersuchte Genabschnitt der maGSCs demethyliert vorlag. Entscheidend waren die Ergebnisse des *Oct4*-Promoters, der in den SSC-Kulturen eine Semimethylierung aufwies. Die analysierten regulatorischen Regionen von *Klf4* und *Sox2* zeigten keinen Unterschied in der Methylierung im Vergleich zu den maGSCs. Die erzielten Ergebnisse korrelierten mit den beobachteten mRNA Analysen der Pluripotenzmarker. Es wurde beschrieben, dass die Methylierungsprofile von unipotenten Stammzellen sich stark von pluripotenten Stammzellen unterscheiden. Maherali *et al.* zeigten, dass aus MEFs generierte iPSCs ein ähnliches Methylierungsmuster in den Pluripotenzgenen *Oct4* und *Nanog* aufzeigen wie mESCs. Die Fibroblasten hingegen zeigten ein konträres Methylierungsmuster in diesen Bereichen im Vergleich zu den pluripotenten Stammzellen auf (Maherali *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Überexprimierung von OCT4 allein in murinen SSCs zu einer Reprogrammierung in iPSCs führte. Die generierten iPSCs (NE4O1 Zellen) besitzen die Fähigkeit Pluripotenzmarker wie NANOG und SSEA1 zu exprimieren und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* spontan in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Die kardiale Differenzierung konnte aufgrund des beinhaltenden Transgens der NE4O1 Zellen anhand des GFP verfolgt und mittels der Neomycin-Antibiotikasequenz selektiert werden. Durch Immunfluoreszenzfärbungen wurden eindeutig charakteristische Proteinstrukturen der gewebespezifischen differenzierten Zellen erkannt. Diese Daten weisen darauf hin, dass OCT4 allein für die Induktion der Pluripotenz von SSCs benötigt wird. OCT4 nimmt somit eine entscheidende Rolle im Reprogrammierungsprozess ein.

Studien zeigten bereits, dass OCT3/4 ein Bestandteil eines Netzwerkes von verschiedenen Transkriptionsfaktoren zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz in ESCs ist. OCT3/4 ist in der Lage an einen downstream Promoter (AGT CAA AT) zu binden und direkt zu einer Aktivierung oder Hemmung der Gentranskription zu führen. Ebenfalls kann OCT3/4 Heterodimere mit SOX2 bilden umso spezifische Genexpressionen zu regulieren. In ESCs ist die Heterodimerbildung von OCT3/4 mit SOX2 sehr häufig vertreten (Liu *et al.*, 2007). Auch andere Studien zeigten Interaktionen von OCT4 mit SOX2 und NANOG (Boer *et al.*, 2007; Scholer *et al.*, 1989; Takahashi und Yamanaka, 2006).

Ähnliche Daten wurden auch für neurale Stammzellen (*neural stem cells*, NSCs) beobachtet. Frühere Studien zeigten das sowohl murine als auch humane NSCs durch

die Überexpression von OCT4 allein in pluripotente Zellen reprogrammiert werden konnten (Kim *et al.*, 2009a; Kim *et al.*, 2009b). Die benötigte Genkombination zur Reprogrammierung von adulten Stammzellen in iPSCs ist somit stark von der Ausgangszellart abhängig. Ähnlich zu den NSCs exprimierte die Ausgangszellpopulation der SSCs bereits endogenes *Sox2* und *Klf4*, was eine reduzierte Zugabe von exogenen Faktoren komplementieren könnte, die für die Reprogrammierung von Fibroblasten verwendet werden. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die SSCs sich in einem Zwischenstatus zwischen pluripotenten und differenzierten Zustand befinden. Die SSCs stellen somit eine einzigartige Zellpopulation zur Analyse der spezifischen Funktion von OCT4 in der iPSCs Generierung dar.

4.2 Stammzellbasierende Regeneration von Myokardinfarkten

Die auf Stammzellen basierende Therapie stellt ein vielversprechendes Verfahren zur Regeneration von Herzkrankheiten dar. Die ideale Stammzellart zur Myokardinfarktregeneration konnte bis heute allerdings noch nicht benannt werden. Die erste Begeisterung für die stammzellbasierende Therapie wurde durch *in vitro* Studien, die Transdifferenzierungen von BMSCs in funktionelle Kardiomyozyten zeigten, hervorgerufen (Makino *et al.*, 1999). Weiterführende Studien zeigten eine Funktionssteigerung von murinen Herzen durch Cytokinapplikationen zur Mobilisierung von Zellen des Knochenmarks oder der direkten Injektion von BMSCs ins Herz (Orlic *et al.*, 2001a; Orlic *et al.*, 2001c; Orlic *et al.*, 2001b; Orlic *et al.*, 2003).

Später wurden auch klinische Studien zur Regeneration von Myokardinfarkten mittels BMSCs durchgeführt. Hierbei wurden BMSCs von Probanden verwendet, die an einem akuten Myokardinfarkt litten. Verschiedenste Studien zeigten, dass die Transplantation von undifferenzierten autologen BMSCs meist zu einer Funktionssteigerung der linksventrikulären EF führten (Abdel-Latif *et al.*, 2007; Hristov *et al.*, 2006; Lipinski *et al.*, 2007; Martin-Rendon *et al.*, 2008). In der TOPCARE-AMI-Studie (*transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction*) wurden 20 Probanden, die einen akuten Myokardinfarkt aufwiesen, humane autologen Vorläuferzellen aus BMSCs injiziert. Diese Injektion führte zu Funktionssteigerungen der EF und zeigte eine gesteigerte

Wandbewegung im infarzierten Bereich an (Assmus *et al.*, 2002). Auch Langzeituntersuchungen (zwei Jahre nach der Transplantation) wiesen noch eine verminderte Mortalität der behandelten Patienten auf (Assmus *et al.*, 2010). Jedoch gab es auch andere Studien, die keine oder keine anhaltende Funktionssteigerung nach Transplantation von BMSCs zeigten (Lunde *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2006; Tendera *et al.*, 2009).

Die anfängliche Begeisterung dieser Therapien nahm jedoch ab, als durch weitere Studien gezeigt wurde, dass die Transdifferenzierung von BMSCs in Kardiomyozyten äußerst selten und nur in geringem Maße auftritt. Diese Studien wiesen darauf hin, dass die bisher veröffentlichten Daten durch Fusionsvorgänge oder unspezifische immunhistochemische Reaktionen eventuell falsch interpretiert worden waren (Balsam *et al.*, 2004; Murry *et al.*, 2004; Nygren *et al.*, 2004). Die beobachteten kardialen Funktionssteigerungen durch Injektion von BMSCs sind lediglich gering ausgeprägt und meist nicht stärker als durch medikamentöse Behandlung.

Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass ESCs pluripotent sind und die Fähigkeit aufweisen *in vitro* und *in vivo* funktionelle Kardiomyozyten zu differenzieren (Kehat *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005; Laflamme *et al.*, 2005). Der klinische Einsatz von humanen ESCs, welche aus frühen Stadien der Embryonen gewonnen werden (Thomson *et al.*, 1998), ist jedoch durch ethische Aspekte, immunologische Reaktionen und die Gefahr der Teratombildung limitiert. Die entwickelten iPSCs könnten den ethischen Aspekt und die immunologischen Probleme durch autologe Zellinjektionen möglicherweise umgehen. Die Gefahr der Teratombildung durch Injektion von undifferenzierten pluripotenten Stammzellen ist jedoch weiter gegeben. Das Auftreten von Teratomen nach Injektion von undifferenzierten ESCs wurde in verschiedenen Studien beobachtet (Kolossoff *et al.*, 2006; ; Nelson *et al.*, 2006; Nussbaum *et al.*, 2007; Swijnenburg *et al.*, 2005). Die Teratombildung war hierbei jedoch stark vom Akzeptororganismus abhängig. Nussbaum *et al.* zeigten, dass die Injektion von undifferenzierten mESC in infarzierte Herzen von immundefizienten Mäusen zu einer starken Teratombildung führte (Nussbaum *et al.*, 2007). Kolossoff *et al.* zeigten, dass undifferenzierte mESC in syngen Akzeptortieren ebenfalls zu einer Teratombildung führten (Kolossoff *et al.*, 2006). Auch Nelson *et al.* injizierten undifferenzierte mESC in infarzierte Herzen von allogenen C57B/6J-Wildtypmäußen. Bei 21% der Mäuse kam es zu einer Teratombildung (Nelson *et al.*, 2006). In einer

anderen Studie führten Zellinjektionen von undifferenzierten mESCs in allogene C57B/6J-Mäusen in den meisten Tieren zur Abstoßung (Nussbaum *et al.*, 2007). Weitere Studien zeigten, dass nach Zelltransplantationen von undifferenzierten mESCs in die Herzen von meist allogenen Maus- oder xenogenen Rattenmodellen zwar Transplantate nachweisbar waren, jedoch keine Teratombildung auftrat (Hodgson *et al.*, 2004; Kofidis *et al.*, 2004; Kofidis *et al.*, 2005; Kuai *et al.*, 2006; Min *et al.*, 2002; Singla *et al.*, 2006).

Das Auftreten von Teratomen wurde durch Injektion von ausdifferenzierten Kardiomyozyten eingeschränkt (Caspi *et al.*, 2007; Kolossov *et al.*, 2006). Kolossov *et al.*, injizierten aus mESCs differenzierte unaufgereinigte Kardiomyozyten in ein syngenes murines MI-Modell, was im Vergleich zu undifferenzierten ESCs zu einer verminderten Teratombildung führte. Diese differenzierten Kardiomyozyten führten ebenfalls zu einer kardiale Funktionssteigerung, wie einer Erhöhung der linksventrikulären EF von etwa 36% auf 52%, nach Injektion in infarzierte Herzen von syngenen C57B/6J-Mäusen (Kolossov *et al.*, 2006). Caspi *et al.* zeigten, dass eine Injektion von ausdifferenzierten Kardiomyozyten aus hESCs nach 30 Tagen in einem Ratten-MI-Modell zu einer Erhöhung des FS von etwa 15% auf 22% führte. Ebenfalls wurde die Bildung von gap junctions zum Wirtmyokard beobachtet. Teratombildungen wurden auch hier nicht beschrieben (Caspi *et al.*, 2007). Rubart *et al.* beobachteten, dass es zwischen syngenen Donor- und Akzeptorkardiomyozyten zu physiologischen Kopplungen nach Injektion von differenzierten Kardiomyozyten in das Myokard gesunder Mäuse kam (Rubart *et al.*, 2003).

Weitere kardiale Funktionssteigerungen bei infarzierten Mausherzen wurden von Nelson *et al.* durch Injektion von miPSCs in immundefiziente infarzierte Mausherzen beobachtet. Die EF erhöhte sich nach vier Wochen von 37% auf 50% (Nelson *et al.*, 2009). Singla *et al.* zeigten ebenfalls durch Injektion von miPSCs in ein murines C57B/6J-MI-Modell differenzierte Kardiomyozyten und Bildung von *gap junction*-Proteinen. Ebenso wurde eine verminderte Apoptoserate und eine Erhöhung der FS von 31% auf 45% nach zwei Wochen beschrieben (Singla *et al.*, 2011).

Bei einem ausgeprägten Myokardinfarkt im Menschen kommt es zu einer Degeneration von ungefähr ein bis zwei Milliarden funktioneller Kardiomyozyten. Ausdifferenzierte Kardiomyozyten weisen jedoch nur eine eingeschränkte Proliferationsrate auf, so dass eine Generierung der beeinträchtigten Zellen durch ausdifferenzierte Stammzellen limitiert ist. Um einen Myokardinfarkt im Menschen

zu behandeln, müssten Stammzellen in großen Maßstab, wie beispielsweise über die Kultivierung in Bioreaktoren, in Kardiomyozyten differenziert werden.

4.3 Kardiiovaskuläre Vorläuferzellen als Zellpopulation zur Myokardinfarktregeneration

Die Teratombildungsfähigkeit der undifferenzierten pluripotenten Stammzellen und die eingeschränkte Proliferationsfähigkeit der ausdifferenzierten Kardiomyozyten führen zu einem eingeschränkten Einsatz dieser Zellarten in der regenerativen Therapie.

Für regenerative Stammzelltherapien stellen Vorläuferzellen, die aufgrund ihres Proliferations- und Differenzierungspotentials noch in verschiedene Zellarten ausdifferenzieren können, jedoch wegen der schon fortgeschrittenen Differenzierung ein geringere Tumorigenität vermuteten lassen, eine entscheidende Zellpopulation dar (Baba *et al.*, 2007; Srivastava, 2006; Wu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008).

4.3.1 Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in kardiiovaskuläre Vorläuferzellen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die murinen iPSCs (NE401 Zellen) als auch die hESCs in der Lage waren in kardiiovaskuläre Vorläuferzellen über verschiedene Methoden mit einer für diese Arbeit ausreichenden Effizienz zu differenzieren. Die generierten murinen FLK1 positiven Zellen waren vital und zeigten durch die Bildung von grün fluoreszierenden Kardiomyozyten ein weiterführendes Differenzierungspotential auf. Durch Analysen der einzelnen differenzierten Zellpopulationen wurde bestätigt, was schon von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, dass FLK1 ein hervorragender Marker für kardiiovaskuläre Vorläuferzellen darstellt (Cheng *et al.*, 2012; Kattman *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008).

Zur kardialen Differenzierung von pluripotenten Stammzellen wurden bereits verschiedene Verfahren etabliert. Neben den spontanen Differenzierungsmethoden, wie dem *hanging drop* oder *mass culture* Verfahren (Fuegemann *et al.*, 2010), nehmen die gezielten Differenzierungsmethoden einen großen Stellenwert ein. Zu diesen Methoden zählen die Cokultivierung auf Versorgerzellen, wie OP9 oder

murine endodermal ähnliche (END2)-Zellen, unterschiedliche Beschichtungsmatrizes, wie Collagen IV und die Zugabe von spezifischen Wachstumsfaktoren (Mummery *et al.*, 2007; Nakano *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde zur Differenzierung ein Cokulturverfahren mittels OP9 Zellen durchgeführt (Cheng *et al.*, 2012; Nakano *et al.*, 1994; Vodyanik *et al.*, 2005). OP9 Zellen sezernieren Wachstumsfaktoren, wie den Stammzellfaktor, die die mesodermale Differenzierung begünstigen (Vegh *et al.*, 2010). 2007 zeigten Hirata *et al.*, dass sie FLK1 positive Zellen über Cokultivierung mit OP9 Zellen generieren konnten (Hirata *et al.*, 2007). Dieses Differenzierungsverfahren wurde für maGSCs etabliert, bei dem 35% FLK1 positive Zellen generiert werden konnten (Cheng *et al.*, 2012). Das Protokoll wurde in dieser Arbeit für die NE401 Zellen erfolgreich modifiziert. Am Tag sechs der Differenzierung wurden um die 30% FLK1 positive Zellen mittels der FACS-Technik separiert. Für die hESCs wurde ebenfalls das Verfahren der Cokultur auf OP9 Zellen und eine weitere Methode, die der *mass culture*, herangezogen. Bei der *mass culture* handelt es sich um eine spontane Differenzierung, die im Vergleich zur gerichteten kardialen Differenzierung der Cokultur hier eine höhere Ausbeute an KDR positiven Zellen aufwies.

