

**ENTWICKLUNG VON AUTOMATISIERTEN UND
SKALIERBAREN VERFAHREN ZUR
KULTIVIERUNG HUMANER EMBRYONALER
STAMMZELLEN**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von
Stefanie Terstegge
aus Rahden (Westf.)

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Oliver Brüstle
2. Referent: Prof. Dr. Michael Hoch

Tag der Promotion: 29. September 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2006

WE SHALL NOT CEASE FROM EXPLORATION.

AND THE END OF ALL OUR EXPLORING
WILL BE TO ARRIVE WHERE WE STARTED,
AND KNOW THE PLACE FOR THE FIRST TIME.

(T.S. ELIOT)

FÜR MEINE ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. EINLEITUNG	12
1.1 Stammzellen	13
1.1.1 Gewinnung embryonaler Stammzellen	15
1.1.2 Kennzeichen embryonaler Stammzellen	17
1.1.3 Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen	20
1.1.4 <i>In vitro</i> Differenzierung von ES Zellen.....	22
1.2 Zellkulturautomatisierung	24
1.3 Skalierbare Zellkulturverfahren	25
1.4 Ziel der Arbeit	28
1.4.1 Etablierung der humanen ES Zellkultur	28
1.4.2 Entwicklung eines automatisierten Systems zur Kultivierung humaner ES Zellen	28
1.4.3 Entwicklung eines skalierbaren Prozesses zur Kultivierung humaner ES Zellen	29
2. MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Allgemeines	30
2.2 Zelllinien	30
2.3 Besondere Systeme zur Zellkultivierung	31
2.3.1 Robotiksystem	31
2.3.2 Spinnersysteme	31
2.3.3 Microcarrier	33
2.4 Zellbiologische Methoden	34
2.4.1 Fibroblasten für die ES Zellkultur	34
2.4.1.1 Präparation primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)	34
2.4.1.2 Kultivierung primärer muriner embryonaler Fibroblasten.....	35
2.4.1.3 Kultivierung humaner Vorhaut-Fibroblasten	35
2.4.1.4 Mitotische Inaktivierung muriner embryonaler Fibroblasten und humaner Vorhaut- Fibroblasten durch γ -Bestrahlung	36
2.4.1.5 Auftauen mitotisch inaktivierter muriner embryonaler Fibroblasten und humaner Vorhaut- Fibroblasten.....	37

2.4.1.6 Gewinnung konditionierten Mediums von mitotisch inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten und humanen Vorhaut-Fibroblasten	37
2.4.2 Kultivierung humaner ES Zellen	38
2.4.2.1 Auftauen humaner ES Zellen	38
2.4.2.2 Passagieren humaner ES Zellen	39
2.4.2.3 Manuelles Entfernen differenzierter Kolonien aus humanen ES Zellkulturen	39
2.4.2.4 Feeder-freie Kultivierung humaner ES Zellen.....	40
2.4.2.5 Einfrieren humaner ES Zellen	40
2.4.2.6 <i>In vitro</i> Induktion der Multikeimblatt-Differenzierung humaner ES Zellen.....	40
2.4.2.7 Kultivierung humaner ES Zellen in Spinnersystemen	41
2.4.3 Kultivierung muriner ES Zellen	42
2.4.3.1 Auftauen muriner ES Zellen	42
2.4.3.2 Passagieren muriner ES Zellen	42
2.4.3.3 Einfrieren muriner ES Zellen	42
2.4.3.4 <i>In vitro</i> Induktion der Multikeimblatt-Differenzierung muriner ES Zellen.....	43
2.5 Analytische Methoden	43
2.5.1 Zellzahlbestimmung und Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate	43
2.5.1.1 Bestimmung der Zellviabilität	43
2.5.1.2 Bestimmung der Zellzahl in Microcarrierkulturen	43
2.5.1.3 Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate μ	44
2.5.2 Enzymatische Bestimmung von Glukose- und Laktat-Konzentrationen im Medium	45
2.5.3 Immunzytochemie	45
2.5.3.1 Allgemeines.....	45
2.5.3.2 Nachweis von Oberflächenantigenen in humanen ES Zellkulturen	45
2.5.3.3 Nachweis des Oberflächenantigens SSEA-1 in murinen ES Zellkulturen	46
2.5.3.4 Nachweis von Kernmarkern.....	46
2.5.3.5 Proliferationsassay bei humanen ES Zellkulturen.....	46
2.5.3.6 Analyse der Multikeimblattdifferenzierung humaner und muriner ES Zellen.....	47
2.5.3.7 Histochemischer Nachweis endogener alkalische Phosphatase-Aktivität	47
2.5.4 Durchflusszytometrie	48
2.5.5 RT-PCR-Analyse	49
2.5.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA	49
2.5.5.2 Reverse Transkription	49
2.5.5.3 Semi-quantitative PCR	50
2.5.5.4 Quantitative PCR	50
2.5.6 Karyotypisierung von humanen ES Zellen.....	51
2.5.7 Rasterelektronenmikroskopie	52
2.6 Statistische Analyse.....	52

3. ERGEBNISSE	54
3.1 Etablierung der humanen ES Zellkultur	54
3.2 Entwicklung eines automatisierten Systems für die ES Zellkultur	59
3.2.1 Konzeptionierung eines automatisierten Systems für die ES Zellkultur	59
3.2.2 Machbarkeitsstudie für den Einsatz eines automatisierten Systems in der ES Zellkultur	65
3.2.3 Langzeitkultivierung muriner und humaner ES Zellen in einem automatisierten System	70
3.2.4 Weiterentwicklung des automatisierten Systems für die ES Zellkultur	75
3.3 Entwicklung eines skalierbaren Prozesses zur Kultivierung humaner ES Zellen	77
3.3.1 Untersuchung konditionierter Medien aus Bioreaktor-basierten Prozessen	77
3.3.2 Evaluierung verschiedener Microcarrier für die humane ES Zellkultur	81
3.3.3 Kultivierung humaner ES Zellen in einem unkontrollierten, Microcarrier-basierten System	85
3.3.4 Implementierung eines kontrollierten Systems zur Microcarrier-basierten Expansion humaner ES Zellen	96
4. DISKUSSION	100
4.1 Etablierung der humanen ES Zellkultur	100
4.2 Entwicklung eines automatisierten Systems für die ES Zellkultur	102
4.3 Entwicklung eines skalierbaren Prozesses zur Kultivierung humaner ES Zellen	105
4.3.1 Suspensionskulturen embryonaler Stammzellen	105
4.3.2 Untersuchung konditionierter Medien aus Bioreaktor-basierten Prozessen	106
4.3.3 Microcarrier-basierte Kultivierung humaner ES Zellen	108
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	115
6. LITERATURVERZEICHNIS	117
7. DANKSAGUNG	127
8. ERKLÄRUNG	129
9. ANHÄNGE	130
9.1 Verbrauchsmaterialien	130
9.2 Geräte	131

9.3 Chemikalien	133
9.4 Primäre Antikörper	135
9.5 Sekundäre Antikörper	136
9.6 Primer	137
9.7 Lösungen.....	138
9.7.1 Lösungen für die Zellkultur.....	138
9.7.2 Lösungen für die Bakterienkultur.....	139
9.7.3 Lösungen für analytische Methoden	140
9.7.3.1 Zellzahlbestimmung.....	140
9.7.3.2 Immunzytochemie.....	140
9.7.3.3 RNA-Isolierung und PCR	140
9.7.3.4 Karyotypisierung	141
9.8 Lebenslauf.....	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	A lkalische P hosphatase
BMP	B one M orphogenetic P rotein
BrdU	5'- B romo-2'- D eoxyuridin
cDNA	copy D eoxyribonucleic A cid
BCM	in einem B ioreaktorprozess gewonnenes konditioniertes Medium (C onditioned M edium)
CM	C onditioned M edium
CP	C rossing P oint
Cy3	C yanin 3
Cy5	C yanin 5
DAPI	4',6- D iaminidin-2'- P henylindol-Dihydrochlorid
DEPC	D iethylpyrocarbonat
DMEM	D ulbecco's M odified E agle M edium
DMSO	D imethylsulfoxid
DNA	D eoxyribonucleic A cid
dNTP	D eoxy- N ukleotidtriphosphate
DTT	D ithiothreitol
EB	E mbryoid B ody
EDTA	E thylene- d iamine- t etraacetic a cid
EF	E mbryonaler F ibroblast
EPO	E rythropoietin
ES Zelle	E mbryonale S tammzelle
FCS	F etal C alf S erum
FGF-2	F ibroblast G rowth F actor 2
FITC	F luorescein- I sothiocyant
flt3-Ligand	F MS-like tyrosine kinase 3 - L igand
FSC	F orward S catter
GABA	G amma- A mino B utyric A cid
GAPDH	G lyceraldehyd-3- P hosphat- D ehydrogenase
GMP	G ood M anufacturing P ractice

gp130	Glycoprotein 130
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
hES Zelle	humane Embryonale Stammzelle
HFF	Human Foreskin Fibroblast
Id	Inhibitor of differentiation
JAK/STAT	Januskinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
kb	Kilo-Basen
Knockout-DMEM	Knockout- Dulbecco's Modified Eagle Medium
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
μ	spezifische Wachstumsrate
MCM	in Monolayer-Kulturen gewonnenes konditioniertes Medium (Conditioned Medium)
MEF	Muriner Embryonaler Fibroblast
mES Zelle	murine Embryonale Stammzelle
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
Oct-3/4	Octamer-binding Transcription Factor 3/4
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PTFE	Polytetrafluorethylen
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Rex-1	Reduced expression 1 protein
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkription
sl	Standardliter
Smad	Sma- and Mad-related protein
SR	Serum Replacement
SSC	Sideward Scatter
SSEA-1	Stage-specific Embryonic Antigen 1

SSEA-3	Stage-specific Embryonic Antigen 3
SSEA-4	Stage-specific Embryonic Antigen 4
STO	Sandos inbred mouse embryo derived thioguanine and ouabain resistant feeders
TAP	The Automation Partnership
TGF β	Tumor Growth Factor β
tPA	tissue Plasminogen Activator
Tra-1-60	Tumor-related Antigen 1-60
Tra-1-81	Tumor-related Antigen 1-81
UM	Unkonditioniertes Medium
Wnt	Wingless-type

1. EINLEITUNG

Die Zellkulturtechnologie schafft die Voraussetzungen für den großtechnischen oder klinischen Einsatz zahlreicher biotechnologischer Entwicklungen. So sind klassische biotechnologische Prozesse wie die Abwasserklärung oder das Bierbrauen im kommerziellen Maßstab auch Paradebeispiele für das Heraufskalieren von Zellkulturanwendungen bis in den 100m^3 Maßstab (Meier et al., 2005). In der pharmazeutischen Industrie sind die Herstellungsprozesse für rekombinantes tPA, EPO und Koagulationsfaktor VIII nur einige Beispiele für den Einsatz von Zellkulturen zur Produktion klinisch zugelassener Erzeugnisse (Kretzmer, 2002).

Darüber hinausgehende Bedeutung gewinnt die Zellkulturtechnologie, wenn das Produkt nicht ein Protein oder ein anderer Zellbestandteil, sondern eine lebende Säugorzelle selbst ist. Da hergebrachte Methoden zur Aufreinigung und Sterilisation in diesem Fall nicht ohne weiteres anwendbar sind, muss ein entsprechendes Verfahren höchsten Ansprüchen auf den Gebieten Standardisierung, Validierung und Qualitätssicherung genügen. Darüber hinaus erfordert die Kultivierung von Säugorzellen im großen Maßstab ein besonderes Verständnis der zellulären Prozesse sowie eine komplexe Kontrolle der Kultivierungsparameter (Meier et al., 2005). Vor diesem Hintergrund wird evident, dass die Gewinnung und der Einsatz Stammzell-basierter Produkte nicht nur von biologischen Differenzierungsverfahren, sondern in hohem Maße auch von der Verfügbarkeit geeigneter Produktionstechnologien abhängig sind.

1.1 Stammzellen

Stammzellen stellen eine maßgebliche Grundlage sowohl für die Entwicklung von Geweben und Organen als auch für die Regenerationsfähigkeit zahlreicher Organe dar. Eine Stammzelle definiert sich zum einen durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung (self-renewal). Selbsterneuerung kann über asymmetrische Zellteilung (Generierung einer Tochterzelle mit Stammzeleigenschaften sowie einer differenzierten Tochterzelle) oder symmetrische Zellteilung (das Hervorbringen zweier Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften) erfolgen (Molofsky et al., 2004). Die symmetrische Teilung einer Stammzelle kann jedoch auch in zwei differenzierten Tochterzellen und damit dem Verlust des Selbsterneuerungspotentials resultieren (Abb. 1.1.1).

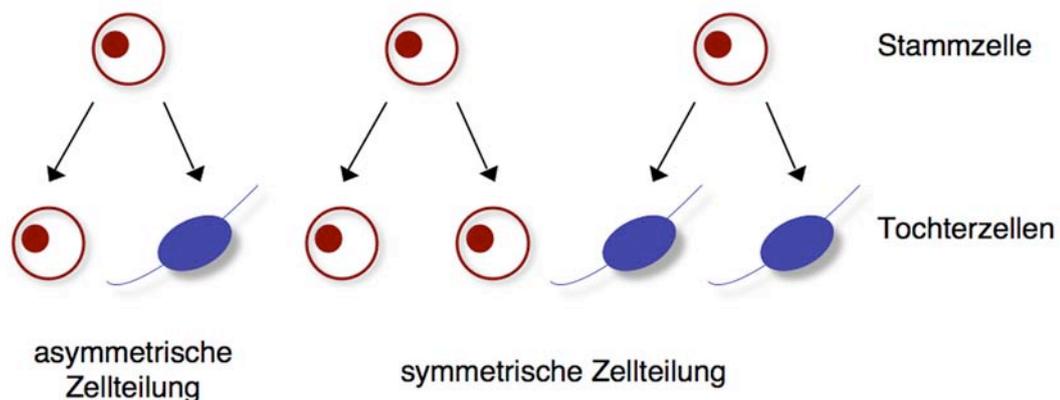


Abb. 1.1.1 Selbsterneuerung von Stammzellen. Stammzellen besitzen zwei Zellteilungsmodi, die asymmetrische und die symmetrische Teilung. Aus der asymmetrischen Zellteilung gehen eine Stammzelle sowie eine differenzierte Tochterzelle hervor. Die symmetrische Zellteilung kann in zwei Stammzellen resultieren. Das Selbsterneuerungspotential geht verloren, wenn die symmetrische Teilung zwei differenzierte Tochterzellen hervorbringt.

Das zweite entscheidende Kennzeichen einer Stammzelle ist ihre Befähigung zur Differenzierung. Besitzt eine Zelle das Potential, auf der Grundlage von Selbsterneuerung und Differenzierung einen vollständigen Organismus hervorzubringen, so wird sie als totipotent bezeichnet. Dies trifft auf die Zygote und die Blastomere zu. Im Vergleich hierzu ist eine pluripotente Stammzelle ausschließlich dazu in der Lage, in Zellen aller drei Keimblätter, ergo in alle somatischen Zelltypen, zu differenzieren (Abb. 1.1.2).

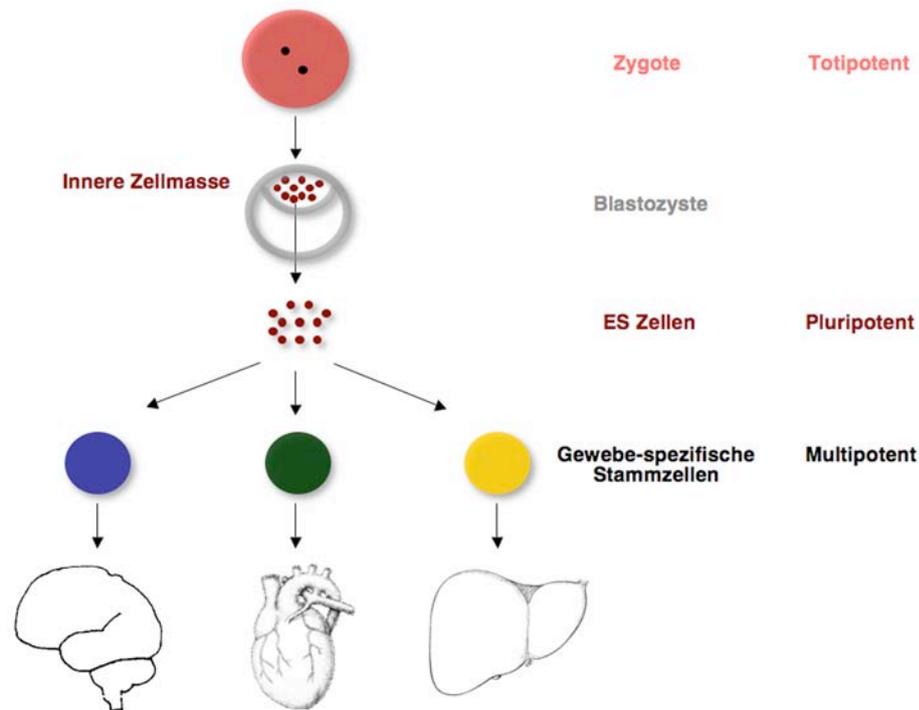


Abb. 1.1.2 Stammzellhierarchie. Stammzellen unterscheiden sich in ihrem Differenzierungspotential. Während totipotente Zellen dazu in der Lage sind, einen vollständigen Organismus hervorzubringen, können pluripotente Zellen noch in alle somatischen Zelltypen differenzieren. Multipotente Zellen besitzen die Fähigkeit, sich zu verschiedenen Zelltypen eines Keimblatts zu entwickeln.

Noch weiter eingeschränkt ist das Differenzierungspotential multipotenter Zellen. Diese somatischen Stammzellen können in Zelltypen des Keimblatts, dem sie selbst zugehören, differenzieren. Sie residieren in zahlreichen adulten Geweben und gewährleisten dort den Grundumsatz an differenzierten Zellen. Neben einer eingeschränkten Differenzierungsfähigkeit besitzen somatische Stammzellen auch ein begrenztes Selbsterneuerungspotential. Nichtsdestotrotz findet dieser Stammzelltyp bereits seit Jahrzehnten klinische Anwendungen (z. B. bei der Knochenmarkstransplantation). In jüngerer Zeit wurde wiederholt das Dogma, dass somatische Stammzellen in ihrer Differenzierung die Keimblattgrenze nicht überschreiten können, in Frage gestellt (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). Zumindest ein Teil der nach Transplantation solcher Stammzellen beobachteten Transdifferenzierungsphänomene lässt sich jedoch auf deren Fusion mit residenten Körperzellen zurückführen (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). Wie groß die Plastizität somatischer Stammzellen tatsächlich ist, ist zur Zeit noch nicht abschließend geklärt.

Embryonale Stammzellen (ES Zellen) hingegen sind nachweislich pluripotent (Bradley et al., 1984). Sie verfügen zudem über ein höheres Selbsterneuerungs-

potential als somatische Stammzellen und sind leicht für genetische Veränderungen zugänglich. Erstmals 1981 aus der Maus isoliert (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981), liegen ES Zellen heute aus einer Reihe von Spezies vor (Graves und Moreadith, 1993; Iannaccone et al., 1994; Pain et al., 1996; Thomson et al., 1995; Wheeler, 1994). Die Gewinnung humaner ES Zellen durch James A. Thomson (Thomson et al., 1998) im Jahre 1998 stellte einen ersten Durchbruch auf dem Weg zum Einsatz embryonaler Stammzellen in der pharmakologischen Forschung und Entwicklung und der Klinik dar.

1.1.1 Gewinnung embryonaler Stammzellen

Die klassische Isolierung von ES Zellen erfolgt aus der präimplantierten Blastozyste. Beim Menschen entspricht dieses Stadium etwa Tag 5 der Embryonalentwicklung. Zu diesem Zeitpunkt hat das erste Differenzierungsereignis der Embryonalentwicklung bereits stattgefunden, die Blastozyste besteht aus zwei Zelltypen: der Inneren Zellmasse sowie den Trophoblast-Zellen. Während der Trophoblast im Laufe der weiteren Entwicklung das Chorion - den embryonalen Teil der Plazenta - bildet, entsteht aus der Inneren Zellmasse der eigentliche Embryo (Gilbert, 2003) (Abb. 1.1.3).

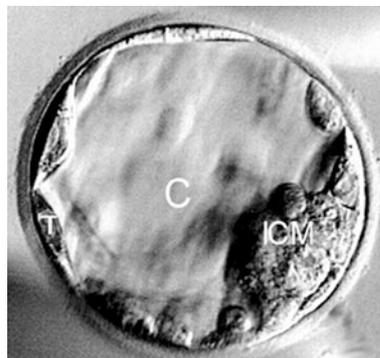


Abb. 1.1.3 Menschliche Blastozyste an Tag 5 der Embryonalentwicklung. Embryonale Stammzellen werden aus der Blastozyste gewonnen. Diese besteht aus der Inneren Zellmasse (inner cell mass, ICM), dem Trophoblast (T) sowie dem Flüssigkeits-gefüllten Blastocoel (C). Während der Trophoblast später den embryonalen Teil der Plazenta bilden wird, entwickelt sich die Innere Zellmasse zum Embryo selbst. Die Innere Zellmasse ist auch der eigentliche Ursprung der ES Zellen.

Bildquelle: <http://www.advancedfertility.com/blastocystimages.htm>

Die Innere Zellmasse ist somit pluripotent; aus ihr allein kann sich kein lebensfähiger Organismus entwickeln, sie ist jedoch der Ursprung aller somatischen Gewebe. Aus

der Inneren Zellmasse, die zu diesem Zeitpunkt aus 30 bis 34 Zellen (Department of Health and Human Services, 2001) besteht, werden die ebenfalls pluripotenten ES Zellen gewonnen. Zu diesem Zweck wird die Blastozyste der sog. Immunosurgery („Immunchirurgie“) (Solter und Knowles, 1975) unterzogen. Durch Komplement-abhängige Antikörper-Zytotoxizität wird hierbei der Trophoblast lysiert, so dass die Innere Zellmasse isoliert und in Kultur genommen werden kann. Die Kultivierung der Inneren Zellmasse erfolgt in Gegenwart sog. Feeder-Zellen, meist primärer embryonaler Fibroblasten der Maus, die über die Sekretion von Wachstumsfaktoren und den Zell-Zell-Kontakt das Überleben und die Proliferation der Inneren Zellmasse ermöglichen. Über Passagierung des Auswuchses der Inneren Zellmasse kann schließlich eine ES Zelllinie gewonnen werden (Thomson et al., 1998) (Abb. 1.1.4).

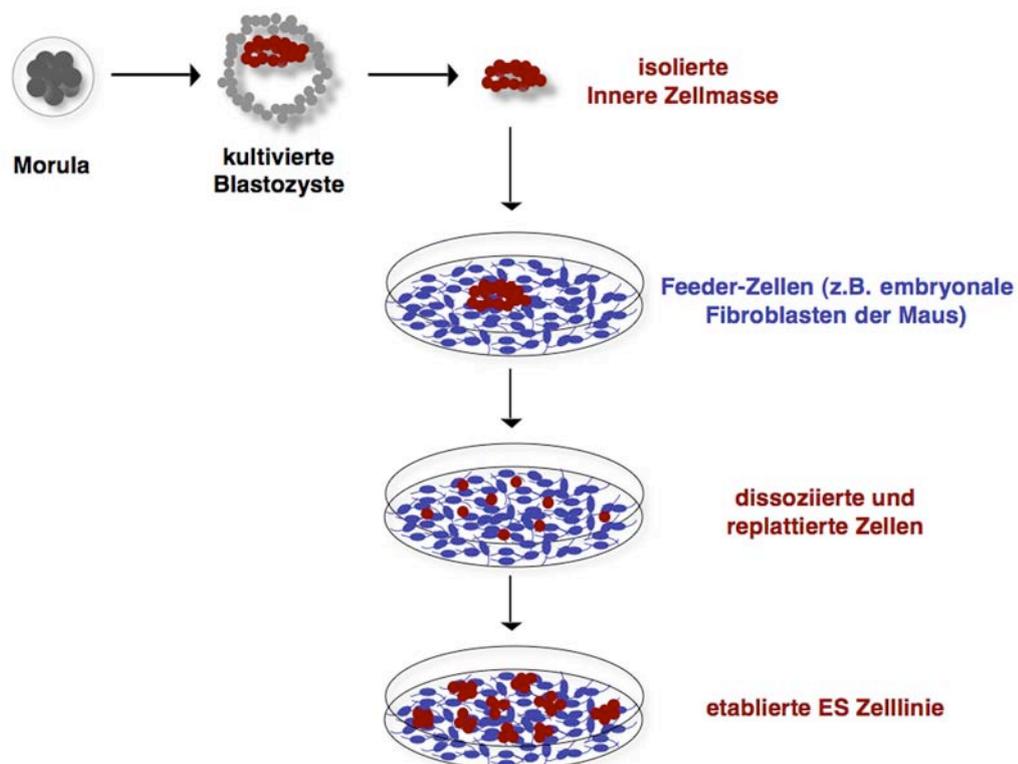


Abb. 1.1.4 Gewinnung embryonaler Stammzellen. Zur Gewinnung embryonaler Stammzellen wird zunächst die Innere Zellmasse einer Blastozyste durch Immunosurgery isoliert. Die Innere Zellmasse wird in Gegenwart mitotisch inaktiver Feeder-Zellen kultiviert. Gelingt es im Folgenden, die Zellen zu replattieren, so wurde eine neue ES Zelllinie etabliert.

Adaptiert nach: Department of Health and Human Services, 2001

Aus unterschiedlichen Gründen werden Anstrengungen unternommen, das klassische Verfahren zur ES Zell-Gewinnung zu modifizieren. Zum einen führt die hier beschriebene Methodik unweigerlich zur Zerstörung des Embryos. Dies könnte

vermieden werden, entnähme man dem Embryo, wie bei der Präimplantationsdiagnostik üblich, im 8-Zell-Stadium eine Blastomere. Arbeiten an der Maus konnten zeigen, dass sich auch aus einer einzelnen Blastomere ES Zell-ähnliche Zelllinien ableiten lassen (Chung et al., 2005). Des Weiteren bringt der klassische Ansatz zur ES Zell-Gewinnung die Innere Zellmasse in Kontakt mit undefinierten tierischen Substanzen. Dies würde ein Ausschlusskriterium für die klinische Zulassung von ES Zell-Produkten darstellen. Aus diesem Grund wurden bereits Verfahren entwickelt, die auf die Immunosurgery und damit auf den Kontakt zu tierischem Komplement vollständig verzichten können, indem die Innere Zellmasse durch Mikromanipulation isoliert wird (Kim et al., 2005). Um auf tierische Feeder-Zellen bei der Gewinnung humaner ES Zellen zu verzichten, wurden zunächst menschliche Feeder-Zellen verwendet (Inzunza et al., 2005). Mittlerweile konnte auch ein vollständig definiertes Medium entwickelt werden, mit dem es gelang, humane ES Zellen in Abwesenheit tierischer Zellen und tierischer Medienbestandteile abzuleiten (Ludwig et al., 2006).

1.1.2 Kennzeichen embryonaler Stammzellen

Die für ES Zellen charakteristische Pluripotenz lässt sich über die Präsenz einer Reihe von Markern auf Protein- und RNA-Ebene sowie über funktionelle Untersuchungen nachweisen (Tab. 1.1.1). ES Zellen unterschiedlicher Spezies gemein ist ihre Fähigkeit, in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren zu können. Dies lässt sich *in vitro* über die Bildung sogenannter Embryoidkörper (embryoid bodies, EBs) funktionell untersuchen. Werden ES Zellen in Suspensionskultur gebracht, so löst dies die spontane Aggregation zu EBs aus. Innerhalb des EBs findet im Folgenden eine Differenzierung statt, die die ersten Differenzierungsschritte der Inneren Zellmasse *in vivo* rekapituliert. So bildet sich in der Peripherie des EBs zunächst primitives Entoderm aus. Dies induziert in benachbarten ES Zellen die Differenzierung zu primitivem ektodermalem Epithel. Im Folgenden führt programmierter Zelltod epithelialer Zellen zur Kavitation des EBs (Murray und Edgar, 2004). Im Laufe dieses Differenzierungsprozesses entstehen in den EBs Zellen des Ektoderms, des Mesoderms sowie des Entoderms, die über immunhistologische Verfahren detektiert werden können.

Marker	Markertyp	Murine ES Zellen	Humane ES Zellen
SSEA-1	Protein	+	-
SSEA-3	Protein	-	+
SSEA-4	Protein	-	+
Tra-1-60	Protein	-	+
Tra-1-81	Protein	-	+
Alkalische Phosphatase-Aktivität	funktionell	+	+
Telomerase-Aktivität	funktionell / mRNA	+	+
Oct-3/4	Protein / mRNA	+	+
Nanog	Protein / mRNA	+	+
Rex-1	mRNA	+	+
Wachstum in vitro	morphologisch	kompakte, dreidimensionale, deutlich abgegrenzte Kolonien	flache, deutlich abgegrenzte Kolonien
EB-Bildung	funktionell	+	+
Teratom-Bildung	funktionell	+	+
Chimären-Bildung	funktionell	+	/

Tab. 1.1.1 Charakterisierung embryonaler Stammzellen.

Adaptiert nach: Department of Health and Human Services, 2001.

In vivo kann die Pluripotenz von ES Zellen über die Bildung von Teratomen belegt werden: Die Transplantation von ES Zellen in einen Empfängerorganismus führt zur Entstehung von zumeist gutartigen Tumoren, die Zellen aller drei Keimblätter enthalten (Evans und Kaufman, 1981). Der endgültige Beweis für die Pluripotenz einer ES Zelle besteht darin, dass die Nachkommenschaft der Zelle nach Blastozysteninjektion an allen Geweben des entstehenden Embryos partizipiert (Bradley et al., 1984). Dieser Beweis lässt sich aus offensichtlichen ethischen Gründen für menschliche ES Zellen jedoch nicht führen.

Neben den hier beschriebenen funktionellen Nachweisen kann die Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker als starkes Indiz für die Pluripotenz einer Zelle gelten. Hierzu zählen die Transkriptionsfaktoren Oct-4 (Okamoto et al., 1990), Nanog (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003) und Rex-1 (Rogers et al., 1991) sowie die Oberflächenantigene SSEA-1 (Solter und Knowles, 1978), SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 und Tra-1-81 (Henderson et al., 2002). Starke alkalische Phosphatase- (AP) sowie Telomerase-Aktivität (Thomson et al., 1998) gehören ebenfalls zu den Kennzeichen pluripotenter Zellen. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass es Spezies-spezifische Unterschiede in der Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker gibt. So ist SSEA-1 ein Marker für die Pluripotenz muriner ES Zellen, tritt jedoch im Gegensatz dazu beim Menschen nur in differenzierten Zellen auf (Thomson et al., 1998) (s. Tab. 1.1.1).

Morphologische Kriterien können erste Anhaltspunkte für die Qualität einer ES-Zellkultur geben. Auch die Morphologie von ES Zellkolonien ist Spezies-abhängig (Abb. 1.1.5). Während murine ES Zellen in von der Umgebung stark abgegrenzten, sehr kompakten und dreidimensionalen Kolonien wachsen, bilden humane ES Zellen zwar auch deutlich umgrenzte Kolonien, die jedoch flach und wesentlich weniger kompakt sind. Anzeichen von Differenzierungsvorgängen in der Kultur sind ein Verlust der scharfen Abgrenzung der Kolonie nach außen sowie die Bildung von Lücken oder Strukturen im Inneren der Kolonie.

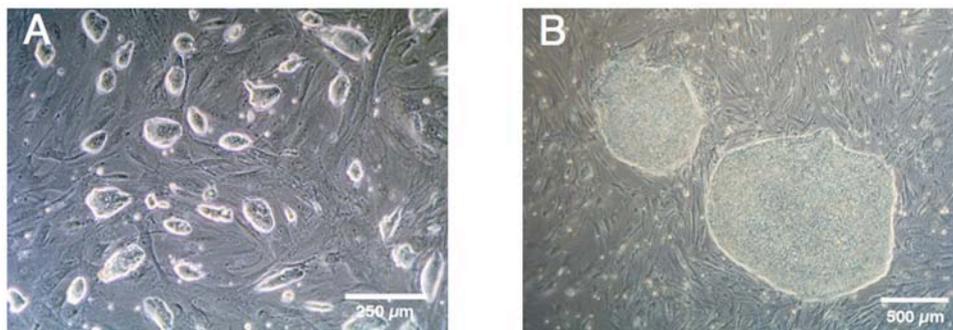


Abb. 1.1.5 ES Zellkolonien. Während murine ES Zellkolonien (A) klein, kompakt und von ihrer Umgebung sehr deutlich abgegrenzt sind, sind humane ES Zellkolonien (B) sehr viel flacher und weniger kompakt.

1.1.3 Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen

Die Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen in der Gegenwart von Feeder-Zellen, Serum und leukemia inhibitory factor (LIF) ist ausreichend, um den undifferenzierten Status der ES Zellen aufrechtzuerhalten (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Bei humanen ES Zellen treten unter diesen Kulturbedingungen jedoch spontane Differenzierungsphänomene auf. Standardkultivierungsmethoden für humane ES Zellen sind zur Zeit die Kokultivierung mit murinen (Thomson et al., 1998) oder humanen (Amit et al., 2003) Fibroblasten in der Gegenwart von Serum (Thomson et al., 1998) oder Serumersatz (Serum Replacement[®], Invitrogen; Amit et al., 2000) und unter Zugabe von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2). Vielfach verwendet wird auch Fibroblasten-konditioniertes Medium anstelle der direkten Kokultur (Xu et al., 2001). Die hier beschriebenen Kultivierungsverfahren für humane ES Zellen erfordern jedoch ein regelmäßiges manuelles Entfernen differenzierter Kolonien. Kürzlich wurde ein definiertes Kulturmedium entwickelt, das nicht nur zur Gewinnung humaner ES Zelllinien, sondern auch zur Kultivierung bestehender humaner ES Zelllinien eingesetzt werden konnte. Dieses Medium ist frei von tierischen Bestandteilen und ermöglicht eine Feeder-freie Kultur (Ludwig et al., 2006).

An der Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von ES Zellen sind eine Reihe von Signalwegen beteiligt. Dies verwundert nicht, da der Selbsterneuerungsprozess sich aus zwei Komponenten zusammensetzt: Proliferation und Erhaltung des undifferenzierten Zustands (Molofsky et al., 2004). Sowohl bei der Selbsterneuerung muriner als auch humaner ES Zellen spielen der POU-Domänen Transkriptionsfaktor Oct-4 (Okamoto et al., 1990) und das Homöodomänen-Protein Nanog (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003) eine entscheidende Rolle. Ein für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von murinen ES Zellen grundlegender Signalweg ist der JAK/STAT-Pathway. Über die Bindung an das Heterodimer LIF-Rezeptor/gp130 aktiviert LIF, ein Mitglied der Interleukin 6-Cytokinfamilie, über Stat3-Aktivierung die Selbsterneuerung von ES Zellen der Maus und unterdrückt die Differenzierung in Entoderm und Mesoderm (Niwa et al., 1998). Trotz eines funktionellen Stat3-Signalwegs (Daheron et al., 2004) hat LIF diesen Effekt jedoch nicht auf humane ES Zellen. Unterschiedliche Funktionen von gp130 während der Entwicklung von Mensch und

Maus können diese Divergenz erklären. So ist gp130 bei der Maus für die Diapause verantwortlich (Nichols et al., 2001). In der Abwesenheit von Serum reicht jedoch LIF auch bei murinen ES Zellen nicht für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung aus. Vielmehr ist ein zweiter Signalweg nötig, um eine neurale Differenzierung der ES Zellen zu verhindern (Abb. 1.1.6). Hierbei handelt es sich um die Induktion von Id (Inhibitor of differentiation) durch bone morphogenetic protein (BMP) über den Smad-Pathway (Ying et al., 2003a).