Einige Studien (Hirata *et al.*, 2007; Nishikawa *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 2000) zeigten, dass ESCs durch eine Collagen IV-Beschichtung am Tag fünf in ca. 25% FLK1 positive Zellen differenzieren konnten.

Zur Erhöhung der Effizienz wurden neben unterschiedlichen Grundmedien auch spezifische Wachstumsfaktoren der Kultur zugefügt. Kennedy *et al.* und Yang *et al.* zeigten unter Verwendung von StemPro34-Medium und Zugabe von spezifischen Wachstumsfaktoren eine erhöhte kardiale Differenzierungsrate (Kennedy *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008). Neben Aktivin A wurde auch das *bone morphogenic protein 4* (BMP4), der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Dickkopf Homolog 1 (DKK1) und Wnt11 eingesetzt. Durch Zugabe von Aktivin A konnte ein positiver Effekt auf die mesodermale Differenzierung von ESCs nachgewiesen werden (Ben-Haim *et al.*, 2006; Johansson und Wiles, 1995). Andere Studien (Eisenberg *et al.*, 1997; Pandur *et al.*, 2002; Terami *et al.*, 2004) zeigten, dass durch Zugabe von Wnt 11 über den non-canonischen Signalweg ein positiver Einfluss auf die kardiale Differenzierung erreicht werden konnte. BMP4, welches eine entscheidende Funktion in der frühen Embryonalentwicklung einnimmt, DKK1, gilt in der Embryonalentwicklung als Inhibitor des Wnt-Signalwegs und VEGF eigneten

sich auch als Induktor der kardialen Entwicklung (Monzen *et al.*, 2002; van Wijk *et al.*, 2007; Varga und Wrana, 2005; Yang *et al.*, 2008).

Neben FLK1 als kardiovaskulärer Vorläufermarker (Kattman *et al.*, 2006) wurden in weiteren Studien auch andere Vorläuferpopulationen untersucht. Brachyury (BRY) wurde als sehr früher mesodermaler Vorläufermarker identifiziert (King *et al.*, 1998). Kattman *et al.* konnten an Tag 3,25 der Differenzierung um die 20% GFP-BRY⁺/FLK1⁺ Zellen gewinnen (Kattman *et al.*, 2006). Auch ISL1 und NKX2.5 wurden als Marker für kardiovaskuläre Vorläuferzellen verwendet. Moretti *et al.* generierten aus ESCs in einer Studie ISL1⁺/NKX2.5⁺/FLK1⁺ Zellen. Diese führten in einer weiteren Differenzierung zu Kardiomyozyten, endothelialen- und glatten Muskelzellen (Moretti *et al.*, 2006). Eine weitere Arbeit in der NKX2.5 positive Zellen aus Mausembryonen isoliert wurden zeigte, dass diese Zellen sich vermehrt in kardiale Zellen und weniger in glatte Muskelzellen differenzierten (Wu *et al.*, 2006). Das Protokoll der Cokultur könnte für eine gesteigerte kardiale Differenzierungseffizienz weiter modifiziert werden. Durch Änderung des Grundmediums und weiterer Zugabe von spezifischen Wachstumsfaktoren, wie oben erwähnt, oder dem Einsatz von spezifischen Matrizes könnte die Effizienz der kardialen Differenzierung erhöht werden.

4.3.2 Regenerationsanalysen von infarzierten Herzen mittels kardialer Vorläuferzellen

In dieser Arbeit wurde zunächst ein MI-Modell etabliert. Dieses Modell wurde bereits in mehreren Studien beschrieben, um ein generatives Potential von spezifischen Zellinjektionen zu untersuchen (Behfar *et al.*, 2002; Hodgson *et al.*, 2004; Kolossov *et al.*, 2006; Min *et al.*, 2002; Singla *et al.*, 2006). Bei der Etablierung dieses MI-Mausmodells wurde gezeigt, dass die charakteristischen Kenngrößen alle signifikanten Veränderungen eines Myokardinfarkts aufwiesen. Auch histologisch wurde die Degeneration des infarzierten Gewebes und der daraus resultierende gesteigerte Fibrosegrad nachgewiesen. Durch die permanente Hemmung der Blutzufuhr kam es zur unzureichenden Sauerstoffversorgung in den infarzierten Bereichen. Dieses führte nach einer gewissen Karenzzeit, in der das Herz versucht diese Sauerstoffunterversorgung durch anaerobe Glykogenolyse auszugleichen, zur Degeneration von Kardiomyozyten. Diese Degeneration basiert

auf lokalen Cytokinausschüttungen und inflammatorischen Reaktionen, die Nekrose und Apoptose der Kardiomyozyten fördern (Dorn und Force, 2005; Olivetti *et al.*, 1997; Sadoshima *et al.*, 1993; Saraste *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2003). Dieser Befund wurde auch durch echokardiografische Analysen bestätigt.

Zur Analyse des regenerativen Potentials der in dieser Arbeit generierten FLK1 positiven Zellen aus reprogrammierten SSCs wurden diese in das etablierte Mausmyokardinfarktmodell injiziert.

Bei Analysen des Fibrosegrades wurde ab Tag 14 zu jedem Zeitpunkt ein stark signifikanter Unterschied zwischen den MI-Gruppen zu der jeweiligen SHAM-Gruppe aufgezeigt. Von Tag 28 zu Tag 56 war ein Trend im Rückgang des Fibrosegrades von 45% auf 35% in der MI+Zellen Gruppe zu beobachten. Mit einem Vergleichswert von $p = 0,1$ lag jedoch keine Signifikanz vor. Dieser Trend wurde allerdings auch durch echokardiografische Analysen bestätigt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die EF in den infarzierten Gruppen im Lauf des Versuchs signifikant reduziert wurde. Von Tag 28 auf Tag 56 wurde allerdings ein signifikanter Anstieg der EF in der MI+Zellen Gruppe nachgewiesen. Ebenfalls wurde eine signifikante Erhöhung der EF an Tag 56 der MI+Zellen Gruppe im Vergleich zur MI+NaCl Kontrollgruppe detektiert. Bei Analysen des FS wurde dieser positive Trend der kardialen Funktionssteigerung bestätigt. Von Tag 28 zu Tag 56 konnte ein Anstieg des FS von 10% auf 15% beobachtet werden, was einem Wert von $p = 0,06$ entsprach. Durch die Degeneration der Kardiomyozyten in infarzierten Herzen versuchen die gesunden noch vorhandenen Kardiomyozyten diesen Verlust zu kompensieren, welches in einer kardialen Hypertrophie resultiert. Bei echokardiografischen Analysen vom Quotienten aus dem Herzgewicht zum Körpergewicht (HW/BW) konnte ab Tag 14 eine signifikante Zunahme des HW/BW in den infarzierten Gruppen nachgewiesen werden. Der Quotient des HW/BW zeigte auch in der MI+Zellen Gruppe eine Zunahme im Vergleich zur SHAM+Zellen Gruppe. An Tag 56 konnte kein signifikanter Unterschied der MI+Zellen Gruppe zur SHAM+Zellen Gruppe mehr erkannt werden. Auch bei näherer Betrachtung der drei kontinuierlich analysierten Versuchstiere konnten funktionssteigernde Trends in den EF- und FS-Parametern von Tag 28 zu Tag 56 beobachtet werden.

Histologisch wurden zu frühen Zeitpunkten nach der Injektion Zellansammlungen mittels der HE Färbung beobachtet. Zu späteren Zeitpunkten des Versuchs konnten die Zellen auf diesem Weg nicht mehr detektiert werden. Ob die injizierten kardialen

Zellen aktiv durch weitere Differenzierung in Kardiomyozyten und funktionelle Integration ins Wirtmyokard (Kehat *et al.*, 2004; Laflamme *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2005) eine Verbesserung der Herzleistung hervorriefen oder evtl. durch parakrine Effekte einen Einfluss auf die residenten Kardiomyozyten aufwiesen, ist noch ungeklärt. *In vitro* Experimente zeigten, dass die FLK1 kardiovaskulären Vorläuferzellen in der Lage sind funktionelle Kardiomyozyten zu bilden. Ebenfalls wurde während der gesamten Versuchsstudie keine Teratombildung in den allogenen Versuchstieren beobachtet.

Um die Konstanz der in dieser Arbeit beobachteten signifikanten kardialen Funktionssteigerungen zu überprüfen, müssten weitere Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden.

Studien mit undifferenzierten maGSCs zeigten, dass diese Zellen in der Lage sind, im Herzen nach Injektion in endotheliale Zellen und glatte Muskelzellen auszdifferenzieren (Kaiser, 2010). Kardiomyozyten konnten auf diesem Weg jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Injektion dieser maGSCs in das Myokard zeigten im TAC und SHUNT-Modell keine anhaltenden signifikanten Funktionssteigerungen. Hierbei wurde jedoch als letzter Untersuchungszeitpunkt Tag 28 gewählt. Verglichen mit dieser Arbeit, die signifikante Effekte an Tag 56 zeigt, könnten zu späteren Zeitpunkten eventuell noch Steigerungen der Herzleistung detektiert werden.

Es wurden bereits Studien zum regenerativen Effekt von infarzierten Herzen mit ESCs und BMPCs durchgeführt. In Studien zu MI-Regeneration im Maus- oder Rattenmodell wurde nachgewiesen, dass kardial injizierte undifferenzierte mESCes im Herzen zu Kardiomyozyten, endothelialen Zellen und glatten Muskelzellen differenzieren können (Behfar *et al.*, 2002; Hodgson *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2002; Singla *et al.*, 2006). Auch Studien mit mBMPCs zeigten, dass nach Transplantation dieser Zellen in infarzierte murine Herzen Kardiomyozyten, endotheliale Zellen und glatte Muskelzellen detektiert werden konnten (Kolossoff *et al.*, 2006).

Ebenso wurden auch Injektionen von kardialen Vorläuferzellen in infarzierte Herzen durchgeführt. Mauritz *et al.* untersuchten das therapeutische Potential von FLK1 positiven kardialen Vorläuferzellen aus murinen iPSCs in infarzierte Herzen von immundefizienten SCID-beige Mäusen. Die Injektion der FLK1 positiven Zellen führte zu einer geringeren Infarktgröße und zu einer verminderten linksventrikulären Wanddickenreduktion. Auch die Injektion von Zellen einer FLK1 Negativpopulation

führte zu einer signifikanten Steigerung des lebensfähigen Myokards. Die Auswirkungen von Zellen der FLK1 Positivpopulation waren jedoch höher ausgeprägt. Die FLK1 positiven Zellen waren in der Lage im Herzen zu cTNT, CD31 und einen geringen Anteil an α -SMA positiven Zellen zu differenzieren (Mauritz *et al.*, 2011).

4.3.3 Tumorigenität von FLK1 positiven Vorläuferzellen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Teratombildung nach Zellinjektion von FLK1 positiven Zellen in immundefiziente Mäuse beobachtet werden konnte.

Die FLK1 positiven Vorläuferzellen wurden nach der FACS Separierung zur Untersuchung der Tumorigenität subkutan in die innere Flanke von immundefizienten RAGC Mäusen injiziert. Zwei von drei Mäusen zeigten nach durchschnittlich 40,5 Tagen Tumorbildungen. Diese Tumore wiesen nach histologischer Analyse Zellen aller drei Keimblätter auf und wurden eindeutig als Teratome klassifiziert. Studien mit undifferenzierten NE401 Zellen zeigten, dass auch hier Teratome entstanden sind. Alle Versuchstiere führten nach 20 Tagen zu einer Teratombildung. Die kardialen Vorläuferzellen zeigten erst nach der doppelten Zeit Teratombildungen. Dies lässt vermuten, dass die Population der FLK1 positiven Zellen nach der FACS-Analyse eventuell nicht rein vorlag, obwohl die Reinheit der FACS-Analyse mit 98-99,9% ermittelt wurde. Die noch vorhandenen undifferenzierten Zellen könnten somit für die Teratombildungen in der Maus verantwortlich sein. Dieses Problem wurde schon von Dressel *et al.* beschrieben (Dressel *et al.*, 2008). Da hier eine deutlich geringere Ausgangszellzahl der undifferenzierten Zellen in der Maus vorlag, könnte auch die längere Wachstumszeit bis zur Entnahmegröße erklärt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit unveröffentlichten Daten unseres Labors. Hier wurden FLK1 positive Zellen aus maGSCs nach der FACS Separierung auf Collagen IV kultiviert und ebenfalls in immundefiziente Mäuse injiziert. Injektionen dieser Zellen in immundefiziente Mäusen führten auch zu Teratombildungen. Bei einem Wert von durchschnittlich 26,3 Tagen hatten die generierten Teratome die Entnahmegröße erreicht. Im Vergleich zu der direkten Injektion in immundefiziente Mäuse nach der FACS-Analyse mit einem durchschnittlichen Wert von 40,5 Tagen war die Zeit bis zur Tumorentnahme deutlich kürzer. Mit einem Wert von 20 Tagen war die Zeit der

Teratombildung nach der Injektion von undifferenzierten maGSCs ebenfalls kürzer ausgeprägt.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die FLK1 positiven Zellen nur eine transiente Zellpopulation darstellen und wieder dedifferenzieren können. Diese Vermutung wird durch *in vitro* Daten unterstützt, die zeigten, dass FLK1 positive Vorläuferzellen generiert aus den NE401 Zellen *in vitro* ihren FLK1-Charakter nur über einen kurzen Zeitraum halten können. Durchflusszytometrieanalysen zeigten, dass im Laufe der Kultivierung die Expression des Pluripotenzmarkers OCT4 stark zunahm. Die FLK1 Expression reduzierte sich im Gegenzug (unveröffentlichte Daten).

Andere Studien zeigten, dass FLK1 positive Zellen aus miPSCs durch intrakardiale Injektion in immundefiziente Mäuse nach zwei Wochen zu nachgewiesenen Transplantaten im Herzen führten, die jedoch auch Bereiche von OCT4 positiven Zellen aufwiesen (Mauritz *et al.*, 2011). Roy *et al.* zeigten ebenfalls, dass dopaminerge Neuronen aus hESCs, injiziert in das Striatum eines Ratten-Parkinsonmodell unter CsA-Behandlung, zu Transplantaten im Gehirn dieser Tiere führten. Die Zellen dieser Transplantate zeigten zum Teil Proliferationspotential auf, welches zu einer instabilen Expansion von undifferenzierten Zellen führte. Die durch Injektion von hESC-differenzierten neuronalen Zellen entstandenen Transplantate beinhalteten tumorigene Zellen (Roy *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit und weiterer Studien zeigten, dass Vorläuferzellen eine Tumorigenität aufweisen können. Obwohl Vorläuferzellen zu Funktionssteigerungen im Herzen führten, ist ihr Einsatz in der klinischen Therapie nur beschränkt möglich. Da diese Zellen noch eine Zellzyklusaktivität aufweisen, müssten ferner einzelne Vorläuferzellen spezifisch auf ihre Tumorigenität untersucht werden.

4.3.4 *In vivo* Zelnachweis nach Transplantation

Das MHC-NEO/MHC-eGFP Mausmodell wurde für diese Arbeit gewählt, da aufgrund des kardialen Promoters (*Mhc*) ein fluoreszierendes Protein an die kardiale Differenzierung gekoppelt ist. Durch intrakardiale Injektion der FLK1 positiven Zellen dieses Modells sollten differenzierte Kardiomyozyten zu einer Expressierung von eGFP führen. Studien mit ausdifferenzierten Kardiomyozyten aus NE401 Zellen zeigten bereits, in Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Mikroskopie, dass diese Zellen

erfolgreich an den Wirtmyokardzellen koppelten und integrierten (unveröffentlichte Daten). Durch eine starke Autofluoreszenz der Herzen in dem verwendeten MI-Modell konnten keine grün fluoreszierenden Kardiomyozyten eindeutig nachgewiesen werden. Um hier genauere Aussagen über den direkten Verbleib der Zellen im Myokard zu treffen, müssten in weiteren Versuchen Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs (FISH)-Analysen durchgeführt werden. Da es sich bei den injizierten Zellen um testikuläre Ausgangszellen handelt und diese in weibliche Versuchstiere appliziert wurden, könnten diese über das vorhandene y-Chromosom in diesen Analysen detektiert werden. Ebenfalls könnte zur Verminderung der Autofluoreszenz des Myokards auf eine Kryokonservierung zurückgegriffen werden. Ferner müsste für weitere Studien ein anderes Modell zum Wiederauffinden der injizierten Zellen verwendet werden. Es wurden bereits verschiedene Möglichkeiten zur Zellmarkierung beschrieben. Neben radioaktiv markierten Sonden, welche sich jedoch toxisch auf die Zellen auswirken und nur in geringem Maße von diesen aufgenommen werden können, wurden auch chemische Marker verwendet (Dworkin *et al.*, 2007; Horan *et al.*, 1990). Chemikalien wie Bisbenzimid (beispielsweise Hoechst-Färbung 33342), die mit der DNA der zu markierenden Zellen interkalieren oder CM-DiI die sich in die Zellmembran einlagern und somit zu einer Markierung der Zellen führen, wurden eingesetzt. CM-DiI wurde häufig verwendet, da es nur langsam verblasst und relativ stabil die Zellen markiert ohne Nachbarzellen zu beeinflussen (Li *et al.*, 2008). Zur Etablierung der Zellinjektion wurden auch in dieser Arbeit CM-DiI-fluoreszenzmarkierte Zellen verwendet. In der MI-Infarktstudie wurde auf eine CM-DiI Markierung der Vorläuferzellen aufgrund der bereits vorliegenden langen Bearbeitungsphase der Zellen vor der Injektion verzichtet. Ebenfalls ist diese Methode der Zellmarkierung nur für einen kurzen Zeitraum einsetzbar. Durch weitere Proliferation der Zellen kommt es zu einem Verlust dieser Markierung (Mosahebi *et al.*, 2000).

Ein transgenes Mausmodell, wie es auch in dieser Arbeit verwendet wurde, besitzt gute Voraussetzungen für eine Zellverfolgung über einen längeren Zeitraum (Dezawa *et al.*, 2001). Für weitere Studien müsste jedoch aufgrund der nachgewiesenen Autofluoreszenz von dem GFP als Markierungsprotein auf einen anderen Marker umgestellt werden. Eignen würde sich in diesem Fall ein MHC-LACZ-Modell, welches differenzierte Kardiomyozyten mittels β -Galaktosidasefärbung anzeigen könnte. Dieses Mausmodell existiert bereits und es

ist in unserem Labor auch schon gelungen SSCs aus diesen transgenen Mäusen zu isolieren (unveröffentlichte Daten). Ebenfalls wären zusätzlich Versuche mit einem Mausmodell interessant, welche eine Fluoreszenz über einen FLK1 oder anderen kardiovaskulären Vorläuferpromoter regulieren.

4.4 Tumorigene Stammzellen sind ein sukzessives Ziel für allogene NK-Zellen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Immunsystem der Akzeptormäuse einen Einfluss auf die Teratombildung besitzt. Tumorigene Stammzellen konnten von NK-Zellen des Immunsystems der allogenen Akzeptortiere abgestoßen werden.

Frühere Studien bei denen undifferenzierte maGSCs intrakardial in allogene Wildtypmäusen appliziert wurden, zeigten ebenfalls wie die FLK1 positiven Zellen unter CsA-Behandlung keine Tumorbildung (Kaiser, 2010). Undifferenzierte maGSCs führten jedoch aufgrund ihres Differenzierungspotentials zu Teratombildungen in immundefizienten Mäusen (Guan *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2009).

Experimente dieser Arbeit und der Arbeit von Kaiser (2010) zeigten, dass es nach intrakardialer Injektion von undifferenzierten maGSCs in immundefiziente RAGN und RAGC Mäusen zu Teratombildungen kam. Die Teratome konnten sowohl kardial als auch im restlichen Körper (meist Darm- und Nierenregion) detektiert werden. Diese Körpertumore basierten auf injizierte Zellen, die über das kardiale Gefäßsystem in den Körperkreislauf gelangt sind. Die Mikroumgebung von Akzeptorgewebe könnte durch vorliegende Wachstumsfaktoren, Cytokine und Zell-Zell-Kontakt mit den Akzeptorzellen die Differenzierung von transplantierten Zellen ebenfalls beeinflussen. Singla *et al.* injizierten undifferenzierte mESCs intrakardial in allogene Akzeptortiere. Die Injektion führte zu nachweisbaren Transplantaten die keine Teratombildung beobachten ließen. Die Zellen wurden sowohl im Grenzbereich zum Infarkt als auch in das gesunde Myokard injiziert. Die Transplantate entwickelten sich jedoch vermehrt im Bereich des geschädigten Myokards. Die injizierten Zellen schienen so durch die Mikroumgebung des infarzierten Bereichs beeinflusst (Singla *et al.*, 2006). Ähnliche Ergebnisse wurden durch Injektion von undifferenzierten mESCs in die Milz von allogenen Akzeptormäusen beobachtet. Auch hier konnten spezifisch differenzierte Zellen ohne

eine Teratombildung im geschädigten Gewebe nachgewiesen werden. Gesundes Gewebe wies dagegen keine Transplantate auf (Moriya *et al.*, 2007).

Diese Arbeit zeigte jedoch, dass die Mikroumgebung des Herzens als möglicher Faktor der fehlenden Teratombildung ausgeschlossen werden konnte.

Die RAGN Mäuse wiesen eine geringere Teratombildungsrate im Vergleich zu den RAGC Tieren auf. Dies schien auf die NK-Zellen zurückzuführen zu sein, die in den RAGN Mäusen im Gegensatz zu den RAGC Tieren noch aktiv vorlagen. Immunologische Analysen der immundefizienten RAGN Mäuse nach Zellinjektion zeigten, dass es durch die Injektion von undifferenzierten maGSCs zu einer Aktivierung der NK-Zellen kam. Diese war an Tag 14 nach der Injektion am höchsten ausgeprägt. Im weiteren Verlauf nahm die gemessene NK-Aktivität wieder ab, was sich auch in der Anzahl der isolierten Splenozyten widerspiegelte. Dieses Phänomen könnte auf die Versuchszeit zurückzuführen sein, da zu späteren Zeitpunkten nach der einmaligen Injektion ein Rückgang der Immunantwort zu erwarten ist.

Anhand der Erhöhung der spezifischen Lyse der maGSCs nach der Injektion wurde gezeigt, dass die Zellinjektion die NK-Zellen aktiviert. Dadurch, dass im Laufe des Versuchs ein Anstieg der spezifischen Lyse zu erkennen war, korrelieren diese Daten mit dem histologischen Nachweis der injizierten Zellen im Myokard. Zu Beginn der Studie wurden die Zellen noch als Zellansammlungen im Myokard lokalisiert. Zu späteren Zeitpunkten traf dieses nicht mehr zu. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die injizierten Zellen vom Immunsystem der Akzeptormaus trotz CsA-Gabe vollkommen oder zum Teil von NK-Zellen abgestoßen wurden. Durch stetigen Anstieg der NK-Zellaktivität bis Tag 14 schienen die injizierten Zellen größten Teils in der späteren Versuchshälfte abgestoßen worden zu sein.

Das NK-Zellen auch einen Einfluss auf die Teratombildungsrate und Größe besitzen, wurde auch von Tian *et al.* (2006) beobachtet. Hier wurde eine erhöhte Teratombildungsrate in SCID-*beige* Mäusen (keine B-, T- und NK-Zellen) im Vergleich zu NOD-SCID Mäusen (keine B- und T-Zellen) nach Injektion von hESCs nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien von Dressel *et al.* nach Injektion von mESCs (Dressel *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass syngene und allogene NK-Zellen zu einem ähnlichen Effekt in der Teratombildungsrate im Vergleich zur Injektion in immundefiziente SCID-*beige* Mäuse führten. Auch für *in vitro* vordifferenzierte Zellen wurde beobachtet, dass diese durch NK-Zellen nach

der Transplantation abgestoßen werden konnten (Ma *et al.*, 2010; Rideout *et al.*, 2002; Tabayoyong *et al.*, 2009).

Studien zeigten, dass undifferenzierte maGSCs nur wenig MHC-Klasse I-Proteine aufweisen, welche als Inhibitor für NK-Zellen gelten (Dressel *et al.*, 2009). Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen ist jedoch nicht nur durch inhibitorische MHC-Klasse I Molekül-Rezeptoren, wie H2K und H2D, kontrolliert. Auch aktivierende Rezeptoren, die spezifische Liganden auf Zielzellen erkennen, nehmen einen entscheidenden Stellenwert ein. Dressel *et al.* zeigten, dass undifferenzierte maGSCs einen NK-Liganden (NKG2D, *natural killer group 2 member D*) auf der Oberfläche exprimieren und somit Zielzellen dieser Killerzellen darstellen (Dressel *et al.*, 2010). Dieser heterogene Rezeptor besteht in der Maus aus Proteinen der RAE-1 (*retinoic acid early inducible 1*) Familie, MULT-1 (*murine UL-16-binding protein like transcript 1*) und H60 Molekülen (Dressel *et al.*, 2008). Spezifische Liganden dieser Rezeptoren bestehen meist nur aus Proteinen der RAE-1 Familie. In differenzierten Zellen ist die Ligandenexprimierung der NKG2D-Rezeptoren herunterreguliert. Im Normalfall tragen gesunde Zellen keine oder kaum NKG2D-Liganden. Diese können jedoch durch Virusinfektionen oder genotoxischen Stress in ihrer Expressierung gesteigert werden (Gasser *et al.*, 2005; Groh *et al.*, 2001). Einen weiteren aktivierenden Rezeptor der NK-Zellen stellt der DNAM-Rezeptor (*cluster of differentiation 226*, CD226) dar. Dieser erkennt CD112 und CD155 Liganden, die vermehrt in pluripotenten Stammzellen exprimiert werden (Dressel *et al.*, 2010; Elishmereni *et al.*, 2008). Dressel *et al.* und Frenzel *et al.* zeigten, dass verschiedene pluripotente Stammzellen keine Liganden für die NK-Rezeptoren 2B4 (CD 244) und NKp46 (auch NKR1, *natural cytotoxicity receptor 1*) exprimieren (Dressel *et al.*, 2010; Frenzel *et al.*, 2009).

Durch die nachgewiesenen Teratome in den RAGN Tieren wurde gezeigt, dass das Immunsystem der Akzeptormäuse eine entscheidende Rolle spielen muss. Die Liganden für aktivierende und inhibierende Rezeptoren bestimmen in ihrer Gesamtheit die Suszeptibilität von pluripotenten Stammzellen gegenüber NK-Zellen. Jede Zelllinie scheint ein spezifisches Expressionsmuster dieser Liganden aufzuweisen (Dressel *et al.*, 2010). Für weitere Studien müssten die zu transplantierenden Zellen auf ihre Expression von NK-zellspezifischen Liganden analysiert werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine intrakardiale Injektion von undifferenzierten maGSCs in RAGN Mäusen zu einer Aktivierung der NK-Zellen führt. Die nachgewiesene NK-Zellaktivität gegen die injizierten Zellen könnte für spätere Zelltransplantationen von Vorläuferzellen oder ausgereiften Zellen positiv genutzt werden. Durch Kultivierung mit NK-Zellen könnten die Reinheit der Zellpopulation vor der Transplantation durch Lyse von tumorigenen Zellen erhöht werden. Auch andere Aufreinigungsmethoden, wie Selektion (Chung *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2006; Klug *et al.*, 1996; Kolossov *et al.*, 2006), das Einfügen von Suizidgenen (Cao, *et al.*, 2006; Schuldiner *et al.*, 2003) sind neben einer verlängerten Differenzierung (Brederlau *et al.*, 2006) von verschiedenen Gruppen untersucht wurden. Doch schon ein geringer Anteil undifferenzierter Zellen bürgt das Risiko einer Teratombildung (Elkabetz *et al.*, 2008; Hentze *et al.*, 2009; Kolossov *et al.*, 2006; Lawrenz *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2006).

4.5 Einfluss von CsA in der Zelltransplantation

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine CsA-Behandlung von RAGN Mäusen nach intrakardialer Zellinjektion von undifferenzierten maGSCs zu einer vollständigen Hemmung der Teratombildung im Vergleich zu unbehandelten Versuchstieren führte.

Frühere Studien mit RAGC Mäusen zeigten, dass durch eine CsA-Behandlung die Teratombildung und Größe der Teratome im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant reduziert wurde. RAGN Tiere wiesen im Vergleich zu RAGC Tieren eine reduzierte Teratombildung und eine geringere Teratomgröße auf. Eine CsA-Behandlung von RAGN Mäusen führte allerdings zu einer vollständigen Hemmung der Teratombildung. Diese Ergebnisse korrelierten mit der tumorigenen Zellinjektion in allogene Versuchstiere unter CsA-Behandlung, wie es in der MI-Studie dieser Arbeit der Fall war.