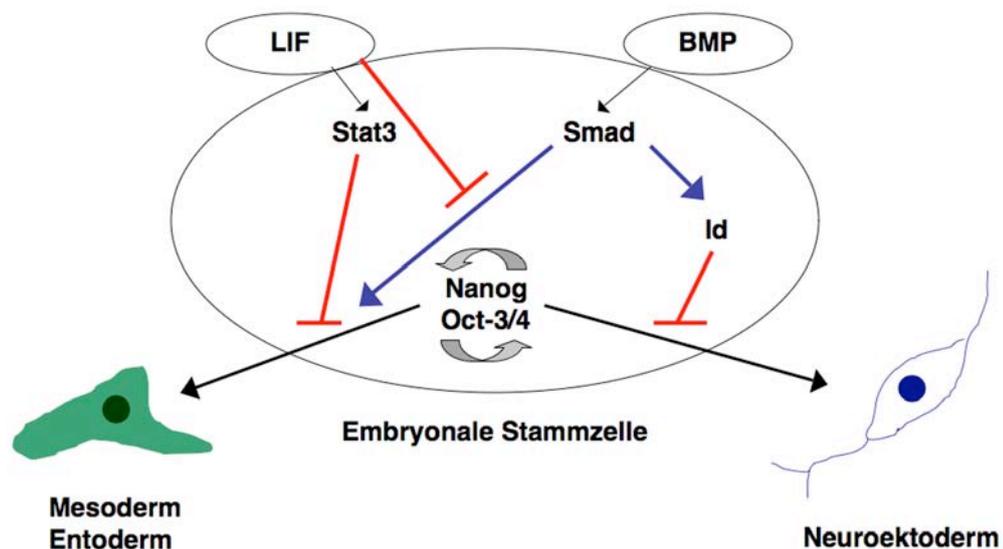


Abb. 1.1.6 Selbsterneuerung muriner ES Zellen. Die Transkriptionsfaktoren Oct-3/4 und Nanog regulieren die Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen. Über Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs inhibiert LIF die Differenzierung in Meso- und Entoderm. BMP-vermittelte Induktion des Smad-Signalwegs führt zu einer Inhibition der Differenzierung in neuroektodermale Zellen.
Adaptiert nach: Ying et al., 2003a

Wiederum zeigen sich hier Spezies-spezifische Unterschiede, denn bei humanen ES Zellen induzieren BMPs die Differenzierung in Trophoblast-Zellen (Xu et al., 2002). Für humane ES Zellen konnte gezeigt werden, dass in der Anwesenheit von FGF-2 und des BMP-Antagonisten Noggin eine Proliferation im undifferenzierten Zustand erreicht werden kann (Xu et al., 2005b). Weitere Arbeiten postulieren, dass FGF-2 allein ausreichend ist, um das Selbsterneuerungspotential humaner ES Zellen aufrechtzuerhalten (Levenstein et al., 2005; Xu et al., 2005a), während andere Autoren auf eine entscheidende Funktion des Wnt-Signalwegs hinweisen (Sato et al., 2004). Eine vollständige Aufklärung der molekularen Mechanismen der Selbsterneuerung insbesondere humaner ES Zellen steht somit noch aus.

1.1.4 *In vitro* Differenzierung von ES Zellen

Ihre praktisch unbegrenzte Vermehrbarkeit *in vitro* und ihre Pluripotenz machen ES Zellen zu vielversprechenden Kandidaten als Donorzellen für die regenerative Medizin. Verschiedene Methoden werden eingesetzt, um differenzierte ES Zell-abgeleitete Populationen zu gewinnen. Hierzu zählen die Bildung von EBs (Keller, 1995), die Kokultur mit anderen Zelllinien (Barberi et al., 2003) und die adhärenente Konversion (Ying et al., 2003b). Mittels dieser Verfahren gewonnene Vorläuferzellen können über die sequentielle Gabe von Wachstumsfaktoren gerichtet weiterdifferenziert werden (Brüstle et al., 1999) oder mit Hilfe eines selektierbaren Markers aufgereinigt werden (Klug et al., 1996) (Abb. 1.1.7).

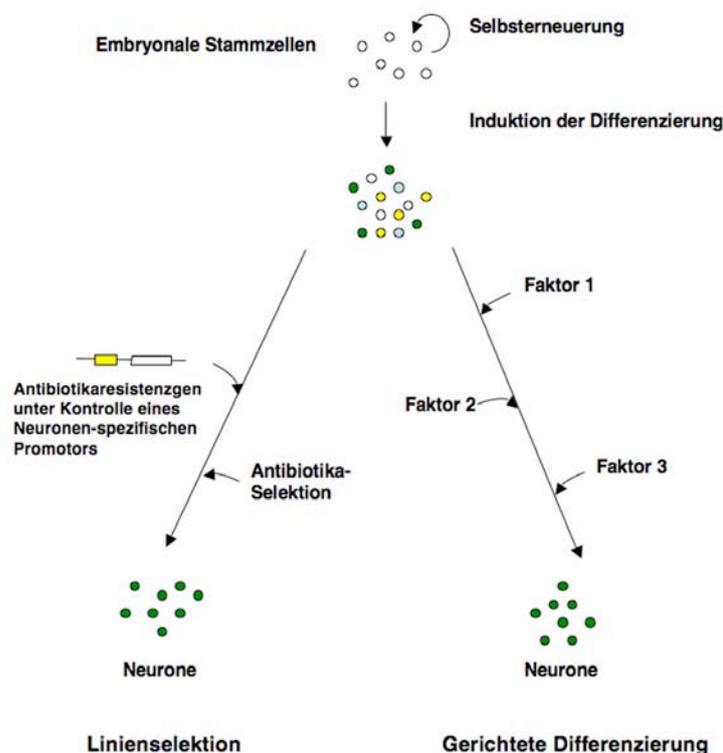


Abb. 1.1.7 *In vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen. Aufgereinigte ES Zell-abgeleitete somatische Zellpopulationen können über Verfahren der Linienselektion oder der gerichteten Differenzierung gewonnen werden.

Differenzierte Zellen aller drei Keimblätter können über die hier angedeuteten Methoden in variierender Reinheit aus ES Zellen gewonnen werden (Keller, 2005). Sehr hohe Aufreinigungen konnten dabei für aus ES Zellen der Maus abgeleitete Oligodendrozyten (Glaser et al., 2005) und Cardiomyozyten (Klug et al., 1996) erreicht werden. Nach Transplantation ES Zell-abgeleiteter glialer Vorläufer in das

Gehirn Myelin-defizienter Ratten konnte eine Myelinbildung festgestellt werden (Brüstle et al., 1999), und die Transplantation aus ES Zellen gewonnener Insulin-produzierender Zellen in diabetische Mäuse resultierte in einer Normalisierung der Glykämie (Leon-Quinto et al., 2004). In einigen Studien wurde die funktionelle Integration ES Zell-abgeleiteter Neurone in das Wirtsgewebe nachgewiesen (Benninger et al., 2003; Wernig et al., 2004).

Auch aus humanen ES Zellen konnten bereits klinisch relevante somatische Zellpopulationen gewonnen werden. Als Beispiele seien hier Neurone (Zhang et al., 2001), Kardiomyozyten (Kehat et al., 2004) sowie Insulin-produzierende Zellen (Assady et al., 2001) genannt. Vielfach erreichen die entwickelten Ansätze zur gerichteten Differenzierung humaner ES Zellen jedoch noch nicht die Effizienzen und Reinheiten, die für einen Einsatz ES Zell-abgeleiteter Zellen als Zellersatz nötig wären. Im Hinblick auf dieses Fernziel sind zudem genauere Untersuchungen zur Funktionalität und Integration ES Zell-abgeleiteter Zellen in das Wirtsgewebe eine unumgängliche Voraussetzung. Auch definierte Kulturbedingungen, die vollständig auf tierische Produkte verzichten, müssen entwickelt werden, bevor an eine klinische Zulassung ES Zell-abgeleiteten Zellersatzes zu denken ist.

Mittelfristig jedoch eröffnen humane ES Zellen und ihre Derivate bereits faszinierende Perspektiven für die Forschung und Entwicklung der pharmazeutischen Industrie. Ihre Vermehrbarkeit und Pluripotenz machen humane Zellpopulationen im großen Maßstab verfügbar, die bislang, wie etwa Neurone, kaum zugänglich waren. Dies könnte die Grundlage für eine Revolution im pharmakologischen und toxikologischen Screening darstellen, das bislang auf immortalisierte Zelllinien und Tiermodelle angewiesen ist. Neben der Tatsache, dass humane Zellen hier das direktere Modell darstellen, besitzen ES Zellen das Atout einer ausgezeichneten Zugänglichkeit für genetische Veränderungen. Dies ist eine entscheidende Grundlage für das Design leicht auslesbarer Zell-basierter Assays. Weiterhin erlaubt es die Gewinnung krankheitsspezifischer humaner ES Zelllinien (Verlinsky et al., 2005), vollkommen neuartige, unmittelbare Krankheitsmodelle auf Zellebene zu generieren.

1.2 Zellkulturautomatisierung

Ein Einsatz ES Zell-abgeleiteter Zellen im pharmakologischen und toxikologischen Screening setzt ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Standardisierung in der Gewinnung der entsprechenden Zellpopulationen voraus. Bereits die Kultur undifferenzierter humaner ES Zellen stellt ein extrem fragiles und komplexes System dar, das durch geringe Abweichungen in den Kulturbedingungen stark beeinflusst werden kann. Hierzu zählen Variationen in den Medienkomponenten ebenso wie Schwankungen in der Qualität der Feederzellen und die individuelle Vorgehensweise des Zellkulturanwenders. Bereits banal erscheinende Faktoren wie die Öffnungsdauer des Brutschranks, die zu Schwankungen in Temperatur und pH-Wert des Mediums (Lo et al., 1994) führen kann, oder die Dauer der Phase des Trockenstehens der Zellen beim Mediumwechsel können Auswirkungen auf die Qualität der humanen ES Zellkultur zeigen. Insbesondere interindividuelle Variationen in der Zellkulturtechnik können einen Einfluss auf Wachstumsverhalten und Pluripotenz humaner ES Zellen haben. Ein Beispiel hierfür sind unterschiedliche Strategien bei der Passagierung humaner ES Zellen in Form kleiner Aggregate. Umso deutlicher sind die Auswirkungen von Variationen während des Ablaufs komplexer mehrstufiger Differenzierungsprotokolle.

Eine zuverlässige Standardisierung der humanen ES Zellkultur und -differenzierung kann insbesondere durch eine Automatisierung der Prozesse erreicht werden. Während zahlreiche molekularbiologische Anwendungen wie DNA-Isolierung, PCR und Proteinkristallisation bereits erfolgreich automatisiert wurden, ist die Automatisierung von Zellkulturen lange vernachlässigt worden. So existieren zwar in der pharmazeutischen Industrie Systeme für die Durchführung Zell-basierter Assays. Die Aufrechterhaltung von Zellkulturen über einen längeren Zeitraum hinweg, was Mediumwechsel und Passagierung einschließt, wurde jedoch als nicht oder nur schwer automatisierbar eingestuft. Als entscheidende Faktoren für die Zurückhaltung auf diesem Gebiet sind die Gefahr bakterieller Kontaminationen, die Notwendigkeit einer flexiblen Reaktion auf den Zustand der Zellkultur und die vielfach vorherrschende irrationale Ansicht, man müsse „ein Gefühl“ für die Zellkultur besitzen, anzusehen.

1.3 Skalierbare Zellkulturverfahren

Die Entwicklung eines automatisierten Zellkultursystems, das Anleihen bei der konventionellen manuellen Zellkultur nimmt, eröffnet den Vorteil, Zellkulturen unter weitestgehender Beibehaltung einer bewährten Methodik standardisiert vermehren zu können. Ein solches parallelisiertes System besitzt jedoch deutliche Limitierungen, wenn es das Ziel ist, große Zellzahlen zu produzieren. Zum einen ist die Kapazität des Systems im Sinne von räumlicher und zeitlicher Auslastung begrenzt. Zudem bringt die Kultivierung von Zellen in Zellkulturschalen oder -flaschen eine inhärente Variabilität zwischen den einzelnen Ansätzen, sprich Zellkulturschalen, mit sich, die sich durch ansatzweise Passagierung weiter propagiert. Selbst innerhalb einer Zellkulturschale liegen an unterschiedlichen Positionen andere Mikroumgebungen vor (Castilho und Medronho, 2002).

Um humane ES Zellen zur Gewinnung von Zell-basierten Produkten für Zellersatz und Screening einsetzen zu können, müssen ausreichende Zellzahlen an möglichst homogenen, pluripotenten ES Zellen als Ausgangsmaterial bereitgestellt werden. Dabei ist zu bedenken, dass zunächst kleinere Zellzahlen für proof-of-concept Studien benötigt werden, bei Erfolg dieser Studien jedoch mit einer wachsenden Nachfrage zu rechnen ist. Als ideale Lösung wäre somit ein skalierbares System anzusehen.

Für die Kultivierung von Säugerzellen kommen zwei Typen skalierbarer Systeme in Betracht: Rührkesselreaktoren und Festbettreaktoren (Abb. 1.3.1). Da humane ES Zellen adhärent wachsende Zellen sind, wäre ein Festbettreaktor wie das Hohlfasermodule eine nahe liegende Wahl. Bei diesem System wachsen die Zellen adhärent auf der Außenseite von Hohlfasern, während das Medium das Innere der Hohlfasern durchströmt. Ein Festbettreaktor ist jedoch in erster Linie dafür geeignet, ein sekretiertes Produkt herzustellen. Die Ernte von Zellen als Produkt erweist sich dagegen als eher schwierig. Zudem treten bei der Besiedlung des Reaktors zwangsläufig Inhomogenitäten in der Zellverteilung auf, und Konzentrationsgradienten in Strömungsrichtung des Mediums sind nicht zu vermeiden. Eine Skalierung ist bei diesem Prinzip nur begrenzt möglich (Chmiel, 1991).

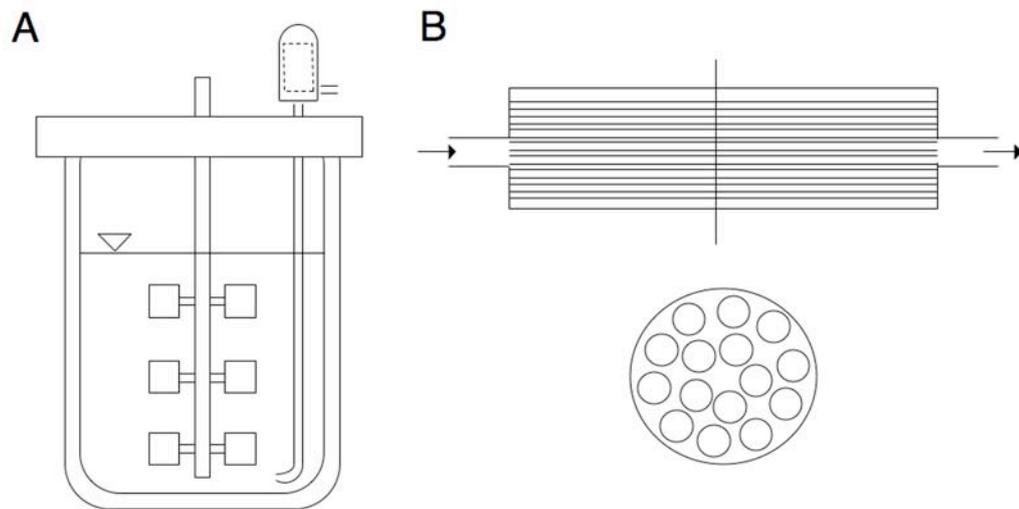


Abb. 1.3.1 Reaktoren zur Kultivierung von Tierzellen. Tierische Zellen können in klassischen Rührkesselreaktoren (A) kultiviert werden. In einem solchen System befinden sich die Zellen in Suspension. Für adhärent wachsende Zellen kommen auch Festbettreaktoren wie das Hohlfasermodul (B, Längs- und Querschnitt) in Frage. In einem Hohlfasermodul wachsen die Zellen auf von Medium durchströmten Membranen. Adaptiert nach: Chmiel, 1991

Gerührte Systeme bieten den Vorteil einer besonders robusten zeitlichen und räumlichen Kontrolle (Chu und Robinson, 2001). Sie sind hervorragend skalierbar, ausgezeichnet homogenisierbar und besitzen eine gute Zugänglichkeit für die online- und offline-Analytik. Kontrollierbarkeit und Homogenisierbarkeit ermöglichen Hochdichte-Kulturen, was es in Kombination mit der Skalierbarkeit erlaubt, die Häufigkeit der Benutzerintervention und damit auch das Kontaminationsrisiko deutlich zu reduzieren (Crespi und Thilly, 1981). Die Kontrollierbarkeit von Rührkesselreaktoren schafft zudem ausgezeichnete Voraussetzungen für die Optimierung von Kulturbedingungen wie Gelöstsauerstoffgehalt, pH-Wert und Medienversorgung. Insbesondere für die Kultivierung von humanen ES Zellen ist dies ein unschätzbare Vorteil, da eine systematische Optimierung der Kulturbedingungen für diesen Zelltyp noch aussteht. Ein gerührtes System kann jedoch auch in negativer Hinsicht auf die kultivierten Zellen einwirken. Insbesondere die durch das Rühren erzeugten Scherströmungen, Dehnströmungen und Turbulenzen können Zellschädigungen verursachen. Aus diesem Grund ist auf die Optimierung der Rührparameter besonderes Augenmerk zu legen.

Sollen adhärent wachsende Zellen wie humane ES Zellen in einem gerührten System kultiviert werden, so benötigen sie ein geeignetes Trägermaterial, sog. Microcarrier

(van Wezel, 1967) (Abb. 1.3.2). Ein idealer Microcarrier muss Oberflächeneigenschaften besitzen, die es den Zellen erlauben zu adhären und zu proliferieren. Die Dichte des Carriers sollte es gestatten, den mit Zellen bewachsenen Carrier bereits bei geringen Rührgeschwindigkeiten in Suspension zu halten; andererseits sollte der Carrier leicht vom Kulturmedium abzutrennen sein. Um ein zeitgleiches Erreichen der Konfluenz zu gewährleisten, sollte die Größenverteilung der Microcarrier vergleichsweise eng sein. Idealerweise erlauben die optischen Eigenschaften der Carrier eine mikroskopische Beurteilung der Kultur. Das Autoklavieren der Carrier sollte möglich sein (Amersham Pharmacia Biotech, 1999). Um den Anforderungen unterschiedlicher Zelltypen Rechnung zu tragen, sind Microcarrier mit verschiedenen Beschichtungen kommerziell erhältlich (z. B. Kollagen, Fibronectin).

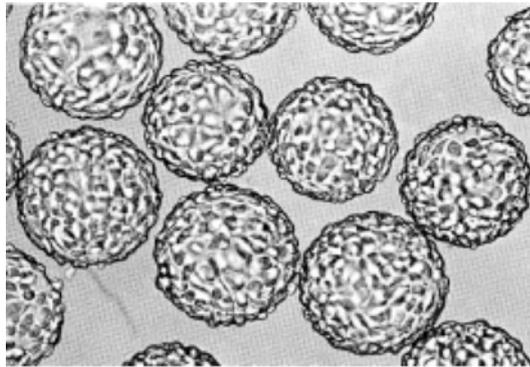


Abb. 1.3.2 Microcarrier. Durch Kultivierung auf Microcarriern können adhären wachsende Zellen in Suspensionskultur gebracht werden. Hier sind humane Osteosarkom-Zellen auf Cytodex-Microcarriern gezeigt. Aus: Amersham Pharmacia Biotech, 1999

Die Microcarrier-basierte Kulturführung ist ein etabliertes Verfahren für die Produktion von Impfstoffen (Mered et al., 1981; van Wezel und van Steenis, 1978) und Interferon (Clark und Hirtenstein, 1981) im industriellen Maßstab. Während bereits erste Ansätze zur Skalierung von differenzierenden EB-Kulturen erarbeitet wurden (Dang et al., 2004; Schroeder et al., 2005; Zandstra et al., 2003), handelt es sich bei der Microcarrier-basierten Suspensionskultur undifferenzierter ES Zellen um ein innovatives Verfahren.

1.4 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten in einem industrienahen Kontext automatisierte und skalierbare Verfahren zur Kultivierung humaner ES Zellen entwickelt werden. Solche Prozesse stellen essentielle Voraussetzungen für kommerzielle Anwendungen der Stammzellforschung dar. Um von ES Zellen abgeleitete somatische Zellen im pharmakologischen und toxikologischen Screening einsetzen zu können, ist es unabdingbar, über im höchsten Maße standardisierte Methoden zu verfügen und große Zellzahlen in gleich bleibender Qualität produzieren zu können.

1.4.1 Etablierung der humanen ES Zellkultur

In einem ersten Teil der Arbeit sollte die konventionelle Kultivierung humaner ES Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von Feeder-Zellen etabliert werden. Hierzu zählte auch die Charakterisierung der humanen ES Zellen hinsichtlich der Expression Pluripotenz-assoziiertes Marker auf Protein- und mRNA-Ebene.

1.4.2 Entwicklung eines automatisierten Systems zur Kultivierung humaner ES Zellen

Auf Grundlage der im ersten Teil erarbeiteten Methoden zur Kultivierung humaner ES Zellen sollte in Kooperation mit Hamilton Life Science Robotics ein automatisiertes System zur Kultivierung und Differenzierung von ES Zellen entwickelt werden. Anschließend sollte dieses System im Rahmen einer Langzeitkultivierung muriner und humaner ES Zellen validiert werden. Im Falle einer erfolgreichen Validierung war es vorgesehen, das automatisierte System mit dem Ziel einer stand-alone-Lösung weiterzuentwickeln.

1.4.3 Entwicklung eines skalierbaren Prozesses zur Kultivierung humaner ES Zellen

Um einen skalierbaren Prozess zur Kultivierung humaner ES Zellen zu entwickeln, sollten zunächst verschiedene Carriertypen auf ihre Fähigkeit hin getestet werden, die Pluripotenz und die Proliferation humaner ES Zellen zu gewährleisten. Parallel dazu sollten verschiedene Ansätze zur Feeder-freien Kultivierung humaner ES Zellen untersucht werden. Im Folgenden war geplant, Rahmenbedingungen für eine Microcarrier-basierte Kultivierung humaner ES Zellen in einem unkontrollierten Suspensionssystem abzustecken. Abschließend sollte eine Prozessoptimierung in einem kontrollierten System angegangen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeines

Alle Arbeiten mit humanen ES Zellen wurden im Rahmen von durch das Robert-Koch-Institut genehmigten Projekten und im Einklang mit dem deutschen Stammzellgesetz durchgeführt.

Für die Zellkultur verwendete Geräte, Materialien und Lösungen wurden vor der Verwendung auf geeignete Weise (Autoklavieren, Sterilfiltrieren, Hitzesterilisation) sterilisiert oder bereits steril vom Hersteller bezogen.

Eine vollständige Auflistung aller verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien, Lösungen und Antikörper mit Herstellerangabe befindet sich im Anhang (s. 9.1-9.7).

2.2 Zelllinien

Zur Validierung des Systems zur Zellkulturautomatisierung wurden die murine ES Zelllinie J1 sowie die humanen ES Zelllinien H9.2 und I3 eingesetzt. Alle Arbeiten zur skalierbaren Kultivierung wurden mit der ES Zelllinie H9.2 durchgeführt. Zur Kokultur und zur Gewinnung konditionierten Mediums wurden γ -bestrahlte primäre embryonale Fibroblasten der Maus (murine embryonale Fibroblasten, MEF; gewonnen aus dem Stamm CD1, Charles River, Sulzfeld) sowie humane Vorhaut-Fibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) eingesetzt.

Die humanen ES Zelllinien sowie die humanen Fibroblasten wurden von Joseph Itskovitz-Eldor, Haifa, Israel, bezogen.

2.3 Besondere Systeme zur Zellkultivierung

2.3.1 Robotiksystem

Das System zur Zellkulturautomatisierung wurde im Rahmen dieser Dissertation gemeinsam mit der Firma Hamilton Life Science Robotics, Bonaduz, Schweiz, entwickelt. Es basiert auf dem Liquid-Handling-Instrument Microlab STAR®. Eine ausführliche Darstellung aller Komponenten ist Bestandteil der Ergebnisdarstellung.

2.3.2 Spinnersysteme

Zur Entwicklung skalierbarer Verfahren für die Kultivierung humaner ES Zellen wurden unkontrollierte und kontrollierte Spinnersysteme eingesetzt. Um zu verhindern, dass Zellen und Microcarrier an die negativ geladene Glasoberfläche dieser Systeme adhärten, wurden die Gefäße regelmäßig für 30 Minuten mit RepelSilane (Amersham) hydrophobisiert und anschließend mit Reinstwasser (Millipore) gespült.

Als unkontrollierte Spinner (Abb. 2.3.1) wurden Gefäße der Firmen Bellco (A; Durchmesser 55mm), Wheaton (B; Durchmesser 60mm) und Corning (C; Durchmesser 65mm) verwendet, die über unterschiedliche Rührertypen verfügten. Dabei handelte es sich um Glasballtaumelrührer (D; Durchmesser 20mm), Paddelrührer (E; Durchmesser 40mm) und Blattrührer (F; Durchmesser 40mm), die über Kopplung an einen Magnetrührer betrieben wurden. Zur Durchmischung der Kultur wurden Rührgeschwindigkeiten von 20 bis 30rpm eingesetzt. Die unkontrollierten Spinnersysteme mit einem Arbeitsvolumen von 20 bis 50ml wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer Atmosphäre von 21% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid inkubiert. Hierbei wurde der Gasaustausch gewährleistet, indem die Deckel auf den Spinnerarmen leicht geöffnet blieben.

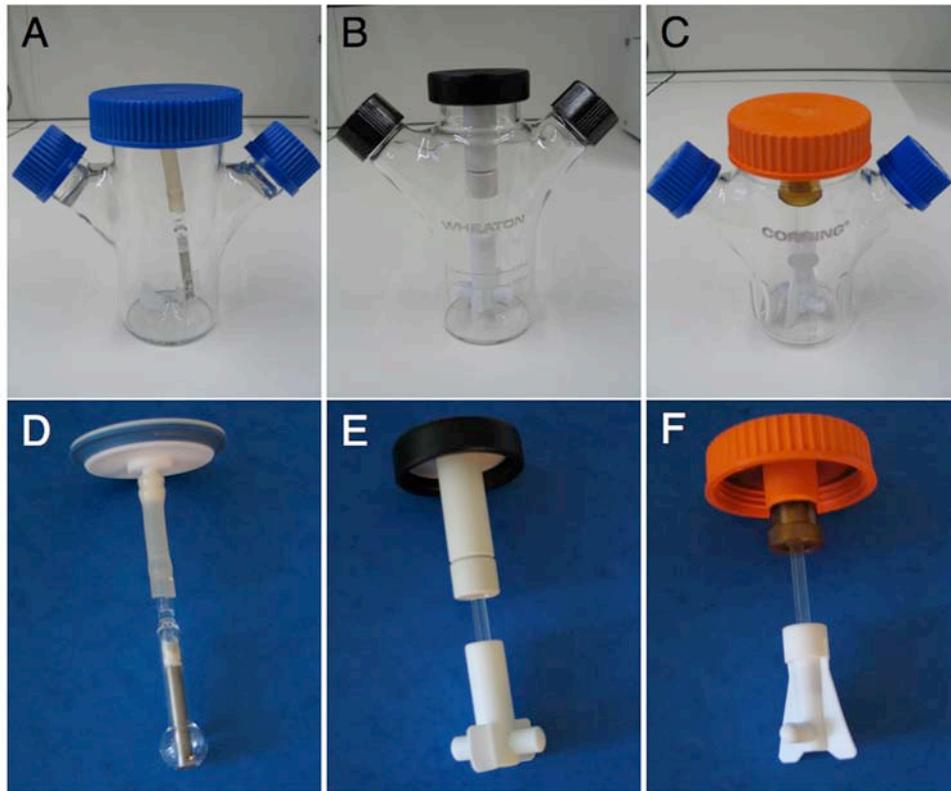


Abb. 2.3.1 Unkontrollierte Spinner mit ihren Rührern. In dieser Arbeit wurden Spinner von Bellco (A), Wheaton (B) und Corning (C) verwendet. Diese Spinner waren mit unterschiedlichen Rührern ausgestattet. Der Spinner von Bellco verfügte über einen Glasballtaumelrührer (D), der Wheaton-Spinner war mit einem Paddelrührer (E) ausgerüstet und der Spinner von Corning besaß einen Blattrührer (F).

Zur weiteren Optimierung der Kulturbedingungen wurde ein kontrolliertes Minispinner-System (Cellferm-pro[®]) mit vier unabhängig voneinander regelbaren Spinners der Firma DASGIP eingesetzt (Abb. 2.3.2; Durchmesser der Gefäße: 35mm). Dieses System ist dafür ausgelegt, bereits bei einem sehr niedrigen Arbeitsvolumen von 40ml eine Messung und Regelung wichtiger Kulturparameter zu ermöglichen. Zugleich kann das Minispinner-System aufgrund des geringen Einsatzes an Zellmaterial, Microcarriern und Medien sehr ökonomisch betrieben werden, was insbesondere während einer Optimierungsphase von Bedeutung ist. Ein kontinuierlicher Betrieb des Systems über ein Schlauchquetschpumpensystem zur Medienzufuhr und -abfuhr ist möglich. Bei den in diesem System verwendeten Rührern handelte es sich um Spezialanfertigungen mit Rührerblättern aus PTFE-Folie (Durchmesser 30mm), die ebenso wie die Rührer der unkontrollierten Spinner über Magnetrührer gesteuert wurden. Die Temperaturregelung erfolgte über Inkubation in einem Brutschrank. pH-Wert und Gelöstsauerstoffgehalt der Kulturmedien wurden online über pH- bzw. Sauerstoff-Elektroden gemessen. Entsprechend den von der

Prozesskontrolle gelieferten Sollwerten wurde der pH-Wert über die Begasung mit Kohlendioxid und der Gelöstsauerstoffgehalt über die Einspeisung von Sauerstoff bzw. Stickstoff geregelt. Dies erfolgte mit 0,2sl/h über eine Gasmischstation, als Grundbegasung diente Druckluft. Um Grenzflächenspannungen zwischen Luftblasen und Zellen zu vermeiden, wurde eine blasenfreie Kopfraumbegasung gewählt. Alle Gasleitungen waren mit 0,2 μ m Sterilfiltern versehen. Die Prozesskontrolle erfolgte über die Software Cellferm pro (DASGIP).

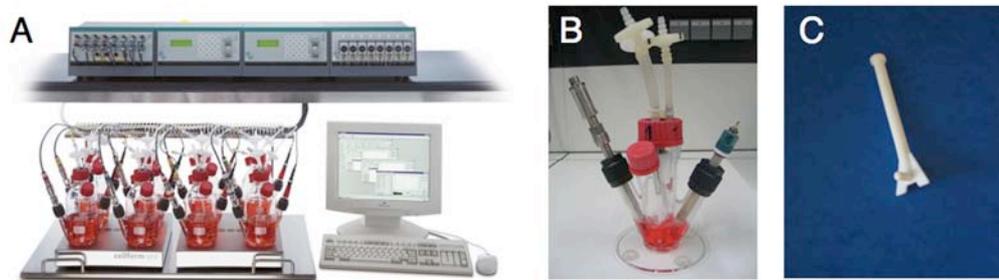


Abb. 2.3.2 Geregeltes Minispinneresystem. Das Minispinneresystem (A) der Firma DASGIP erlaubt es, pH-Wert und Gelöstsauerstoffgehalt in niedrigvolumigen Kulturen zu messen und zu regulieren. Jeder Spinner ist mit pH- und Sauerstoff-Elektroden ausgestattet (B). Bei dem verwendeten Rührer (C) handelt es sich um eine Spezialanfertigung.

Bildquelle zu A: <http://www.dasgip.de/de/prozess/index2.php3?choice1=labor&choice2=produkte>

2.3.3 Microcarrier

Die in dieser Arbeit evaluierten Microcarrier sind mit ihren Charakteristika in Tab. 2.3.1 dargestellt. Bei der Vorbereitung von Carriern für die Kultivierung humaner ES Zellen wurde wie folgt vorgegangen: Vor der Verwendung zu quellende Carrier wurden über Nacht bei Raumtemperatur in 50ml PBS pro Gramm Carrier inkubiert. Anschließend wurden sowohl gequollene als auch nicht-quellende Carrier zweimal mit PBS gewaschen, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt. Vor der Inokulation mit Zellen wurden die Carrier dreimal mit angewärmtem Kulturmedium gewaschen.

Name des Microcarriers	Hersteller	Material	Beschichtung	Fläche (m ² /g Trocken-gewicht)	Dichte (g/ml)	Porosität	Quellbar	Eingesetzte Konzentration (mg/ml)
Cytodex 1	GE Healthcare	Dextran	keine	4,4	1,03	mikroporös	ja	0,8
Cytodex 3	GE Healthcare	Dextran	Kollagen	2,7	1,04	mikroporös	ja	0,8
Cultispher G	Perbio	Kollagen	keine	nicht bekannt	1,04	makroporös	ja	1
Cultispher S	Perbio	Kollagen	keine	nicht bekannt	1,04	makroporös	ja	1
Cytopore	GE Healthcare	Zellulose	keine	1,1	1,03	makroporös	ja	2
Biosilon	Nunc	Nunclon®	keine	0,026	1,05	nicht porös	nein	24
FACT	Sigma	Polystyren	Kollagen	0,036	1,02	nicht porös	nein	20
Pronectin	Sigma	Polystyren	RGD-Bindedomäne	0,036	1,02	nicht porös	nein	20

Tab. 2.3.1 Eigenschaften und Konzentrationen der verwendeten Microcarrier.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Fibroblasten für die ES Zellkultur

2.4.1.1 Präparation primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)

Die Kokultur mit mitotisch inaktivierten murinen oder humanen Fibroblasten ist eine Voraussetzung zur Erhaltung der Pluripotenz der verwendeten ES Zelllinien.

Mäuse des Stammes CD1 wurden an Tag 13,5 oder 14,5 der Embryonalentwicklung präpariert und in frischem PBS gewaschen. Nach Entfernen des Kopfes und Entnahme der inneren Organe wurde das verbleibende Bindegewebe erneut gewaschen und anschließend mit einer Schere fein zerkleinert. Die resultierenden Gewebestücke wurden in 50ml 1,5x Trypsin/EDTA resuspendiert und in einen Erlenmeyerkolben mit Glaskugeln (Ø 4mm) überführt. Nach 30-minütigem Rühren bei 37°C auf einem Magnetrührer (50rpm) wurde das Trypsin durch Zugabe von 50ml FCS-haltigem MEF-Medium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde gesiebt, um Glaskugeln und verbleibende Gewebestücke zu entfernen und für 5 Minuten bei 1200rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert, und die vereinzelt Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 15cm-Zellkulturschale ausplattiert und

bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach drei bis vier Tagen wurde Medium von den subkonfluenten Schalen abgenommen und auf Mycoplasmen hin untersucht. Hierzu wurde das Mycoplasma Plus PCR Primer Set nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Bei negativem Mycoplasma-Testergebnis wurden die Zellen bei Erreichen der Konfluenz eingefroren. Hierzu wurden die Schalen zweimal mit PBS gewaschen, für 5 Minuten bei 37°C mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend mit FCS-haltigem MEF-Medium gespült. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 1200rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml MEF-Medium pro 15cm-Zellkulturschale resuspendiert. Nach Zugabe DMSO-haltigen MEF-Gefriermediums im Verhältnis 1:1 wurden die Zellen in Kryoröhrchen à 1ml Zellsuspension eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden hierzu in Styroporboxen für 1 Stunde bei -20°C und anschließend über Nacht bei -80°C inkubiert. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.4.1.2 Kultivierung primärer muriner embryonaler Fibroblasten

Röhrchen mit kryokonservierten murinen embryonalen Fibroblasten wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 5ml vorgelegtes MEF-Medium pro Kryoröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1200rpm für 5 Minuten abzentrifugiert, in MEF-Medium resuspendiert und auf eine 15cm-Zellkulturschale pro Kryoröhrchen ausplattiert. Die Schalen wurden bis zur Konfluenz bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.4.1.1 beschrieben abtrypsinisiert und im Verhältnis 1:3 erneut ausplattiert. Die Zellen wurden bis maximal zur vierten Passage propagiert.

2.4.1.3 Kultivierung humaner Vorhaut-Fibroblasten

15cm-Zellkulturschalen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1% Gelatine beschichtet. Röhrchen mit kryokonservierten humanen Vorhaut-Fibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 5ml vorgelegtes MEF-Medium pro Kryoröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1500rpm für 5 Minuten abzentrifugiert, in MEF-Medium resuspendiert und auf eine Gelatine-beschichtete 15cm-Zellkulturschale pro Kryoröhrchen ausplattiert.

Die Schalen wurden bis zur Konfluenz bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.4.1.1 beschrieben abtrypsinisiert und im Verhältnis 1:2 erneut ausplattiert. HFF konnten für mehr als 50 Passagen propagiert und in einem Verhältnis von 2 Kryoröhrchen pro konfluenter 15cm-Zellkulturschale nach der unter 2.4.1.1 beschriebenen Methode in MEF-Gefriermedium eingefroren werden.

2.4.1.4 Mitotische Inaktivierung muriner embryonaler Fibroblasten und humaner Vorhaut-Fibroblasten durch γ -Bestrahlung

Die Kokultur embryonaler Stammzellen mit Fibroblasten setzt voraus, dass die Fibroblasten mit ihrer schnelleren Wachstumsrate die ES Zellkultur nicht überwuchern. Aus diesem Grund werden Feeder-Zellen mitotisch inaktiviert.

Mit MEF oder HFF konfluent bewachsene 15cm-Schalen wurden zur γ -Bestrahlung verwendet. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben abtrypsinisiert (vgl. 2.4.1.1). Zellpellets von 25 15cm-Zellkulturschalen wurden in 35ml MEF-Medium resuspendiert und in eine T125-Zellkulturflasche überführt. Die γ -Bestrahlung fand in der Funktionseinheit Strahlentherapie der Radiologischen Universitätsklinik Bonn statt. Sie erfolgte an einem medizinischen Linearbeschleuniger (MEVATRON MD2, Siemens) mit 6MV Photonen im Dosismaximum (17mm) oder alternativ in einem gewebeäquivalenten Festkörperphantom (RW3, PTW Freiburg) bei einem Fokus-Haut-Abstand von 100cm. Die Fibroblasten wurden mit 15Gy Einzeldosis bestrahlt. Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Fibroblasten auf Gelatine-beschichtete 15cm-Zellkulturschalen ausplattiert (zur Gelatine-Beschichtung s. 2.4.1.3) und über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die γ -bestrahlten Fibroblasten wie unter 2.4.1.1 beschrieben eingefroren. Hierbei wurde eine Zellzahl von $2,4 \times 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen eingestellt.

2.4.1.5 Auftauen mitotisch inaktivierter muriner embryonaler Fibroblasten und humaner Vorhaut-Fibroblasten

Das in dieser Arbeit für die humane ES Zellkultur verwendete serumfreie Medium ist nicht zur Kultivierung von Fibroblasten geeignet. Bereits nach 24 Stunden in diesem Medium nehmen Fibroblasten eine spindelförmige Struktur an und lösen sich nach etwa einer Woche von der Zellkulturschale ab. Um eine gute Qualität der mitotisch inaktivierten Fibroblasten zu gewährleisten, werden diese zunächst in serumhaltigem Medium ausgesät und nur über wenige Tage nach dem Plattieren für die humane ES Zellkultur verwendet.

Sechs-Well-Zellkulturplatten wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1% Gelatine beschichtet. Röhrchen mit kryokonservierten mitotisch inaktivierten Fibroblasten wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 5ml vorgelegtes MEF-Medium pro Kryoröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1200rpm (1500rpm für HFF) für 5 Minuten abzentrifugiert, in MEF-Medium resuspendiert und auf zwei Gelatine-beschichtete Sechs-Well-Zellkulturplatten pro Kryoröhrchen ausplattiert. Dies entspricht einer Zelldichte von 2×10^5 Fibroblasten pro Well einer Sechs-Well-Zellkulturplatte. Die Schalen wurden mindestens über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor humane ES Zellen darauf ausgesät wurden. Plattierte mitotisch inaktivierte Fibroblasten wurden für höchstens drei Tage nach dem Ausplattieren für die humane ES Zellkultur verwendet.

2.4.1.6 Gewinnung konditionierten Mediums von mitotisch inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten und humanen Vorhaut-Fibroblasten

Statt in direkter Kokultur mit mitotisch inaktivierten Fibroblasten können humane ES Zellen auch in Gegenwart von Fibroblasten-konditioniertem Medium (conditioned medium, CM) auf Matrigel®-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert werden.

15cm-Zellkulturschalen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1% Gelatine beschichtet. Röhrchen mit kryokonservierten mitotisch inaktivierten Fibroblasten wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 5ml vorgelegtes MEF-Medium pro Kryoröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1200rpm (1500rpm für HFF) für 5 Minuten abzentrifugiert und in MEF-Medium resuspendiert.

Pro Gelatine-beschichteter 15cm-Zellkulturschale wurden $7,2 \times 10^6$ Fibroblasten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ wurde das MEF-Medium durch 50ml hES Zellmedium ohne FGF-2 ersetzt. Alle 24 Stunden wurde das CM geerntet, über eine 0,22µm-Filtereinheit sterilfiltriert und für bis zu vier Wochen bei -20°C gelagert. Nach spätestens sieben Tagen wurden die Fibroblasten verworfen. Vor Gebrauch wurden dem CM 4ng/ml FGF-2 zugesetzt.

2.4.2 Kultivierung humaner ES Zellen

2.4.2.1 Auftauen humaner ES Zellen

Die Effizienz des Einfrier- und Auftauprozesses humaner ES Zellen ist relativ niedrig. Neben einer geringen Überlebensrate ist die Spontandifferenzierung nach dem Auftauen zunächst besonders hoch. Aus diesem Grund werden humane ES Zellen möglichst in Dauerkultur gehalten und nur so selten wie möglich aufgetaut.

Das Medium eines mit Fibroblasten beschichteten Wells einer Sechs-Well-Zellkulturplatte wurde abgesaugt und durch 1ml hES Zellmedium ersetzt. Ein Kryoröhrchen mit humanen ES Zellen wurde zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 15ml-Falcon-Röhrchen überführt. Sehr vorsichtig und langsam wurden 5ml hES Zellmedium zugegeben, dann wurden die Zellen bei 800rpm für 3 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 1ml hES Zellmedium resuspendiert, dabei wurde darauf geachtet, Aggregate nicht zu stark zu zerkleinern. Die Zellen wurden gleichmäßig auf das Fibroblasten-beschichtete Well ausplattiert und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

2.4.2.2 Passagieren humaner ES Zellen

Humane ES Zellen werden möglichst in kleinen Zellverbänden passagiert. Diese Vorgehensweise erhöht die Plattierungseffizienz und vermindert Spontandifferenzierung sowie Karyotyp-Veränderungen. Da das zur Passagierung gängige Trypsin Zellverbände auflöst, wird zur Passagierung humaner ES Zellen Kollagenase IV in Kombination mit mechanischen Verfahren verwendet.

Das Kulturmedium der humanen ES Zellen wurde täglich erneuert. Alle drei bis sechs Tage wurden die humanen ES Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen, und die Zellen wurden für 45 Minuten mit 1mg/ml Kollagenase IV (0,5ml pro Well) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenase mit 1ml hES Zellmedium pro Well verdünnt, und die Kolonien wurden von der Zellkulturplatte abgespült oder vorsichtig mit der Spitze einer 5ml-Zellkulturpipette abgekratzt. Die Zellsuspension wurde für 3 Minuten bei 800rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1ml hES Zellmedium aufgenommen. Die hES Zellaggregate wurden mit einer 1000µl-Eppendorfpipette resuspendiert, bis nur noch kleine Aggregate sichtbar waren. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 bis 1:6 in hES Zellmedium auf mit mitotisch inaktivierten Fibroblasten beschichteten Sechs-Well-Zellkulturplatten ausplattiert. Nach spätestens acht Tagen wurden die hES Zellen auf einen frischen Fibroblastenrasen umgesetzt.

2.4.2.3 Manuelles Entfernen differenzierter Kolonien aus humanen ES Zellkulturen

Auch in Gegenwart von Feederzellen weisen humane ES Zellen eine gewisse Rate an Spontandifferenzierung auf. Meist gehen differenzierte Zellen beim Passagieren verloren. Überschreitet der Anteil an differenzierten Zellen jedoch 5% einer Kultur, so müssen differenzierte Kolonien manuell entfernt werden. Anzeichen von Differenzierung können der Verlust einer klaren Umgrenzung der Kolonie und die Bildung von Strukturen innerhalb der Kolonie sein.

Das Beseitigen differenzierter Kolonien erfolgte unter Verwendung eines Binokulars in einer horizontalen Sterilbank. Mittels einer mit einer Kanüle (26 g 3/8, 0.45 x 10)

versehenen 1ml-Injektionsspritze wurden differenzierte Kolonien aus der Kultur entfernt. Anschließend wurde die Kultur wie unter 2.4.2.2 beschrieben passagiert.

2.4.2.4 Feeder-freie Kultivierung humaner ES Zellen

Matrigel® wurde über Nacht bei 4°C auf Eis aufgetaut und in eiskaltem Knockout-DMEM 1:30 verdünnt. Mit dieser Lösung wurden Sechs-Well-Zellkulturplatten über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend wurde das Matrigel® entfernt, und humane ES Zellen konnten wie unter 2.4.2.2 beschrieben auf die beschichteten Schalen passagiert werden. Als Kulturmedium wurde Fibroblasten-konditioniertes Medium (CM) verwendet. Bei der Feeder-freien Kultivierung wurde ein Passageverhältnis von 1:2 eingehalten, der Passagerhythmus betrug etwa sieben Tage.

2.4.2.5 Einfrieren humaner ES Zellen

Humane ES Zellen wurden wie unter 2.4.2.2 beschrieben mit Kollagenase IV von den Zellkulturplatten abgelöst und abzentrifugiert. Je nach Dichte der Kultur wurden 1 bis 3 Wells pro Kryoröhrchen eingefroren. Das Pellet wurde mit einer 5ml-Zellkulturpipette in 0,5ml hES-Zellmedium pro Kryoröhrchen vorsichtig und langsam resuspendiert, um die Zellaggregate aufrechtzuerhalten. Tropfenweise wurden 0,5ml hES-Gefriermedium pro Kryoröhrchen zugegeben und je 1ml Zellsuspension pro Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden in einem Gefrierbehälter bei -80°C kontrolliert um 1°C pro Minute heruntergekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.4.2.6 *In vitro* Induktion der Multikeimblatt-Differenzierung humaner ES Zellen

Unter geeigneten Kulturbedingungen bilden ES Zellen sog. EBs, die Zellen aller drei Keimblätter enthalten. Dies ist ein Indiz für die Aufrechterhaltung der ES Zellidentität.

Humane ES Zellen wurden wie beim Passagieren (vgl. 2.4.2.2) mit Kollagenase abgelöst und abzentrifugiert. Im Folgenden wurde das Pellet vorsichtig in FCS-haltigem EB-Medium resuspendiert, um die Zellaggregate aufrechtzuerhalten. Die

Aggregate wurden anschließend auf Petrischalen in Suspensionskultur gebracht. Jeden zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, indem die EBs in ein Falconröhrchen überführt wurden. Nach dem Absinken der EBs wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die EBs wurden daraufhin auf die Petrischalen zurückgegeben. Nach dreiwöchiger Suspensionskultur wurden die EBs fixiert, geschnitten und über immunhistologische Färbungen auf die Präsenz von Zellen des Ekto-, Meso- und Entoderms hin untersucht (vgl. 2.5.3.6).

2.4.2.7 Kultivierung humaner ES Zellen in Spinnersystemen

Humane ES Zellen wurden wie beim Passagieren mit Kollagenase behandelt, abzentrifugiert und resuspendiert, bis nur noch kleine Zellaggregate erkennbar waren (vg. 2.4.2.2). Im Anschluss daran wurden, je nach Zelldichte, die Zellen von 8 bis 10 Wells in einen Spinner überführt. Die Microcarrier wurden wie unter 2.3.3 beschrieben vorbehandelt und in den in Tab. 2.3.1 dargestellten Konzentrationen mit den Zellen vermischt. Als Medium wurde Fibroblasten-konditioniertes Medium verwendet. Um ein gutes Anheften der Zellen an die Microcarrier zu ermöglichen, wurden die Spinner zunächst statisch bei 37°C inkubiert. Zudem wurde nur das halbe Endkulturvolumen an Medium eingesetzt, um die Konzentration an Zellen und Microcarriern während der Besiedelungsphase zu erhöhen. 24 Stunden nach der Inokulation wurden die Spinner auf das Endkulturvolumen aufgefüllt, und die Rührprozedur wurde gestartet. Jeden Tag erfolgte eine Probenahme vom Medienüberstand zur Bestimmung metabolischer Parameter (Glukose- und Laktatkonzentrationen, vgl. 2.5.2) sowie eine Probenahme der Microcarrier-Suspension zur Zellzahlbestimmung (vgl. 2.5.1.2). Im Anschluss an eine Sedimentationsphase wurde das Kulturmedium ausgetauscht.

Alle hier nicht mit einem Zahlenwert angegebenen Kulturparameter wie Rührgeschwindigkeit und Sauerstoffkonzentration stellten Variablen dar und sind im Zusammenhang mit den erzielten Resultaten im Ergebnisteil dargestellt.

2.4.3 Kultivierung muriner ES Zellen

2.4.3.1 Auftauen muriner ES Zellen

Das Medium einer mit Fibroblasten beschichteten Sechs-Well-Zellkulturplatte wurde abgesaugt und durch mES Zellmedium ersetzt. Ein Kryoröhrchen mit murinen ES Zellen wurde zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 5ml vorgelegtes mES-Zellmedium pro Kryoröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1200rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und in mES Zellmedium resuspendiert. Murine ES Zellen wurden in einer Zelldichte von $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² auf der Fibroblasten-beschichteten Zellkulturplatte ausplattiert und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

2.4.3.2 Passagieren muriner ES Zellen

Das Kulturmedium der murinen ES Zellen wurde täglich erneuert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde das Trypsin mit FCS-haltigem mES Zellmedium inaktiviert, die Zellen wurden von der Zellkulturschale ab gespült, in einem Falconröhrchen gesammelt und bei 1200rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in mES Zellmedium resuspendiert, und die Zellen wurden in einer Konzentration von $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² auf mit mitotisch inaktivierten Fibroblasten beschichteten Sechs-Well-Zellkulturplatten ausplattiert.

2.4.3.3 Einfrieren muriner ES Zellen

Murine ES Zellen wurden wie unter 2.4.3.2 beschrieben mit Trypsin von den Zellkulturplatten abgelöst und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5ml mES-Zellmedium pro Kryoröhrchen resuspendiert, dann wurden 0,5ml mES-Gefriermedium pro Kryoröhrchen zugegeben und je 1ml Zellsuspension pro Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zelldichte pro Kryoröhrchen betrug $1,4 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zellen wurden in einem Gefrierbehälter bei -80°C kontrolliert um 1°C pro Minute heruntergekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.4.3.4 *In vitro* Induktion der Multikeimblatt-Differenzierung muriner ES Zellen

Murine ES Zellen wurden wie beim Passagieren (vgl. 2.4.3.2) mit Trypsin abgelöst und abzentrifugiert. Im Folgenden wurde das Pellet in FCS-haltigem EB-Medium resuspendiert, und die Zellsuspension wurde auf Petrischalen überführt. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt, indem die EBs in ein Falconröhrchen überführt wurden. Nach dem Absinken der EBs wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die EBs wieder auf die Petrischalen zurückgeführt. Nach zweiwöchiger Suspensionskultur wurden die EBs fixiert, geschnitten und über immunhistologische Färbungen auf die Präsenz von Zellen des Ekto-, Meso- und Entoderms hin untersucht (vgl. 2.5.3.6).

2. 5 Analytische Methoden

2.5.1 Zellzahlbestimmung und Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate

2.5.1.1 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde über Trypanblau-Färbung ermittelt. Der Azofarbstoff Trypanblau kann die Membran toter Zellen permeieren, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Der Anteil lebender Zellen in der Zellkultur ergibt sich aus dem Quotienten lebender (ungefärbter) Zellen zur Gesamtzellzahl (ungefärbte und gefärbte Zellen).

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde die durch Trypsin- oder Accutase II-Behandlung erzeugte Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt und mittels eines Fuchs-Rosenthal Hämocytometers ausgezählt.

2.5.1.2 Bestimmung der Zellzahl in Microcarrierkulturen

Um die Zellzahl in Microcarrierkulturen zu ermitteln, müssen die Zellen zunächst von den Microcarriern gelöst und getrennt werden. Dies kann prinzipiell über enzymatische Behandlung und anschließendes Sieben erfolgen. Die einfachere Alternative hierzu ist die Kernzählung über die Kristallviolett-Methode. Dabei werden die Zell-Microcarrier-Aggregate in eine hypotonische Lösung überführt und die

freiwerdenden Kerne angefärbt. Über die Kristallviolett-Methode kann die Lebendzellzahl bestimmt werden, nicht jedoch die Zellviabilität, da tote Zellen mit diesem Verfahren nicht erfasst werden.

Um den Fehler bei der Probenahme möglichst gering zu halten, wurden von jeder Kultur drei parallele Proben der Microcarrier-Zell-Suspension gezogen. Die Proben wurden abzentrifugiert (2000rpm, 3 Minuten), das Pellet wurde in Kristallviolettlösung aufgenommen und kräftig gevortext. Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mittels eines Fuchs-Rosenthal-Hämozytometers gezählt. Beim Auftragen der Proben auf das Hämozytometer konnten nur die Zellkerne in die Zählkammer eindringen, während die Microcarrier am Rande des Deckgläschens blieben.

2.5.1.3 Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate μ

Die Kulturführung bei allen in dieser Arbeit verwendeten Systemen war diskontinuierlich. Das Kulturmedium wurde sowohl bei Spinnerkulturen als auch bei Kulturen auf Zellkulturschalen täglich ausgetauscht. Obwohl bei der Spinnerkultivierung keine Zellrückhaltesysteme eingesetzt wurden, ist aufgrund der Sedimentationsphase wie bei den Kulturen auf Zellkulturschalen von einem minimalen Zellverlust beim Mediumwechsel auszugehen. Damit entspricht die Kinetik des Zellwachstums in den hier durchgeführten Versuchen der eines Batchprozesses. Das Zellwachstum kann somit mathematisch beschrieben werden durch:

$$dx/dt = \mu x$$

Durch Umstellen und Bildung eines Differenzenquotienten ergibt sich:

$$\mu = (x_1 - x_0) / (t_1 - t_0) \cdot 2 / (x_1 + x_0)$$

Die Verdopplungszeit ergibt sich aus:

$$t_d = \ln 2 / \mu$$

Wobei x : Zelldichte [Zellzahl/ml], t : Zeit, μ : spezifische Wachstumsrate, t_d : Verdopplungszeit.

2.5.2 Enzymatische Bestimmung von Glukose- und Laktat-Konzentrationen im Medium

Zur Bestimmung des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion der Zellen wurde jeden Tag vor dem Mediumwechsel eine Probe des Mediumüberstands genommen und entweder sofort vermessen oder bei -20°C gelagert. Als Bezugswert diente das frische Ausgangsmedium. Die Messung erfolgte über enzymatischen Umsatz an einem YSI 2700 Select Analyzer. Zur Glukosemessung verfügt das Gerät über eine Membran, an der immobilisierte Glukoseoxidase die im Medium enthaltene Glukose zu D-Glukono- δ -Lakton und Wasserstoffperoxid oxidiert. Die Laktatbestimmung erfolgt an einer zweiten Membran, an der immobilisierte Laktatoxidase Laktat zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Das bei diesen Reaktionen entstandene Wasserstoffperoxid zerfällt im Folgenden an einer Platinanode zu 2H^+ , O_2 und 2e^- . Der Elektronenstrom ist damit der Glukose- bzw. Laktatkonzentration indirekt proportional.

2.5.3 Immunzytochemie

2.5.3.1 Allgemeines

Primäre und sekundäre Antikörper, Hersteller, Verdünnung und Besonderheiten bei der Färbung sind im Anhang unter 9.4 und 9.5 aufgeführt.

Mikroskopische Auswertung und Dokumentation erfolgten an einem Zeiss Axioskop 2 bzw. an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Olympus Fluoview 1000). Das jeweils verwendete Mikroskop sowie ein Längenstandard sind in allen gezeigten Abbildungen angegeben.

2.5.3.2 Nachweis von Oberflächenantigenen in humanen ES Zellkulturen

Zum Nachweis der Oberflächenmarker Tra-1-60 und Tra-1-81 wurden adhärente humane ES Zellkulturen für 30 Minuten bei 37°C mit dem entsprechenden primären Antikörper in hES Zellmedium inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das Antigen durch eine weitere 30-minütige Inkubation bei 37°C mit dem geeigneten Cy3-konjugierten sekundären Antikörper visualisiert. Anschließend wurden die Kulturen durch 10-minütige Behandlung mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Zellkerne

wurden mit DAPI (1:10000 in NaHCO₃) gegengefärbt und die Präparate mit Mowiol eingedeckelt.

2.5.3.3 Nachweis des Oberflächenantigens SSEA-1 in murinen ES Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit 4% PFA fixiert. Nach einem 1-stündigen Blockierungsschritt mit Blockierungslösung 1 bei Raumtemperatur wurden die Zellen über Nacht mit dem primären anti-SSEA1 Antikörper in Blockierungslösung 1 inkubiert. Im Anschluss an einen Waschschrift wurde das Antigen durch 1-stündige Inkubation mit dem geeigneten Cy3-konjugierten sekundären Antikörper in Blockierungslösung 1 visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10000 in NaHCO₃) gegengefärbt und die Präparate mit Mowiol eingedeckelt.

2.5.3.4 Nachweis von Kernmarkern

Zur Detektion von Kernmarkern wurden die Kulturen bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit 4% PFA behandelt und anschließend bei Raumtemperatur für weitere 10 Minuten mit 0,5% Triton-X100 in PBS permeabilisiert. Nach einem 1-stündigen Blockierungsschritt mit Blockierungslösung 2 bei Raumtemperatur wurden die Zellen über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper in Blockierungslösung 2 inkubiert. Darauf folgte ein Waschschrift, anschließend wurde das Antigen durch 1-stündige Inkubation mit dem geeigneten Cy3-konjugierten sekundären Antikörper in Blockierungslösung 2 visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10000 in NaHCO₃) gegengefärbt und die Präparate mit Mowiol eingedeckelt.

2.5.3.5 Proliferationsassay bei humanen ES Zellkulturen

Zur Quantifizierung der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus wurden die Kulturen je nach Koloniegröße an Tag 3 oder 4 nach der Passagierung mit 10µM 5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) gepulst. Sechs Stunden später wurden die Kulturen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit 0,5% Triton-X100 in PBS für 30 Minuten permeabilisiert, anschließend wurde die DNA für 10 Minuten mit 2N HCl denaturiert. Im Anschluss an eine 10-minütige Neutralisierung mit 0,1M Boratpuffer (pH 9,5) wurden die Kulturen für 30 Minuten mit

Blockierungslösung 2 geblockt. Im Folgenden wurden die Zellen über Nacht mit dem primären anti-BrdU Antikörper in Blockierungslösung 2 inkubiert. Die Visualisierung erfolgte im Anschluss an einen Waschschrift durch 1-stündige Inkubation mit dem geeigneten Rhodamin-konjugierten sekundären Antikörper in Blockierungslösung 2. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10000 in NaHCO₃) gegengefärbt und die Präparate mit Mowiol eingedeckelt.

2.5.3.6 Analyse der Multikeimblattdifferenzierung humaner und muriner ES Zellen

Ganze EBs wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert und dann für 3 Stunden in 30% Saccharose in PBS inkubiert. Anschließend wurden die EBs in Tissue-Tek eingebettet und eingefroren. Am Kryostat wurden im Folgenden 13µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

Zum Nachweis einer Multikeimblattdifferenzierung wurden die EB-Schnitte auf die Marker Zytokeratin (Ektoderm), Desmin (Mesoderm) und α-Fetoprotein (Entoderm) gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 0,5% Triton-X100 in PBS permeabilisiert. Nach einem 1-stündigen Blockierungsschritt mit Blockierungslösung 2 bei Raumtemperatur wurden die Zellen über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper in Blockierungslösung 2 inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das Antigen durch 1-stündige Inkubation mit dem geeigneten Cy3- oder FITC-konjugierten sekundären Antikörper in Blockierungslösung 2 visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:10000 in NaHCO₃) gegengefärbt und die Präparate mit Mowiol eingedeckelt.

2.5.3.7 Histochemischer Nachweis endogener alkalische Phosphatase-Aktivität

Zunächst wurden die Zellkulturen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert. Alkalische Phosphatase-Aktivität wurde mittels des Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit bestimmt, welches den Angaben des Herstellers entsprechend eingesetzt wurde. Anschließend wurden die Präparate mit Mowiol eingedeckelt.

2.5.4 Durchflusszytometrie

Aufgrund der sehr punktuellen Expression von Tra-1-60 und Tra-1-81 an der Zelloberfläche ist es an den kompakten hES Zellkolonien nur schwer möglich, eine visuelle Quantifizierung der für diese Antigene positiven Zellen durchzuführen. Aus diesem Grund wurden die Anteile an Tra-1-60- und Tra-1-81-positiven Zellen an den humanen ES Zellkulturen durchflusszytometrisch bestimmt.

Durch 5-minütige Accutase II-Behandlung wurden Einzelzellsuspensionen der zu untersuchenden Zellen hergestellt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. In einem Volumen von 500µl PBS wurden 1×10^6 Zellen für 15 Minuten mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Die Antigene wurden nach einem Waschschrift durch 15-minütige Inkubation mit einem geeigneten Cy5-konjugierten sekundären Antikörper visualisiert. Als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindung und Autofluoreszenz wurden Zellen mitgeführt, bei denen auf eine Inkubation mit dem primären oder dem sekundären Antikörper verzichtet wurde. Nach einem Waschschrift wurden die Proben in 500µl PBS mit 1,2µg/ml Hoechst 33258 resuspendiert, um tote Zellen nachzuweisen, und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluorochrome wurden auf einem mit drei Lasern ausgestatteten analytischen Durchflusszytometer (LSRII) angeregt und ausgelesen. Für die Messung der Hoechst-Fluoreszenz wurden eine Anregungswellenlänge von 405nm sowie ein 440/40 Bandpassfilter eingesetzt. Als Einstellungen für die Cy5-Messung wurden eine Anregungswellenlänge von 635nm und ein 660/20 Bandpassfilter gewählt. Die Daten wurden mit Hilfe der Flowjo Analysesoftware analysiert und dargestellt. Bei der Auswertung wurden Feeder-Zellen über Vorwärtsstreulicht- (Forward Scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht- (Sideward Scatter, SSC) Eigenschaften und tote Zellen über Hoechst 33258-Fluoreszenz identifiziert und aus der zu analysierenden Zellpopulation eliminiert.

2.5.5 RT-PCR-Analyse

2.5.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden RNase-freie Gefäße und Filterspitzen verwendet. Das eingesetzte Wasser wurde durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) von RNasen befreit.

Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen wurden in 80µl Trizol pro cm² Zellkulturoberfläche lysiert. Das Lysat wurde entweder bei -80°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet. Im Anschluss an eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurden dem Lysat 200µl Chloroform pro ml Trizol zugesetzt. Nach gründlichem Vermischen erfolgte eine weitere 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000xg und 4°C wurde eine Phasentrennung vorgenommen. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen 70% Ethanol in DEPC-Wasser versetzt. Die weitere Aufreinigung dieser Suspension erfolgte mit dem RNeasy-Kit nach Angaben des Herstellers. Kontaminierende DNA wurde durch Verwendung des RNase-free DNase Set eliminiert, das ebenfalls nach Anleitung des Herstellers eingesetzt wurde.

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260nm (OD₂₆₀) bestimmt. 1 OD₂₆₀ Einheit entspricht dabei 40µg/ml RNA. Die RNA wurde bei -80°C gelagert oder sofort in die Reverse Transkription eingesetzt.

2.5.5.2 Reverse Transkription

Als Ausgangsmaterial für die Reverse Transkription diente Gesamt-RNA. Um bei der Reversen Transkription lediglich mRNA zu erfassen, wurden oligo(dT)₁₅-Primer verwendet.

Zur Reversen Transkription (RT) wurden 0,8µg Gesamt-RNA pro Reaktion eingesetzt. RNA und 160pmol oligo(dT)₁₅-Primer wurden für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Dann erfolgte die eigentliche RT (1 Stunde, 37°C) in Gegenwart von 1x Expand Reverse Transcriptase Puffer, 10mM DTT, je 1mM dNTP, 20U RNase

Inhibitor und 50U Expand Reverse Transcriptase. Abschließend wurde die Reverse Transkriptase durch Hitzebehandlung (5 Minuten bei 93°C) inaktiviert. Die gebildete cDNA wurde bei -20°C eingefroren oder sofort in die PCR eingesetzt.

2.5.5.3 Semi-quantitative PCR

Da viele der untersuchten Proben RNA von Feedern enthielten, wurden bei semi-quantitativer und quantitativer PCR human-spezifische Primer eingesetzt, um das Resultat nicht zu verfälschen.

Die semi-quantitative PCR wurde auf 2µl cDNA pro Ansatz durchgeführt. Es wurden je 25pmol der Primer, 200µM je dNTP und 2,5U Taq-Polymerase eingesetzt. Primer-Sequenzen, Annealing-Temperaturen, Anzahl der PCR-Zyklen, Größe des PCR-Produkts sowie die eingesetzten MgCl₂-Konzentrationen sind Anhang 9.6 zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden auf 1%igen Agarosegelen analysiert und mit dem Geldokumentationssystem GelDoc2000 dokumentiert.

2.5.5.4 Quantitative PCR

Die cDNA für die quantitative PCR wurde wie unter 2.5.5.1 und 2.5.5.2 beschrieben gewonnen. Die quantitative PCR wurde unter Verwendung der SYBR-Green-Methode an einem iCycler-System durchgeführt. Hierfür wurden 1µl cDNA, je 31,25pmol der Primer, 200µM je dNTP, 3mM MgCl₂, 3% DMSO, 1:2.000.000 SYBR Green I, 10µM Fluorescein und 0,5U Taq-Polymerase eingesetzt. Primer-Sequenzen, Annealing-Temperaturen, Anzahl der PCR-Zyklen sowie Schmelztemperatur des PCR-Produkts sind Anhang 9.6 zu entnehmen. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde über Schmelzkurvenanalyse verifiziert.

2.5.6 Karyotypisierung von humanen ES Zellen

Humane ES Zellen können im Laufe einer Langzeitkultivierung Karyotypveränderungen erfahren. Insbesondere ein Erwerb der Chromosomen 12 und 17q verschafft humanen ES Zellen einen Selektionsvorteil.

Um Feeder-freie Kulturen zur Karyotypisierung zu erhalten, wurden humane ES Zellen zunächst auf Matrigel passagiert (vgl. 2.4.2.4) und in Gegenwart von CM über zwei Passagen kultiviert. Bei Subkonfluenz wurde das Medium erneuert, und 0,2µg/ml Colcemid wurden zugegeben. Nach 23 Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, durch 5-minütige Trypsin-Behandlung in eine Einzelzellsuspension überführt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 1ml 0,075M KCl-Lösung resuspendiert, anschließend wurde mit KCl-Lösung auf 3ml aufgefüllt und die Zellsuspension für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe von 3 Tropfen Fixativ, gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1500rpm. Im Folgenden wurde das Pellet zweimal mit Fixativ gewaschen, in 1ml Fixativ aufgenommen und auf zuvor entfettete und bei -20°C vorgekühlte Objektträger aufgetropft. Über einem 60°C warmen Wasserbad wurden die Chromosomen für ca. 20 Sekunden gespreitet, dann wurden die Objektträger auf einer Wärmeplatte (60°C) getrocknet. Die Proben wurden daraufhin über Nacht bei 60°C im Wärmeschrank gealtert und am nächsten Tag einer G-Bänderung unterzogen. Hierzu wurden die Präparate für 55 Sekunden in einer auf 37°C angewärmten Küvette mit 2,5µl Bactotrypsin / ml PBS inkubiert. Nach zweimaligem Spülen in PBS wurden die Proben für 20 Minuten in Giemsa-Lösung angefärbt und anschließend in Leitungswasser gespült. Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Christina Ergang am Institut für Humangenetik der Universitätskliniken Bonn an einem Leitz Diaplan 68236 Mikroskop. Dabei wurde die Software CytoVision Ultra verwendet.

2.5.7 Rasterelektronenmikroskopie

Um die zellbewachsenen Microcarrier rasterelektronenmikroskopisch zu untersuchen, wurden die Kulturen zunächst für 10 Minuten mit 2% PFA / 0,5% Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden die Microcarrier über eine aufsteigende Ethanolreihe (je 10-minütige Inkubation in 10%, 30%, 50%, 70%, 90% Ethanol, zweimal 10-minütige Inkubation in 99,8% Ethanol, zweimal 15-minütige Inkubation in 100% Ethanol) dehydriert. Nach der Entwässerung wurde eine Kritisch-Punkt-Trocknung durchgeführt. Hierzu wurden die Proben in einer Haltevorrichtung in den Kritisch-Punkt-Trockner eingebracht. Die Probenkammer wurde neunmal mit flüssigem Kohlendioxid gewaschen; bei 40°C und 95bar wurden die Präparate anschließend durch Verdampfen des Kohlendioxids getrocknet. Die so getrockneten Proben wurden mit einer etwa 0,5nm dicken Platinschicht bedampft. Die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte unter Vakuum und bei einer Beschleunigungsspannung von 3,0kV an einem Philips XL 30 SEM. Die Rasterelektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Alexander Rigort am Institut für Zellbiologie der Universität Bonn durchgeführt.

2.6 Statistische Analyse

Zellzahlen in Microcarrierkulturen stellen Mittelwerte aus drei parallelen Proben dar. Zur Berechnung von Wachstumsraten, Glukoseverbrauchsrate und Laktatproduktionsraten wurden mindestens drei unabhängige Experimente herangezogen; die dargestellten Werte sind, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse der Experimente zur Zellkulturautomatisierung sowie der mittleren spezifischen Wachstumsraten in Microcarrierkulturen wurde der t-Test nach Student eingesetzt. Zuvor wurde ein F-Test auf Gleichheit der Varianzen durchgeführt.