Immunologische Analysen der RAGN Tiere zeigten auch in der Gruppe mit CsA-Behandlung eine NK-Zellaktivität gegen die maGSCs auf. Ein Effekt der NK-Aktivität durch CsA konnte nicht beobachtet werden.

Wie und über welchen Mechanismus das CsA seine Wirkung auf die maGSCs ausübt, ist noch unklar. CsA ist bereits in vielen Studien eingesetzt und als gängiges Immunsuppressivum nach humanen Transplantationen verabreicht worden. Aufgrund

der starken Nebenwirkungen (Nephrotoxizität) und der geringen therapeutischen Breite wird CsA neuerdings durch vergleichbare Calcineurininhibitoren wie etwa Tacrolimus oder Sirolimus, Substanzen anderer Wirkmechanismen (z.B. Glukokortikoide, Zytostatika) oder Kombinationsapplikationen ersetzt (Caroti *et al.*, 2012; Hocker und Tonshoff, 2011; Woodroffe *et al.*, 2005). Studien zeigten, dass vor allem T-Lymphozyten und weniger die B-Lymphozyten und NK-Zellen eine Abstoßung von injizierten undifferenzierten ESCs verursachten (Drukker *et al.*, 2006; Swijnenburg *et al.*, 2008b). Von den T-Zellen weisen die T-Helferzellen den größten Abstoßungseffekt auf. Somit stellt CsA aufgrund seines Wirkprinzips ein gutes Immunsuppressivum nach Transplantationen dar. Allerdings wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Injektion von tumorigenen Zellen in RAGN Mäusen unabhängig von der CsA-Behandlung zu einer Aktivierung der NK-Zellaktivität führt.

CsA bindet an Cyclophilin A, welches seinerseits mit Calcineurin interagiert. Das Cyclophilinprotein zeigt Peptidylprolylisomeraseaktivität (Hohman und Hultsch, 1990; Nag *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 1989) und ist somit für die cis/trans-Isomerisierung der Peptidbindungen verantwortlich. Durch die Bindung von CsA an Cyclophilin A wird der Calcineurin-Calmodulin-Komplex gehemmt und somit die Dephosphorylierung von NFAT blockiert. Die fehlende Dephosphorylierung hindert NFAT daran, in den Zellkern vorzudringen. Die Bildung von Interleukinen, die zu T-Zellaktivierung in der G₀- oder G₁- Phase des Zellzyklus führen, wird somit unterbunden. Bereits aktivierte T-Zellen oder NK-Zellen werden jedoch nur schwach oder gar nicht beeinflusst (www.ciclosporin.autoimmun.de, 07.08.12; www.uniklinik-ulm.de, 07.08.12; Zenke *et al.*, 1993).

Durch die Ergebnisse der immunologischen Studie konnte kein Effekt des CsA auf die NK-Zellaktivität nachgewiesen werden. Dies wurde durch die Definition des CsA als Inhibitor des NFAT Signalwegs durch Hemmung des Calcineurin-Calmodulin-Komplexes erwartet, da so nur die T- und B-Zell-Aktivität reguliert wird. Durch die Bindung an die Peptidylprolylisomerase, die nicht nur Einfluss auf den Calcineurin-Calmodulin-Komplex ausübt, könnten andere Reaktionen und Signalwege inhibiert werden. Da die Peptidylprolylisomerasekonzentration in verschiedenen Organen variiert, könnte somit auch die Nephrotoxizität des CsA durch eine geringe Isomerasekonzentration in den Nieren erklärt werden.

Die Vermutung, dass das CsA einen toxischen Effekt direkt auf die Zellen ausübt, konnte in *in vitro* Kulturversuchen, durch Analyse der Zellzyklusaktivität, ausgeschlossen werden (unveröffentlichte Daten). Hierbei ist die Ciclosporinkonzentration jedoch nicht direkt auf die *in vivo* Experimente übertragbar. Andere Studien zeigten bereits, dass CsA einen positiven Effekt auf die kardiale Differenzierung ausüben kann (Fujiwara *et al.*, 2011). Hierbei wurden murine iPSCs zunächst in FLK1 positive Zellen differenziert und mittels FACS-Analyse selektiert. Diese separierten Zellen wurden auf OP9 kokultiviert und weiter in FLK1/CXCR4- positive und vaskulär endotheliales Cadherin negative Zellen, hier als FCV-Zellen bezeichnet, differenziert. Bei CXCR4 handelt es sich um einen Chemokinrezeptor. Diese beschriebenen Zellen befinden sich in einem intermediären Status zwischen FLK1 positiven Vorläuferzellen und ausgereiften Kardiomyozyten. Durch Zugabe von 1-3 µg CsA pro ml Medium in die Kokultur konnte eine 10-20 fach höhere Effizienz an FCV-Zellen und Kardiomyozyten generiert werden. Durch die intrakardiale Injektion von maGSCs oder FLK1 positiven Zellen in der MI-Studie könnte, durch die tägliche CsA-Behandlung, eine Differenzierung in kardiale Zellen begünstigt und somit eine Teratombildung im Herzen reduziert worden sein. Dem entsprechen auch die Ergebnisse von der Injektion der maGSCs in RAGC Mäuse. Die hier nachgewiesenen Teratome der unbehandelten Mäuse zeigen in immunhistologischen Analysen ein deutlich höheres Vorkommen von OCT4 positiven Zellen im Vergleich zu mit CsA behandelten Mäusen (Kaiser, 2010). Da OCT4 ein Marker für undifferenzierte Stammzellen darstellt, weisen auch diese Ergebnisse auf eine verstärkte Differenzierung durch die CsA-Behandlung hin. CsA zeigte keinen Effekt auf die NK-Zellaktivität, hemmte jedoch die Tumorbildung der maGSCs. Um den genauen Wirkmechanismus des CsA auf die Stammzellen zu erklären, müssten noch weitere Versuchsanalysen durchgeführt werden. Durch Injektion von kardialen Vorläuferzellen oder transgenen kardial markierten Stammzellen könnte die vermutete begünstigte kardiale Differenzierung untersucht werden. Ebenfalls könnten durch immunhistochemische Analysen spezifische kardiale Differenzierungsmarker nachgewiesen werden.

4.6 ViPSCs sind in syngener und autologer Situation nicht immunogen

Ein weiterer Teil dieser Arbeit zeigte, dass ViPSCs in syngener und autologer Situation keine Immunogenität aufweisen. Nach subkutaner Transplantation dieser Zellen in syngene und autologe Mäuse wurden Teratombildungen beobachtet. Die immunologischen Aspekte und die daraus resultierenden Teratombildungen spielen eine entscheidende Rolle in der regenerativen Therapie. Die genauen Mechanismen oder Faktoren, die eine Teratombildung in einem Wirtorganismus nach einer Zellinjektion von undifferenzierten Stammzellen beeinflussen oder fördern sind noch unklar. Es wird jedoch angenommen, dass wirtspezifische Hormone, Wachstumsfaktoren und Cytokine eine entscheidende Rolle spielen (Dressel, 2011; Przyborski, 2005).

Die Methoden der Reprogrammierung in iPSCs sind vielfältig. In Experimenten mit syngen Injektionen von ViPSCs und EiPSCs in Wildtypmäuse wurden unterschiedliche Teratombildungsraten beobachtet (Zhao *et al.*, 2011). ViPSCs zeigten im Vergleich zu ESCs und EiPSCs eine erhöhte Immunogenität gegenüber den Akzeptormäusen und führten zu keiner Teratombildung. Diese Daten zeigten jedoch nicht, ob dieser Effekt zelllinienspezifisch ist oder ViPSCs, aufgrund ihrer viral induzierten Reprogrammierung, im Allgemeinen immunogen wirken. Ebenfalls könnte die fehlende Teratombildung auch durch die syngene Injektion beeinflusst worden sein.

In dieser Arbeit wurden zur Überprüfung der Beeinflussung der viral induzierten Reprogrammierung, ViPSCs sowohl in syngener als auch in autologer Zellinjektionssituation analysiert. Hierfür wurden aus Schwanzbiopsien von C57BL/6J-Wildtypmäusen Fibroblasten gewonnen. Diese Fibroblasten wurden mittels eines viralen Systems durch Überexpression von den Pluripotenzfaktoren *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* und *Klf4* in iPSCs reprogrammiert und charakterisiert. Die Pluripotenz dieser gewonnenen Zelllinien wurde durch charakteristische Gen- und Proteinexpressionen nachgewiesen. Die ViPSCs waren in der Lage *in vitro* und *in vivo* in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die ViPSCs nach autologer und syngener Transplantation zu Teratombildungen führten. Die Ergebnisse von Zhao *et al.* konnten so in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Zhao *et al.*, 2011).

Bei drei von vier Tieren wurden bei der autologen Injektion Teratome nachgewiesen. In immunologischen Analysen (Chromfreisetzungstest) konnte jedoch keine NK-Zellaktivität gegen die autologen ViPSCs nachgewiesen werden. Somit wurde gezeigt, dass diese Tiere die autologen Zellen nicht als fremd erkannten und somit keine Immunantwort ausgelöst wurde. Die undifferenzierten autologen Zellen konnten somit ungehindert aufgrund ihres Differenzierungspotentials Teratome bilden. Die fehlende Teratombildung in der weiteren Versuchsmäus könnte auf die Zellqualität bei der Injektion zurückzuführen sein.

Bei syngener Injektion zeigten sich auch bei dieser Zelllinie Teratombildungen. Syngene Injektionen in C57BL/6J-Wildtypmäusen zeigten in der Hälfte der injizierten Tiere Teratombildungen. Die andere Hälfte der injizierten Mäuse wiesen auch nach einer Zweitinjektion keine Teratombildungen auf. Da es sich bei der syngenen Injektion um Geschwister der Donormäuse eines Inzuchtstammes handelt, ist die Bildung der Teratome bei der Hälfte der Versuchstiere aufgrund des engen genetischen Verwandtschaftsgrades nicht verwunderlich. Die allogene Injektion führte bis zur Abgabe dieser Arbeit (Tag 45 nach Injektion) zu keiner Teratombildung. Die injizierten Zellen schienen wie erwartet vollständig durch das Immunsystem der Akzeptormäuse abgestoßen zu sein.

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten weisen vielmehr darauf hin, dass zelllinienspezifische Immunogene verantwortlich für fehlende oder eingeschränkte Teratombildungen zu sein scheinen. Boghaert *et al.* zeigten, dass auch sogenannte onkofetale Antigene durch cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) erkannt werden können (Boghaert *et al.*, 2008). Diese Antigene werden auch von Stammzellen exprimiert (Engelhard *et al.*, 2002). Dressel *et al.* untersuchten *in vitro* die maGSCs, miPSCs, mESCs und weitere Zelllinien auf ihre CTL-Empfindlichkeit. Diese Studien zeigten, dass *in vitro* alle untersuchten Zelllinien durch CTLs, die aus allogenen Milzbiopsien von OT-I Mäusen gewonnen wurden, getötet werden konnten (Dressel *et al.*, 2009). Viele Studien bestätigten, dass CTLs eine entscheidende Rolle in der Abstoßung von pluripotenten Stammzellen nach Transplantation in allogene oder semiallogene Versuchstiere spielen (Koch *et al.*, 2008; Lui *et al.*, 2010; Swijnenburg *et al.*, 2008a; Wu *et al.*, 2008). Die Erkennungssequenzen der CTLs, die MHC-Klasse I-Proteine, scheinen eine der wichtigsten immunologischen Barrieren für die Transplantation von pluripotenten Stammzellen allogener Transplantate darzustellen (Bradley *et al.*, 2002; Saric *et al.*, 2008). Doch auch die *minor histocompatibility*

Antigene spielen bei einer Abstoßung von transplantierten ESCs durch CTLs eine Rolle (Dressel *et al.*, 2008; Lui *et al.*, 2010; Robertson *et al.* 2007). Sie können zu einer Verringerung der Teratombildung führen, wenn ESCs injiziert werden, die Übereinstimmungen in den MHC-Komplexen aufweisen, jedoch einen Unterschied im genetischen Hintergrund besitzen. Analysen zu autologen Situationen wurden noch nicht durchgeführt.

In weiteren Untersuchungen müssten zunächst die in dieser Arbeit generierten Zelllinien mit denen von Zhao *et al.* verglichen werden. Die in der Studie von Zhao *et al.* untersuchten Markerproteine müssten für unsere Zelllinien und weitere viral induzierter iPSC-Zelllinien analysiert werden, um beurteilen zu können, in welchem Maß die spezifischen Zelllinien einen Einfluss auf die Teratombildung besitzen. Ferner müssten auch Vorläuferzellen und differenzierte Zellen in autologen Situationen analysiert werden, da in späteren therapeutischen Ansätzen zumeist diese Zellarten eingesetzt werden würden. Tseng *et al.* zeigten bereits, dass differenzierte humane iPSCs eine geringere NK-Zellaktivität aufwiesen als undifferenzierte Zellen (Tseng *et al.*, 2010). Jedoch wurde auch beschrieben, dass *in vitro* vordifferenzierte ESCs oder *in vivo* differenzierte Produkte dieser transplantierten Zellen ein besseres Target für CTLs darzustellen scheinen (Nussbaum *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008).

4.7 Ausblick

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und weiterführenden Differenzierung stellen Stammzellen einen guten Ansatz für regenerative Therapien dar. Kardiovaskuläre Vorläuferzellen besitzen ein Proliferationspotential und sind in der Lage in Kardiomyozyten, endotheliale Zellen und glatte Muskelzellen zu differenzieren und stellen somit eine hervorragende Zellpopulation zur Herzregeneration dar. Diese kardiovaskulären Vorläuferzellen zeigten in einem Mausmyokardinfarktmodell regeneratives Potential. Durch die nachgewiesene Tumorigenität dieser Zellen, können diese in dieser Form jedoch nicht für regenerative Therapien eingesetzt werden. Hierzu müssten noch weitere Analysen erfolgen. Die Vorläuferzellen zeigten im Vergleich zu den undifferenzierten iPSCs bereits eine spätere Teratombildung, was eventuell auf eine Unreinheit von undifferenzierten Zellen, einer noch nicht weit genug fortgeschrittenen

Differenzierung oder einer Dedifferenzierung zurückzuführen ist. Für spätere Versuche könnten die Zellpopulation vor Transplantation erneut selektiert werden. Dies könnte durch Kultivierung der Population mit NK-Zellen erfolgen, da diese Arbeit gezeigt hat, dass eine NK-Zellaktivität gegen tumorigene Zellen vorliegt. Ebenso wurde gezeigt, dass es durch allogene Injektion von pluripotenten Stammzellen zu einer Aktivierung der NK-Zellen kam. Eine andere Möglichkeit wäre diese kardiovaskulären Vorläuferzellpopulation im Folgenden auch für EHTs einzusetzen, um größere Bereiche von geschädigtem Myokard zu regenerieren.