Zur immunzytochemischen Charakterisierung wurden mindestens 800 Zellen pro Färbung ausgezählt. Diese Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden jeweils 30000 Ereignisse aufgenommen. Die dargestellten Daten sind jeweils einem einzelnen Versuch entnommen, sind aber, sofern im Ergebnisteil nicht ausdrücklich erwähnt, repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Zur Berechnung der relativen Genexpressionen auf Grundlage der aus der quantitativen PCR gewonnenen Daten wurde die $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode verwendet, wobei der CP (Crossing Point)-Wert der Anzahl an PCR-Zyklen entspricht, die nötig ist, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am CP befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Die Expression des jeweiligen Zielgens wird auf die Expression eines homogen exprimierten Referenzgens bezogen: $\Delta\text{CP} = \text{CPZielgen} - \text{CPReferenzgen}$. Nach dieser Normierung wird vom ΔCP -Wert der Proben der ΔCP -Wert der Kontrolle abgezogen: $\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CPProbe} - \Delta\text{CPKontrolle}$. Der relative Expressionsunterschied (Ratio) einer Probe zur Kontrolle, normalisiert auf ein Referenzgen, ergibt sich aus der Formel $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$. Liegt der relative Expressionsunterschied unter 1, so ist das analysierte Gen in der Probe im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert, liegt er über 1, so ist das Gen im Vergleich zur Kontrolle heraufreguliert. Als Referenzgen wurde Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) gewählt. Diese Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Bei der Karyotypisierung wurden mindestens 20 Metaphasen ausgezählt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Etablierung der humanen ES Zellkultur

Um innovative Verfahren zur Kultivierung humaner ES Zellen entwickeln zu können, musste zunächst die konventionelle Kultur etabliert werden. Im Unterschied zu murinen ES Zellen zeigen humane ES Zellen eine erhöhte Spontandifferenzierungsrate. Die Qualität der hES Zellkultur erwies sich dabei als in hohem Maße abhängig von der Herkunft, dem Zustand und der Dichte der verwendeten Feeder-Zellen. Als besonders geeignet zur Gewinnung primärer Feeder-Zellen zeigte sich der Mausstamm CD1, da aus diesem Stamm isolierte Fibroblasten robust genug waren, um in dem zur hES Zellkultur verwendeten serumfreien Medium für etwa eine Woche zu überleben. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass nach dem Ausplattieren der Feeder-Zellen mehr als zwölf Stunden vergehen mussten, bevor hES Zellen auf den Fibroblastenrasen ausgesät werden konnten. Erfolgte das Plattieren der hES Zellen eher, so wurden die Feeder von den hES Zellen verdrängt und es kam zu einer verstärkten Differenzierung in der Kultur. Wurden die Feeder-Zellen hingegen mehr als drei Tage vor dem Aussäen der hES Zellen ausplattiert, so überlebten die Fibroblasten nicht gut in dem serumfreien Medium, was wiederum zu einer Differenzierung der hES Zellen führte. Generell war die Dichte der Feeder-Zellen ein ausschlaggebender Faktor für die Spontandifferenzierungsrate der hES Zellen. Eine Zelldichte von $2,1 \times 10^4$ Fibroblasten pro cm^2 erwies sich als ideal für die Kultivierung von hES Zellen. Sowohl eine niedrigere als auch eine höhere Feeder-Dichte führten zu erhöhten Differenzierungsraten.

Über den Einfluss der Feeder-Zellen hinaus konnte festgestellt werden, dass ein täglicher Mediumwechsel nötig war, um die Qualität der hES Zellkultur aufrechtzuerhalten. Zudem spielten der Zeitpunkt des Passagierens sowie die hierbei verwendete Vorgehensweise eine große Rolle. Beim Passagieren humaner ES Zellen werden üblicherweise kleine Zellverbände aufrechterhalten. Als ideal erwies es sich, die Größe dieser Zellverbände so einzustellen, dass alle vier Tage eine regelmäßige Passagierung durchgeführt werden konnte. Um durch enzymatische Passagierung induzierte Karyotypveränderungen zu vermeiden, wurde das mechanische Passagieren von Stock-Kulturen eingeführt. Ein gelegentliches Entfernen

differenzierter Kolonien aus den hES Zellkulturen stellte sich als unumgänglich heraus. Dies sollte jedoch auch nicht zu oft durchgeführt werden. Optimal war es, dies höchstens alle fünf bis zehn Passagen vorzunehmen.

Unter diesen Feeder-abhängigen Kultivierungsbedingungen zeigten hES Zellen eine spezifische Wachstumsrate von $0,26 \pm 0,09 d^{-1}$. Die hES Zellkolonien wiesen eine deutliche Abgrenzung zum Fibroblasten-Rasen hin auf. In der Immunzytochemie waren die Kolonien positiv für die Pluripotenz-assoziierten Marker Tra-1-60 und Tra-1-81. hES Zellkolonien exprimierten Nanog (Expression in $94 \pm 4\%$ der Zellen) sowie Oct-4 (Expression in $96 \pm 1\%$ der Zellen) und zeigten alkalische Phosphatase-Aktivität. Die Expression der Oberflächenantigene Tra-1-60 und Tra-1-81 konnte über Durchflusszytometrie quantitativ erfasst werden (Abb. 3.1.1).

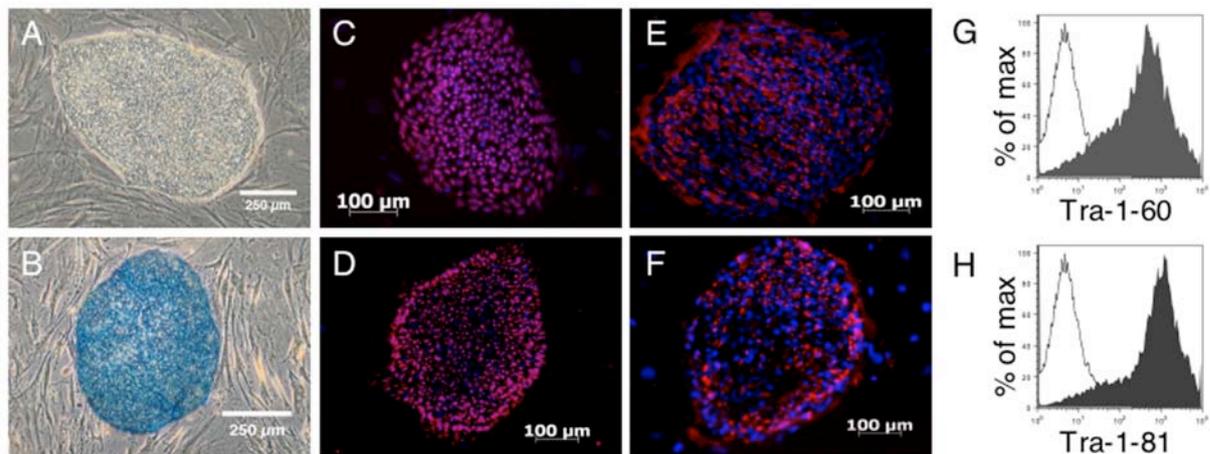


Abb. 3.1.1 Charakterisierung von hES Zellen über Immunzytochemie. In Kokultur mit murinen Fibroblasten bilden hES Zellen (hier dargestellt: Zelllinie I3) Kolonien, die eine klare Abgrenzung zur Umgebung besitzen (A). hES Zellen zeigen eine starke alkalische Phosphatase-Aktivität (B), sind in der Immunzytochemie positiv für die Transkriptionsfaktoren Oct-4 (C) und Nanog (D) und exprimieren die Oberflächenantigene Tra-1-60 (E) und Tra-1-81 (F). Tra-1-60- und Tra-1-81-Expression humaner ES Zellen lassen sich auch durchflusszytometrisch quantifizieren (G, H). Zur Darstellung der durchflusszytometrischen Daten wurden Feederzellen und tote Zellen über Gating nach Forward Scatter- und Sideward Scatter-Eigenschaften sowie nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Offene Histogramme entsprechen Negativkontrollen, gefüllte Histogramme stellen Färbungen auf die angegebenen Pluripotenz-assoziierten Marker dar.

Bei der Analyse der durchflusszytometrischen Daten konnten Feederzellen, tote Zellen sowie Debris, die eine Autofluoreszenz aufwiesen, anhand von Vorwärts- und Seitwärtsstreuungparametern von der hES Zellpopulation getrennt werden (Abb. 3.1.2). Diese Methode ließ sich über Markierung der Feederzellen mit 5-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester validieren (Winter, 2005).

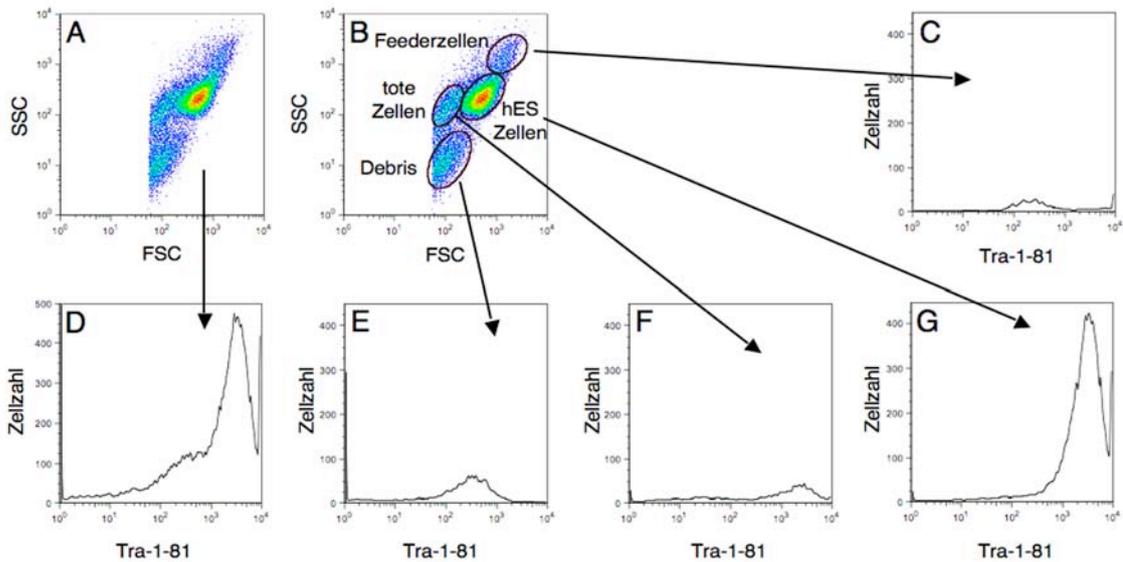


Abb. 3.1.2 Trennung der hES Zellpopulation von Feederzellen und Debris bei der durchflusszytometrischen Analyse. Die Scatterplot-Darstellung von Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen Vorwärtsstreulicht (FSC) (A, B) zeigt, dass mehrere Zellpopulationen vorliegen. Bei Populationen mit geringer Intensität der SSC- bzw. FSC-Signale handelt es sich hauptsächlich um tote Zellen und Debris. Feederzellen sind größer und komplexer als hES Zellen, was sich in stärkeren SSC- und FSC-Signalen widerspiegelt. Wie die Abbildungen C, E und F zeigen, besitzen sowohl Feederzellen als auch tote Zellen und Debris eine Autofluoreszenz im Bereich der Fluoreszenz des Cy5-gekoppelten Antikörpers, der zur Detektion des α -Tra-1-81-Antikörpers eingesetzt wird. Werden diese drei Populationen nicht durch Gating von der Analyse ausgeschlossen, so wird der Anteil an Tra-1-81-positiven Zellen verfälscht dargestellt (D). Der korrekte Prozentsatz an Tra-1-81-positiven Zellen kann bestimmt werden, wenn nur die hES Zellpopulation zur Analyse herangezogen wird (G). Analog wurde auch bei der Bestimmung des Anteils an Tra-1-60-positiven Zellen verfahren.

Auf mRNA Ebene wurde über RT-PCR mit human-spezifischen Primern die Expression der Pluripotenz-assoziierten Marker Rex-1, Nanog und Oct-4 nachgewiesen (Abb. 3.1.3).

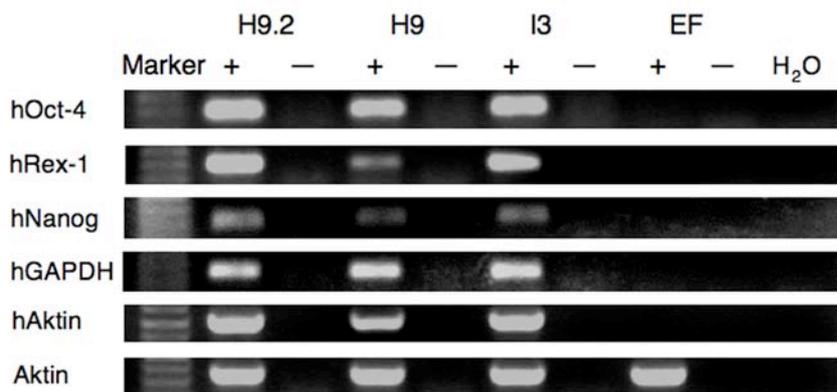


Abb. 3.1.3 Charakterisierung von hES Zellen über RT-PCR. hES Zellen exprimieren die Transkriptionsfaktoren Oct-4, Nanog und Rex-1. In Kokulturen mit murinen Fibroblasten erlaubt es die Verwendung human-spezifischer Primer, hES Zell-Transkripte spezifisch zu amplifizieren. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Bestimmung des Expressionsniveaus von Referenzgenen, hier dargestellt sind Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Aktin. Werden nicht-human-spezifische Primer für Aktin verwendet, so werden über die RT-PCR auch Transkripte der murinen embryonalen Fibroblasten (EF) erfasst. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen, wurden bei der Reversen Transkription und den anschließenden PCRs neben den eigentlichen Proben (+) Kontrollen ohne Reverse Transkriptase (-) mitgeführt. Als Längenstandard wurde der 1kb plus-Marker (Invitrogen) eingesetzt.

Insbesondere für die Etablierung eines skalierbaren Prozesses für die Kultivierung humaner ES Zellen stellt eine direkte Kokultur mit Fibroblasten eine Erschwernis dar. Aus diesem Grund wurde eine Feeder-freie Kultur etabliert. In diesem Paradigma werden hES Zellen unter Verwendung Fibroblasten-konditionierten Mediums auf Matrigel-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Für diese Art der Kultivierung humaner ES Zellen erwies es sich als außerordentlich wichtig, die Kulturen erst bei einer sehr hohen Zelldichte zu passagieren und zudem hierbei wesentlich vorsichtiger vorzugehen. Mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,2 \pm 0,08 d^{-1}$ proliferierten hES Zellen unter Feeder-freien Bedingungen etwas langsamer als in Fibroblasten-Kokultur. Die Abgrenzung der Kolonien zur Umgebung war aufgrund der höheren Zelldichte unter diesen Kultivierungsbedingungen nicht ganz so deutlich, jedoch konnte immunzytochemisch die Expression von Tra-1-60, Tra-1-81, Nanog (Expression in $96 \pm 1\%$ der Zellen) und Oct-4 (Expression in $93 \pm 1\%$ der Zellen) sowie alkalische Phosphatase-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.1.4).

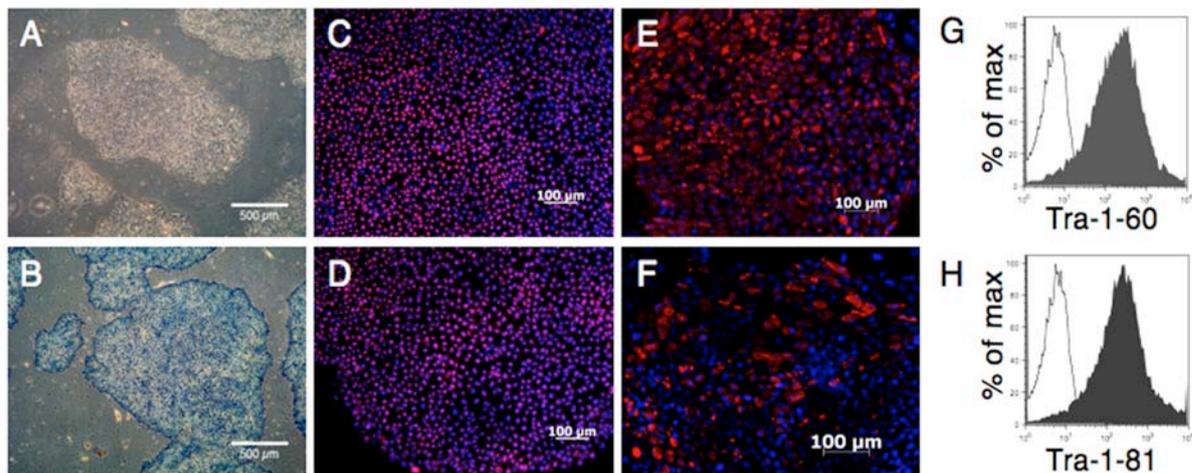


Abb. 3.1.4 Charakterisierung von hES Zellen über Immunzytochemie. In Feeder-freier Kultur mit Fibroblasten-konditioniertem Medium bilden hES Zellen (hier dargestellt: Zelllinie H9.2) nicht so deutlich abgegrenzte Kolonien wie in Kokultur mit Fibroblasten (A). Auch in Feeder-freier Kultur zeigen hES Zellen starke alkalische Phosphatase-Aktivität (B). Sie sind in der Immunzytochemie positiv für die Transkriptionsfaktoren Oct-4 (C) und Nanog (D) und exprimieren die Oberflächenantigene Tra-1-60 (E) und Tra-1-81 (F). Tra-1-60- und Tra-1-81-Expression lassen sich durchflusszytometrisch quantifizieren (G, H). Zur Darstellung der durchflusszytometrischen Daten wurden tote Zellen über Gating nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Offene Histogramme entsprechen Negativkontrollen, gefüllte Histogramme stellen Färbungen auf die angegebenen Pluripotenz-assoziierten Marker dar.

Ebenso zeigte die RT-PCR Analyse, dass Feeder-frei kultivierte hES Zellen Rex-1-, Nanog- und Oct-4-mRNA exprimierten (Abb. 3.1.5). Zwar werden diese Marker unter Feeder-freien Bedingungen tendenziell schwächer exprimiert als in Feeder-Kokulturen. Ihr Nachweis auf mRNA-Ebene wie auf Proteinebene weist jedoch darauf

hin, dass die Zellpopulationen ihre Pluripotenz unter Feeder-freien Bedingungen aufrechterhalten.

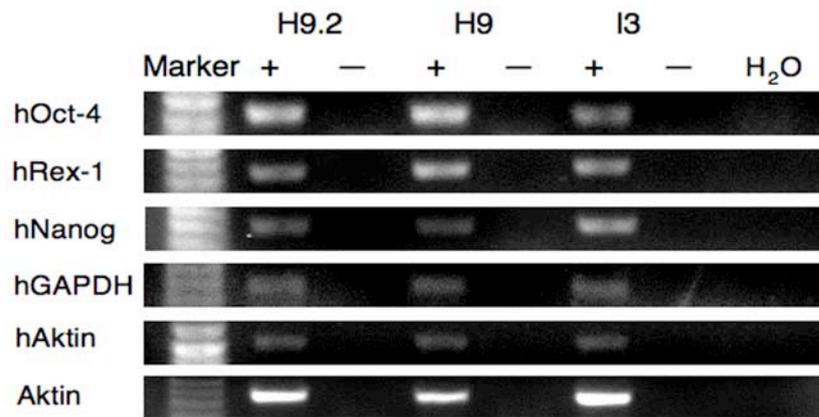


Abb. 3.1.5 Charakterisierung von hES Zellen über RT-PCR. Werden hES Zellen nicht in direkter Kokultur mit murinen Fibroblasten, sondern in der Gegenwart Fibroblasten-konditionierten Mediums kultiviert, so bleibt die Expression der Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct-4, Nanog und Rex-1 erhalten. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen, wurden bei der Reversen Transkription und den anschließenden PCRs neben den eigentlichen Proben (+) Kontrollen ohne Reverse Transkriptase (-) mitgeführt. Als Längenstandard wurde der 1kb plus-Marker (Invitrogen) eingesetzt.

Sowohl die konventionelle Feeder-abhängige als auch die Feeder-freie Kultivierung humaner ES Zellen konnte etabliert werden. In diesem Zuge wurden zudem Methoden zum Nachweis Pluripotenz-assoziiierter Marker implementiert, die eine wichtige Voraussetzung für die Evaluierung neuartiger Kultivierungsverfahren darstellen.

3.2 Entwicklung eines automatisierten Systems für die ES Zellkultur

3.2.1 Konzeptionierung eines automatisierten Systems für die ES Zellkultur

Die Entwicklung eines automatisierten Zellkultursystems erfolgte in Kooperation mit der Firma Hamilton Life Science Robotics. Als Basis für die Konzeptionierung diente die Pipettierplattform Microlab STAR®. Gerätebau und Programmierung wurden von Hamilton entsprechend der im Rahmen dieser Dissertation erarbeiteten Spezifikationen vorgenommen.

In einer ersten Arbeitsphase wurden die bei der Kultivierung von murinen und humanen ES Zellen sowie bei der Differenzierung muriner ES Zellen bislang manuell ausgeführten Protokolle in einzelne Schritte aufgegliedert, hier beispielhaft gezeigt für die Kultivierung humaner ES Zellen (Abb. 3.2.1). Bei einer näheren Betrachtung der so entstandenen Flussdiagramme mussten einige der Prozesse als schwer automatisierbar eingestuft werden. Hierzu zählten die Schritte, bei denen Zellen abgeschabt und differenzierte Kolonien aus den Kulturen entfernt wurden sowie die EB-Suspensionskulturen. Da zudem der Erfolg der Zellkulturautomatisierung nicht vollständig absehbar war, wurde aus Kostengründen zunächst auf eine automatisierte Zentrifugation verzichtet.

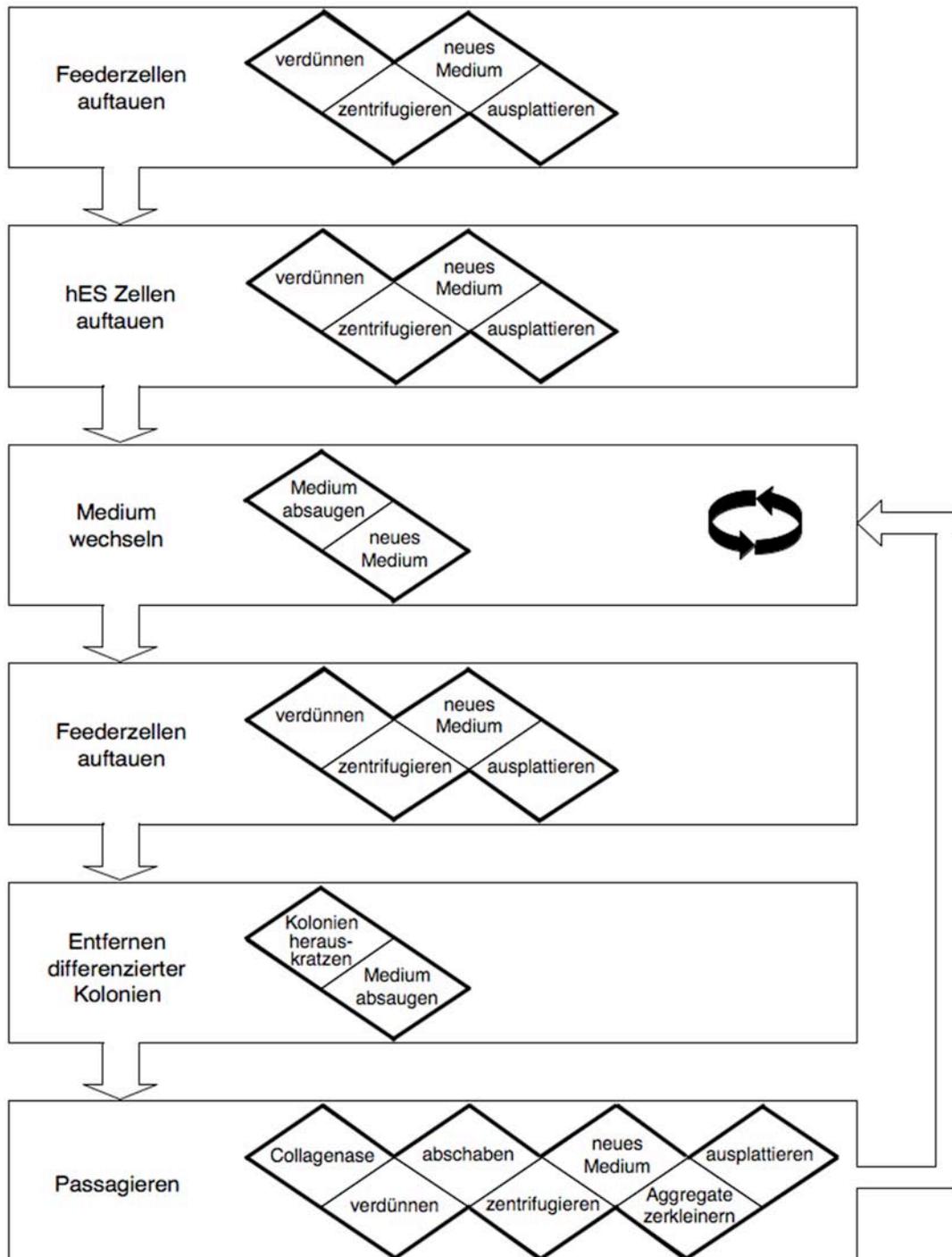


Abb. 3.2.1 Aufgliederung der Protokolle zur hES Zell-Kultivierung. Um die hES Zellkultur automatisieren zu können, wurden die einzelnen Prozesse zunächst in überschaubare Einzelschritte aufgeschlüsselt.

Hiermit reduzierten sich die zu automatisierenden Prozesse auf das Gelatinisieren von Zellkulturplatten, das Ausplattieren und Abtrypsinieren von Feederzellen, den Mediumwechsel bei Feederzellen, das Ausplattieren von murinen und humanen ES Zellen, den Mediumwechsel bei ES Zellen sowie die Zugabe von Wachstumsfaktoren. Um Feederzellen automatisiert mitotisch inaktivieren zu können,

eine Trennung zwischen unschädlichen Abfällen und Mitomycin C-haltigen Abfällen vorgenommen.

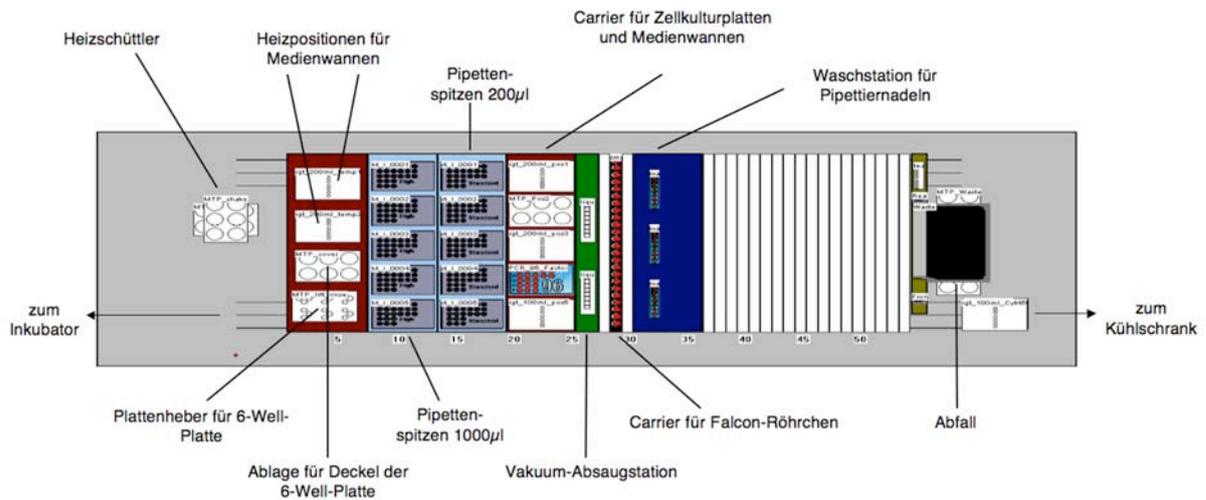


Abb. 3.2.3 Aufbau der Pipettierplattform des automatisierten Zellsystems. Die Pipettierplattform ist über lineare Transfereinheiten mit dem Inkubator und dem Kühlschrank verbunden. Zellkulturmedien werden auf Heizpositionen temperiert. Um Medien von Zellkulturplatten vollständig abnehmen zu können, wurde ein Plattenheber entwickelt, der die Platten schräg stellt. Über eine Vakuum-Absaugstation wird das alte Medium dem Flüssigabfall zugeführt. Zum Pipettieren stehen Pipettenspitzen und waschbare Pipettieradeln zur Verfügung. Um das Trypsinieren von Zellkulturen zu ermöglichen, verfügt das System über einen Heizschüttler. Des Weiteren können über spezielle Carrier Zellkulturplatten, Medienwannen und Falcon-Röhrchen in das System gebracht werden.

Ein Prinzip bei der Konzeptionierung des Zellsystems war es, die manuelle Vorgehensweise weitestgehend zu imitieren. So wurde ein Hebemechanismus zum Schrägstellen der Zellkulturplatten während des Mediumwechsels entworfen (Abb. 3.2.4 C), der es ermöglichte, das alte Medium vollständig von den Platten zu entfernen. Weiterhin wurde das manuell eingesetzte Mischungskreuz zum gleichmäßigen Plattieren von Zellen durch den Roboterarm nachgeahmt. Andererseits war es in mancher Hinsicht notwendig, die Zellkulturverfahren an den automatisierten Prozess anzupassen. Vor diesem Hintergrund wurde ein Heizschüttler zum Trypsinieren von Zellkulturen eingeplant, um das Ablösen von Zellen zu erleichtern.

Durch eine mit HEPA-Filtern ausgestattete und mit einer UV-Dekontaminationsroutine versehene Einhausung wurde eine sterile Umgebung geschaffen, die durch

Brutschrank und Kühlschrank über lineare Transferstationen nahtlos bedient werden kann und in der alle Pipettierschritte durchgeführt werden (Abb. 3.2.4 A).

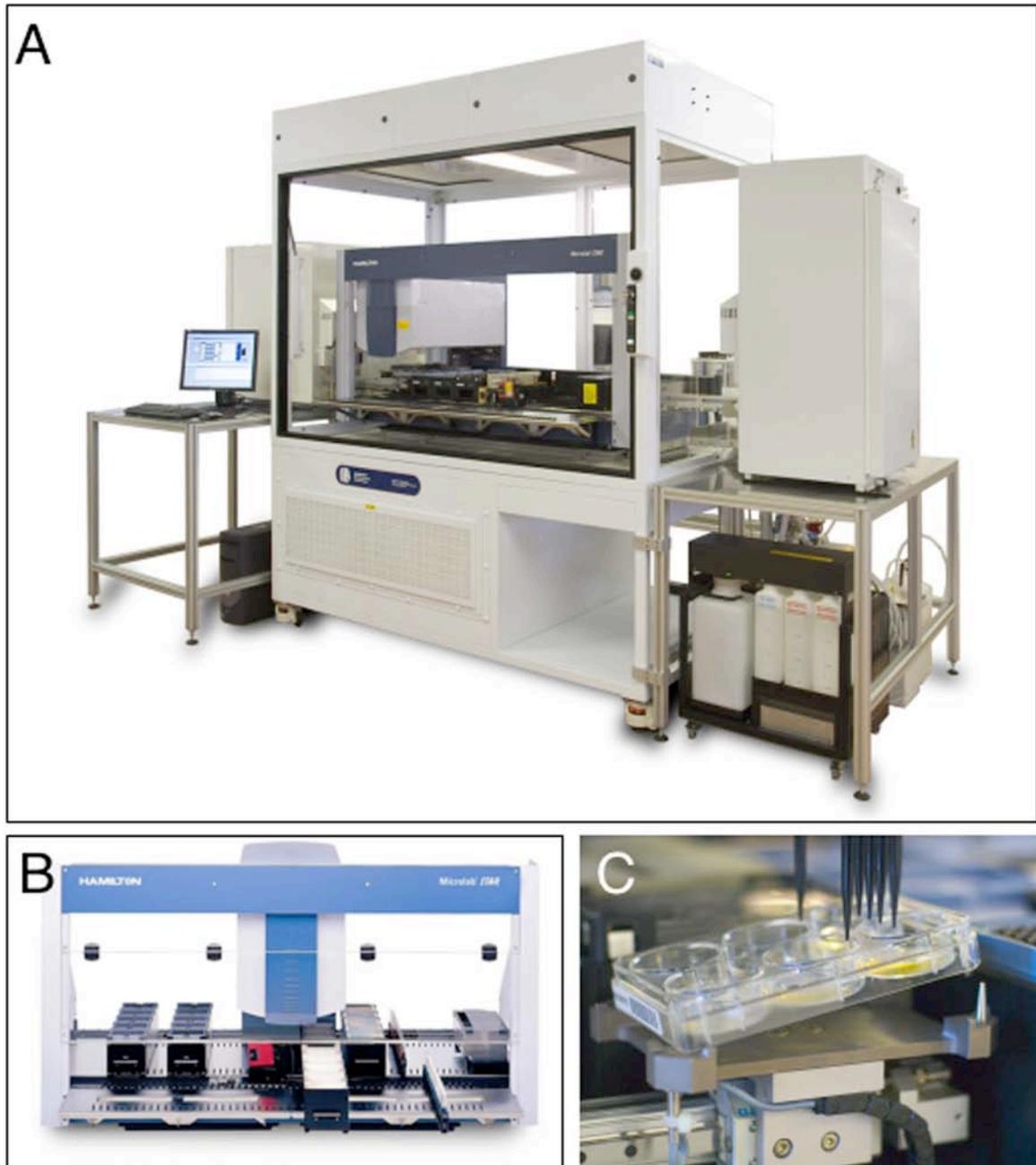


Abb. 3.2.4 System zur automatisierten Zellkultur. Das im Rahmen dieser Dissertation mitentwickelte und validierte automatisierte Zellkultursystem (A) basiert auf einer Microlab STAR-Pipettierplattform (B). Diese Plattform wurde in eine sterile Werkbank (Bigneat) eingehaust und hat Zugriff auf einen automatisierten Inkubator (A, links) sowie auf einen automatisierten Kühlschrank (A, rechts). Sowohl Inkubator als auch Kühlschrank sind mit Strichcode-Lesegeräten ausgestattet. Um Kosten einzusparen, wurde das Zellkultursystem mit einer Waschstation für wiederverwendbare Pipettieradeln ausgerüstet (A, rechts unten). Das System verfügt über Sonderanfertigungen für die Zellkultur wie den Plattenheber zum rückstandslosen Abnehmen von Medien (C).

Bildquelle: Hamilton Life Science Robotics

Darüber hinaus wurde vorgesehen, die Geschwindigkeit des Roboterarms auf die Hälfte zu reduzieren, um Luftverwirbelungen gering zu halten. Durch das ausschließliche Verwenden von Einmalspitzen für alle Pipettiervorgänge hätte sich eine Kontaminationsgefahr weiter minimieren lassen. Da dies jedoch zu einem erheblichen Kostenaufwand für Verbrauchsmaterial geführt hätte, sollte die Verwendung wieder verwendbarer Pipettiernadeln evaluiert werden. Die zur Reinigung der Nadeln nötige Waschstation sollte idealerweise ausschließlich mit Reinstwasser betrieben werden, um einen negativen Effekt von Reinigungslösungen auf die Zellkulturen auszuschließen.

Mit dem Ziel, einen möglichst sicheren Prozess zu gewährleisten, wurde auf eine parallele Prozessierung von Zellkulturplatten verzichtet. Auch die Transportschritte mit dem Roboterarm wurden auf ein Minimum reduziert, um Problemen beim Plattentransport vorzubeugen. Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz des Zellkultursystems unter GMP-Bedingungen wurde zudem auf eine Rückverfolgbarkeit der einzelnen Zellkulturplatten geachtet. Alle Platten und Medienbehälter sollten mit Barcodes versehen werden. Eine Ausgabe von Zellkulturplatten und Medienbehältern sollte nur über das installierte Barcode-Lesegerät möglich sein. Für jede Zellkulturplatte wurde ein „Plate Trail“ vorgesehen, der in elektronischer Form alle Schritte, denen die Platte unterworfen wurde, aufzeichnen sollte. Zu den dokumentierten Daten sollten der Anwender, Datum und Uhrzeit, durchgeführter Prozess sowie verwendetes Medium mit Chargennummer zählen.

Um einen anschaulicheren Eindruck zu vermitteln, sei an dieser Stelle ein typischer Prozess beschrieben. In einem ersten Schritt wird ein vom Anwender ausgewähltes Mediengefäß auf dem Heizelement auf 37°C aufgewärmt. Anschließend wird eine ebenfalls vom Anwender bestimmte Zellkulturplatte vom Inkubator auf die Pipettierplattform überführt. Über kapazitive Detektion des Flüssigkeitsstandes überprüft das Zellkultursystem, ob das Mediengefäß ausreichend Medium für einen Mediumwechsel bei der gewählten Platte enthält. Mit Hilfe des Plattenhebers wird das verbrauchte Medium vollständig von der Zellkulturplatte entfernt, und neues Medium wird zugegeben. Während Zellkulturplatte und Medienbehälter in den Inkubator bzw. Kühlschrank zurücktransportiert werden, wird der Plate Trail aktualisiert.

Das hier dargestellte Konzept ist dazu geeignet, entscheidende Schritte der ES Zellkultur zu automatisieren. Bevor dieses System jedoch in die Produktion gehen konnte, mussten in einer Machbarkeitsstudie noch einige grundlegende Fragen geklärt werden. Hierzu zählte insbesondere, ob ein Pipettierroboter Zellen schonend genug resuspendiert und dispensiert bzw. ob durch einen Mediumwechsel der Zellrasen beschädigt wird. Weiterhin stellte sich die Frage, ob ein gleichmäßiges Plattieren der Zellen möglich ist. Sollten aus Kostengründen wieder verwendbare Pipettiernadeln eingesetzt werden, so müsste eine mit Reinstwasser betriebene Waschstation ein kontaminationsfreies Arbeiten gewährleisten.

3.2.2 Machbarkeitsstudie für den Einsatz eines automatisierten Systems in der ES Zellkultur

In Zusammenarbeit mit Dr. Peter Kiesau (Hamilton Life Science Robotics) wurden an einer isolierten Microlab STAR[®] Pipettierplattform grundlegende Untersuchungen zur Automatisierbarkeit von Zellkulturen durchgeführt.

Zunächst wurden wesentliche Parameter des Liquid Handling betrachtet. Da die verwendeten Medien unterschiedliche Konzentrationen an FCS und Serum Replacement[®] enthielten, musste geprüft werden, ob es beim Pipettieren dieser Medien zu einer problematischen Schaumbildung kommen konnte. Alle in den geplanten Prozessen einzusetzenden Medien erwiesen sich in dieser Hinsicht als unkritisch. Als weiterer entscheidender Parameter bei der Durchführung eines Mediumwechsels musste das Restvolumen nach Abnahme des verbrauchten Mediums gelten. Während bei einem manuellen Mediumwechsel ein Restvolumen von etwa 50 μ l pro Well einer Sechs-Well-Platte vorlag, betrug dieses bei einer automatisierten Medienabnahme von gerade stehenden Platten ca. 200 μ l. Bei einem Gesamtvolumen von 2000 μ l pro Well ist dies als kritisch zu betrachten. Wurde die Sechs-Well-Platte über einen Plattenheber schräg gestellt, so ließ sich das Restvolumen auf 50 μ l reduzieren. Die Implementierung eines Plattenhebers musste somit als Grundvoraussetzung für einen automatisierten Mediumwechsel betrachtet werden. Darüber hinaus wurde untersucht, wie lange Sechs-Well-Zellkulturplatten während eines automatisierten Mediumwechsels trockenstehen. Diese Phase musste minimiert werden, um negative Effekte des Austrocknens auf die Zellen zu

vermeiden. In den Händen eines Zellkultur-erfahrenen Wissenschaftlers betrug die Dauer des Trockenstehens etwa 30s, wenn eine Sechs-Well-Platte bearbeitet wurde. In der täglichen Praxis werden auch Medienwechsel an zwei Sechs-Well-Platten parallel durchgeführt, die Platten stehen dann für etwa 60s trocken. Bei einem automatisierten Mediumwechsel betrug die Dauer des Trockenstehens 45s und lag somit innerhalb des Toleranzbereichs. Abschließend wurde untersucht, ob es möglich ist, geringe Volumina an Wachstumsfaktoren homogen im Zellkulturmedium zu verteilen. Hierzu wurden $2\mu\text{l}$ Trypanblau zu 2ml Wasser in ein Well einer Sechs-Well-Platte pipettiert. Durch das Ausführen von 2x3 Kreuzschritten mit dem Roboterarm konnte eine homogene Verteilung des Farbstoffs erreicht werden.

Im Folgenden wurden für die Automatisierung fundamentale Fragestellungen an lebenden Zellkulturen untersucht. Zunächst musste abgesichert werden, dass die automatisierte Zugabe von Medien zu adhärennten Zellkulturen nicht zu einer Beschädigung des Zellrasens führte. Bei der Zugabe von Medien mit Dispensiergeschwindigkeiten von $50\mu\text{l/s}$, $200\mu\text{l/s}$ und $400\mu\text{l/s}$ konnte weder für wachsende noch mitotisch inaktivierte Fibroblasten noch für murine oder humane ES Zellkulturen eine Auswirkung auf die Integrität des Zellrasens festgestellt werden. Auch nach drei Tagen automatisierten Mediumwechsels konnte bei diesen Kulturen kein Ablösen von Zellen beobachtet werden (Abb. 3.2.5).

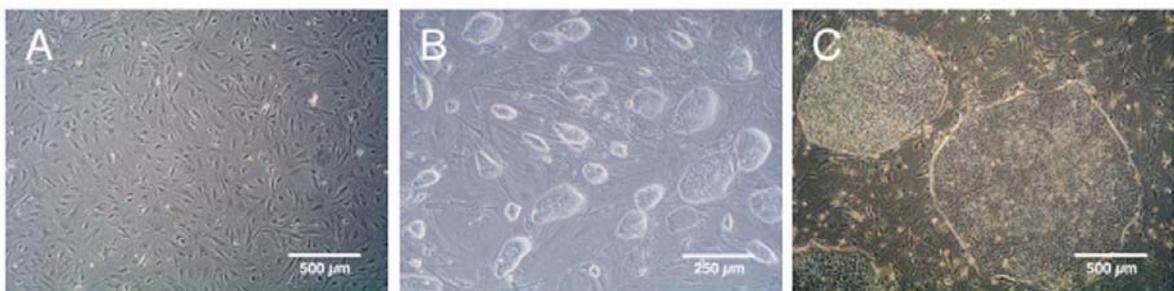


Abb. 3.2.5 Wiederholter automatisierter Mediumwechsel beeinträchtigt die Integrität des Zellrasens nicht. Über jeweils drei Tage wurden Mediumwechsel bei murinen Fibroblasten (A), murinen ES Zellen (B) und humanen ES Zellen (C) durch das automatisierte System vorgenommen. Obwohl eine hohe Dispensiergeschwindigkeit von $400\mu\text{l/s}$ eingesetzt wurde, konnte keine Beschädigung des Zellrasens beobachtet werden.

Des Weiteren wurden Bedingungen eingestellt, um ein homogenes Resuspendieren und Plattieren von Zellen zu erreichen. Für Feeder-Zellen und murine ES Zellen konnte eine homogene Verteilung erreicht werden, wenn diese Zellen zunächst mit

1000 μ l-Spitzen zweimal mit einer Dispensiergeschwindigkeit von 250 μ l/s resuspendiert und auf die Kulturplatten überführt wurden. Anschließend wurden die Zellen über 3x3 Kreuzbewegungen mit dem Roboterarm gleichmäßig auf der Platte verteilt (Abb. 3.2.6 A).

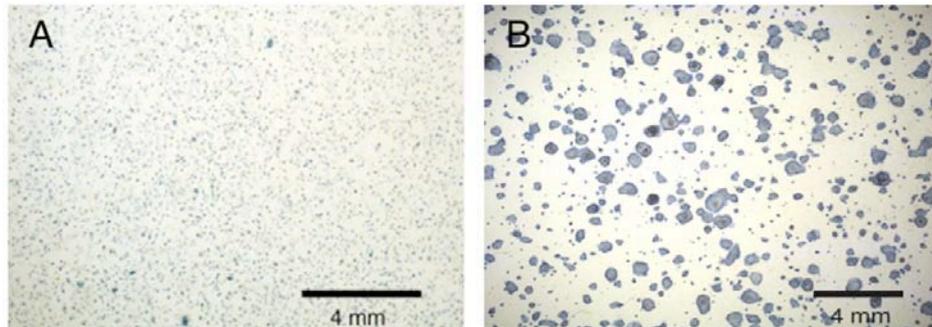


Abb. 3.2.6 Mit dem Zellkultursystem wird eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Zellkulturschale erreicht. Über 3x3 Kreuzbewegungen mit dem Roboterarm konnten mES Zellen homogen auf der Zellkulturplatte verteilt werden (A). Für hES Zellen wurde mit 6x3 Kreuzbewegungen ein vergleichbares Resultat erzielt (B). Eine geeignete Aggregatgröße der hES Zellen wurde über Zerkleinerung mittels 300 μ l-Pipettenspitzen eingestellt. Hierzu wurden 30 Zyklen mit einer Dispensiergeschwindigkeit von 500 μ l/s eingesetzt. Zur Visualisierung wurde für mES und hES Zellen ein histochemischer Nachweis der alkalische Phosphatase-Aktivität durchgeführt.

Diese Parameter mussten für das Plattieren humaner ES Zellen modifiziert werden, da diese Zellen in Aggregatform passagiert wurden. Unter Verwendung von 200 μ l-Spitzen wurden die hES Zell-Aggregate zunächst mit einer Dispensiergeschwindigkeit von 500 μ l/s über 30 Zyklen zerkleinert. Anschließend wurden die Zellen mit 1000 μ l-Spitzen fünfmal mit einer Dispensiergeschwindigkeit von 500 μ l/s resuspendiert und auf die Zellkulturplatten gegeben. Die Verteilung auf der Platte erfolgte über 6x3 Kreuzbewegungen. Unter Verwendung dieser Parameter konnte sowohl eine adäquate Größe der hES Zell-Aggregate als auch eine homogene Verteilung erreicht werden (Abb. 3.2.6 B).

Zwei Tage nach dem Plattieren von Feederzellen, mES Zellen und hES Zellen wurde der Einfluss des automatisierten Prozesses auf das Überleben der Zellen überprüft. Hierzu wurde eine Lebend-/Totzellzahlbestimmung durchgeführt. Für alle drei untersuchten Zelltypen war der Anteil an lebenden Zellen nach Behandlung durch den Pipettierroboter vergleichbar mit der manuellen Kontrolle (Abb. 3.2.7).

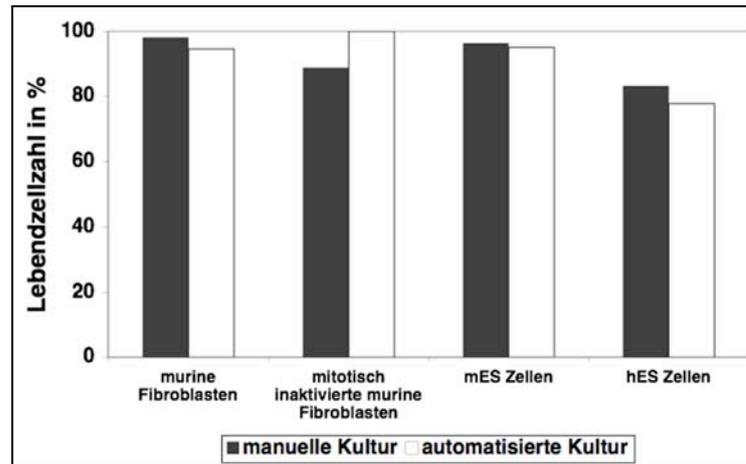


Abb. 3.2.7 Automatisiertes Plattieren hat keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Nach dem Plattieren von murinen Fibroblasten, mitotisch inaktivierten murinen Fibroblasten, murinen ES Zellen und humanen ES Zellen wurde eine Lebend-/Totzellzahlbestimmung über Trypanblau-Färbung vorgenommen. Der Anteil an lebenden Zellen unterscheidet sich für keine der untersuchten Zellpopulationen signifikant von der manuell plattierten Kontrolle. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse eines Einzelerperiments.

Des Weiteren wurde im Verlauf der Machbarkeitsstudie überprüft, inwieweit ein Abtrypsinieren von Fibroblasten automatisiert werden kann. Hierfür wurde ein Heizschüttler eingesetzt. Bei einer Temperatur von 37°C, einer Amplitude von 2cm und 100rpm wurden die Zellkulturplatten jeweils für 150s im Querformat und im Längsformat geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Dispensiergeschwindigkeit von 500 μ l/s je zweimal an drei Punkten pro Well abgespült und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Mit diesen Einstellungen konnte eine mit manuellen Trypsinierungsverfahren vergleichbare Restzellzahl auf der Zellkulturplatte erreicht werden (Abb. 3.2.8 A-C). Einen Tag nach dem Trypsinieren und erneuten Ausplattieren der Zellen wurde das Überleben der Zellen mittels Lebend-/Totzellzahlbestimmung untersucht. Ein vergleichbarer Anteil an lebenden Zellen im automatisierten und im manuellen Experiment konnte festgestellt werden (Abb. 3.2.8 D).

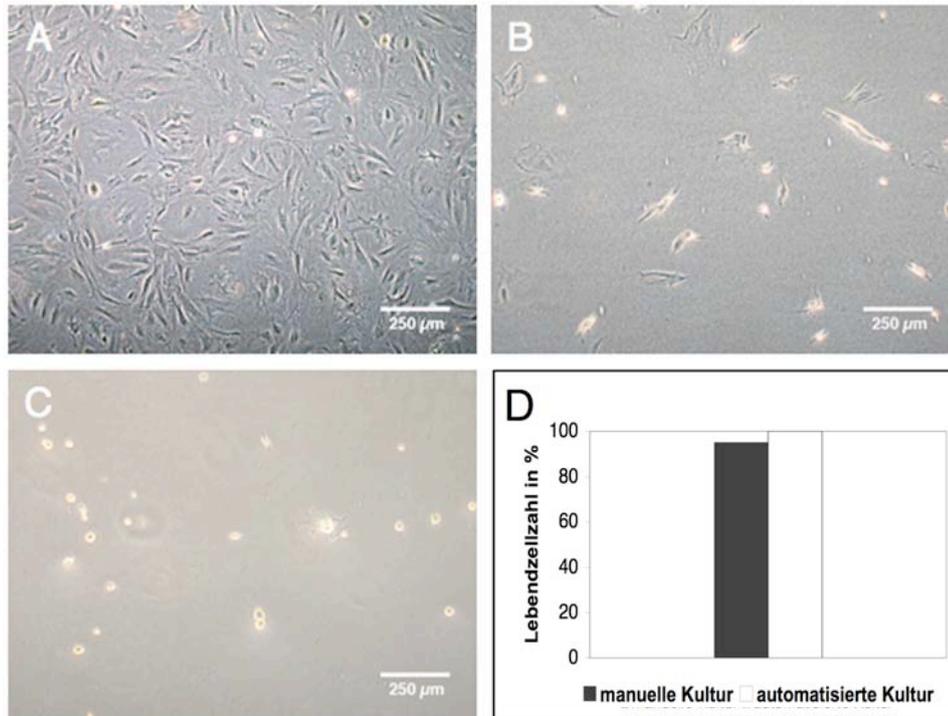


Abb. 3.2.8 Automatisiertes Trypsinieren von Zellkulturen erfolgt mit derselben Effizienz wie das manuelle Verfahren. Murine Fibroblasten (A, vor dem Trypsinieren) wurden manuell (B) und durch das automatisierte System (C) mittels Trypsinbehandlung von der Zellkulturplatte abgelöst. Der Anteil an auf der Zellkulturplatte zurückbleibenden Zellen ist für beide Verfahren vergleichbar. Im Anschluss an das Trypsinieren wurde die Viabilität der Zellen über Lebend-/Totzellzahlbestimmung festgestellt. Der Anteil an lebenden Zellen war für automatisch behandelte Kulturen vergleichbar mit dem an manuellen Kontrollen. Dargestellt sind Daten aus Einzelexperimenten.

Abschließend wurde untersucht, ob mit wieder verwendbaren Pipettirnadeln kontaminationsfrei gearbeitet werden kann. Hierzu wurde ein Bakterienverschleppungsexperiment durchgeführt. Ampicillin-resistente *Escherichia coli*-Bakterien in LB-Medium wurden mit Pipettirnadeln aufgenommen und wieder abgegeben. Daraufhin wurden die Nadeln in einer Waschstation bei einer Durchflussrate von 12ml/s mit 3%iger Natriumhypochlorit-Lösung und anschließend mit sterilem Wasser bzw. nur mit sterilem Wasser gespült und in LB-Medium getaucht. Dieses LB-Medium wurde auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag waren die Positivkontrollen dicht mit Bakterienkolonien bewachsen, der Bakterientiter lag bei $1,36 \times 10^{10}$. Weder bei mit Hypochlorit noch mit Wasser gespülten Nadeln konnte ein Koloniewachstum beobachtet werden.

3.2.3 Langzeitkultivierung muriner und humaner ES Zellen in einem automatisierten System

Um das Zellkultursystem abschließend zu validieren, wurden automatisierte Langzeitkulturen muriner und humaner ES Zellen durchgeführt. Über Kultivierungszeiträume von vier Wochen und bei täglichem Mediumwechsel konnte bestätigt werden, dass automatisierte Medienwechsel sowie das automatisierte Plattieren von ES Zellen auf Fibroblastenrasen die Integrität des Zellrasens nicht beeinträchtigten. Beim Ausplattieren von Zellen wurde reproduzierbar eine homogene Verteilung erreicht. Nach vierwöchiger automatisierter Kultivierung zeigten sowohl murine als auch humane ES Zellkolonien dieselben typischen Morphologien wie in der manuellen Kultur. Während mES Zellkolonien eine kompakte Form aufwiesen, zeigten hES Zellkolonien klar abgegrenzte Ränder und keine Anzeichen von Differenzierungsphänomenen (Abb.3.2.9, A mES; B hES). Obwohl die ES Zellen in Antibiotika-freien Medien kultiviert wurden, war in den automatisierten Kulturen keine mikrobielle Kontamination zu beobachten.

Während der Langzeitkultivierung zeigten ES Zellen, die im automatisierten System kultiviert wurden, ein mit den manuellen Kontrollen vergleichbares Wachstumsverhalten. Die mittleren spezifischen Wachstumsraten von mES und hES Zellen, die automatisiert kultiviert wurden, entsprachen mit $0,72 \pm 0,06 \text{d}^{-1}$ bzw. $0,22 \pm 0,003 \text{d}^{-1}$ den Wachstumsraten der manuellen Kontrollen (Abb. 3.2.9, C mES; D hES). Die metabolische Analyse ließ erkennen, dass sowohl die Glukoseverbrauchsrate von mES Zellen ($0,9 \pm 0,17 \text{ mM/d} \cdot 10^8 \text{ Zellen}$) als auch die von hES Zellen ($5,28 \pm 0,9 \text{ mM/d} \cdot 10^8 \text{ Zellen}$) durch die automatisierte Kultivierung nicht beeinflusst wurden. Auch die Laktatproduktionsraten von mES Zellen ($2,45 \pm 0,44 \text{ mM/d} \cdot 10^8 \text{ Zellen}$) und hES Zellen ($11,99 \pm 1,15 \text{ mM/d} \cdot 10^8 \text{ Zellen}$) unterschieden sich nicht signifikant von denen der manuellen Kontrollen (Abb. 3.2.9, E mES; F hES).

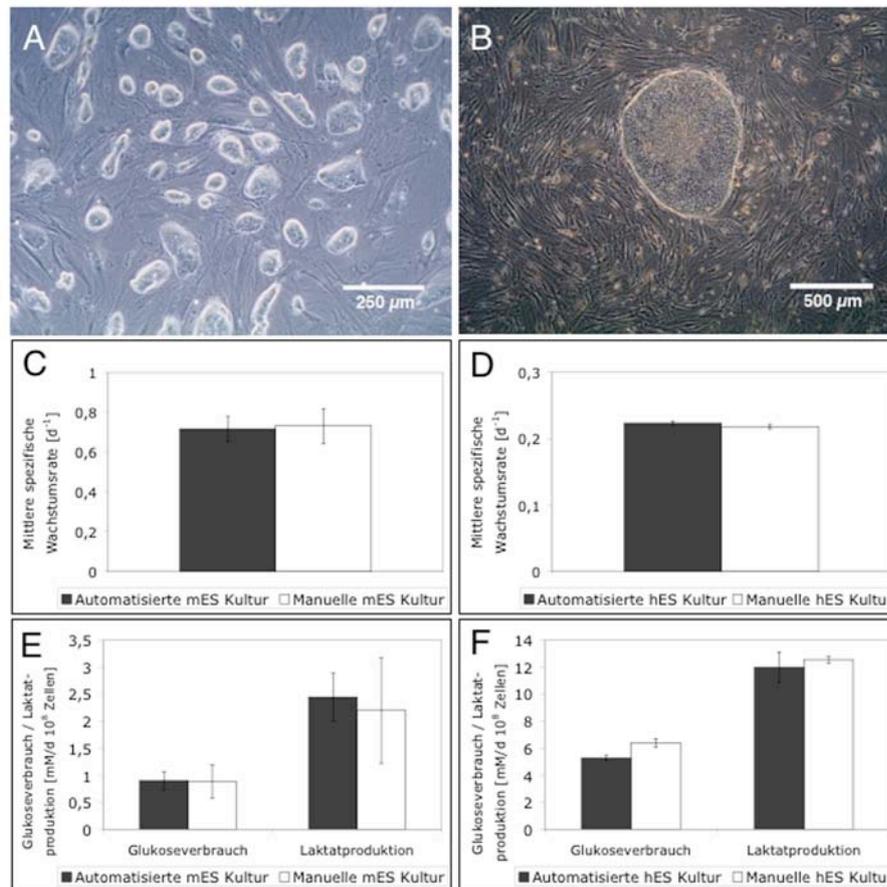


Abb. 3.2.9 Morphologie, Wachstumsrate und metabolische Aktivität von ES Zellen werden durch automatisierte Kultivierung nicht beeinflusst. Durch das automatisierte System kultivierte ES Zellen zeigen typische Morphologien (A, mES Zellen; B, hES Zellen). Mittlere spezifische Wachstumsrate (C, mES Zellen; D, hES Zellen) sowie Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten (E, mES Zellen; F, hES Zellen) von automatisiert kultivierten ES Zellen sind vergleichbar mit denen manuell kultivierter Zellen. Quantitative Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. T-Tests ergaben p-Werte von 0,78 (Wachstumsrate, mES Zellen), 0,80 (Wachstumsrate, hES Zellen), 0,91 (Glukoseverbrauchsrate, mES Zellen), 0,28 (Glukoseverbrauchsrate, hES Zellen), 0,66 (Laktatproduktionsrate, mES Zellen) und 0,77 (Laktatproduktionsrate, hES Zellen). Dies lässt darauf schließen, dass es keine statistischen Unterschiede zwischen automatisierter und manueller Kultivierung gibt. Wachstumsraten von $0,7d^{-1}$ und $0,2d^{-1}$ entsprechen Verdopplungszeiten von 1d bzw. 3,5d.

Über immunzytochemische Analyse konnte gezeigt werden, dass die Expression der Pluripotenz-assoziierten Marker Oct-4 und SSEA-1 in mES Zellkulturen über den gesamten Zeitraum der automatisierten Kultivierung hinweg erhalten blieb (Abb. 3.2.10). Mit $96\pm 2\%$ entsprach der Anteil an Oct-4-exprimierenden Zellen in den automatisierten mES Zellkulturen dem in manuellen Kulturen ($97\pm 1\%$; Abb. 3.2.10 A-C). Der Oberflächenmarker SSEA-1 wurde von $94\pm 2\%$ der automatisiert kultivierten mES Zellen und, im Vergleich, von $92\pm 2\%$ der manuell kultivierten Zellen exprimiert (Abb. 3.2.10 D-F).

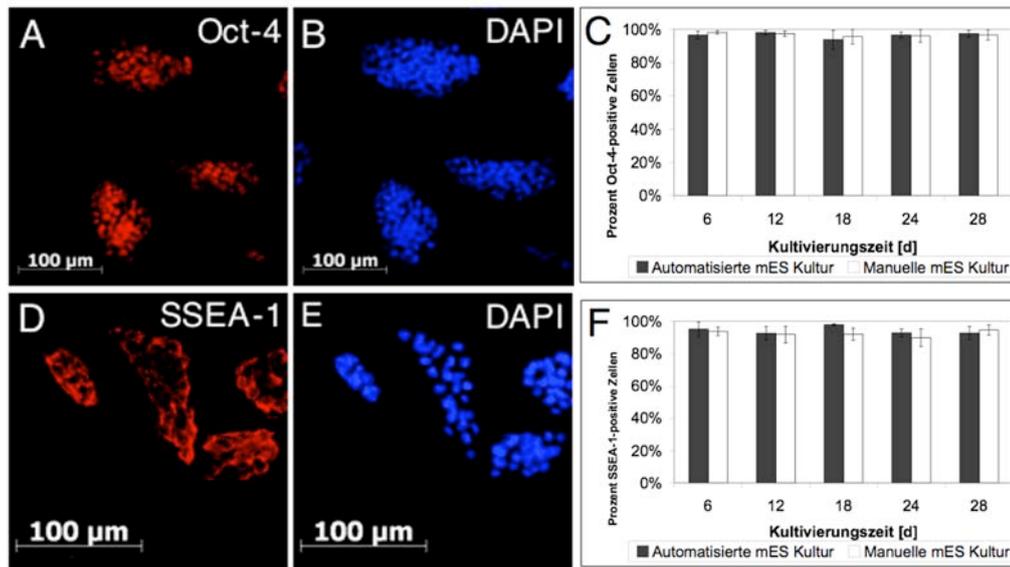


Abb. 3.2.10 Die Expression Pluripotenz-assoziiertes Marker bei durch das automatisierte System propagierten mES Zellen bleibt erhalten. Nach vierwöchiger automatisierter Kultivierung ist das Expressionsniveau der Pluripotenz-assoziierten Marker Oct-4 (A, B, C) und SSEA-1 (D, E, F) vergleichbar mit dem bei manuellen Kontrollen. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Die quantitativen Immunfluoreszenz-Daten basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Ebenso wenig unterschied sich mit einem Anteil von $96\pm 1\%$ positiven Zellen das Expressionsniveau von Oct-4 in automatisierten hES Zellkulturen von dem in manuellen Kontrollen ($96\pm 1\%$; Abb. 3.2.11 A-C). Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass $87\pm 4\%$ der hES Zellen, die automatisiert kultiviert worden waren, positiv für den Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker Tra-1-60 waren (manuelle Kontrolle: $84\pm 2\%$; Abb. 3.2.11 D), während $89\pm 2\%$ eine Färbung für Tra-1-81 zeigten (manuelle Kontrolle: $86\pm 5\%$; Abb. 3.2.11 E).

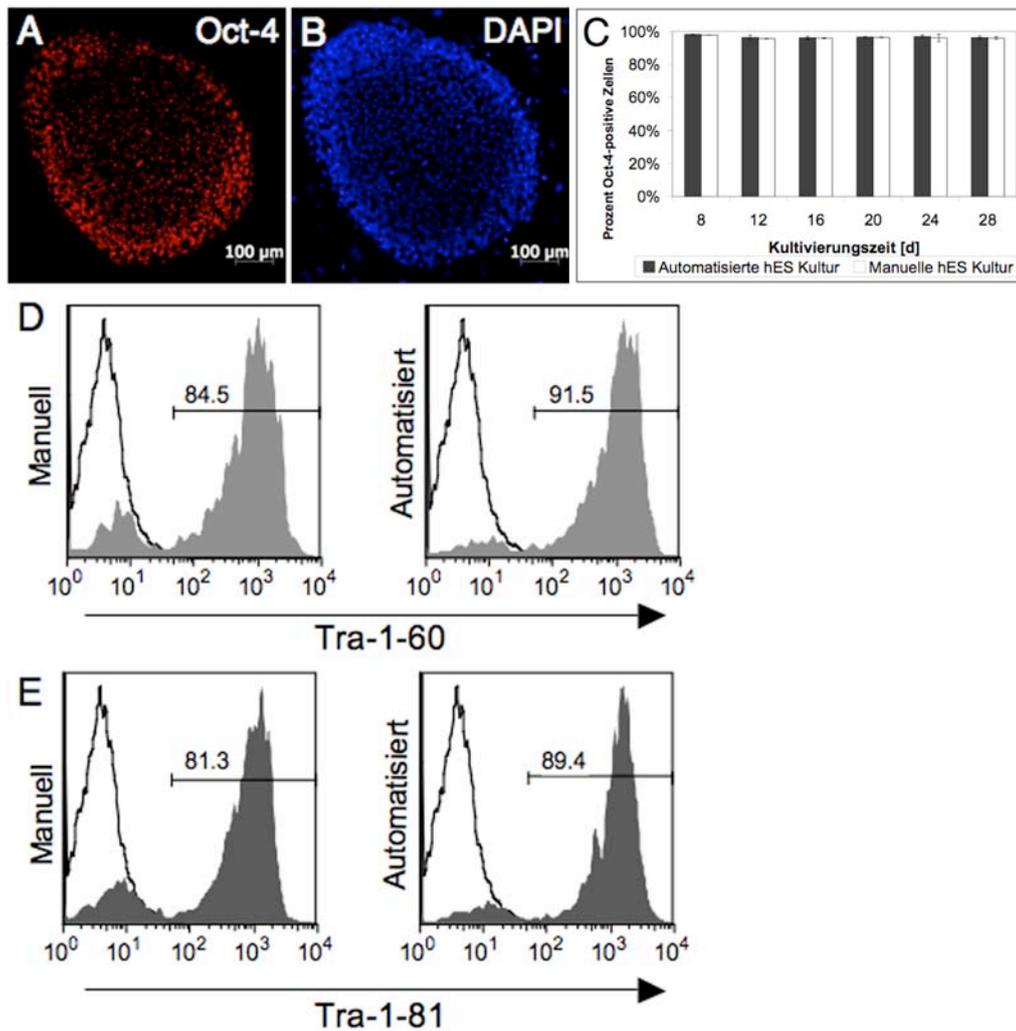


Abb. 3.2.11 Automatisiert kultivierte hES Zellen zeigen keine Veränderung in der Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker. Immunfluoreszenzanalysen (A, B, C) und Durchflusszytometrie (E, F) zeigen, dass durch das Zellkultursystem propagierte hES Zellen eine mit der Kontrolle vergleichbare Expression von Oct-4, Tra-1-60 und Tra-1-81 aufweisen. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Die quantitativen Immunfluoreszenz-Daten basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die durchflusszytometrischen Daten beziehen sich auf einzelne, repräsentative Experimente. Feederzellen und tote Zellen wurden über Gating nach Forward Scatter- und Sideward Scatter-Eigenschaften sowie nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Offene Histogramme entsprechen Negativkontrollen, gefüllte Histogramme stellen Färbungen auf die angegebenen Pluripotenz-assoziierten Marker dar. Die Balken zeigen den Bereich der Fluoreszenzintensität an, der in die Berechnung des Anteils an für einen Pluripotenz-assoziierten Marker positiven Zellen einging. Als negativ für den jeweiligen Marker wurden die Zellen betrachtet, deren Fluoreszenzintensität im Bereich der Negativkontrolle lag.

Die Daten zur Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker konnten für humane ES Zellen auf mRNA Ebene über quantitative RT-PCR bestätigt werden. hES Zellen, die automatisch kultiviert wurden, zeigten keine Reduktion in der Expression der Pluripotenz-assoziierten Marker Oct-4, Nanog und Rex-1 (Abb. 3.2.12 A). Zugleich war bei diesen Zellen keine Erhöhung in der Expression Differenzierungs-assoziiierter Marker wie α -Fetoprotein, Nestin oder Vimentin festzustellen (Abb. 3.2.12 B).

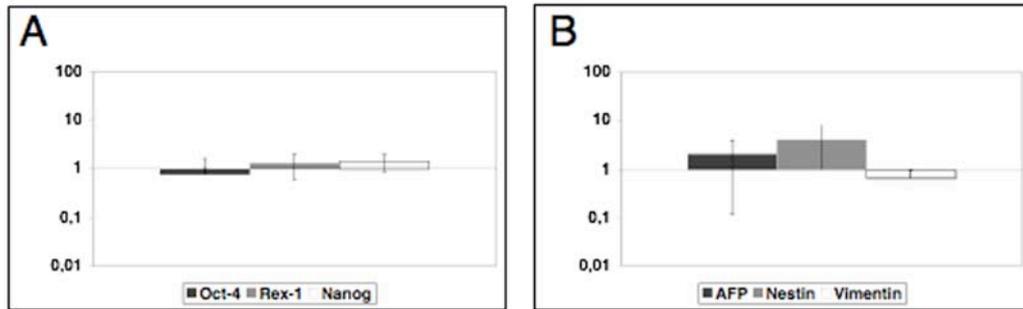


Abb. 3.2.12 Expressionsmuster Pluripotenz-assoziiertes und Differenzierungs-assoziiertes Gene werden durch automatisierte Kultivierung nicht beeinflusst. Nach einer vierwöchigen automatisierten Kultivierung zeigen hES Zellen in quantitativen RT-PCR-Untersuchungen keine signifikante Veränderung in der Expression der Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct-4, Rex-1 und Nanog (A). Die Expression der Differenzierungs-assoziierten Gene α -Fetoprotein (AFP), Nestin und Vimentin unterscheidet sich ebenfalls nicht von der Expression bei Kontrollzellen (B). Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten \pm Standardabweichung. Die für die automatisierten Kulturen erhobenen Daten wurden nach der $\Delta\Delta$ CP-Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für manuell kultivierte Kontrollkulturen gewonnen wurden, bezogen.

Eine vierwöchige automatisierte Kultivierung zeigte keine Auswirkungen auf den Karyotyp humaner ES Zellen. Über G-Bänderung konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Zelllinie I3 als auch die Zelllinie H9.2 (Daten nicht gezeigt) im Anschluss an eine automatisierte Kultivierung einen stabilen Karyotyp besaßen (Abb. 3.2.13).

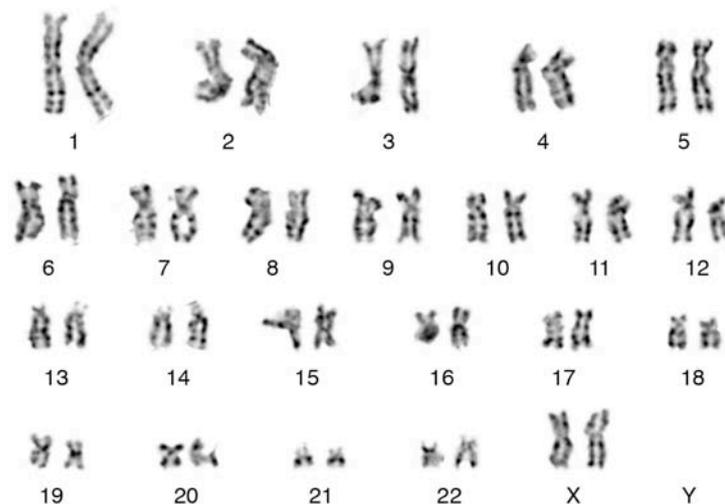


Abb. 3.2.13 Automatisiert kultivierte hES Zellen besitzen einen stabilen Karyotyp. Die durchgeführten Karyotypisierungen zeigen, dass die hES Zelllinien I3 und H9.2 nach einer vierwöchigen automatisierten Kultivierung einen stabilen Karyotyp (46XX) aufweisen. Abgebildet ist ein Karyogramm der Zelllinie I3. Mindestens 20 Metaphasen pro Zelllinie wurden ausgewertet. Die Karyogramm-Darstellung erfolgte unter Verwendung der Software CytoVision Ultra.

Um das *in vitro*-Differenzierungspotential der ES Zellen nach einer vierwöchigen automatisierten Kultivierung zu untersuchen, wurde eine EB-Bildung eingeleitet.

Sowohl mES als auch hES Zellen waren im Anschluss an die automatisierte Kultur dazu in der Lage, EBs auszubilden. Die immunzytochemische Analyse von Kryoschnitten durch aus mES und hES Zellen gebildete EBs zeigte die Anwesenheit von α -Fetoprotein-, Desmin- und Zytokeratin-positiven Zellen (Abb. 3.2.14). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ES Zellen ihr Multi-Keimblatt-Differenzierungspotential während der automatisierten Kultivierung erhalten.