Durch die autologen Zellinjektionsstudien wurde gezeigt, dass die ViPSCs zu einer Teratombildung führten. Die injizierten undifferenzierten ViPSCs wurden vom Immunsystem der autologen Maus nicht abgestoßen. Die Tumorigenität scheint vielmehr von zelllinienspezifischen Immunogenen beeinflusst. Somit müssten vor Transplantationsstudien die Tumorigenität der verwendeten Zellen spezifisch analysiert werden.

5 Zusammenfassung

Stammzellen nehmen in der regenerativen Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen einen hohen Stellenwert ein. Aufgrund der ethischen Kontroverse besitzen adulte Stammzellen mit einem Differenzierungspotential von embryonalen Stammzellen einen Vorteil gegenüber den humanen embryonalen Stammzellen.

In dieser Arbeit konnten spermatogoniale Stammzellen aus einem transgenen Mausmodell isoliert und mittels lentiviraler Überexpression von OCT4 allein in den pluripotenten Zustand überführt werden. Die Pluripotenz dieser induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) wurde durch verschiedene charakteristische Analysen nachgewiesen. Für therapeutische Einsätze zur Myokardinfarktregeneration stellen kardiovaskuläre Vorläuferzellen, die die Fähigkeit aufweisen sowohl zu proliferieren als auch in Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und endotheliale Zellen zu differenzieren, eine geeignete Zellart dar. Diese Vorläuferzellen sind durch die Expression des Oberflächenrezeptors *fetal liver kinase 1* (FLK1) gekennzeichnet.

In dieser Arbeit wurden iPSCs generiert und in FLK1 positive Zellen durch Cokultivierung differenziert und mit Hilfe der *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Technik separiert. Es wurden 30% FLK1 positive Zellen gewonnen. Auch hESCs konnten durch Cokultivierung auf OP9 Zellen (30%) und über das *mass culture* Verfahren (50%) in *kinase domain region* (KDR) positive Zellen differenziert werden. Die Vitalität und Differenzierungsfähigkeit der FLK1 positiven Zellen nach der FACS-Separierung wurden bestätigt.

Zur Analyse des therapeutischen Effekts dieser FLK1 positiven Zellen wurde ein Myokardinfarkt-Mausmodell etabliert. Die FLK1 positiven Zellen wurden allogent in Wildtypmäuse injiziert, die mit dem Immunsuppressivum Ciclosporin A (CsA) behandelt wurden. Nach Injektion dieser Vorläuferzellen wurde eine signifikante Steigerung der Ejektionsfraktion an Tag 56 nach Injektion nachgewiesen. Dieser funktionssteigernde Trend an Tag 56 durch die Zellinjektion wurde auch bei der Verkürzungsfraktion beobachtet. Die injizierten Zellen konnten zu den frühen Untersuchungszeitpunkten im Myokard durch Zellkernansammlungen nachgewiesen werden. Zu späteren Zeitpunkten war dies nicht mehr der Fall. Während der *in vivo* Studie wurde zu keinem Zeitpunkt eine Teratombildung beobachtet.

Immunologische Untersuchungen zeigten, dass die FLK1 positiven Zellen eine Tumorigenität in immundefizienten Mäusen aufwiesen und somit in dieser Form nicht direkt für die regenerative Therapie eingesetzt werden können. Ebenfalls wurde gezeigt, dass das Immunsystem der Versuchstiere und die Behandlung mit dem Immunsuppressivum CsA Auswirkungen auf die Teratombildung in der *in vivo* Studie besitzen. Die injizierten Zellen führten zu einer Aktivierung der natürlichen Killer (NK)-Zellen der Versuchstiere, die hingegen zu einer Lyse der injizierten Zellen führen konnten. CsA inhibierte die Teratombildung, besaß jedoch keinen Einfluss auf die NK-Zellaktivität. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die injizierten Zellen vom Immunsystem der Mäuse abgestoßen worden sind und somit zu späteren Versuchszeiten nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Trotz der eventuellen Abstoßung im späteren Versuchsverlauf führte die Injektion der FLK1 positiven Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Herzleistung.

Die Tumorigenität von Zellen spielt eine entscheidende Rolle in der stammzellbasierenden Therapie. Die virale Methode der Reprogrammierung in iPSCs hatte keinen Einfluss auf die Tumorigenität dieser Zellen. Bei Injektion von autologen ViPSCs in entsprechende Akzeptormäuse wurden Teratombildungen beobachtet. Die NK-Zellaktivität wurde durch die Injektion jedoch nicht aktiviert. Es wurde somit gezeigt, dass die ViPSCs vom Immunsystem der autologen Versuchstiere nicht abgestoßen wurden. Die Tumorigenität schien somit von zelllinienspezifischen Immunogenen beeinflusst.

Für klinische Anwendungen könnten die hier untersuchten kardiovaskulären Vorläuferzellen, die ein regeneratives Potential aufwiesen, aufgrund ihrer Tumorigenität jedoch nicht eingesetzt werden. Zukünftig müssten die zu transplantierenden Zellen erneut selektiert werden, um eventuelle Unreinheit von undifferenzierten Zellen zu umgehen. Dies könnte durch Kultivierung der Population mit NK-Zellen erfolgen, da diese Arbeit gezeigt hat, dass eine NK-Zellaktivität gegen tumorogene Zellen vorliegt. Eine andere Möglichkeit wäre diese kardiovaskulären Vorläuferzellpopulation im Folgenden auch zur Herstellung von künstlichem Herzgewebe einzusetzen, um größere Bereiche von geschädigtem Myokard zu regenerieren.

Aus dieser Arbeit resultierende Veröffentlichungen, Vorträge und Posterpräsentationen

Veröffentlichungen

- I-Fen Cheng, Diana Kaiser, **Daniela Huebscher**, Gerd Hasenfuss, Kaomei Guan, and Katrin Schäfer: *Differentiation of Multipotent Adult Germline Stem Cells Derived from Mouse Testis into Functional Endothelial Cells*, 2012, Journal of Vascular Research 49, 207-220.
- Katrin Streckfuss-Bömeke, Frieder Wolf, Azadeh Azizian, Michael Stauske, Malte Tiburcy, Stefan Wagner, **Daniela Hübscher**, Ralf Dressel, Simin Chen, Jörg Jende, Gerald Wulf, Verena Lorenz, Michael P. Schön, Lars S. Maier, Wolfram H. Zimmermann, Gerd Hasenfuss, and Kaomei Guan: *Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts*, 2012, European Heart Journal 12, doi: 10.1093/eurheartj/ehs203.

Manuskripte in Bearbeitung

- **Daniela Hübscher**, Diana Kaiser, Leslie Elsner, Ralf Dressel, Kaomei Guan: *Tumorigenic cells are a susceptible target of natural killer cells after transplantation*.
- Alexander Becker*, **Daniela Hübscher***, Mark Soonpaa, Frieder Wolf, Katrin Streckfuss-Bömeke, Loren J. Field, Kaomei Guan: *Generation and in-vivo cardiomyogenic potential of induced germline-derived pluripotent stem cells*

Vorträge/Abstracts/Poster

- **Daniela Hübscher**, Frieder Wolf, Katrin Streckfuss-Bömeke, Alexander Becker, Gerd Hasenfuss, Kaomei Guan: *Oct4-reprogramming of spermatogonial stem cells to generate cardiovascular progenitor cells*, Stem cell network NRW in Essen, Germany (05. - 06. April 2011).
- **Daniela Hübscher**, Frieder Wolf, Katrin Streckfuss-Bömeke, Alexander Becker, Gerd Hasenfuss, Kaomei Guan: *Oct4-reprogramming of spermatogonial stem cells to generate cardiovascular progenitor cells*, 2th EugeneHeart Ph.D student exchange meeting in London, UK (18. - 19. October 2010).

- **Daniela Hübscher**, Frieder Wolf, Katrin Streckfuss-Bömeke, Alexander Becker, Gerd Hasenfuss, Kaomei Guan: *Generation of Flk1⁺ cells from Oct4-reprogrammed spermatogonial stem cells*, 5th Annual Meeting German Society for Stem Cell Research, University of Luebeck, Germany (30. September – 02. October 2010).
- **Daniela Hübscher**, Gerd Hasenfuss, Kaomei Guan: *Myocardinfarct regeneration by cardiovascular progenitors from human and murine pluripotent stem cells*, 1th EugeneHeart Ph.D student exchange meeting in Goettingen, Germany (05. - 06. July 2010).
- Frieder Wolf, Alexander Becker, Katrin Streckfuss-Bömeke, **Daniela Hübscher**, Loren J. Field, Ralf Dressel, Gerd Hasenfuss, Kaomei Guan: *Characterization and maintenance of adult spermatogonial stem cell culture*, Combined Meeting of the ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT in Hanover, Germany (20. - 25. November 2009).

6 Literaturverzeichnis

Publikationen:

- Alonso, L., and Fuchs, E. (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A 100 Suppl 1*, 11830-11835.
- Abdel-Latif, A., Bolli, R., Tley Jeh, I. M., Montori, V. M., Perin, E. C., Hornung, C. A., Zuba-Surma, E. K., Al-Mallah, M., Dawn, B. (2007). Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med 167*, 989-997.
- Anisimov, S. V., Morizane, A., and Correia, A. S. (2010). Risks and mechanisms of oncological disease following stem cell transplantation. *Stem Cell Rev 6*, 411-424.
- Anversa, P., Kajstura, J., and Olivetti, G. (1996). Myocyte death in heart failure. *Curr Opin Cardiol 11*, 245-251.
- Assmus, B., Rolf, A., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Tillmanns, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., Suselbeck, T., Tonn, T., Dimmler, S., Dill, T., Zeiher, A. M., Schächinger, V. (2010). Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail 3*, 89-96.
- Assmus, B., Schächinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Döbert, N., Grünwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., dimmler, S., Zeiher, A. M. (2002). Transplantation of progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation 106*, 3009-3017.
- Baba, S., Heike, T., Yoshimoto, M., Umeda, K., Doi, H., Iwasa, T., Lin, X., Matsuoka, S., Komeda, M., and Nakahata, T. (2007). Flk1(+) cardiac stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells improve cardiac function in a dilated cardiomyopathy mouse model. *Cardiovasc Res 76*, 119-131.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E., and Gottlieb, D. I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol 168*, 342-357.
- Balsam, L. B., Wagers, A. J., Christensen, J. L., Kofidis, T., Weissman, I. L., Robbins, R. C. (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature 428*, 668-673.
- Becker, A. J., Mc, C. E., and Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature 197*, 452-454.

- Behfar, A., Zingman, L. V., Hodgson, D. M., Rauzier, J. M., Kane, G. C., Terzic, A., and Puceat, M. (2002). Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *Faseb J* *16*, 1558-1566.
- Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., Mummery C. L. (2012). Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol*, doi: 10.1038/nrm3448.
- Beltrami, A. P., 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*, 763-776.
- Ben-Haim, N., Lu, C., Guzman-Ayala, M., Pescatore, L., Mesnard, D., Bischofberger, M., Naef, F., Robertson, E. J., and Constam, D. B. (2006). The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4. *Dev Cell* *11*, 313-323.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2003). *Biochemie*, 5.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Verlag, ISBN-3-82741303-6.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., *et al.* (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* *324*, 98-102.
- Bieberich, E., Silva, J., Wang, G., Krishnamurthy, K., and Condie, B. G. (2004). Selective apoptosis of pluripotent mouse and human stem cells by novel ceramide analogues prevents teratoma formation and enriches for neural precursors in ES cell-derived neural transplants. *J Cell Biol* *167*, 723-734.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (1981). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. II. Evidence from paneth cells in the newborn mouse. *Am J Anat* *160*, 65-75.
- Bleumink, G. S., Knetsch, A. M., Sturkenboom, M. C., Straus, S. M., Hofman, A., Deckers, J. W., Witteman, J. C., and Stricker, B. H. (2004). Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J* *25*, 1614-1619.
- Blum, B., and Benvenisty, N. (2008). The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res* *100*, 133-158.
- Blum, B., and Benvenisty, N. (2009). The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell Cycle* *8*, 3822-3830.
- Boer, B., Kopp, J., Mallanna, S., Desler, M., Chakravarthy, H., Wilder, P. J., Bernadt, C., and Rizzino, A. (2007). Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Res* *35*, 1773-1786.
- Boghaert, E. R., Sridharan, L., Khandke, K. M., Armellino, D., Ryan, M. G., Myers, K., Harrop, R., Kunz, A., Hamann, P. R., Marquette, K., *et al.* (2008). The

- oncofetal protein, 5T4, is a suitable target for antibody-guided anti-cancer chemotherapy with calicheamicin. *Int J Oncol* 32, 221-234.
- Borchardt, T., and Braun, T. (2007). Cardiovascular regeneration in non-mammalian model systems: what are the differences between newts and man? *Thromb Haemost* 98, 311-318.
- Boudoulas, K. D., and Hatzopoulos, A. K. (2009). Cardiac repair and regeneration: the Rubik's cube of cell therapy for heart disease. *Disease Models & Mechanisms* 2, 344-358.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Bradley, J. A., Bolton, E. M., and Pedersen, R. A. (2002). Stem cell medicine encounters the immune system. *Nat Rev Immunol* 2, 859-871.
- Brederlau, A., Correia, A. S., Anisimov, S. V., Elmi, M., Paul, G., Roybon, L., Morizane, A., Bergquist, F., Riebe, I., Nannmark, U., *et al.* (2006). Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells* 24, 1433-1440.
- Breitbach, M., Bostani, T., Roell, W. *et al.* (2007). Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 110(4), 1362-1369.
- Brivanlou, A. H., Gage, F. H., Jaenisch, R., Jessell, T., Melton, D., and Rossant, J. (2003). Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science* 300, 913-916.
- Cao, F., Lin, S., Xie, X., Ray, P., Patel, M., Zhang, X., Drukker, M., Dylla, S. J., Connolly, A. J., Chen, X., Weissman I. L., Gambhir, S. S., Wu, J. C. (2006). In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 113, 1005-1014.
- Caplan, A. I., and Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98, 1076-1084.
- Caroti, L., Zanazzi, M., Paudice, N., Tsalouchos, A., Carta, P., Larti, A., Pimpinelli, N., Moscarelli, L., Salvadori, M., and Bertoni, E. (2012). Conversion from calcineurin inhibitors to everolimus with low-dose Ciclosporine in renal transplant recipients with squamous cell carcinoma of the skin. *Transplant Proc* 44, 1926-1927.
- Caspi, O., Huber, I., Kehat, I., Habib, M., Arbel, G., Gepstein, A., Yankelson, L., Aronson, D., Beyar, R., and Gepstein, L. (2007). Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol* 50, 1884-1893.