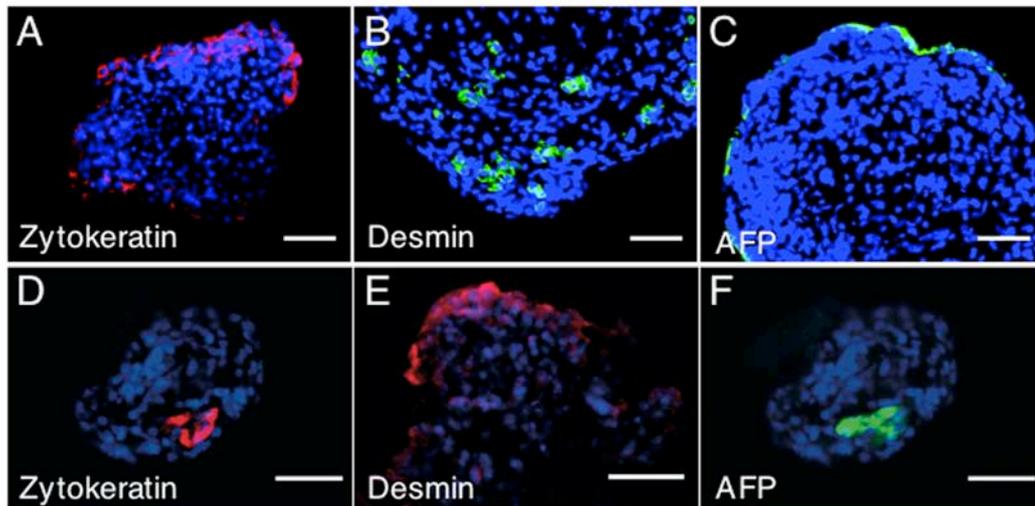


Abb. 3.2.14 Erhalt des *in vitro* Differenzierungspotentials. Nach vierwöchiger automatisierter Kultivierung bilden mES Zellen (A-C) und hES Zellen (D-F) Embryoidkörper, die die Keimblatt-assoziierten Marker Zytokeratin (A, D; Ektoderm), Desmin (B, E; Mesoderm) und α -Fetoprotein (AFP, C, F; Entoderm) exprimieren. Kerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Maßstab = 50 μ m.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass es möglich ist, ES Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg automatisiert zu kultivieren, ohne ihr Wachstumsverhalten und ihr *in vitro*-Multikeimblatt-Differenzierungspotential zu beeinflussen.

3.2.4 Weiterentwicklung des automatisierten Systems für die ES Zellkultur

Um die Eigenständigkeit des Systems für die ES Zellkultur zu erhöhen, wurde in Zusammenarbeit mit Hamilton Life Science Robotics eine Zentrifuge mit den dazugehörigen Methoden implementiert (Abb. 3.2.15). Bei der eingesetzten Zentrifuge handelt es sich um eine Platten-Zentrifuge, die durch einen Roboter-Greifarm bedient werden kann. Für die Zentrifugation werden Deep-Well-Platten verwendet, die 96 Wells mit einem Volumen von je 2ml besitzen und problemlos von einem Roboterarm

transportiert werden können. Die entsprechenden Methoden verknüpfen die bereits zuvor existierenden Methoden zum Abtrysinieren und zum Plattieren von Zellen.

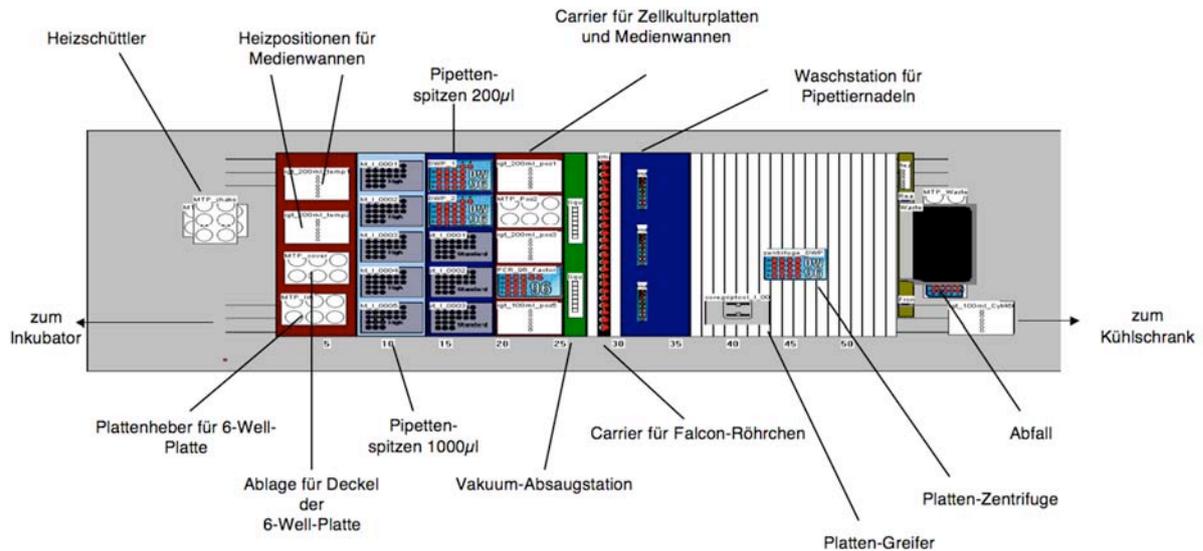


Abb. 3.2.15 Erweiterung des automatisierten Zellkultursystems. Das Zellkultursystem wurde um eine Platten-Zentrifuge erweitert, die es nunmehr ermöglicht, das Passagieren von Zellkulturen vollständig zu automatisieren. Zum Beschicken der Zentrifuge ist ein spezieller Platten-Greifer nötig.

Ein automatisiertes Zellkultursystem für die Kultivierung muriner und humaner ES Zellen konnte entwickelt und validiert werden. Schließlich war es möglich, die Häufigkeit der Anwender-Intervention durch die Implementierung einer Zentrifuge deutlich zu verringern. Die bislang durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass eine automatisierte Kultivierung in Verbindung mit einer automatisierten Zentrifugation keine negativen Auswirkungen auf die Proliferation und die Pluripotenzhaltung humaner ES Zellen hat.

3.3 Entwicklung eines skalierbaren Prozesses zur Kultivierung humaner ES Zellen

3.3.1 Untersuchung konditionierter Medien aus Bioreaktor-basierten Prozessen

Eine Heraufskalierung der humanen ES Zellkultur unter Beibehaltung des klassischen Kokultur-Paradigmas ist äußerst komplex. Zum einen erfordert ein solcher Prozess zwei Besiedlungsphasen, zum anderen müssen Verfahren entwickelt werden, um die beiden Zelltypen am Ende des Prozesses effizient voneinander zu trennen. Zugleich war zu Beginn dieser Arbeit die Entwicklung eines vollständig definierten Kulturmediums absehbar; mit der Verfügbarkeit eines solchen definierten Mediums würde ein skalierbarer Prozess das fehlende Glied zur Produktion großer hES Zellzahlen unter standardisierten Bedingungen darstellen. Vor diesem Hintergrund wurde bei der Entwicklung des skalierbaren Prozesses auf eine direkte Kokultur mit Feederzellen verzichtet und stattdessen Fibroblasten-konditioniertes Medium eingesetzt. Der vorzusehende Umfang an Etablierungs- und Optimierungsarbeiten machte große Mengen an konditioniertem Medium erforderlich. Daher wurde eine Kooperation mit Prof. Dr. Jürgen Lehmann (Technische Fakultät der Universität Bielefeld) initiiert. An der Universität Bielefeld sollten Bioreaktor-basierte Verfahren zur Produktion konditionierten Mediums entwickelt werden. Die hierbei gewonnenen Medien wurden im Rahmen dieser Dissertation auf ihre Funktionalität in der Erhaltung der Pluripotenz humaner ES Zellen hin untersucht. In Bielefeld wurden primäre murine Fibroblasten, humane Fibroblasten sowie die Fibroblastenzelllinie STO in Microcarrier-basierten Prozessen für die Produktion konditionierter Medien eingesetzt (Nottorf, 2003). Die in diesen Prozessen gewonnenen Medien wurden nach Bonn transferiert und in einem Screening-Ansatz auf ihre Pluripotenz-erhaltende Wirkung hin getestet. Hierbei wurden humane ES Zellen über drei Passagen in den entsprechenden Medien kultiviert und am Ende jeder Passage auf alkalische Phosphatase-Aktivität hin untersucht. Als Kontrollen dienten in Monolayer-Kulturen hergestelltes konditioniertes Medium sowie nicht konditioniertes hES Zellmedium. Auf Grundlage dieses Assaysystems konnte eine gute erste Abschätzung über die Funktionalität des

konditionierten Mediums vorgenommen werden, da in nicht konditioniertem Medium am Ende der dritten Passage keine hES Zellen mehr zu detektieren waren.

hES Zellen konnten unter Erhalt ihrer alkalische Phosphatase-Aktivität über drei Passagen in Medien, die von murinen Fibroblasten in einem Spinnerprozess konditioniert worden waren, kultiviert werden (Abb. 3.3.1 A-D). Wurden jedoch in Spinnerprozessen gewonnene konditionierte Medien von humanen Fibroblasten oder STO-Zellen eingesetzt, so ließen sich nach spätestens drei Passagen keine hES Zellen mit alkalischer Phosphatase-Aktivität mehr vorfinden. Die Pluripotenz-erhaltende Wirkung dieser Medien war somit als äußerst eingeschränkt zu betrachten.

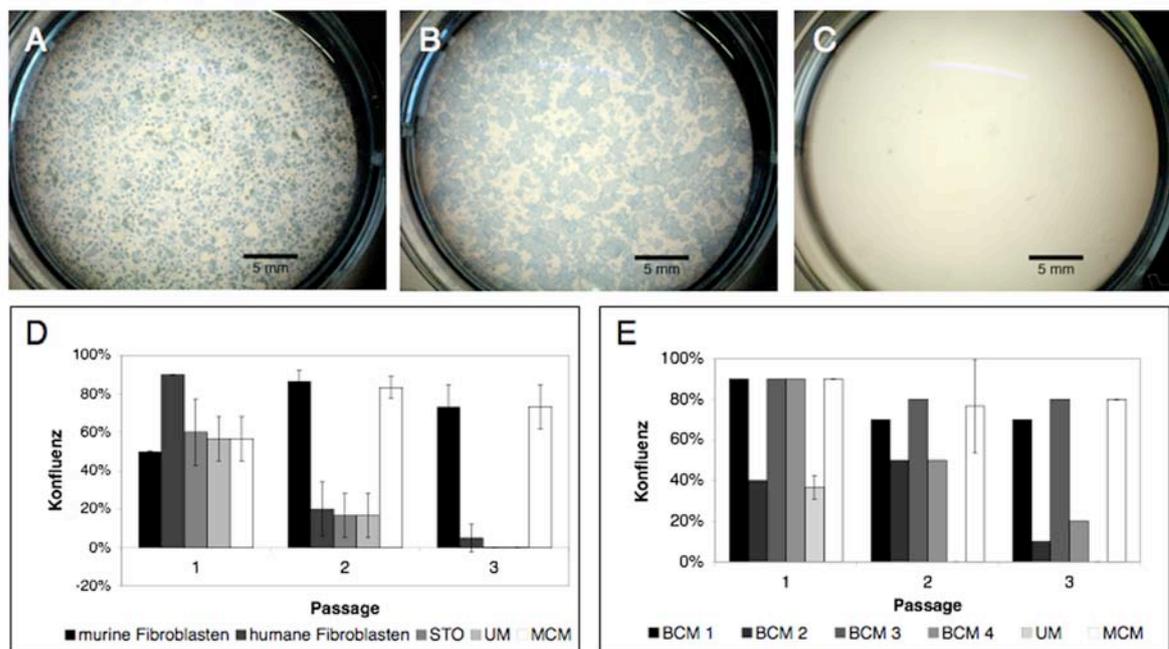


Abb. 3.3.1 In Microcarrier-basierten Prozessen erzeugte Fibroblasten-konditionierte Medien weisen deutliche Qualitätsunterschiede auf. In einem Spinnerprozess gewonnenes konditioniertes Medium von murinen Fibroblasten ist dazu geeignet, das Wachstum alkalische Phosphatase (AP)-positiver hES Zellen über drei Passagen aufrechtzuerhalten (A, D). Es ist damit vergleichbar mit in Monolayer-Kulturen hergestelltem konditioniertem Medium (MCM) von murinen Fibroblasten (B, D). Im Gegensatz hierzu können nach einer Kultivierung über drei Passagen in unkonditioniertem hES Zellmedium (UM) keine AP-positiven hES Zellkolonien mehr detektiert werden (C, D). In Spinnerprozessen gewonnenes konditioniertes Medium von humanen Fibroblasten oder STO-Zellen zeigt keine Funktionalität (D). Eine starke Variabilität besteht zwischen von murinen Fibroblasten konditionierten Medien, die zu verschiedenen Zeitpunkten von zwei kontrollierten Bioreaktorprozessen geerntet wurden (BCM, E). Während zu Beginn der Prozesse (Tage 3-5 der Kultivierung) gewonnenes konditioniertes Medium (BCM 1, BCM 3) dazu geeignet ist, das Wachstum AP-positiver hES Zellen über drei Passagen aufrechtzuerhalten, zeigt das am Ende der Prozesse (Tage 7-10 der Kultivierung) gewonnene konditionierte Medium (BCM 2, BCM 4) keine Funktionalität.

Über jeweils drei Passagen wurden hES Zellen in den untersuchten konditionierten Medien kultiviert. Am Ende jeder Passage wurde ein histochemischer Nachweis auf AP-Aktivität durchgeführt (A-C) und die Konfluenz der AP-positiven hES Zellkolonien bestimmt (D, E). Dargestellt sind Mittelwerte für mindestens zwei unabhängig voneinander hergestellte konditionierte Medien \pm Standardabweichung (D) bzw. Einzelwerte für zu jeweils zwei unterschiedlichen Zeitpunkten zweier Reaktorläufe gewonnene konditionierte Medien und Mittelwerte \pm Standardabweichung für jeweils vier unabhängige Positiv- (MCM) und Negativkontrollen (UM) (E).

Im Folgenden wurden murine Fibroblasten zur Produktion konditionierten Mediums im Bioreaktor eingesetzt. Bei der Analyse dieser Medien musste eine sehr große Variabilität zwischen den zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Prozesses gewonnenen Medien festgestellt werden (Abb. 3.3.1 E). So besaßen Medien, die zu Beginn der Bioreaktorprozesse (Tage 3-5 des Prozesses) gewonnen wurden, eine gute Qualität für die Kultivierung humaner ES Zellen (BCM 1, BCM 3). Für Medien, die gegen Ende der Bioreaktorprozesse (Tage 7-10 des Prozesses) geerntet wurden, konnte jedoch keine Pluripotenz-erhaltende Wirkung über drei Passagen gezeigt werden (BCM 2, BCM 4). Wie die Standardabweichungen in Abb. 3.3.1 E zeigen, war diese Variabilität zwischen verschiedenen Chargen von in Monolayerkultur hergestelltem konditionierten Medium nicht zu beobachten.

Mit dem Ziel, eine Standardisierung des Produktionsprozesses für konditionierte Medien zu erreichen, wurde in Bielefeld eine Optimierung der Kulturführung vorgenommen (Bauwens, 2005). Die in dem optimierten Prozess gewonnenen konditionierten Medien wurden für die Kultivierung humaner ES Zellen über drei Passagen eingesetzt. Im Anschluss wurden die hES Zellkulturen durchflusszytometrisch auf die Expression der Pluripotenz-assoziierten Marker Tra-1-60 und Tra-1-81 hin untersucht (Abb. 3.3.2). Für die überprüften von murinen Fibroblasten konditionierten Medien musste festgestellt werden, dass sowohl der Anteil an Tra-1-60 (21,1% bis 1,91%) als auch der Anteil an Tra-1-81 exprimierenden Zellen (25,5% bis 2,5%) gegenüber der Kontrolle (Tra-1-60: 91,2%; Tra-1-81: 95,7%) erheblich reduziert war.

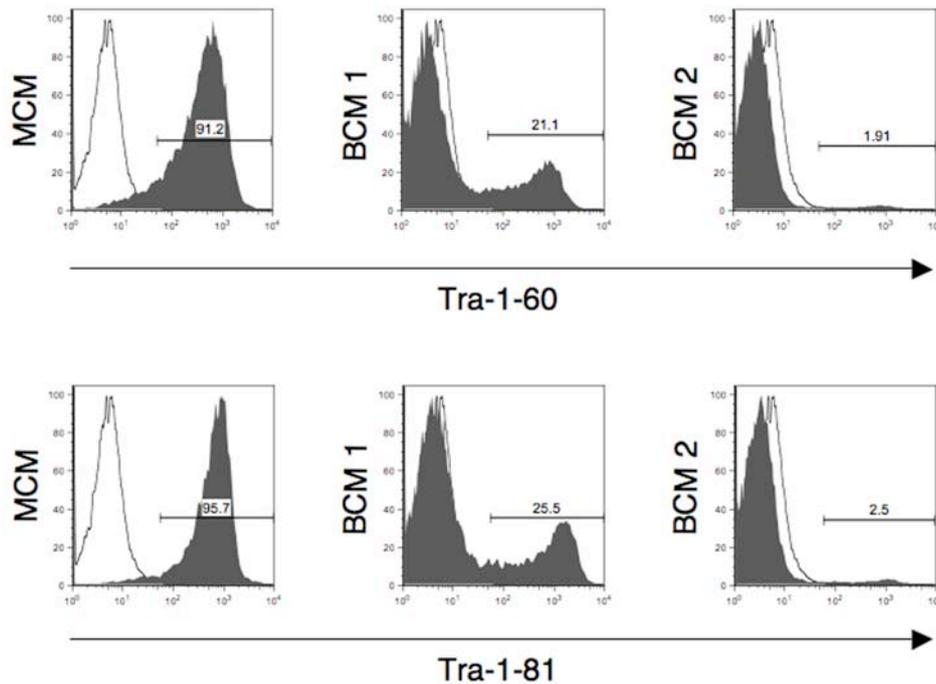


Abb. 3.3.2 Der Bioreaktorprozess zur Gewinnung konditionierter Medien für die hES Zellkultur bedarf weiterer Optimierung. hES Zellen, die in konditionierten Medien von murinen Fibroblasten aus Monolayer-Kulturen (MCM) kultiviert werden, sind in der Durchflusszytometrie zu über 90% positiv für die Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker Tra-1-60 und Tra-1-81. Bei Einsatz konditionierten Mediums aus zwei Läufen eines optimierten Bioreaktorprozesses (BCM 1, BCM 2) zeigen hES Zellen eine deutliche Reduktion bzw. einen Verlust der Tra-1-60- und Tra-1-81-Expression.

hES Zellen wurden für drei Passagen in den untersuchten konditionierten Medien kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch auf ihre Tra-1-60- und Tra-1-81-Expression hin untersucht. Tote Zellen wurden über Gating nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Offene Histogramme entsprechen Negativkontrollen, gefüllte Histogramme stellen Färbungen auf die angegebenen Pluripotenz-assoziierten Marker dar. Die Balken zeigen den Bereich der Fluoreszenzintensität an, der in die Berechnung des Anteils an für einen Pluripotenz-assoziierten Marker positiven Zellen einging. Als negativ für den jeweiligen Marker wurden die Zellen betrachtet, deren Fluoreszenzintensität im Bereich der Negativkontrolle lag. Dargestellt sind Ergebnisse aus Einzelexperimenten.

In den ersten Ansätzen, einen Bioreaktor-basierten Prozess zur Produktion konditionierten Mediums für die Kultivierung humaner ES Zellen zu entwickeln, konnte nicht die gewünschte Qualität und Standardisierung erreicht werden. Im Folgenden wurden daher ausschließlich konditionierte Medien eingesetzt, die in Monolayer-Kulturen hergestellt worden waren.

3.3.2 Evaluierung verschiedener Microcarrier für die humane ES Zellkultur

Der erste Schritt in der Entwicklung eines skalierbaren Prozesses für die Suspensionskultur humaner ES Zellen ist die Wahl eines geeigneten Trägermaterials für diese adhärent wachsenden Zellen. Verschiedene kommerziell erhältliche Microcarrier (vgl. 2.3.3) wurden auf ihre Eignung hin untersucht, die Proliferation undifferenzierter humaner ES Zellen zu unterstützen.

Zunächst wurden hES Zellen statisch mit den unterschiedlichen Microcarriern inkubiert und eine Kinetik der Adhäsion erstellt. Schon nach zwei Stunden war die Besiedlung der Carrier durch die Zellen abgeschlossen (Abb. 3.3.3). Bereits im initialen Adhäsionsverhalten der hES Zellen an die verschiedenen Microcarrierarten konnten Unterschiede beobachtet werden. So hefteten sich die Zellen am schnellsten an die Carrier Cytopore, Cytodex1 und Cytodex3, Pronectin und Biosilon an, während die Adhäsion an die Carrier CultispherG und CultispherS etwas langsamer verlief. Am schlechtesten erwies sich die Adhäsion an den Carrier FACT, an den sich nach 2 Stunden nur etwa 70% der Zellen angeheftet hatten.

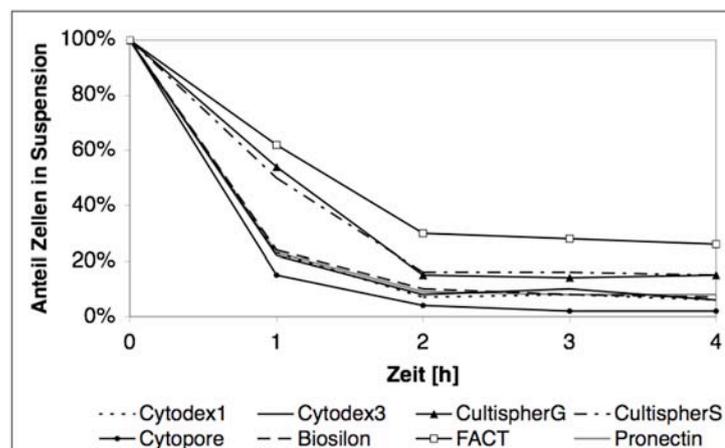


Abb. 3.3.3 Im Laufe von zwei Stunden adhären in Suspension befindliche hES Zellen an Microcarrier. Die schnellste Adhäsionskinetik zeigen hES Zellen bei Verwendung des Carriers Cytopore. Etwa vergleichbar ist das Adhäsionsverhalten an die Microcarrier Cytodex1, Cytodex3, Pronectin und Biosilon, während die Anheftung an die Carrier CultispherG und CultispherS etwas langsamer verläuft. Die geringste Zellzahl adhärert an den Microcarrier FACT. Nach etwa zwei Stunden ist die maximale adhärenente Zellzahl erreicht.

hES Zellen wurden mit den untersuchten Microcarriern in Suspension inkubiert. Jede Stunde wurde der Anteil der noch in Suspension befindlichen Zellen an der eingesetzten Gesamtzellzahl bestimmt.

Die hES Zellen wurden im Folgenden unter statischen Inkubationsbedingungen für eine Woche auf den Microcarriern kultiviert. Über diesen Zeitraum wurde eine Wachstumskurve der Zellen erstellt. Am Ende des Kultivierungszeitraums wurde eine Abschätzung der Pluripotenzerhaltung über Bestimmung der alkalische Phosphatase-Aktivität vorgenommen. Die höchste Proliferationsrate zeigten hES Zellen, die auf Cytodex- bzw. Cultispher-Microcarriern kultiviert worden waren. Mit Ausnahme der Carrier Pronectin und FACT, auf denen sich keine alkalische Phosphatase-positiven Zellen detektieren ließen, waren zwischen den einzelnen Carriertypen keine deutlichen Unterschiede in der alkalische Phosphatase-Aktivität zu beobachten. Es wurde apparent, dass unter den hier verwendeten Kultivierungsbedingungen eine Verklumpung der hES Zellen und der Carrier stattfand. Im Inneren der so entstandenen Aggregate nahm die alkalische Phosphatase-Aktivität deutlich ab. Eine Ausnahme bildete der Microcarrier Cytopore. Bei diesem Carrier wuchsen die hES Zellen innerhalb der makroporösen Struktur, wodurch eine Aggregatbildung verhindert wurde. Allerdings war die Proliferation der auf diesem Microcarrier kultivierten hES Zellen deutlich niedriger als diejenige für die übrigen Carrier (Abb. 3.3.4).

Da es das Ziel war, die hES Zellen auf den Microcarriern in einem gerührten System zu kultivieren, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, um das Adhäsionsverhalten der Zellen unter Scherstress zu untersuchen. Hierzu wurden die hES Zellen in Gegenwart der Microcarrier für eine Woche auf einem Wippschüttler inkubiert. Die alkalische Phosphatase-Aktivität der hES Zellen sowie ihre Tendenz zur Aggregation wurden durch den erzeugten Scherstress im Vergleich zu der statischen Versuchsanordnung nicht beeinflusst. Im Wachstumsverhalten der hES Zellen konnten jedoch Unterschiede zu dem stationär durchgeführten Versuch beobachtet werden. Diese betrafen vor allem die Carrier Cytodex1 und Cytodex3, für die unter Scherstress ein deutlich geringeres Zellwachstum zu verzeichnen war. Unter Scherstress zeigten hES Zellen auf dem Microcarrier CultispherG die höchste Proliferationsrate (Abb. 3.3.5).

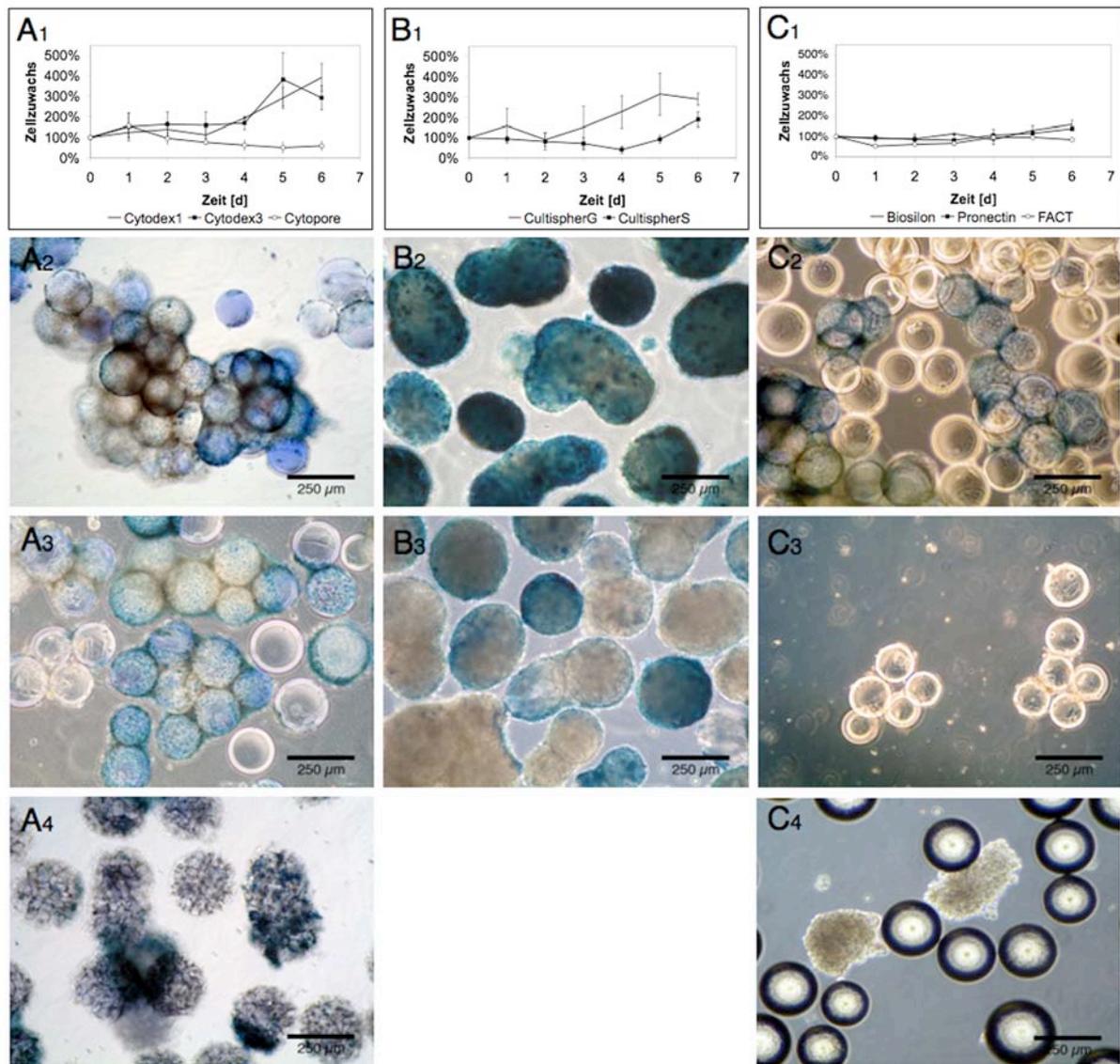


Abb. 3.3.4 hES Zellen können unter statischen Bedingungen auf Microcarriern kultiviert werden. Die höchste Proliferationsrate besitzen hierbei hES Zellen, die auf Cytodex1 oder Cytodex3-Microcarriern kultiviert werden (A_1). Nach sechs Tagen zeigen diese Zellen eine deutliche Tendenz zur Aggregatbildung, weisen jedoch zu einem Großteil alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität auf (A_2 Cytodex1, A_3 Cytodex3). Während auf Cytopore-Carriern kultivierte hES Zellen keinen Zellzuwachs verzeichnen (A_1), verhindert die makroporöse Struktur dieses Carriers eine Zellaggregation (A_4). Eine Zellproliferation unter Erhalt der AP-Aktivität ist für die Microcarrier CultispherG (B_1 , B_2) und CultispherS (B_1 , B_3) zu beobachten. Kaum ein Wachstum zeigen hES Zellen auf Biosilon-, Pronectin- und FACT-Carriern (C_1). Während auf Biosilon-Microcarriern AP-positive hES Zellen zu detektieren sind (C_2), zeigen hES Zellen auf Pronectin- (C_3) und FACT-Carriern (C_4) keine AP-Aktivität. Bei Verwendung von FACT tendieren die hES Zellen dazu, Aggregate untereinander zu bilden, statt auf den Microcarriern zu wachsen.

hES Zellen wurden über sechs Tage statisch mit den angegebenen Microcarriern auf Petrischalen inkubiert. Es wurde konditioniertes Medium aus Monolayerkulturen muriner Fibroblasten verwendet, das täglich erneuert wurde. Vor jedem Mediumwechsel wurde die Zellzahl über Kristallviolett-Färbung bestimmt, nach sechs Tagen wurde ein histochemischer AP-Nachweis durchgeführt. In A_1 , B_1 und C_1 sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus jeweils drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

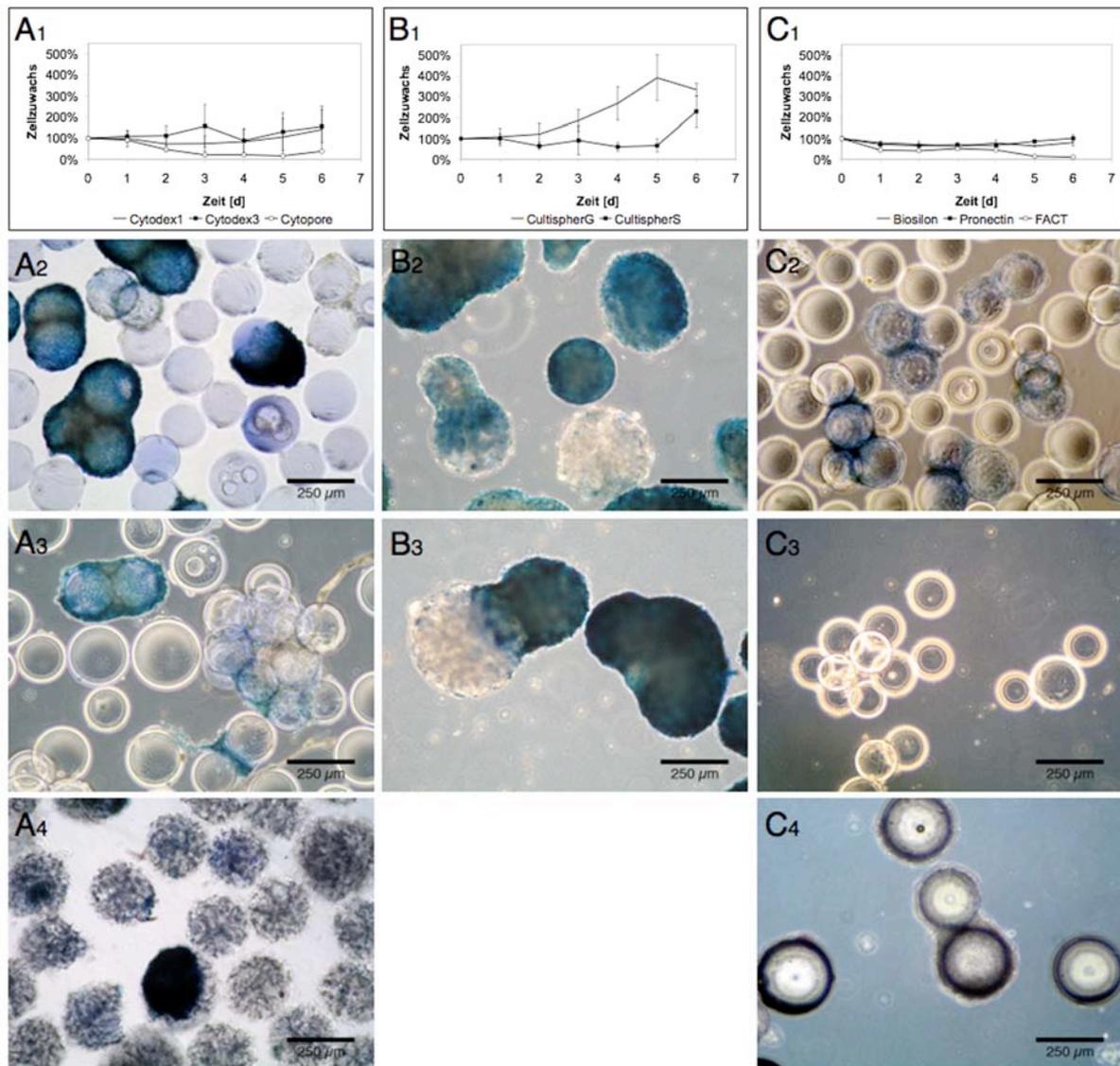


Abb. 3.3.5 hES Zellen können unter Scherstress auf Microcarriern kultiviert werden. Unter Scherstress besitzen hES Zellen, die auf Cytodex1 oder Cytodex3-Microcarriern kultiviert werden (A₁), eine niedrigere Wachstumsrate als unter statischen Kultivierungsbedingungen. Trotz einer Aggregatbildung zeigen diese Zellen alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität (A₂ Cytodex1, A₃ Cytodex3). Auf Cytopore-Carriern kultivierte hES Zellen weisen keine Proliferation auf (A₁), zeigen jedoch auch keine Zellaggregation (A₄). Das beste Wachstumsverhalten unter Scherstress zeigen hES Zellen auf den Microcarriern CultispherG (B₁, B₂) und CultispherS (B₁, B₃). Die AP-Aktivität bleibt hierbei erhalten. Kaum ein Wachstum weisen hES Zellen auf Biosilon-, Pronectin- und FACT-Carriern (C₁) auf. Während auf Biosilon-Microcarriern AP-positive hES Zellen zu detektieren sind (C₂), zeigen hES Zellen auf Pronectin- (C₃) und FACT-Carriern (C₄) keine AP-Aktivität. hES Zellen wurden über sechs Tage auf einem Wippschüttler mit den angegebenen Microcarriern inkubiert. Es wurde konditioniertes Medium aus Monolayerkulturen muriner Fibroblasten verwendet, das täglich erneuert wurde. Vor jedem Mediumwechsel wurde die Zellzahl über Kristallviolett-Färbung bestimmt, nach sechs Tagen wurde ein histochemischer AP-Nachweis durchgeführt. In A₁, B₁ und C₁ sind Mittelwerte ± Standardfehler aus jeweils drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Auf Grundlage der hier beschriebenen Daten wurden die Microcarrier CultispherG und Cytodex3 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Darüber hinaus wurde der Carrier Cytopore trotz des schlechten Abschneidens hinsichtlich der Proliferation in die engere Wahl gezogen, da die Kulturen mit diesem Carrier die geringste Tendenz zur Aggregatbildung aufwiesen.