- Castrillon, D. H., Quade, B. J., Wang, T. Y., Quigley, C., Crum, C. P. (2000). The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9585-9590.
- Cerdan, C., Hong, S. H., and Bhatia, M. (2007). Formation and Hematopoietic Differentiation of Human Embryoid Bodies by Suspension and Hanging Drop Cultures. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 3,1D.2.1-1D.2.16.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
- Cheng, I. F., Kaiser, D., Huebscher, D., Hasenfuss, G., Guan, K., and Schafer, K. (2012). Differentiation of multipotent adult germline stem cells derived from mouse testis into functional endothelial cells. *J Vasc Res* 49, 207-220.
- Choi, S. H., Jung, S. Y., Kwon, S. M., and Baek, S. H. (2012). Perspectives on stem cell therapy for cardiac regeneration. *Circ J* 76, 1307-1312.
- Choo, A. B., Tan, H. L., Ang, S. N., Fong, W. J., Chin, A., Lo, J., Zheng, L., Hentze, H., Philp, R. J., Oh, S. K., and Yap, M. (2008). Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem Cells* 26, 1454-1463.
- Christoforou, N., Miller, R. A., Hill, C. M., Jie, C. C., McCallion, A. S., and Gearhart, J. D. (2008). Mouse ES cell-derived cardiac precursor cells are multipotent and facilitate identification of novel cardiac genes. *J Clin Invest* 118, 894-903.
- Chung, S., Shin, B. S., Hedlund, E., Pruszak, J., Ferree, A., Kang, U. J., Isacson, O., Kim, K. S. (2006). Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation. *J Neurochem* 97, 1467-1480.
- Conrad, S., Renninger, M., Hennenlotter, J., Wiesner, T., Just, L., Bonin, M., Aicher, W., Buhning, H. J., Mattheus, U., Mack, A., *et al.* (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456, 344-349.
- Costoya, J. A., Hobbs, R. M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K. E., Wolgemuth, D. J., Pandolfi, P. P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 36, 653-659.
- Damjanov, I. (1993). Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis. *Int J Dev Biol* 37, 39-46.
- Dann, C. T., Alvarado, A. L., Molyneux, L. A., Denard, B. S., Garbers, D. L., Porteus, M. H. (2008). Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. *Stem Cells* 26, 2928-2937.

- Dezawa, M., Takahashi, I., Esaki, M., Takano, M., and Sawada, H. (2001). Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* *14*, 1771-1776.
- Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J. J., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P. A., Stromberg, A., van Veldhuisen, D. J., Atar, D., Hoes, A. W., *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 J Heart Fail* *10*, 933-989.
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., *et al.* (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* *321*, 1218-1221.
- Diwan, A., and Dorn, G. W., 2nd (2007). Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda)* *22*, 56-64.
- Dorn, G. W., 2nd, and Force, T. (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* *115*, 527-537.
- Dressel, R. (2011). Effects of histocompatibility and host immune responses on the tumorigenicity of pluripotent stem cells. *Semin Immunopathol* *33*, 573-591.
- Dressel, R., Guan, K., Nolte, J., Elsner, L., Monecke, S., Nayernia, K., Hasenfuss, G., Engel, W. (2009). Multipotent adult germ-line stem cells, like other pluripotent stem cells, can be killed of major histocompatibility complex class I molecules. *Biol Direct* *4*, 31.
- Dressel, R., Nolte, J., Elsner, L., Novota, P., Guan, K., Streckfuss-Bomeke, K., Hasenfuss, G., Jaenisch, R., and Engel, W. (2010). Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. *Faseb J* *24*, 2164-2177.
- Dressel, R., Schindehutte, J., Kuhlmann, T., Elsner, L., Novota, P., Baier, P. C., Schillert, A., Bickeboller, H., Herrmann, T., Trenkwalder, C., Paulus, W., Mansouri, A. (2008). The Tumorigenicity of Mouse Embryonic Stem Cells and In V Differentiated Neuronal Cells Is Controlled by the Recipients' Immune Response. *PLoS ONE* *3*(7):e2622.
- Drukker, M., Katchman, H., Katz, G., Even-Tov Friedman, S., Shezen, E., Hornstein, E., Mandelboim, O., Reisner, Y., Benvenisty N. (2006). Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* *24*, 221-229.
- Dworkin, H. J., Premo, M., and Dees, S. (2007). Comparison of red cell and whole blood volume as performed using both chromium-51-tagged red cells and iodine-

- 125-tagged albumin and using I-131-tagged albumin and extrapolated red cell volume. *Am J Med Sci* 334, 37-40.
- Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Jr., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A., and Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277-280.
- Eichmann, A., Corbel, C., Nataf, V., Vaigot, P., Breant, C., and Le Douarin, N. M. (1997). Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5141-5146.
- Eisenberg, C. A., Gourdie, R. G., and Eisenberg, L. M. (1997). Wnt-11 is expressed in early avian mesoderm and required for the differentiation of the quail mesoderm cell line QCE-6. *Development* 124, 525-536.
- Elishmereni, M., Bachelet, I., Levi-Schaffer, F. (2008). DNAM-1: an amplifier of immune responses as a therapeutic target in various disorders. *Curr Opin Investig Drugs* 9, 491-496.
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Succi, N. D., Tabar, V., Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* 22, 152-165.
- Ema, M., Takahashi, S., and Rossant, J. (2006). Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors. *Blood* 107, 111-117.
- Engelhard, V. H., Bullock, T. N., Colella, T. A., Sheasley, S. L., and Mullins, D. W. (2002). Antigens derived from melanocyte differentiation proteins: self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188, 136-146.
- Erdo, F., Buhrle, C., Blunk, J., Hoehn, M., Xia, Y., Fleischmann, B., Focking, M., Kustermann, E., Kolossov, E., Hescheler, J., *et al.* (2003). Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 780-785.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Faller, A. (1999). *Der Körper des Menschen*, 13. Auflage, Thieme Verlag, ISBN-3-13-329713-9.
- Fong, C. Y., Gauthaman, K., and Bongso, A. (2010). Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *J Cell Biochem* 111, 769-781.
- Frenzel, L. P., Abdullah, Z., Kriegeskorte, A. K., Dietrich, R., Lange, N., Busch, D. H., Krönke, M., Utermöhlen, O., Hescheler, J., and Saric, T. (2009). Role of NKG2D-ligands and IGAM-1 in NK-cell-mediated lysis of murine embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells* 27: 307-316.

- Fuegemann, C. J., Samraj, A. K., Walsh, S., Fleischmann, B. K., Jovinge, S., and Breitbach, M. (2010). Differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes via the hanging-drop and mass culture methods. *Curr Protoc Stem Cell Biol Chapter 1*, Unit 1F 11.
- Fujiwara, M., Yan, P., Otsuji, T. G., Narazaki, G., Uosaki, H., Fukushima, H., Kuwahara, K., Harada, M., Matsuda, H., Matsuoka, S., *et al.* (2011). Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with Cyclosporin-A. *PLoS One* 6, e16734.
- Fukuda, H., Takahashi, J., Watanabe, K., Hayashi, H., Morizane, A., Koyanagi, M., Sasai, Y., and Hashimoto, N. (2006). Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. *Stem Cells* 24, 763-771.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J., Raulet, D. H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186-1190.
- Geijsen, N. and Hochedlinger, K. (2009). gPS Navigates Germ Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* 5, 3-4.
- Gepstein, L., Ding, C., Rahmutula, D. *et al.* (2010). *In vivo* assessment of the electrophysiological integration and arrhythmogenic risk of myocardial cell transplantation strategies. *Stem Cells* 28(12), 2151-2161.
- Gertow, K., Wolbank, S., Rozell, B., Sugars, R., Andang, M., Parish, C. L., Imreh, M. P., Wendel, M., and Ahrlund-Richter, L. (2004). Organized development from human embryonic stem cells after injection into immunodeficient mice. *Stem Cells Dev* 13, 421-435.
- Golestaneh, N., Kokkinaki, M., Pant, D., Jiang, J., DeStefano, D., Fernandez-Bueno, C., Rone, J. D., Haddad, B. R., Gallicano, G. I., and Dym, M. (2009). Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev* 18, 1115-1126.
- Grimaldi, P. A., Teboul, L., Inadera, H., Gaillard, D., and Amri, E. Z. (1997). Transdifferentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57(1): 71-75.
- Grinnemo, K. H., Genead, R., Kumagai-Braesch, M., Andersson, A., Danielsson, C., Mansson-Broberg, A., Dellgren, G., Stromberg, A. M. *et al.* (2008). Costimulation blockade induces tolerance to HESC transplanted to the testis and induced regulatory T-cells to HESC transplanted into the heart. *Stem Cells* 26, 1850-1857.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R., Spies, T. (2001). Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2, 255-260.
- Gruh, I., Beilner, J., Blomer, U., Schmiedl, A., Schmidt-Richter, I., Kruse, M. L., Haverich, A., and Martin, U. (2006). No evidence of transdifferentiation of human

- endothelial progenitor cells into cardiomyocytes after coculture with neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* *113*, 1326-1334.
- Guan, K., and Hasenfuss, G. (2007). Do stem cells in the heart truly differentiate into cardiomyocytes? *J Mol Cell Cardiol* *43*(4), 377-387.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L. S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J. H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., and Hasenfuss, G. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* *440*, 1199-1203.
- Guan, K., Wagner, S., Unsold, B., Maier, L. S., Kaiser, D., Hemmerlein, B., Nayernia, K., Engel, W., and Hasenfuss, G. (2007). Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* *100*, 1615-1625.
- Guan, K., Wolf, F., Becker, A., Engel, W., Nayernia, K., and Hasenfuss, G. (2009). Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. *Nat Protoc* *4*, 143-154.
- Halme, D. G., and Kessler, D. A. (2006). FDA regulation of stem-cell-based therapies. *N Engl J Med* *355*, 1730-1735.
- Henning, J. (2011). Stem cells in cardiac repair. *Future Cardiology* *7*, 99-117.
- Hentze, H., Soong, P. L., Wang, S. T., Phillips, B. W., Putti, T. C., Dunn, N. R. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res* *2*, 198-210.
- Hirata, H., Kawamata, S., Murakami, Y., Inoue, K., Nagahashi, A., Tosaka, M., Yoshimura, N., Miyamoto, Y., Iwasaki, H., Asahara, T., and Sawa, Y. (2007). Coexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha and fetal liver kinase 1 enhances cardiogenic potential in embryonic stem cell differentiation in vitro. *J Biosci Bioeng* *103*, 412-419.
- Ho, K. K., Pinsky, J. L., Kannel, W. B., and Levy, D. (1993). The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* *22*, 6A-13A.
- Hochedlinger, K., and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* *136*, 509-523.
- Hocker, B., and Tonshoff, B. (2011). Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in pediatric renal transplantation: a viable option? *Paediatr Drugs* *13*, 49-69.
- Hodgson, D. M., Behfar, A., Zingman, L. V., Kane, G. C., Perez-Terzic, C., Alekseev, A. E., Puceat, M., and Terzic, A. (2004). Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *287*, H471-479.
- Hohman, R. J., and Hultsch, T. (1990). Ciclosporin A: new insights for cell biologists and biochemists. *New Biol* *2*, 663-672.

- Horan, P. K., Melnicoff, M. J., Jensen, B. D., and Slezak, S. E. (1990). Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods Cell Biol* 33, 469-490.
- Hristov, M., Heussen, N., Schober, A., Weber, C. (2006). Intracoronary infusion of autologous bone marrow cells and left ventricular function after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *J Cell Mol Med* 10, 727-733.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., and Melton, D. A. (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 26, 795-797.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D. A. (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26, 1269-1275.
- Hussein, S. M., Batada, N. N., Vuoristo, S., Ching, R. W., Autio, R., Narva, E., Ng, S., Sourour, M., Hamalainen, R., Olsson, C., *et al.* (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471, 58-62.
- Iwasa, T., Baba, S., Doi, H., Kaichi, S., Yokoo, N., Mima, T., Kanatsu-Shinohara, M., Shinohara, T., Nakahata, T., and Heike, T. (2010). Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 400, 27-33.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Johansson, B. M., and Wiles, M. V. (1995). Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* 15, 141-151.
- Jujo, K., Ii, M., and Losordo, D. W. (2008). Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 45, 530-544.
- Kaiser, D. (2010) Der Einfluss mechanischer Last auf das Potential multipotenter adulter Keimbahnstammzellen zur kardialen Regeneration, Georg-August Universität Göttingen.
- 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, 127-137.
- Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogunuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., *et al.* (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119, 1001-1012.

- Kattman, S. J., Huber, T. L., and Keller, G. M. (2006). Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* *11*, 723-732.
- Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livine, 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*, 407-414.
- Kehat, I., Khimovich, L., Caspi, O., Gepstein, A., Shofti, R., Arbel, G., Huber, I., Satin, J., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2004). Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *22*, 1282-1289.
- Kennedy, M., D'Souza, S. L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S., and Keller, G. (2007). Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* *109*, 2679-2687.
- Kim, J. B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M. J., Meyer, J., Park, K. I., Zaehres, H., and Scholer, H. R. (2009a). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* *461*, 649-643.
- Kim, J. B., Sebastiano, V., Wu, G., Arauzo-Bravo, M. J., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrich, M., van den Boom, D., *et al.* (2009b). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* *136*, 411-419.
- Kim, J. B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M. J., Ruau, D., Han, D. W., Zenke, M., and Scholer, H. R. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* *454*, 646-650.
- King, R. G., Beddington, R. S., and Brown, N. A. (1998). The role of the brachyury gene in heart development and left-right specification in the mouse. *Mech Dev* *79*(1-2), 29-37.
- Klug, M. G., Soonpaa, M. H., Koh, G. Y., and Field, L. J. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* *98*, 216-224.
- Knoepfler, P. S. (2009). Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* *27*, 1050-1056.
- Ko, K., Arauzo-Bravo, M. J., Kim, J., Stehling, M., Schöler, H. R. (2010). Conversion of adult mouse unipotent germline stem cells into pluripotent stem cells. *Nat Protoc* *5*(5), 921-928.
- Ko, K., Tapia, N., Wu, G., Kim, J. B., Bravo, M. J., Sasse, P., Glaser, T., Ruau, D., Han, D. W., Greber, B., Hausdörfer, K., Sebastiano, V., Stehling, M., Fleischmann, B. K., Brüstle, O., Zenke, M., Schöler, H. R. (2009). Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. *Cell Stem Cell* *5*(1), 87-96.