3.3.3 Kultivierung humaner ES Zellen in einem unkontrollierten, Microcarrier-basierten System

Mit den Microcarriern Cytodex3, CultispherG und Cytopore wurden erste Versuche im gerührten System durchgeführt. Hierzu wurden Glasballspinner verwendet. Die hES Zellen wurden zunächst über Nacht in einem geringen Medienvolumen statisch mit den Microcarriern inkubiert, um eine initiale Adhäsion zu erreichen. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium verdoppelt und mit dem Rühren begonnen. Hierzu wurde Intervallrühren eingesetzt (30 Minuten 20rpm, 30 Minuten Rührpause), um es Zellen, die durch das Rühren von den Carriern abgelöst wurden, zu ermöglichen, erneut an Microcarrier zu adhären. Es wurde konditioniertes Medium aus Monolayerkulturen muriner Fibroblasten verwendet, das täglich erneuert wurde. Die Kultivierungsdauer betrug jeweils 12 Tage. Im gerührten System zeigten auf dem Carrier Cytodex3 kultivierte hES Zellen mit $0,34 \pm 0,02 d^{-1}$ die beste Wachstumsrate (Abb. 3.3.6).

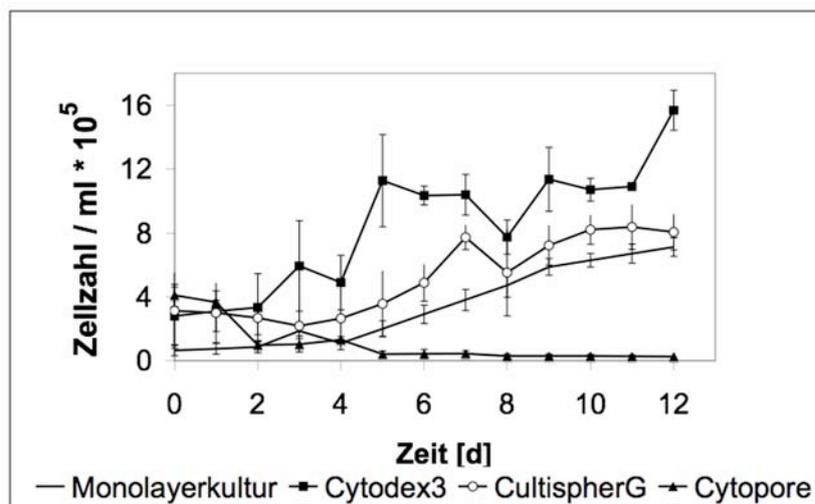


Abb. 3.3.6 hES Zellen proliferieren in Microcarrier-basierten Suspensionskulturen. Über 12 Tage in Suspension kultivierte hES Zellen zeigen bei Verwendung des Carriers Cytodex3 eine gegenüber der Monolayerkultur erhöhte Proliferation. Wird der Microcarrier CultispherG eingesetzt, so ist das Wachstum der hES Zellen mit der konventionellen Monolayerkultur vergleichbar. Eine Kultivierung der hES Zellen auf dem Carrier Cytopore führt nicht zu einer Proliferation der Zellen. Die mittleren spezifischen Wachstumsraten von hES Zellen auf Cytodex3-Carriern ($0,34 \pm 0,02 d^{-1}$) und CultispherG-Carriern ($0,24 \pm 0,03 d^{-1}$) unterscheiden sich signifikant von denen von hES Zellen auf Cytopore-Carriern ($-0,12 \pm 0,03 d^{-1}$; $p < 0,01$).

Vor jedem Mediumwechsel wurden zur Zellzahlbestimmung Proben für eine Kristallviolett-Färbung genommen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Die Pluripotenzerhaltung, abgeschätzt über die Bestimmung der alkalische Phosphatase-Aktivität, erwies sich für die Kulturen mit dem Carrier Cytopore am

besten, diese Kulturen zeigten zudem die geringste Verklumpung, jedoch mit $-0,12 \pm 0,03 d^{-1}$ auch eine negative Wachstumsrate. Darüber hinaus ließen sich die hES Zellen nur schwer von den Cytopore-Microcarriern ernten. In Verbindung mit der niedrigen Wachstumsrate führte dies zu unbefriedigenden Zellausbeuten. Mit einer Wachstumsrate von $0,24 \pm 0,03 d^{-1}$ proliferierten hES Zellen auch auf CultispherG-Carriern erheblich schlechter als auf Cytodex3-Microcarriern. Vor diesem Hintergrund wurde der Carrier Cytodex3 als am besten geeigneter Microcarrier für die Kultivierung humaner ES Zellen ausgewählt.

Über Rasterelektronenmikroskopie konnte ein optischer Eindruck von der Oberflächenstruktur der Microcarrier gewonnen werden. So besitzt der Carrier Cytodex3 (Abb. 3.3.7 A) eine glatte Oberfläche, während die Carrier CultispherG (Abb. 3.3.7 B) und Cytopore (Abb. 3.3.7 C) eine makroporöse Oberflächenstruktur aufweisen. Im Folgenden konnte für die Carrier, bei denen vornehmlich eine Oberflächenbesiedlung mit Zellen erfolgt, der Bewuchs mit hES Zellen näher untersucht werden.

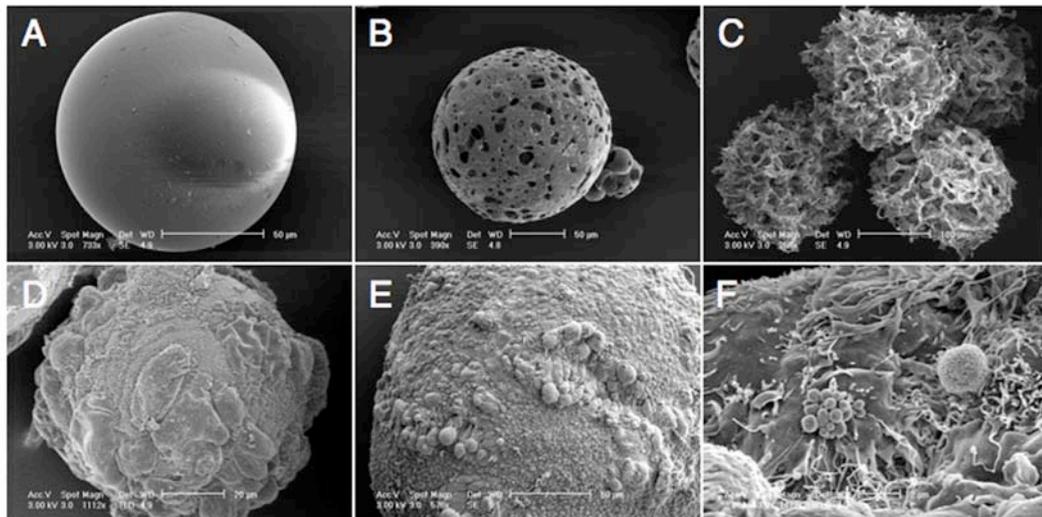


Abb. 3.3.7 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung unbewachsener und bewachsener Microcarrier. Der Carrier Cytodex3 (A) besitzt eine glatte Oberflächenstruktur, auf der die hES Zellen adhären und proliferieren (D). Im Gegensatz hierzu ist der Carrier CultispherG (B) makroporös, die hES Zellen wachsen nicht nur auf der Oberfläche des Carriers, sondern dringen auch in die Poren ein (E). Auch der Microcarrier Cytopore (C) weist eine makroporöse Struktur auf. Über Rasterelektronenmikroskopie (REM) können auch apoptotische Zellen detektiert werden (F), ihr Anteil erwies sich als sehr niedrig.

An Tag 12 der Kultivierung wurden Proben für die REM entnommen. Die REM erfolgte an einem Philips XL 30 SEM.

Trotz der Scherkräfte im gerührten System zeigten die hES Zellen eine gute Adhärenz an die Carrier Cytodex3 (Abb. 3.3.7 D). und CultispherG (Abb. 3.3.7 E). Da der Carrier Cytodex3 eine glatte Oberflächenstruktur aufweist, konnten die hES

Zellen bei diesem Carrier ausschließlich die Oberfläche bewachsen. CultisphereG-Carrier hingegen besitzen eine makroporöse Struktur, die in geringem Umfang das Einwachsen von Zellen in die Poren ermöglichte. Im Rasterelektronenmikroskop ließen die hES Zellen eine unauffällige Zellmorphologie erkennen. Nur einige wenige apoptotische Zellen (Abb. 3.3.7 F) waren zu beobachten.

Wurden hES Zell-bewachsene Cytodex3-Carrier nach einer 12-tägigen Kultivierung in Suspension auf murine Fibroblasten replattiert, so bildeten sich Kolonien. Bei einer durchschnittlichen Zellausbeute von $1,5 \times 10^6 \pm 0,1$ Zellen/ml entstanden pro ml ausplattierter Microcarrier-Zell-Suspension 126 ± 23 Kolonien. Dies entspricht einem Ausbeutekoeffizienten von $8,4 \times 10^{-5}$ Kolonien/eingesetzte Zelle. Die entstandenen Kolonien zeigten eine Expression der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenantigene Tra-1-60 (Abb. 3.3.8 A) und Tra-1-81 (Abb. 3.3.8 B) und wiesen eine typische Morphologie sowie eine klare Abgrenzung zum Feederrasen hin auf (Abb. 3.3.8 C). Sie besaßen alkalische Phosphatase-Aktivität (Abb. 3.3.8 D) und waren zu 97,7% Oct-4-positiv (Abb. 3.3.8 E, F).

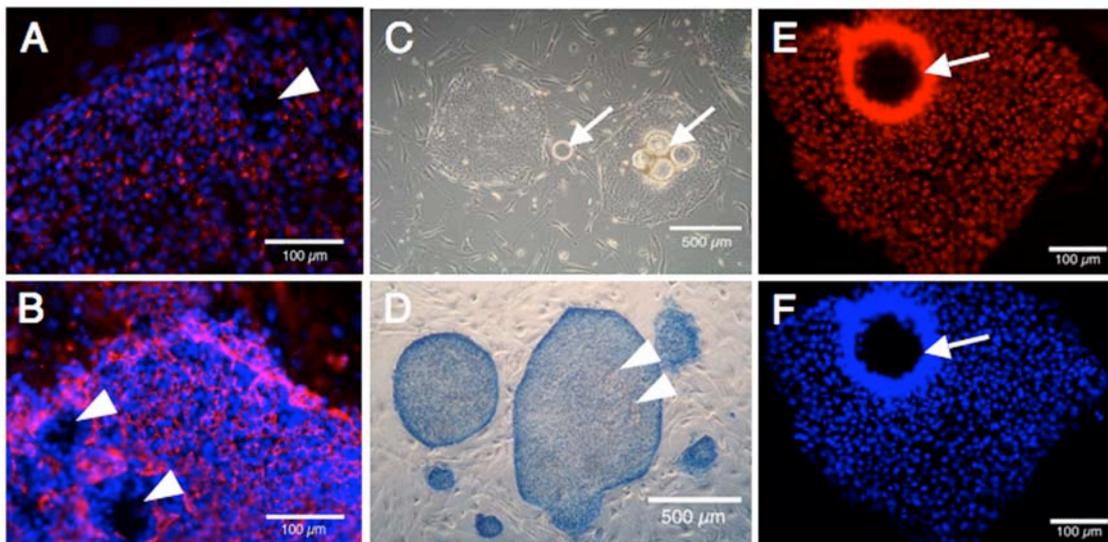


Abb. 3.3.8 Die Microcarrier-basierte Suspensionskultur erlaubt den Erhalt von hES Zelleigenschaften.

Werden die hES Zell-bewachsenen Carrier auf murine Fibroblasten ausplattiert, so bilden sich Kolonien, die positiv für die Pluripotenz-assoziierten Oberflächenantigene Tra-1-60 (A) und Tra-1-81 (B) sind, eine typische hES Zellmorphologie (C) aufweisen und alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität besitzen (D). Die Kolonien sind in der Immunzytochemie positiv für den Transkriptionsfaktor Oct-4 (E). Die Gegenfärbung der Kerne in F erfolgte mit DAPI. Die Pfeile weisen auf Microcarrier, von denen hES Zellkolonien ausgewachsen sind. Die Pfeilspitzen deuten auf Stellen innerhalb der Kolonien, von denen sich Microcarrier im Verlauf der Färbungen abgelöst haben.

An Tag 12 der Kultivierung wurden bewachsene Microcarrier entnommen und auf murine Fibroblasten ausplattiert. Nach vier Tagen wurden die Kolonien im Phasenkontrast und nach histochemischem AP-Nachweis an dem inversen Lichtmikroskop Axiovert 25 dokumentiert. Der immunzytochemische Nachweis von Tra-1-60, Tra-1-81 und Oct-4 erfolgte ebenfalls an Tag 4 nach dem Ausplattieren der Microcarrier. Die Dokumentation erfolgte an einem Axioskop 2.

Darüber hinaus ließen sich aus hES Zellen, die für eine Woche im gerührten System kultiviert worden waren, EBs bilden. Die Anwesenheit α -Fetoprotein-, Desmin- und Zytokeratin-positiver Zellen in diesen EBs deutete darauf hin, dass die Microcarrier-basierte Spinnerkultivierung der hES Zellen nicht zu einem Verlust des Multikeimblatt-Differenzierungspotentials geführt hatte (Abb. 3.3.9).

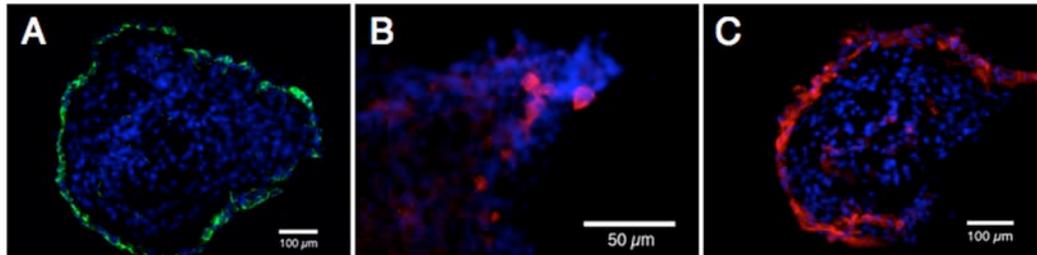


Abb. 3.3.9 Erhalt des in vitro Differenzierungspotentials. Nach 12tägiger Microcarrier-basierter Suspensionskultur bilden hES Zellen Embryoidkörper, die die Keimblatt-assoziierten Marker α -Fetoprotein (A, grün; Entoderm), Desmin (B, rot; Mesoderm) und Zytokeratin (C, rot; Ektoderm) exprimieren. Kerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Deutlich wurde jedoch auch, dass es in diesem System zu einer offensichtlichen Aggregatbildung kam, die von Differenzierungsphänomenen begleitet wurde. So zeigte die Untersuchung von hES Zellen nach einer 12-tägigen Spinnerkultivierung am konfokalen Laser Scanning Mikroskop, dass ein Teil der Zellen auf den hES Zell-Microcarrier-Aggregaten positiv für die Pluripotenz-assoziierten Oberflächenantigene Tra-1-60 und Tra-1-81 war. Es war jedoch auffällig, dass sich insbesondere im Inneren der Aggregate auch ein großer Anteil an Tra-1-60- und Tra-1-81-negativen Zellen befand (Abb. 3.3.10, A Tra-1-60; B Tra-1-81). Durchflusszytometrische Analysen bestätigten, dass nach einer 12-tägigen Spinnerkultivierung zwar ein deutlicher Anteil an Zellen in den Kulturen zu detektieren war, der die Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker Tra-1-60 und Tra-1-81 exprimierte. Es bildete sich aber auch eine Zellpopulation heraus, die negativ für diese beiden Marker war (Abb. 3.3.10). Dies führte dazu, dass der Gesamtanteil an Tra-1-60- und Tra-1-81-positiven Zellen in Spinnerkulturen deutlich unter dem in Monolayer-Kulturen lag. Betrag der Anteil an Tra-1-60-exprimierenden Zellen in Monolayer-Kulturen $88 \pm 8,3\%$, so lag er in Spinnerkulturen bei nur $36,6 \pm 13\%$. In Monolayer-Kulturen zeigten $91,7 \pm 5\%$ der Zellen eine Tra-1-81-Expression, im Gegensatz hierzu waren nur $44,9 \pm 13,2\%$ der Zellen in Spinnerkulturen positiv für diesen Marker.

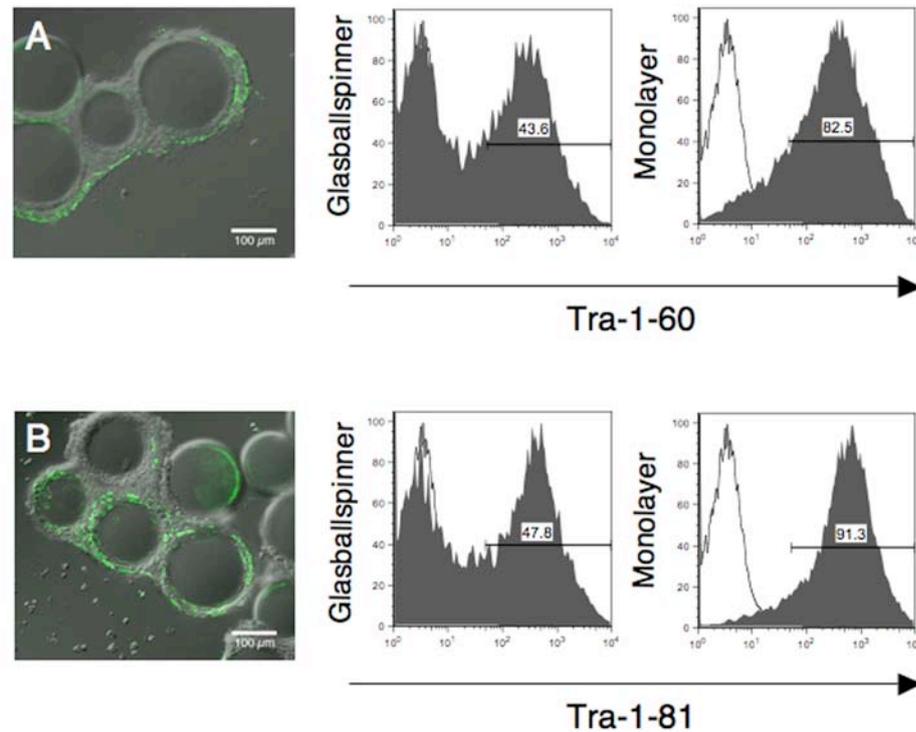


Abb. 3.3.10 Die Microcarrier-basierte Suspensionskultur erlaubt den Erhalt von hES Zelleigenschaften. Ein Teil der auf Cytodex3-Microcarrier wachsenden hES Zellen exprimiert die Pluripotenz-assoziierten Oberflächenantigene Tra-1-60 (A) und Tra-1-81 (B). Dies wird anhand von durchflusszytometrischen Analysen bestätigt. Der Anteil an Tra-1-60- und Tra-1-81-positiven Zellen in Suspensionskultur ist jedoch gegenüber hES Zell-Monolayer-Kulturen deutlich reduziert.

An Tag 12 der Kultivierung wurden Proben für die Untersuchung der Tra-1-60- und Tra-1-81-Expression genommen. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte an dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Olympus Fluoview 1000. Ebenfalls an Tag 12 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Im Anschluss an das enzymatische Ablösen der Zellen von den Carriern wurde mikroskopisch überprüft, dass keine Zellen auf den Carriern zurückblieben. Tote Zellen wurden über Gating nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Offene Histogramme entsprechen Negativkontrollen, gefüllte Histogramme stellen Färbungen auf die angegebenen Pluripotenz-assoziierten Marker dar. Die Balken zeigen den Bereich der Fluoreszenzintensität an, der in die Berechnung des Anteils an für einen Pluripotenz-assoziierten Marker positiven Zellen einging. Als negativ für den jeweiligen Marker wurden die Zellen betrachtet, deren Fluoreszenzintensität im Bereich der Negativkontrolle lag. Dargestellt sind Daten aus repräsentativen Einzelexperimenten.

In den folgenden Experimenten wurde das Ziel verfolgt, eine Aggregatbildung und eine damit verbundene Differenzierung der hES Zellen zu minimieren. Zunächst wurde die Rührerdrehzahl von 20rpm auf 30rpm heraufgesetzt, um die Scherkräfte im System zu erhöhen. Diese Maßnahme führte zu einer Verringerung der Proliferation (Abb. 3.3.11), nicht jedoch zu der gewünschten Reduktion der Aggregatbildung. Um das Wachstum der hES Zellen nicht zu stark zu beeinträchtigen, kam eine weitere Erhöhung der Rührerdrehzahl nicht in Frage.

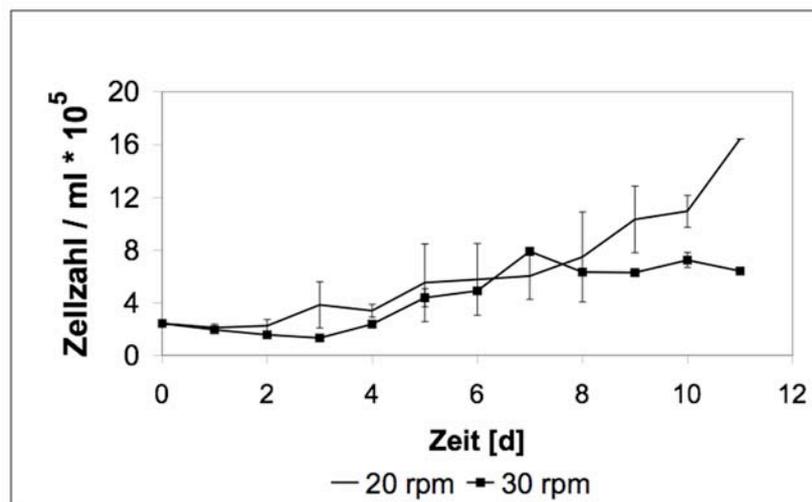


Abb. 3.3.11 Eine Erhöhung der Rührerdrehzahl führt zu einer Verringerung der hES Zellproliferation. Wird die Rührerdrehzahl von 20rpm auf 30rpm heraufgesetzt, so resultiert dies in einer Reduktion der erreichbaren Zellzahl. Die mittlere spezifische Wachstumsrate von hES Zellen, die bei einer Rührerdrehzahl von 20rpm kultiviert wurden ($0,33 \pm 0,02 d^{-1}$), unterscheidet sich signifikant von der von hES Zellen, die bei einer Rührerdrehzahl von 30rpm kultiviert wurden ($0,22 \pm 0,02 d^{-1}$; $p < 0,05$).

hES Zellen wurden über Nacht statisch mit Cytodex3-Microcarriern in einem Glasballspinner inkubiert. Ab dem nächsten Tag wurde Intervallrühren (30 Minuten 20rpm bzw. 30rpm, 30 Minuten Rührpause) eingesetzt und das Kulturvolumen verdoppelt. Es wurde konditioniertes Medium aus Monolayerkulturen muriner Fibroblasten verwendet, das täglich erneuert wurde. Vor jedem Mediumwechsel wurden zur Zellzahlbestimmung Proben für eine Kristallviolett-Färbung genommen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Daher wurden im Folgenden zwei andere Rührertypen, Paddelrührer und Blattrührer, eingesetzt. Die Geometrie dieser Rührer ließ eine Vergrößerung der auf die Zell-Microcarrier-Aggregate wirkenden Scherkräfte erwarten. In der Anwendung zeigten hES Zellen, die unter Verwendung eines Paddelrührers kultiviert wurden, vergleichbare Wachstumsraten zu hES Zellen, die in Spinnersystemen mit Glasballrührern propagiert wurden (Abb. 3.3.12). Wurde ein Blattrührer eingesetzt, so führte dies zu einer leichten Verringerung der hES Zellproliferation. Eine Verminderung der Aggregatbildung konnte jedoch weder durch die Verwendung eines Paddelrührers noch durch die eines Blattrührers erzielt werden.

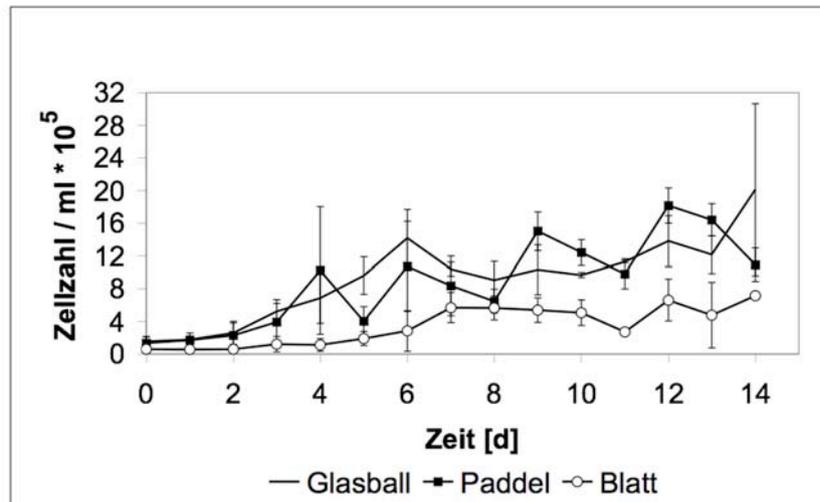


Abb. 3.3.12 Einfluss verschiedener Rührertypen auf das Wachstum von hES Zellen in Microcarrier-basierter Suspensionskultur. Bei Verwendung von Glasball- und Paddelrührern weisen hES Zellen eine vergleichbare Proliferation auf. Wird ein Blattrührer eingesetzt, so führt dies zu einer Reduktion des hES Zellwachstums gegenüber Kulturen mit Glasballrührern. Die mittlere spezifische Wachstumsrate von hES Zellen, die unter Einsatz eines Glasballrührers kultiviert wurden ($0,31 \pm 0,03 d^{-1}$), unterscheidet sich signifikant von der von hES Zellen, die unter Verwendung eines Blattrührers kultiviert wurden ($0,26 \pm 0,17 d^{-1}$; $p < 0,05$).

hES Zellen wurden über Nacht statisch mit Cytodex3-Microcarriern in Spinnern mit einem Glasballrührer, einem Paddelrührer bzw. einem Blattrührer inkubiert. Ab dem nächsten Tag wurde Intervallrühren (30 Minuten 20rpm, 30 Minuten Rührpause) eingesetzt und das Kulturvolumen verdoppelt. Es wurde konditioniertes Medium aus Monolayerkulturen muriner Fibroblasten verwendet, das täglich erneuert wurde. Vor jedem Mediumwechsel wurden zur Zellzahlbestimmung Proben für eine Kristallviolett-Färbung genommen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Eine weitere Möglichkeit, die Scherkräfte im System zu erhöhen, bestand darin, von dem bislang eingesetzten Intervallrühren (30 Minuten Rühren, 30 Minuten Pause) zum Dauerrühren überzugehen. Wurde bei 20rpm unter Verwendung eines Glasballrührers stetig gerührt, so führte dies zu einem Absterben eines Großteils der inokulierten Zellen (Abb. 3.3.13 A). Zugleich ließ die quantitative RT-PCR unter Dauerrühren eine Tendenz zur Herunterregulierung Pluripotenz-assoziiierter Marker und zur Heraufregulierung Differenzierungs-assoziiierter Marker erkennen (Abb. 3.3.13 B).

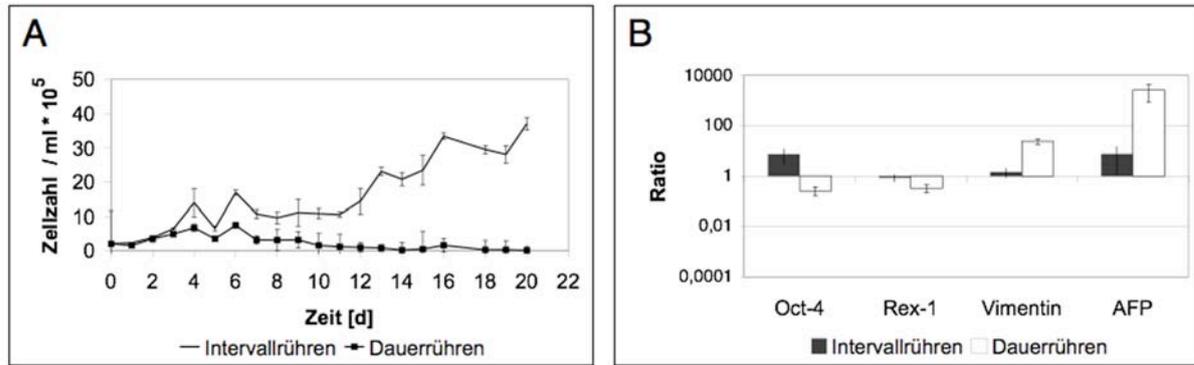


Abb. 3.3.13 Dauerrühren in Microcarrier-basierten hES Zell-Suspensionskulturen führt zu Zelltod und zu einer erhöhten Differenzierungsrate. Werden hES Zellen unter Dauerrühren kultiviert, so löst dies eine Verringerung der Wachstumsrate und langfristig Zelltod aus (A). Die mittlere spezifische Wachstumsrate von hES Zellen, die unter Intervallrühren kultiviert wurden ($0,32 \pm 0,07 d^{-1}$), unterscheidet sich signifikant von der von hES Zellen, die unter Dauerrühren kultiviert wurden ($-0,12 \pm 0,005 d^{-1}$; $p < 0,01$). Eine Untersuchung der Expression Pluripotenz- und Differenzierungs-assoziiierter Marker über quantitative RT-PCR zeigt eine Herunterregulierung Pluripotenz-assoziiierter Marker wie Oct-4 und Rex-1 und eine deutliche Heraufregulierung Differenzierungs-assoziiierter Marker wie Vimentin und α -Fetoprotein (AFP) in hES Zellkulturen, die einem Dauerrühren ausgesetzt wurden (B).

hES Zellen wurden über Nacht statisch mit Cytodex3-Microcarriern in Glasballspinnern inkubiert. Ab dem nächsten Tag wurde Intervallrühren (30 Minuten 20rpm, 30 Minuten Rührpause) bzw. Dauerrühren (20rpm) eingesetzt und das Kulturvolumen verdoppelt. Es wurde konditioniertes Medium aus Monolayerkulturen muriner Fibroblasten verwendet, das täglich erneuert wurde. Vor jedem Mediumwechsel wurden zur Zellzahlbestimmung Proben für eine Kristallviolett-Färbung genommen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus jeweils drei unabhängigen Versuchen. An Tag 12 der Kultivierung wurden Proben für die quantitative RT-PCR-Analyse genommen. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten \pm Standardabweichung. Die für die Spinnerkulturen erhobenen Daten wurden nach der $\Delta\Delta CP$ -Methode auf ein Referenzgen sowie auf Daten, die für Monolayer-Kulturen gewonnen wurden, bezogen.

Als geeignetes Mittel, um die Aggregatbildung in Spinnerkulturen zu verhindern, wurde in der Literatur die Reduktion der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen-Konzentrationen im Kulturmedium beschrieben (Amersham Pharmacia Biotech, 1999). Da divalente Kationen die Zelladhäsion vermitteln, wird die Bildung von Zellaggregaten bei geringeren Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen-Konzentrationen reduziert. Zunächst wurden Medien mit verringerten Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen in der konventionellen Feeder-abhängigen Kultur auf ihre Eignung hin untersucht, die Pluripotenz humaner ES Zellen zu erhalten. Hierfür wurde das im hES Zellmedium enthaltene Knockout-DMEM zur Hälfte bzw. zu einem Viertel durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Medien der Hersteller Sigma und Gibco ersetzt. hES Zellen, die in diesen Medien kultiviert wurden, zeigten ein mit der Kontrolle vergleichbares Wachstumsverhalten (Abb. 3.3.14).

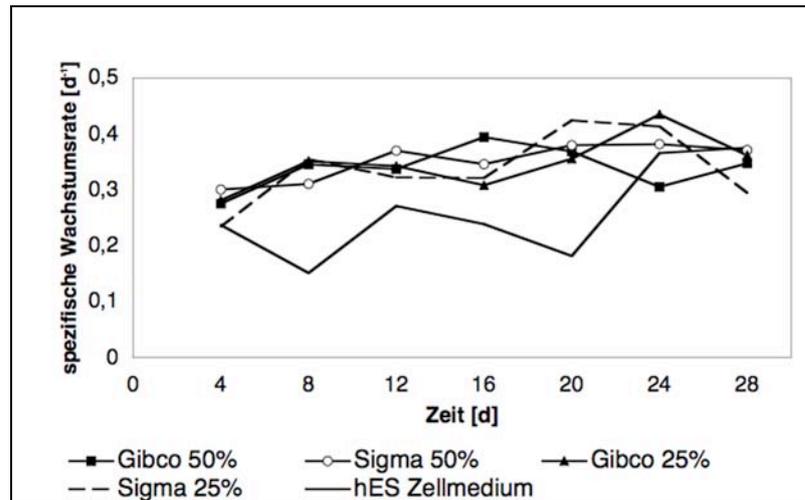


Abb. 3.3.14 Die Kultivierung von hES Zellen in Medien mit reduzierter Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen-Konzentration führt nicht zu einer Verringerung der spezifischen Wachstumsrate. Werden hES Zellen in Monolayerkulturen und in Gegenwart muriner Fibroblasten unter Verwendung von hES Zellmedium kultiviert, bei dem die Komponente Knockout-DMEM zur Hälfte bzw. zu einem Viertel durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Medien ersetzt ist, so löst dies keine Abnahme in der hES Zellproliferation aus.

Vor jedem Mediumwechsel wurden zur Zellzahlbestimmung Proben für eine Kristallviolett-Färbung genommen. Dargestellt sind Daten aus einem Einzelexperiment.

Die Expression der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker Tra-1-60 und Tra-1-81 wurde in diesen Kulturen über Durchflusszytometrie bestimmt. Für keines der untersuchten Medien zeigte sich eine Reduktion der Tra-1-60- oder der Tra-1-81-Expression gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.3.15).