- Koch, C. A., Geraldes, P., Platt, J. L. (2008). Immunosuppression by embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 89-98.
- Koch, C. A., Jordan, C. E., and Platt, J. L. (2006). Complement-dependent control of teratoma formation by embryonic stem cells. *J Immunol* 177, 4803-4809.
- Kofidis, T., de Bruin, J. L., Yamane, T., Balsam, L. B., Lebl, D. R., Swijnenburg, R. J., Tanaka, M., Weissman, I. L., and Robbins, R. C. (2004). Insulin-like growth factor promotes engraftment, differentiation, and functional improvement after transfer of embryonic stem cells for myocardial restoration. *Stem Cells* 22(7), 1239-1245.
- Kofidis, T., de Bruin, J. L., Yamane, T., Tanaka, M., Lebl, D. R., Swijnenburg, R. J., Weissman, I. L., and Robbins, R. C. (2005). Stimulation of paracrine pathways with growth factors enhances embryonic stem cell engraftment and host-specific differentiation in the heart after ischemic myocardial injury. *Circulation* 111, 2486-2493.
- Kolossov, E., Bostani, T., Roell, W., Breitbach, M., Pillekamp, F., Nygren, J. M., Sasse, P., Rubenchik, O., Fries, J. W., Wenzel, D., *et al.* (2006). Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 203, 2315-2327.
- Kossack, N., Meneses, J., Shefi, S., Nguyen, H. N., Chavez, S., Nicholas, C., Gromoll, J., Turek, P. J., and Reijo-Pera, R. A. (2009). Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells* 27, 138-149.
- Kuai, X. L., Cong, X. Q., Du, Z. W., Bian, Y. H., and Xiao, S. D. (2006). Treatment of surgically induced acute liver failure by transplantation of HNF4-overexpressing embryonic stem cells. *Chin J Dig Dis* 7, 109-116.
- Kumar, D., Kamp, T. J., LeWinter, M. M. (2005). Embryonic stem cells: differentiation into cardiomyocytes and potential for heart repair and regeneration. *Coron Artery Dis* 16, 111-116.
- Kurosawa, H. (2007). Methods for Inducing Embryoid Body Formation: In Vitro Differentiation System of Embryonic Stem Cells. *J of Bioscience and Bioengineering* 103 (5), 389-398.
- Laflamme, M. A., Gold, J., Xu, C., Hassanipour, M., Rosler, E., Police, S., Muskheli, V., and Murry, C. E. (2005). Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 167, 663-671.
- Lam, J. T., Moretti, A., Laugwitz, K. L. (2009). Multipotent Progenitor Cells in Regenerative Cardiovascular Medicine. *Pediatr Cardiol* 30, 690-698.
- Laugwitz, K. L., Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., and Chien, K. R. (2008). Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development* 135, 193-205.

- Laugwitz, K. L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L. Z., Cai, C. L., Lu, M. M., Reth, M., *et al.* (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433, 647-653.
- Lawrenz, B., Schiller, H., Willbold, E., Ruediger, M., Muhs, A., Esser, S. (2004). Highly sensitive biosafety model for stem-cell-derived grafts. *Cytotherapy* 6, 212-222.
- Lensch, M. W., Schlaeger, T. M., Zon, L. I., and Daley, G. Q. (2007). Teratoma formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human-animal chimera. *Cell Stem Cell* 1, 253-258.
- Leone, A. M., Rutella, S., Giannico, M. B., Perfetti, M., Zaccone, V., Brugaletta, S., Garramone, B., Niccoli, G., Porto, I., Liuzzo, G., *et al.* (2008). Effect of intensive vs standard statin therapy on endothelial progenitor cells and left ventricular function in patients with acute myocardial infarction: Statins for regeneration after acute myocardial infarction and PCI (STRAP) trial. *Int J Cardiol* 130, 457-462.
- Leor, J., Gerecht, S., Cohen, S., Miller, L., Holbova, R., Ziskind, A., Shachar, M., Feinberg, M. S., Guetta, E., and Itskovitz-Eldor, J. (2007). Human embryonic stem cell transplantation to repair the infarcted myocardium. *Heart* 93, 1278-1284.
- Li, Y., Song, Y., Zhao, L., Gaidosh, G., Laties, A. M., and Wen, R. (2008). Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye DiI. *Nat Protoc* 3, 1703-1708.
- Linke, A., Muller, P., Nurzynska, D., Casarsa, C., Torella, D., Nascimbene, A., Castaldo, C., Cascapera, S., Bohm, M., Quaini, F., *et al.* (2005). Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8966-8971.
- Lipinski, M. J., Biondi-Zoccai, G. G., Abbate, A., Khianey, R., Sheiban, I., Bartunek, J., Vanderheyden, M., Kim, H. S., Khang, H. J., Strauer, B. E., Vetrovec G. W. (2007). Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborate systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 50, 1761-1767.
- Liu, Y., Ji, L., Ten, Y., Wang, Y., and Pei, X. (2007). The molecular mechanism of embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Sci China Ser C-Life Sci* 50(5), 619-623.
- Lloyd-Jones, D. M., Larson, M. G., Leip, E. P., Beiser, A., D'Agostino, R. B., Kannel, W. B., Murabito, J. M., Vasan, R. S., Benjamin, E. J., and Levy, D. (2002). Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106, 3068-3072.
- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., 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, 431-440.

- Löffler, G., Heinrich, P.C., Petrides, P.E. (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*, 8.Auflage, Springer Verlag, ISBN-10 3-540-32680-4.
- Lui, K. O., Boyd, A. S., Cobbold, S. P., Waldmann, H., Fairchild, P. J. (2010). A role for regulatory T cells in acceptance of ESC-derived tissues transplanted across an major histocompatibility complex barrier. *Stem Cells* 28, 1905-1914.
- Lunde, K., Solheim, S., Forfang, K., Arnesen, H., Brinch, L., Bjornerheim, R., Ragnarsson, A., Egelandt, T., Endresen, K., Ilbekk, A., Mangschau, A., Aakhus, S. (2008). Anterior myocardial infarction with acute percutaneous coronary intervention and intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: safety, clinical outcome, and serial changes in left ventricular function during 12-months' follow-up. *J Am Coll Cardiol* 51, 674-676.
- Ma, M., Ding, S., Lundqvist, A., San, H., Fang, F., Konoplyannikov, M., Berry, C., Beltran, L. E., Chen, G., Kovacic, J. C., Boehm, M. (2010). Major histocompatibility complex-I expression on embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells is critical for syngeneic transplant survival. *Stem Cells* 28, 1465-1475.
- 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.
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., *et al.* (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103, 697-705.
- Mansour, S., Roy, D. C., Bouchard, V., Nguyen, B. K., Stevens, L. M., Gobeil, F., Rivard, A., Leclerc, G., Reeves, F., and Noiseux, N. (2010). COMPARE-AMI trial: comparison of intracoronary injection of CD133+ bone marrow stem cells to placebo in patients after acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: study rationale and design. *J Cardiovasc Transl Res* 3, 153-159.
- Martin, C. M., Meeson, A. P., Robertson, S. M., Hawke, T. J., Richardson, J. A., Bates, S., Goetsch, S. C., Gallardo, T. D., and Garry, D. J. (2004). Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 265, 262-275.
- Martin-Rendon, E., Brunskill, S. J., Hyde, C. J., Stanworth, S. J., Mathur, A., Watt, S. M. (2008). Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 29(15), 1807-1818.
- Mauritz, C., Martens, A., Rojas, S. V., Schnick, T., Rathert, C., Schecker, N., Menke, S., Glage, S., Zweigerdt, C., Haverich, A., Martin, U., and Kutschka, I. (2011). Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived Flk-1 progenitor cells engraft in a mouse model of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 32, 2634-2641.
- McMurray, J. J., and Pfeffer, M. A. (2005). Heart failure. *Lancet* 365, 1877-1889.

- Medvedev, S. P., Shevchenko, A. I., and Zakian, S. M. (2010). Induced Pluripotent Stem Cells: Problems and Advantages when Applying them in Regenerative Medicine. *Acta Naturae* 2, 18-28.
- Meyer, G. P., Wollert, K. C., Lotz, J. *et al.* (2009). Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J* 30(24), 2978-2984.
- Meyer, G. P., Wollert, K. C., Lotz, J., Steffens, J., Lippolt P., Fichtner, S. *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, 1287-1294.
- Mignone, J. L., Kreuziger, K. L., Paige, S. L., and Murry, C. E. (2010). Cardiogenesis from human embryonic stem cells. *Circ J* 74, 2517-2526.
- Min, J. Y., Yang, Y., Converso, K. L., Liu, L., Huang, Q., Morgan, J. P., and Xiao, Y. F. (2002). Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 92, 288-296.
- Mizarek, S. C., Chikhovskaya, J. V., Sadri-Ardekani, H. *et al.* (2010). Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis. *Hum Reprod* 25, 158-167.
- Monzen, K., Nagai, R., and Komuro, I. (2002). A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation. *Trends Cardiovasc Med* 12, 263-269.
- Mosahebi, A., Woodward, B., Green, C., Martin, R., and Terenghi, G. (2000). Long-term effect of vital labelling on mixed schwann cell cultures. *Histochem J* 32, 337-343.
- Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J. T., 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, 1151-1165.
- Moriya, K., Yoshikawa, M., Saito, K., Ouji, Y., Nishiofuku, M., Hayashi, N., Ishizaka, S., and Fukui, H. (2007). Embryonic stem cells develop into hepatocytes after intrasplenic transplantation in CCl4-treated mice. *World J Gastroenterol* 13, 866-873.
- Mountford, P., Nichols, J., Zevnik, B., O'Brien, C., and Smith, A. (1998). Maintenance of pluripotential embryonic stem cells by stem cell selection. *Reprod Fertil Dev* 10, 527-533.
- Mummery, C. L., Ward, D., and Passier, R. (2007). Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes by coculture with endoderm in serum-free medium. *Curr Protoc Stem Cell Biol Chapter 1, Unit 1F 2.*

- Murry, C. E., Soonpaa, M. H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H. O., Rubart, M., Pasumarthi, K. B., Virag, J. L., Bartelmez, S. H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J. D., Williams, D. A., Field, L. J. (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-668.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Schäfer-Korting, M. (2001). *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 8.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, ISBN-3-8047-1763-2.
- Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., and Anversa, P. (2003). Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 92, 139-150.
- Nag, A., Robotham, J. M., and Tang, H. (2012). Suppression of Viral RNA Binding and the Assembly of Infectious Hepatitis C Virus Particles in vitro by Cyclophilin Inhibitors. *J Virol*, doi: 10.1128/JVI.01351-12.
- Nagy, A., Gócza, E., Diaz, E. M., Prideaux, V. R., Iványi, E., Markkula, M., Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*, 110(3):815-21.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8424-8428.
- Naito, H., Melnychenko, I., Didie, M., Karikkineth, B. C., Biermann, D., Eschenhagen, T., Zimmermann, W. H. (2006). Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* 114(1), 172-178.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101-106.
- Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y., Braun, R. E., Yoshida, S. (2010). Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science* 328, 62-67.
- Nakano, T., Kodama, H., and Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098-1101.
- Narazaki, G., Uosaki, H., Teranishi, M., Okita, K., Kim, B., Matsuoka, S., Yamanaka, S., and Yamashita, J. K. (2008). Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118, 498-506.
- Nelson, T. J., Ge, Z., van Orman, J., Barron, M., Rudy-Reil, D., Hacker, T. H., Misra, R. Auchampach, J. A., and Lough, J. (2006). Improved Cardiac Function

- in Infarcted Mice after Treatment with Pluripotent Embryonic Stem Cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288(11), 1216-1224.
- Nelson, T. J., Martinez-Fernandez, A., Yamada, S., Perez-Terzic, C., Ikeda, Y., and Terzic, A. (2009). Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 120, 408-416.
- Nishikawa, S. I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and 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, 1747-1757.
- Nolte, J., Michelmann, H. W., Wolf, M., Wulf, G., Nayernia, K., Meinhardt, A., Zechner, U., and Engel, W. (2010). PSCDGs of mouse multipotent adult germline stem cells can enter and progress through meiosis to form haploid male germ cells in vitro. *Differentiation* 80, 184-194.
- Novak, A., Barad, L., Zeevi-Levin, N., Shick, R., Shtrichman, R., Lorber, A., Itskovitz-Eldor, J., Binah, O. (2012). Cardiomyocytes generated from CPVTD307H patients are arrhythmogenic in response to β -adrenergic stimulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16, 468-482.
- Nussbaum, J., Minami, E., Laflamme, M. A., Virag, J. A., Ware, C. B., Masino, A., Muskheli, V., Pabon, L., Reinecke, H., and Murry, C. E. (2007). Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *Faseb J* 21, 1345-1357.
- Nygren, J. M., Jovinge, S., Breitbach, M., Sawen, P., Roll, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B. K., Jacobsen, S. E. (2004). Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 10, 494-501.
- Oberpriller, J. O., Oberpriller, J. C. (1974). Response of the adult newt ventricle to injury. *J Exp Zool* 187(2), 249-253.
- Oh, H., Bradfute, S. B., Gallardo, T. D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L. H., Behringer, R. R., Garry, D. J., *et al.* (2003). Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12313-12318.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J. A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., Krajewski, S., *et al.* (1997). Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 336, 1131-1141.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D. M., Leri, A., Anversa, P. (2001a). Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* 938, 221-229; discussion 229-230.

- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D. M., Leri, A., Anversa, P. (2003). Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 7 Suppl 3, 86-88.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., Anversa, P. (2001b). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10344-10349.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., *et al.* (2001c). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.
- 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, 469-477.
- Pandur, P., Lasche, M., Eisenberg, L. M., and Kuhl, M. (2002). Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* 418, 636-641.
- Passier, R., Oostwaard, D. W., Snapper, J., Kloots, J., Hassink, R. J., Kuijk, E., Roelen, B., de la Reviere A. B., Mummery, C. (2005). Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* 23(6), 772-780.
- Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D., and Williams, R. L. (1990). Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* 141, 344-352.
- Porello, E. R., Mahmoud, A. I., Simpson, E. *et al.* (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331(6020), 1078-1080.
- Poss, K. D. (2007). Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* 18, 36-45.
- Poss, K. D., Wilson, L. G., Keating, M. T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298(5601), 2188-2190.
- Przyborski, S. A. (2005). Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells* 23, 1242-1250.
- Pyeon, H. J., and Lee, Y. I. (2012). Differential expression levels of synaptophysin through developmental stages in hippocampal region of mouse brain. *Anat Cell Biol*. 45(2),97-102.
- Rideout, W. M. 3rd, Hochedlinger, K., Kyba, M., Daley, G. Q., Jaenisch, R. (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 109, 17-27.

- Robertson, N. J., Brook, F. A., Gardner, R. L., Cobbold, S. P., Waldmann, H., and Fairchild, P. J. (2007). Embryonic stem cell-derived tissues are immunogenic but their inherent immune privilege promotes the induction of tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 20920-20925.
- Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H. H., Hescheler, J., and Wobus, A. M. (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.
- Roy, N. S., Cleren, C., Singh, S. K., Yang, L., Beal, M. F., Goldman, S. A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* *12*, 1259-1268.
- Rubart, M., Field, L. J. (2008). Stem cell differentiation: cardiac repair. *Cells Tissues Organs* *188*(1-2), 202-211.
- Rubart, M., Pasumarthi, K. B., Nakajima, H., Soonpaa, M. H., Nakajima, H. O., Field, L. J. (2003). Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ Res* *92*(11), 1217-1224.
- Sadoshima, J., and Izumo, S. (1993). Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J* *12*, 1681-1692.
- Saraste, A., Voipio-Pulkki, L. M., Parvinen, M., and Pulkki, K. (1997). Apoptosis in the heart. *N Engl J Med* *336*, 1025-1026; author reply 1026.
- Saric, T., Frenzel, L. P., and Hescheler, J. (2008). Immunological barriers to embryonic stem cell-derived therapies. *Cells Tissues Organs* *188*, 78-90.
- Sarig, R., Fuchs, O., Tencer, L., Panski, A., Nudel, U., and Yaffe, D. (2010). Cloned myogenic cells can transdifferentiate in vivo into neuron-like cells. *PLoS One* *5*(1): e8814.
- Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., *et al.* (2006a). Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* *355*, 1210-1221.
- Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., *et al.* (2006b). Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* *27*, 2775-2783.
- Scholer, H. R., Balling, R., Hatzopoulos, A. K., Suzuki, N., and Gruss, P. (1989). Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. *Embo J* *8*, 2551-2557.

- Schuldiner, M., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2003). Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. *Stem Cells* 21, 257-265.
- Seandel, M., James, D., Shmelkov, S.V., Falciatori, I., Kim, J., Chavala, S., Scherr, D. S., Zhang, F., Torres, R., Gale, N. W., *et al.* (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* 449, 346-350.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- Shiota, M., Heike, T., Haruyama, M., Baba, S., Tsuchiya, A., Fujino, H., Kobayashi, H., Kato, T., Umeda, K., Yoshimoto, M., and Nakahata, T. (2007). Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties. *Exp Cell Res* 313, 1008-1023.
- Singla, D. K., Hacker, T. A., Ma, L., Douglas, P. S., Sullivan, R., Lyons, G. E., and Kamp, T. J. (2006). Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. *J Mol Cell Cardiol* 40, 195-200.
- Singla, D.K., Long, X., Glass, C., Singla, R.D., Yan, B. (2011). Induced pluripotent stem (iPS) Cells Repair and Regenerate Infarcted Myocardium. *Mol Pharmaceutics* 8, 1573-1581.
- Smith, S. C., Jr., Benjamin, E. J., Bonow, R. O., Braun, L. T., Creager, M. A., Franklin, B. A., Gibbons, R. J., Grundy, S. M., Hiratzka, L. F., Jones, D. W., *et al.* (2011). AHA/ACCF Secondary Prevention and Risk Reduction Therapy for Patients with Coronary and other Atherosclerotic Vascular Disease: 2011 update: a guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation. *Circulation* 124, 2458-2473.
- Soonpaa, M. H., Field, L. J. (1997). Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am J Physiol* 272(Pt2), H220-H226.
- Srivastava, D. (2006). Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 126, 1037-1048.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-949.
- Stevens, K. R., Pabon, L., Muskheli, V., and Murry, C. E. (2009). Scaffold-free human cardiac tissue patch created from embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 15, 1211-1222.
- Streckfuss-Bomeke, K., Vlasov, A., Hulsmann, S., Yin, D., Nayernia, K., Engel, W., Hasenfuss, G., and Guan, K. (2009). Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germ-line stem cells. *Stem Cell Res* 2, 139-154.

- Streckfuss-Bomeke, K., Wolf, F., Azizian, A., Stauske, M., Tiburcy, M., Wagner, S., Hubscher, D., Dressel, R., Chen, S., Jende, J., Wulf, G., Lorenz, V., Schon, M. P., Maier, L. S., Zimmermann, W. H., Hasenfuss, G., Guan, K. (2012). Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. *Eur Heart J*, *12*, doi: 10.1093/eurheartj/ehs203.
- Sun, N., Yazawa, M., Liu, J., Han, L., Sanchez-Freie, V., Abilez, O. J., Navarrete, E. G., Hu, S., Wang, L., Lee, A., Pavlovic, A., Lin, S., Chen, R., Hajjar, R. J., Snyder, M. P., Dolmetsch, R. E., Butte, M. J., Ashley, E. A., Longaker, M. T., Robbins, R. C., and Wu, J. C. (2012). Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy. *Sci Transl Med* *4*(130), 130ra47.
- Swijnenburg R. J., Schrepfer, S., Cao, F., Pearl, J. I., Xie, X., Connolly, A. J., Robbins, R. C., Wu, J. C. (2008a). In vivo imaging of embryonic stem cells reveals patterns of survival and immune rejection following transplantation. *Stem Cells Dev* *17*, 1023-1029.
- Swijnenburg, R. J., Schrepfer, S., Govaert, J. A., Cao, F., Ransohoff, K., Sheikh, A. Y., Haddad, M., Connolly, A. J., Davis, M. M., Robbins, R. C., Wu, J. C. (2008b). Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 12991-12996.
- Swijnenburg, R. J., Tanaka, M., Vogel, H., Baker, J., Kofidis, T., Gunawan, F., Lebl, D. R., Caffarelli, A. D., de Bruin, J. L., Fedoseyeva, E. V., and Robbins, R. C. (2005). Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* *112*, 1166-172.
- Tabayoyong, W. B., Salas, J. G., Bonde, S., Zavazava, N. (2009). HOXB4-transduced embryonic stem cell-derived Lin-c-kit+and Lin-Sca-1+ hematopoietic progenitors express H60 and are targeted by NK cells. *J Immunol* *183*, 5449-5457.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.
- Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. (1989). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the Cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* *337*, 473-475.
- Takahashi, N., Seko, Y., Noiri, E., Tobe, K., Kadowaki, T., Sabe, H., and Yazaki, Y. (1999). Vascular endothelial growth factor induces activation and subcellular translocation of focal adhesion kinase (p125FAK) in cultured rat cardiac myocytes. *Circ Res* *84*, 1194-1202.

- Tang, C., Drukker, M. (2011). Potential barriers to therapeutics utilizing pluripotent cell derivatives: intrinsic immunogenicity of in vitro maintained and matured populations. *Semin Immunopathol* 33, 563-572.
- Tapia, N., Arauzo-Bravo, M. J., Ko, K., Schöler, H. R. (2011). Concise Review: Challenging the Pluripotency of Human Testis-Derived ESC-Like Cells. *Stem Cells* 29, 1165-1169.
- Tegelenbosch, R. A., and de Rooij, D. G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* 290, 193-200.
- Templin, C., Kotlarz, D., Faulhaber, J., Schnabel, S., Grote, K., Salguero, G., Luchtefeld, M., Hiller, K. H., Jakob, P., Naim, H. Y., *et al.* (2008). Ex vivo expanded hematopoietic progenitor cells improve cardiac function after myocardial infarction: role of beta-catenin transduction and cell dose. *J Mol Cell Cardiol* 45, 394-403.
- Templin, C., Lüscher, T. F., and Landmesser, U. (2011). Cell-based cardiovascular repair and regeneration in acute myocardial infarction and chronic ischemic cardiomyopathy - current status and future developments. *Int J Dev Biol* 55, 407-417.
- Tendera, M., Wojakowski, W., Ruzyllo, W., Chojnowska, L., Kepka, C., Tracz, W., Musialek, P., Piwowarska, W., Nessler, J., Buszman, P., *et al.* (2009). Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J* 30, 1313-1321.
- Terami, H., Hidaka, K., Katsumata, T., Iio, A., and Morisaki, T. (2004). Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 968-975.
- Teratani, T., Yamamoto, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Asari, A., Quinn, G., Sasaki, H., Terada, M., and Ochiya, T. (2005). Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology* 41, 836-846.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Tian, X., Woll, P. S., Morris, J. K., Linehan, J. L., Kaufman, D. S. (2006). Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity. *Stem Cells* 24, 1370-1380.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3, 778-784.

- Tseng, H. C., Arasteh, A., Paranjpe, A., Teruel, A., Yang, W., Behel, A., Alva, J. A., Walter, G., Head, C., Ishikawa, T. O., *et al.* (2010). Increased lysis of stem cells but not their differentiated cells by natural killer cells; de-differentiation or reprogramming activates NK cells. *PLoS One* 5, e11590.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8, 726-736.
- van Wijk, B., Moorman, A. F., and van den Hoff, M. J. (2007). Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovasc Res* 74, 244-255.
- Varga, A. C., and Wrana, J. L. (2005). The disparate role of BMP in stem cell biology. *Oncogene* 24, 5713-5721.
- Vegh, P., Winckler, J., and Melchers, F. (2010). Long-term "in vitro" proliferating mouse hematopoietic progenitor cell lines. *Immunol Lett* 130, 32-35.
- Vodyanik, M. A., Bork, J. A., Thomson, J. A., and Slukvin, II (2005). Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 105, 617-626.
- Wang, X., Hu, Q., Nakamura, Y., Lee, J., Zhang, G., From, A. H., and Zhang, J. (2006). The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* 24, 1779-1788.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.
- Wilson, E. M., Moainie, S. L., Baskin, J. M., Lowry, A. S., Deschamps, A. M., Mukherjee, R., Guy, T. S., St John-Sutton, M. G., Gorman, J. H. 3rd, Edmunds, L. H. Jr, Gorman, R. C., Spinale, F. G., (2003). Region-and type-specific induction of matrix metalloproteinases in postmyocardial infarction remodelling. *Circulation* 107, 2857-2863.
- Wobus, A. M., and Boheler, K. R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85, 635-678.
- Wobus, A. M., Holzhausen, H., Jakel, P., Schoneich, J. (1984). Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152, 212-219.
- Wobus, A. M., Wallukat, G., and 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, 173-182.
- Wollert, K. C., Meyer, G. P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., *et al.* (2004).

- Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364, 141-148.
- Woodroffe, R., Yao, G. L., Meads, C., Bayliss, S., Ready, A., Raftery, J., and Taylor, R. S. (2005). Clinical and cost-effectiveness of newer immunosuppressive regimens in renal transplantation: a systematic review and modelling study. *Health Technol Assess* 9, 1-179, iii-iv.
- Wu, D. C., Boyd, A. S., Wood, K. J. (2008). Embryonic stem cells and their differentiated derivatives have a fragile immune privilege but still represent novel targets of immune attack. *Stem Cells* 26, 1939-1950.
- Wu, S. M., Fujiwara, Y., Cibulsky, S. M., Clapham, D. E., Lien, C. L., Schultheiss, T. M., and Orkin, S. H. (2006). Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell* 127, 1137-1150.
- Xu, E. Y., Moore, F. L., Pera, R. A. (2001). A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7414-7419.
- Xue, T., Cho, H. C., Akar, F. G., Tsang, S. Y., Jones, S. P., Marban, E., Tomaselli, G. F., and Li, R. A. (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., and Nishikawa, S. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408, 92-96.
- Yang, L., Soonpaa, M. H., Adler, E. D., Roepke, T. K., Kattman, S. J., Kennedy, M., Henckaerts, E., Bonham, K., Abbott, G. W., Linden, R. M., *et al.* (2008). Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453, 524-528.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292.
- Yoon, Y. S., Wecker, A., Heyd, L., Park, J. S., Tkebuchava, T., Kusano, K., Hanley, A., Scadova, H., Qin, G., Cha, D. H., *et al.* (2005). Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 115, 326-338.
- Yoshida, S., Nabeshima, Y., Nakagawa, T. (2007). Stem cell heterogeneity: actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1120, 47-58.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced

- pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., and Lisheng, L. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364, 937-952.
- Zenke, G., Baumann, G., Wenger, R., Hiestand, P., Quesniaux, V., Andersen, E., and Schreier, M. H. (1993). Molecular mechanisms of immunosuppression by Ciclosporins. *Ann N Y Acad Sci* 685, 330-335.
- Zhang, W. J., Park, C., Arentson, E., and Choi, K. (2005). Modulation of hematopoietic and endothelial cell differentiation from mouse embryonic stem cells by different culture conditions. *Blood* 105, 111-114.
- Zhang, Y. M., Hartzell, C., Narlow, M., and Dudley, S. C., Jr. (2002). Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation* 106, 1294-1299.
- Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z., and Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474, 212-215.
- Zheng, K., Wu, X., Kaestner, K. H., Wang, P. J. (2009). The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Dev Biol* 9, 38.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381-384.
- Zimmermann, H. W., Melnychenko, I., Eschenhagen, T. (2006). Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials* 25(9), 1639-1647.

Internetadressen:

www.ciclosporin.autoimmun.de, Novartis Deutschland, aufgerufen am 07.08.2012

www.destatis.de, aufgerufen am 07.07.2012

www.dimdi.de, aufgerufen am 27.07.2012

www.uniklinik-ulm.de, aufgerufen am 07.08.2012

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Wienands und Herrn Prof. Dr. Nils Brose für ihre Bereitschaft und Interesse zur Betreuung meiner Promotion und der konstruktiven Kritik während der Entstehung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in der Abteilung Kardiologie/Pneumologie im Bereich der Stammzellforschung der UMG anfertigen zu dürfen.

PD Dr. Kaomei Guan-Schmidt danke ich für die Bereitstellung des Themas, die gute Betreuung und die freundliche Unterstützung während der letzten Jahre.

Bei Herrn Prof. Dr. Ralf Dressel möchte ich mich für die Unterstützung in den immunologischen Aspekten dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den gesamten Mitarbeitern des Stammzelllabors für die stets sehr gute, umfangreiche, nette und kollegiale Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Vor allem Katrin Streckfuß-Bömeke, Frieder Wolf, Anke Cierpka, Yvonne Hintz, Yvonne Wiegräfe und Sandra Georgi danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor und das freundschaftliche Arbeitsverhältnis. „Ohne Euch wäre vieles nicht möglich gewesen.“

Kirsten Koschel danke ich für die Durchführung der anfallenden echokardiografischen Analysen. Den Tierpflegern der ZTE gilt mein Dank für die Hilfe in der Betreuung der Versuchstiere.

Nadine Kramann und Carmen Kamps danke ich für die Unterstützung im Korrekturlesen und die vielen Anmerkungen und Ratschläge.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, ohne die ich es nicht bis hierhin geschafft hätte und auf deren Unterstützung ich immer zählen kann.

Vor allem möchte ich mich auch bei meinem Mann Jens bedanken. „Danke, dass Du immer für mich da bist.“