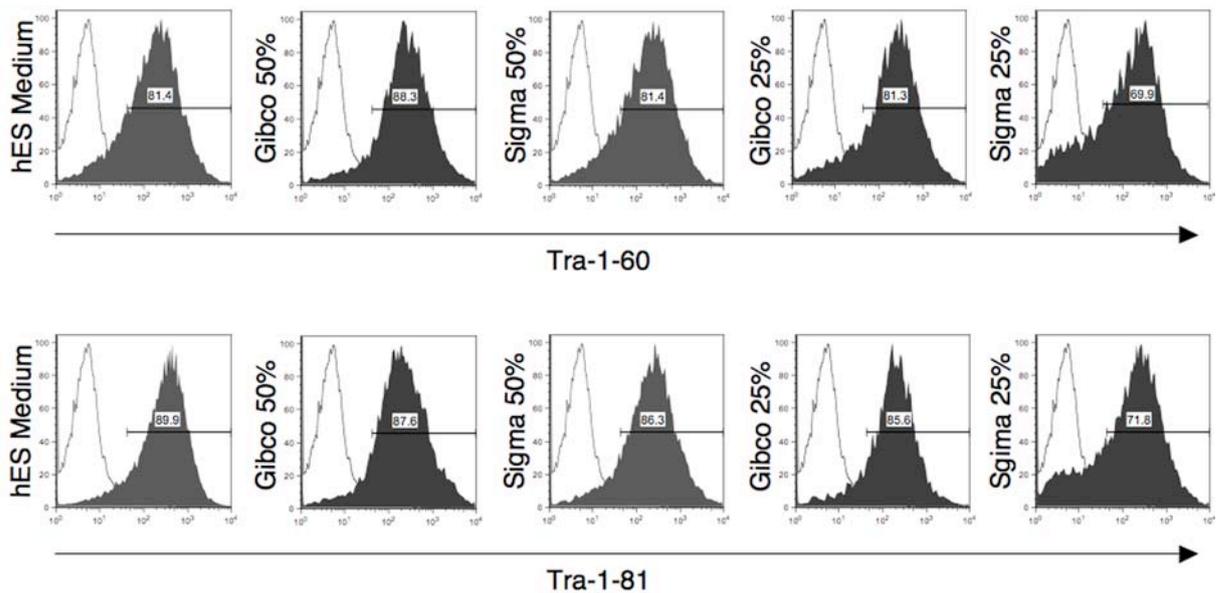


Abb. 3.3.15 Die Kultivierung von hES Zellen in Medien mit reduzierter Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen-Konzentration hat keinen Einfluss auf die Expression der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker Tra-1-60 und Tra-1-81. Werden hES Zellen in Monolayerkulturen und in Gegenwart muriner Fibroblasten unter Verwendung von hES Zellmedium kultiviert, bei dem die Komponente Knockout-DMEM zur Hälfte bzw. zu einem Viertel durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Medien ersetzt ist, so bleiben die Tra-1-60- und die Tra-1-81-Expression der hES Zellen stabil.

Im Anschluss an eine 28-tägige Kultivierung in den entsprechenden Medien wurden Proben für die durchflusszytometrische Analyse genommen. Feederzellen und tote Zellen wurden über Gating nach Forward Scatter- und Sideward Scatter-Eigenschaften sowie nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Offene Histogramme entsprechen Negativkontrollen, gefüllte Histogramme stellen Färbungen auf die angegebenen Pluripotenz-assoziierten Marker dar. Die Balken zeigen den Bereich der Fluoreszenzintensität an, der in die Berechnung des Anteils an für einen Pluripotenz-assoziierten Marker positiven Zellen einging. Als negativ für den jeweiligen Marker wurden die Zellen betrachtet, deren Fluoreszenzintensität im Bereich der Negativkontrolle lag. Dargestellt sind Daten aus Einzelexperimenten.

In Suspensionskulturen unter Verwendung des Carriers Cytodex3 und eines Glasballrührers konnte bestätigt werden, dass es nicht zu einer Abnahme der Proliferation kam, wenn das Knockout-DMEM im Medium zur Hälfte durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Medien ersetzt wurde (Abb. 3.3.16 A). Die Verwendung eines 50%igen Anteils Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier Medien führte jedoch nicht zu einer sichtbaren Verringerung der Aggregatbildung in den Kulturen. Auch die durchflusszytometrische Analyse ließ erkennen, dass die Verwendung dieser Medienkomposition nicht zu einer Erhöhung des Anteils an Tra-1-60- und Tra-1-81-positiven Zellen in den Microcarrier-Kulturen führte (Daten nicht gezeigt). Wurde jedoch ein 75%iger Anteil an Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem Medium verwendet, so führte dies zu einer Verringerung der Aggregatbildung sowie zu einer Erhöhung des Anteils an Tra-1-60-positiven Zellen auf 83,2% (konventionelles CM: 36,1%). Für das Oberflächenantigen Tra-1-81

erhöhte sich der Anteil an positiven Zellen von 30% auf 80,5% (Abb. 3.3.16 B). Dies ging allerdings einher mit einer deutlichen Verringerung der hES Zellproliferation (Abb. 3.3.16 A). Unter diesen Kultivierungsbedingungen konnte somit zwar die Pluripotenz der hES Zellen aufrechterhalten werden, die Kultur proliferierte jedoch nicht, sondern blieb praktisch stationär.

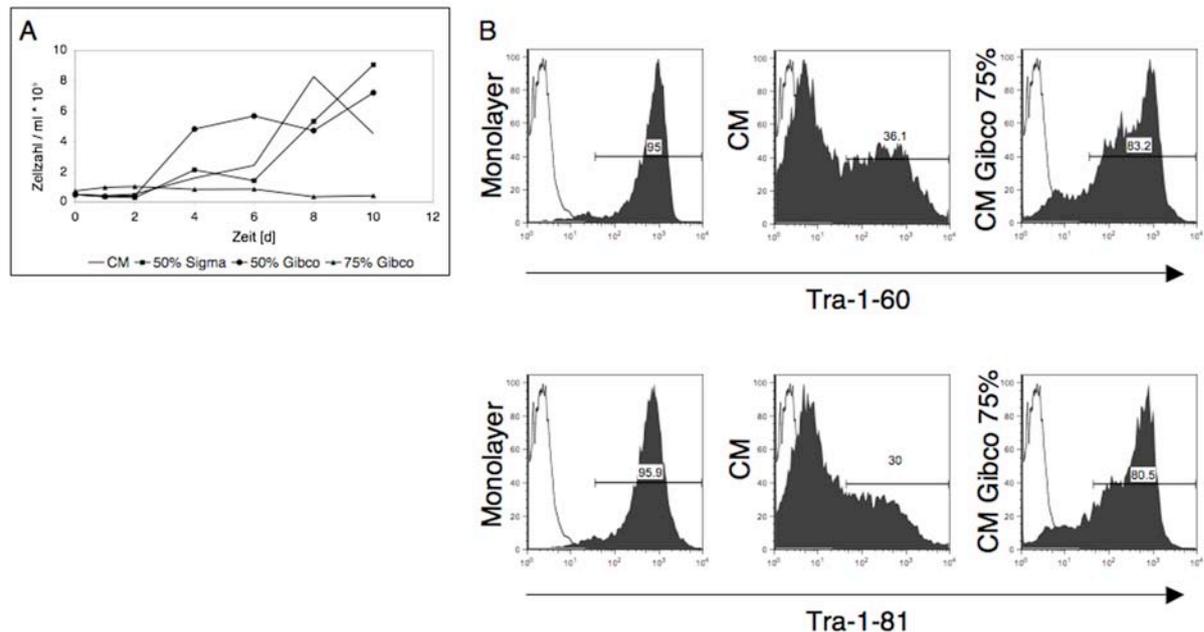


Abb. 3.3.16 Eine Reduktion in der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen-Konzentration führt zu einer verbesserten Pluripotenz-Erhaltung humaner ES Zellen in Microcarrier-basierten Suspensionskulturen. Werden hES Zellen in Spinnerkulturen unter Verwendung von konditioniertem Medium (CM) kultiviert, bei dem die Komponente Knockout-DMEM zur Hälfte durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Medien ersetzt ist, so löst dies keine Abnahme in der hES Zellproliferation aus. Wird das Knockout-DMEM zu 75% durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Medien ersetzt, so führt dies jedoch zu einer deutlichen Reduktion in der Proliferationsrate (A). Die Expression der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker Tra-1-60 und Tra-1-81 ist gegenüber Suspensionskulturen mit konventionellem CM erhöht, wenn das Knockout-DMEM im Medium zu 75% durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Medien ersetzt ist (B).

hES Zellen wurden über Nacht statisch mit Cytodex3-Microcarriern in einem Glasballspinner inkubiert. Ab dem nächsten Tag wurde Intervallrühren (30 Minuten 20rpm, 30 Minuten Rührpause) eingesetzt und das Kulturvolumen verdoppelt. Es wurde konditioniertes Medium aus Monolayerkulturen muriner Fibroblasten verwendet, das täglich erneuert wurde. Vor jedem Mediumwechsel wurden zur Zellzahlbestimmung Proben für eine Kristallviolett-Färbung genommen. Im Anschluss an eine 10-tägige Kultivierung wurden Proben für die durchflusszytometrische Analyse genommen. Tote Zellen wurden über Gating nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Offene Histogramme entsprechen Negativkontrollen, gefüllte Histogramme stellen Färbungen auf die angegebenen Pluripotenz-assoziierten Marker dar. Die Balken zeigen den Bereich der Fluoreszenzintensität an, der in die Berechnung des Anteils an für einen Pluripotenz-assoziierten Marker positiven Zellen einging. Als negativ für den jeweiligen Marker wurden die Zellen betrachtet, deren Fluoreszenzintensität im Bereich der Negativkontrolle lag. Dargestellt sind Daten aus Einzelexperimenten.

Zusammenfassend erwies sich eine Kultivierung humaner ES Zellen in Microcarrier-basierter Suspensionskultur als machbar. Eine starke Tendenz zur Bildung von hES Zell-Microcarrier-Aggregaten führte jedoch zu einer erhöhten Differenzierung gegenüber konventionellen Monolayer-Kulturen. So bildeten sich zwei Zellpopulationen heraus: Eine dieser Populationen exprimierte Pluripotenz-assoziierte

Marker und zeigte eine Multikeimblatt-Differenzierung in EBs. Die zweite Zellpopulation jedoch wies einen Verlust der Expression der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenantigene Tra-1-60 und Tra-1-81 auf und besaß somit keinen ES Zellcharakter mehr. Um einen Routine-Einsatz zu ermöglichen, war somit eine weitere Optimierung des Systems notwendig.

3.3.4 Implementierung eines kontrollierten Systems zur Microcarrier-basierten Expansion humaner ES Zellen

Um die Prozessführung für die Microcarrier-basierte Kultivierung humaner ES Zellen in Zukunft optimieren zu können, wurde ein kontrolliertes Minispinner-System implementiert. Neben der Einstellung der Rührerdrehzahl erlaubt dieses System die Regulierung der Gelöstsauerstoff-Konzentration über Einspeisung von Sauerstoff bzw. Stickstoff und Kontrollierung des pH-Werts über Begasung mit Kohlendioxid sowie die Zufütterung von Medien und/oder Medienkomponenten (s. 2.3.2). Das Minispinner-System verfügt über eigens angefertigte Rührer, die den im unkontrollierten System verwendeten Blattrührern ähneln. Das Minispinner-System ist aufgrund seiner parallelen Auslegung ausgezeichnet dafür geeignet, um Kultivierungsprozesse in einer Vielzahl von Parametern zu optimieren. Zudem erlaubt es das geringe Kultivierungsvolumen, die Kosten für Medien und Wachstumsfaktoren zu reduzieren.

hES Zellen werden aus der Inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen. *In vivo* ist die präimplantierte Blastozyste Sauerstoffkonzentrationen von 5-10% im Ovidukt (Leese, 1995) bzw. von 1-10% im Uterus (Fischer und Bavister, 1993) ausgesetzt. Mit dem Ziel, langfristig Proliferation und Pluripotenz-erhaltung der hES Zellen zu optimieren, wurde das geregelte Minispinner-System in ersten Versuchen dafür eingesetzt, um physiologische Gelöstsauerstoffkonzentrationen von 5% und 10% sowie Gelöstsauerstoffkonzentrationen von 30% und 90% zu untersuchen. Der Gelöstsauerstoffgehalt in dem als Kontrolle mitgeführten unregulierten Glasballspinner betrug etwa 10%. Wurden die hES Zellen unter Intervallrühren bei einer Rührerdrehzahl von 20rpm in dem Sauerstoff-geregelten System kultiviert, so zeigten sie in ersten Versuchen für alle vier untersuchten Sauerstoffkonzentrationen eine deutlich niedrigere Wachstumsrate als im unkontrollierten Glasballspinner. Bei einer

Gelöstsauerstoffkonzentration von 90% konnte nach etwa vier Tagen ein vollständiges Absterben der inokulierten Zellen beobachtet werden (Abb. 3.3.17 A). Die schlechte Wachstumsrate der hES Zellen im kontrollierten System deutet auf ein inhärentes Problem hin, da hES Zellen im unkontrollierten Glasballspinnernsystem bei einer vergleichbaren Sauerstoffkonzentration von 10% ein deutlich besseres Wachstum zeigten. Die Aggregatbildung im kontrollierten Spinnersystem erwies sich als deutlich erhöht. Die Dokumentation der Prozesswerte für die Gelöstsauerstoffkonzentration (Abb. 3.3.17 B) zeigt, dass die Regelung auf 5%, 10% und 30% Gelöstsauerstoff sehr stabil erfolgte, während bei der Einstellung auf 90% Gelöstsauerstoff vermutlich aufgrund einer Elektrodendrift größere Schwankungen auftraten. Der pH-Wert wurde für alle Spinner konstant bei 7 gehalten (Abb. 3.3.17 C).

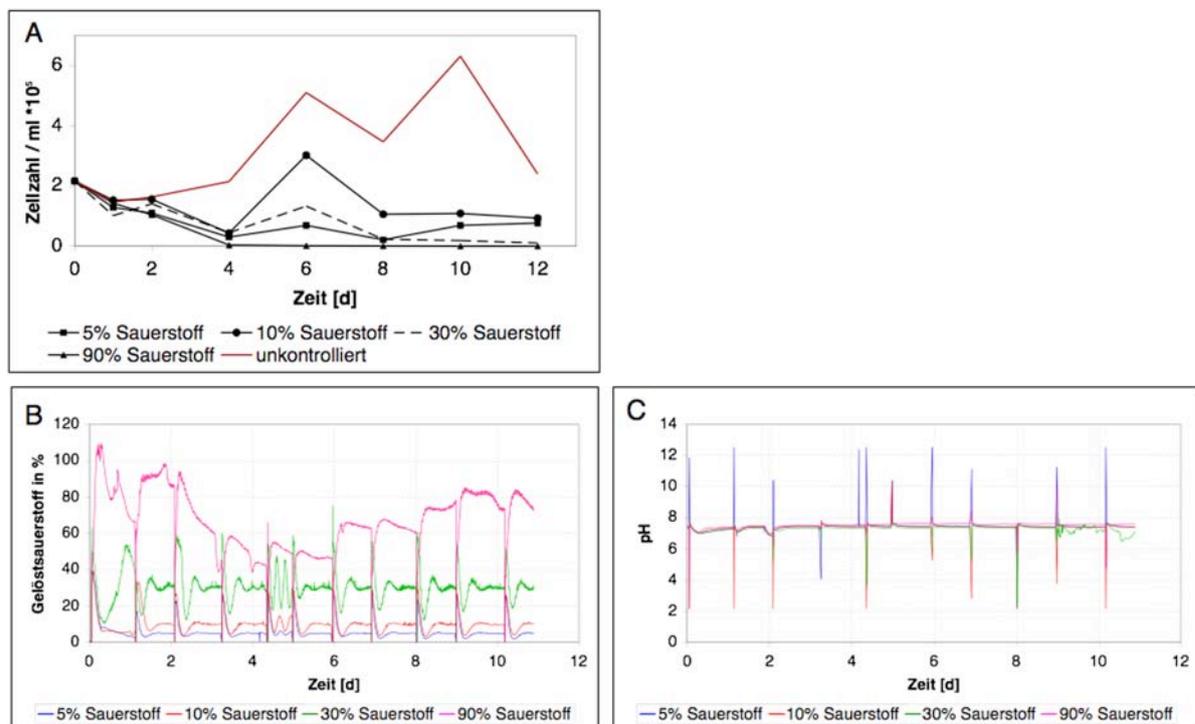


Abb. 3.3.17 Die Proliferation von hES Zellen im kontrollierten Minispinnernsystem ist reduziert. hES Zellen, die über 12 Tage in Sauerstoff-geregelten Minispinnern kultiviert werden, zeigen eine Verringerung der Wachstumsrate gegenüber hES Zellen, die in einem unregulierten Glasballspinner kultiviert werden (A).

hES Zellen wurden über Nacht statisch mit Cytodex3-Microcarriern in kontrollierten Minispinnern (DASGIP) inkubiert. Ab dem nächsten Tag wurde Intervallrühren (30 Minuten 20rpm, 30 Minuten Rührpause) eingesetzt und das Kulturvolumen verdoppelt. Es wurde konditioniertes Medium aus Monolayerkulturen muriner Fibroblasten verwendet, das täglich erneuert wurde. Vor jedem Mediumwechsel wurden zur Zellzahlbestimmung Proben für eine Kristallviolett-Färbung genommen. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde auf 5%, 10%, 30% bzw. 90% geregelt (B). Der pH-Wert wurde durch Kohlendioxid-Begasung konstant bei pH7 gehalten (C). Die Peaks in B und C entsprechen dem Zeitpunkt des täglichen Mediumwechsels, bei dem die Elektroden entfernt wurden. Als unkontrolliertes System wurde ein Glasballspinner verwendet.

Erste Daten deuten darauf hin, dass der Anteil an Tra-1-60- und Tra-1-81-exprimierenden Zellen von der Gelöstsauerstoffkonzentration abhängig war. Nach einer 12tägigen Kultivierung lag der Anteil an Tra-1-60- und Tra-1-81-exprimierenden Zellen im unregulierten Spinner bei unter 40%. Für Gelöstsauerstoffkonzentrationen von 10% und 30% schwankte der Anteil an Tra-1-60- und Tra-1-81-exprimierenden Zellen zwischen 20% und 45% und bewegte sich somit größenordnungsmäßig in der Höhe der Werte, die im unkontrollierten Glasballspinnernsystem erreicht wurden (Abb. 3.3.18).

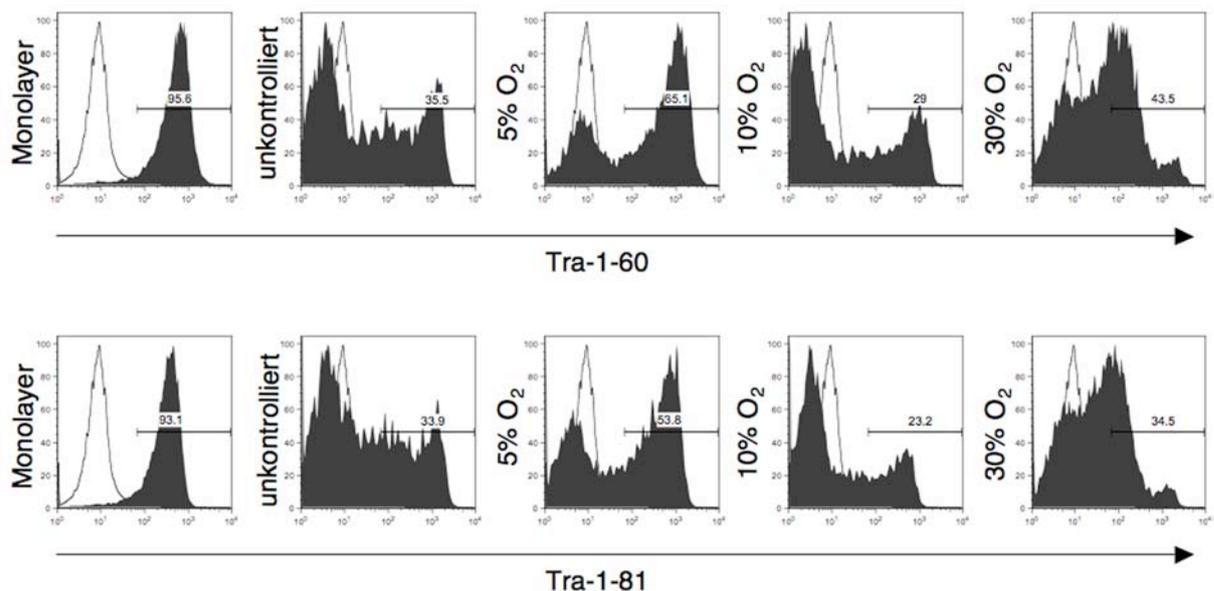


Abb. 3.3.18 Über Regelung der Gelöst-Sauerstoffkonzentration kann die Pluripotenz-Erhaltung von hES Zellen in Microcarrier-basierter Suspensionskultur optimiert werden. Durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass der Anteil an hES Zellen in Spinnerkulturen, die die Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker Tra-1-60 und Tra-1-81 exprimiert, in einem kontrollierten Prozess erhöht werden kann.

hES Zellen wurden über Nacht statisch mit Cytodex3-Microcarriern in kontrollierten Minispinnern (DASGIP) inkubiert. Ab dem nächsten Tag wurde Intervallrühren (30 Minuten 20rpm, 30 Minuten Rührpause) eingesetzt und das Kulturvolumen verdoppelt. Es wurde konditioniertes Medium aus Monolayerkulturen muriner Fibroblasten verwendet, das täglich erneuert wurde. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde auf 5%, 10% bzw. 30% geregelt. Als unkontrolliertes System wurde ein Glasballspinner verwendet. Am Tag 12 der Kultivierung wurden Proben für die durchflusszytometrische Analyse genommen. Tote Zellen wurden über Gating nach Hoechst 33258-Aufnahme von der Analyse ausgeschlossen. Offene Histogramme entsprechen Negativkontrollen, gefüllte Histogramme stellen Färbungen auf die angegebenen Pluripotenz-assoziierten Marker dar. Die Balken zeigen den Bereich der Fluoreszenzintensität an, der in die Berechnung des Anteils an für einen Pluripotenz-assoziierten Marker positiven Zellen einging. Als negativ für den jeweiligen Marker wurden die Zellen betrachtet, deren Fluoreszenzintensität im Bereich der Negativkontrolle lag.

Aufgrund des Absterbens der hES Zellen unter einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 90% konnte für diese Kultivierungsbedingung keine Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Wurde eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 5% eingesetzt, so erhöhte sich der Anteil an Tra-1-60-positiven Zellen auf 65,1% und der Anteil an

Tra-1-81-positiven Zellen auf 53,8%. Im Vergleich zur in konventioneller Monolayerkultur propagierten Kontrolle war die Expression der beiden Pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarker in diesen ersten Experimenten jedoch auch unter einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 5% sichtlich herunterreguliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Prozess zur Microcarrier-basierten Suspensionskultur humaner ES Zellen entwickelt werden konnte. Erste Ansätze zur Optimierung dieses Prozesses zeigten das Potential, dass in der Kontrolle über entscheidende Kultivierungsparameter wie etwa der Gelöstsauerstoffkonzentration liegt.

4. DISKUSSION

4.1 Etablierung der humanen ES Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die hES Zellkultur unter Serum-freien und Feeder-freien Bedingungen etabliert werden. hES Zellen konnten bei Erhalt ihrer charakteristischen Marker-Expression stabil über längere Zeiträume hinweg kultiviert werden. Hiermit wurde die Voraussetzung für die Entwicklung automatisierter und skalierbarer Verfahren der hES Zellkultur geschaffen. Methoden zur Charakterisierung von hES Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene wurden eingeführt und optimiert. Sie stellen die Grundlage für die Beurteilung innovativer Kultivierungsverfahren hinsichtlich ihrer Eignung für die hES Zellkultur dar.

Ursprünglich erfolgte die Gewinnung und Kultivierung humaner ES Zellen in Anwesenheit von Serum sowie in direktem Kontakt mit murinen Fibroblasten (Thomson et al., 1998) und somit unter schlecht definierten Bedingungen. Amit et al. (2000) konnten zeigen, dass es möglich ist, klonale hES Zelllinien unter Verwendung eines definierten Serumersatzes (Serum Replacement[®]) abzuleiten und für mehr als ein Jahr zu kultivieren, ohne Pluripotenz, Proliferation oder Stabilität des Karyotyps zu beeinträchtigen. Dass es möglich ist, hES Zellen unter Verwendung konditionierten Mediums und ohne direkten Kontakt zu Feederzellen zu propagieren, wiesen Xu et al. (2001) nach. In dieser Arbeit sowie in zwei Folgestudien (Carpenter et al., 2004; Rosler et al., 2004) wurde ausführlich belegt, dass verschiedene hES Zelllinien über mehr als ein Jahr unter diesen Feeder-freien Bedingungen kultiviert werden konnten, ohne die Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker zu verlieren. Der Karyotyp erwies sich in diesen Untersuchungen als weitgehend stabil, in etwa 20% der Zellkulturen wurden vereinzelte aneuploide Zellen detektiert. Obwohl es der Einsatz konditionierten Mediums erlaubt, eine direkte Kokultur humaner ES Zellen mit Feeder-Zellen zu vermeiden, so schafft diese Methode dennoch keine vollständig definierten Kulturbedingungen. Einige Autoren erklärten, definierte Medienzusammensetzungen für die Kultivierung pluripotenter humaner ES Zellen entwickelt zu haben. So setzten Amit et al. (2004) TGF β und LIF ein, um Proliferation und Pluripotenz humaner ES Zellen unter definierten Kulturbedingungen zu erhalten. Sato et al. (2004) postulierten, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs über den GSK-3-

spezifischen Inhibitor BIO die Pluripotenzerhaltung muriner und humaner ES Zellen auslöse. Andere Autoren (Xu et al., 2005b) verwendeten eine Kombination aus FGF-2 und dem BMP-Antagonisten Noggin, um eine vergleichbare Wirkung zu erzielen. Einer weiteren Studie zufolge (Li et al., 2005) führte der Einsatz von FGF-2 in Zusammenarbeit mit flt3-Ligand zu einer Pluripotenzerhaltung humaner ES Zellen. Wurde FGF-2 in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt, so war bereits dies hinreichend. Dieser Befund wurde durch weitere Arbeiten bestätigt (Levenstein et al., 2005; Xu et al., 2005a). Xiao et al. (2006) schlugen vor, dass Activin A über Induktion von FGF-2 und BMP-Repression eine Schlüsselrolle in der Pluripotenzerhaltung humaner ES Zellen spiele. Um die Überlebensrate von hES Zellen unter klonalen Bedingungen zu erhöhen, erwiesen sich Neurotrophine als deutlich besser geeignet als FGF-2 und Noggin (Pyle et al., 2006). Die Entwicklung eines vollständig definierten, für die humane ES Zellkultur optimierten Mediums erfolgte durch Ludwig et al. (2006). Dieses Medium enthält FGF-2, GABA, Pipicolinsäure, Lithiumchlorid und TGF β und erwies sich sowohl als geeignet für die Isolierung neuer hES Zelllinien als auch für die Kultivierung bestehender Linien.

Die hohen Konzentrationen an rekombinanten Faktoren, die in den bislang publizierten definierten Medien eingesetzt wurden, stellen einen enormen Kostenfaktor dar. Im Rahmen einer umfangreichen Prozessentwicklung und -optimierung erwies sich eine Verwendung dieser Medien als kaum finanzierbar. Als wesentlich wirtschaftlichere Alternative wurden daher konventionelle Kokulturen sowie der Einsatz konditionierten Mediums gewählt. Diese Vorgehensweise bot den Vorteil, die Kosten in der aufwändigen ersten Phase der Etablierung neuartiger Kultivierungsverfahren möglichst gering zu halten. Zugleich ist es möglich, das Medium in einer zweiten Phase im Rahmen einer Feineinstellung der einzelnen Kultivierungsparameter durch ein vollständig definiertes Medium auszutauschen. Im Hinblick auf die große Forschungsaktivität im Bereich der Zusammensetzung von Medien für hES Zellen kann zudem flexibel auf neue Entwicklungen reagiert werden.

Im Laufe der Etablierung konventioneller Kultivierungsbedingungen für humane ES Zellen wurde immer wieder deutlich, dass es sich bei hES Zellkulturen um ein außerordentlich komplexes System handelt, das sehr sensibel auf feinste Schwankungen, etwa bei der Feederzell-Dichte oder bei der Vorgehensweise beim

Passagieren, reagiert. Eine Standardisierung der Zellkulturverfahren für hES Zellen stellt somit eine unumgängliche Voraussetzung für einen breiten Einsatz von hES Zellen und hES Zell-abgeleiteten somatischen Zellpopulationen dar.

4.2 Entwicklung eines automatisierten Systems für die ES Zellkultur

Die Zusammenarbeit mit Spezialisten auf dem Gebiet des Liquid Handling ermöglichte es, ein automatisiertes System für die ES Zellkultur zu entwickeln und zu validieren. Dieses System erwies sich als geeignet, murine und humane ES Zellen über einen längeren Zeitraum unter Erhalt ihrer Proliferationseigenschaften, ihrer Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker sowie ihres in vitro Differenzierungspotenzials zu kultivieren.

Während zahlreiche molekularbiologische Methoden wie die Nukleinsäureaufreinigung und die Durchführung von PCRs seit langem automatisiert durchgeführt werden können, werden erst in jüngster Zeit erste Anstrengungen unternommen, Zellen automatisiert zu behandeln. Gerade in der Zellkultur besteht jedoch ein großer Bedarf für die Entwicklung automatisierter Verfahren. Dies liegt zum einen darin begründet, dass die Zellkultur einen hohen Personal- und Zeitaufwand (auch an Wochenenden und Feiertagen) erfordert. Zum anderen setzen Zellkulturen ein hohes Maß an Standardisierung und Reproduzierbarkeit voraus, das von immortalisierten Zelllinien über Primärzellkulturen zu komplexen Differenzierungskulturen humaner ES Zellen graduell zunimmt. Insbesondere ein wachsender Einsatz von Zellkulturen im pharmakologischen und toxikologischen Wirkstoffscreening lässt eine ansteigende Nachfrage nach Lösungen zur Zellkulturautomatisierung entstehen. Vor diesem Hintergrund entwickelte The Automation Partnership (TAP) in Kooperation mit großen Pharmaunternehmen erste Konzepte für die Automatisierung von Zellkulturen. So ermöglicht es das System SelecT, Zellkulturen in Zellkulturflaschen vollautomatisch anzuzüchten und zu passagieren und anschließend auf Multi-Well-Platten auszuplattieren. Das System Cellmate wurde dafür entwickelt, Zellen in Rollerflaschen und Zellkulturflaschen zu kultivieren und zu passagieren. Zellkulturen in Multi-Well-Platten können mit der neuesten Entwicklung, Cello, kultiviert werden. Seit kurzem bietet auch die Firma Tecan mit Cellerity™ ein Zellkultursystem an, das

es erlaubt, Zellen in Zellkulturflaschen und in Multi-Well-Platten automatisiert zu kultivieren. Den Systemen von TAP und Tecan ist gemein, dass das verwendete Pipettierprinzip auf Systemflüssigkeit beruht. Während es sich bei Cellerity™ um ein kompaktes Gerät handelt, haben die Lösungen von TAP einen relativ hohen Platzbedarf und sind für akademische Einrichtungen kaum erschwinglich.

Sowohl das System von Tecan als auch die Geräte von TAP wurden vornehmlich für den Einsatz bei Zelllinien entwickelt. Die Anforderungen für die Kultivierung von ES Zellen heben sich in vielerlei Hinsicht deutlich von jenen für konventionelle Zelllinien ab. So erfordern ES Zell-Feeder-Kokulturen das Ausplattieren von zwei Zellschichten, die bei allen Prozessschritten intakt bleiben müssen. Die Homogenität der Zellverteilung spielt bei ES Zellkulturen eine besondere Rolle, da eine Aggregation von Zellen zu Spontandifferenzierungs-Phänomenen führen kann. Das System sollte zudem über eine ausreichende Flexibilität verfügen, um die Kultivierungsbedingungen jederzeit optimieren und an unterschiedliche ES Zelllinien anpassen zu können. Dies ist besonders wichtig, wenn es um den Passagerhythmus und das Splitverhältnis geht, die bei ES Zellen wesentlich stärker schwanken als bei Zelllinien. Eine visuelle Kontrolle der Zellkulturen, eventuell eine Entnahme aus dem System, muss in diesem Zusammenhang erfolgen können. Insbesondere humane ES Zellen werden zudem in Antibiotika-freien Medien kultiviert. Ein automatisiertes Zellkultursystem für humane ES Zellen muss darum einen besonders hohen Standard hinsichtlich der Sterilität erfüllen. Vor diesem Hintergrund scheiden Systemflüssigkeits-gefüllte Systeme für die Automatisierung von hES Zellkulturen aus, da Systemflüssigkeit eine Hauptquelle für die Verbreitung von Kontaminationen darstellen kann. Die Tatsache, dass Hamilton Life Science Robotics über eine Systemflüssigkeits-freie Pipettier-technologie verfügt, ist somit als ausschlaggebend dafür anzusehen, dass die Entwicklung des Zellkultursystems in Kooperation mit diesem Unternehmen erfolgte. Pipettierroboter von Hamilton arbeiten nach dem Prinzip des Air Displacement und damit vergleichbar mit konventionellen Kolbenhub-Pipetten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es diese Technologie erlaubt, unter sterilen Bedingungen Langzeitkulturen muriner und humaner ES Zellen in Antibiotika-freien Medien durchzuführen.

Das entscheidende Ziel der Zellkulturautomatisierung lag in der Standardisierung der Prozesse. Die sehr kleine Öffnung des verwendeten automatisierten Brutschranks (Thermo Electron) war dazu geeignet, Schwankungen in Temperatur und CO₂-Konzentration gegenüber konventionellen Brutschränken deutlich zu minimieren. Darüber hinaus führte die Automatisierung unweigerlich dazu, dass die Dauer aller einzelnen Schritte, wie etwa die Dauer eines Mediumwechsels, für alle behandelten Zellkulturplatten vereinheitlicht wurde. Weitere Parameter, wie die Größe der Kraftanwendung beim Resuspendieren von Zellen und die Verteilung der Zellen beim Ausplattieren wurden durch die Automatisierung gegenüber der manuellen Kultur ebenfalls vereinheitlicht.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass es möglich ist, ein so komplexes System wie die ES Zellkultur zu automatisieren. Über einen Zeitraum von vier Wochen konnten sowohl mES Zellen als auch hES Zellen unter Erhalt ihres *in vitro*-Differenzierungspotenzials automatisiert kultiviert werden. Bietet ein automatisiertes System auch gegenüber der manuellen Kultur keinen unmittelbaren Zeitvorteil bezogen auf den einzelnen Arbeitsschritt, so verringert es die Eingriffszeiten durch den Anwender und setzt dadurch personelle Kapazitäten frei. Zudem ist es möglich, ein automatisiertes System über 24 Stunden am Tag kontinuierlich zu betreiben. Vor allem wird durch die Zellkulturautomatisierung jedoch eine Standardisierung der Verfahren und eine Anwender-Unabhängigkeit erreicht, die die Voraussetzung für einen Einsatz ES Zell-abgeleiteter Zellen in der Biomedizin und der pharmakologischen Entwicklung darstellen. Eine Erweiterung des automatisierten Systems um bildgebende Verfahren kann in Zukunft die Anwender-Unabhängigkeit weiter erhöhen. Während weitere Studien zeigen müssen, dass eine Pluripotenzerhaltung und Karyotyp-Stabilität von ES Zellen auch nach mehrmonatiger automatisierter Kultivierung noch gegeben sind, so wird das im Rahmen dieser Arbeit mitentwickelte automatisierte System bereits erfolgreich als gemeinsames Produkt von Hamilton Life Science Robotics und der Life & Brain GmbH unter dem Namen Cell^{host} vertrieben und für die Kultivierung von Stammzellen und Hautmodellen eingesetzt.

4.3 Entwicklung eines skalierbaren Prozesses zur Kultivierung humaner ES Zellen

4.3.1 Suspensionskulturen embryonaler Stammzellen

Gerührte Suspensionskulturen sind relativ leicht skalierbar, so dass sie für die Produktion großer Zellzahlen geeignet sind. Sie sind zudem wesentlich homogener als Zellkulturen im Platten- oder Flaschenformat. Darüber hinaus können die Kulturbedingungen in gerührten Bioreaktorsystemen kontrolliert und geregelt werden, so dass eine Standardisierung des Prozesses möglich ist. Während eine Automatisierung von Zellkulturen bereits eine weitgehende Standardisierung stationärer Zellkulturen ermöglicht, kann eine reproduzierbare Gewinnung großer Zellchargen am besten in gerührten Suspensionskulturen erfolgen. Kann bei einer Automatisierung von Säugerzellkulturen das konventionelle adhärenente Kultivierungsprinzip beibehalten werden, so erfordert eine Überführung der Kulturen in Suspension den Einsatz neuer Techniken.

Am einfachsten ist es, *per se* in Suspension wachsende Zellen in ein gerührtes System zu überführen. Konsequenterweise wurden erste Ansätze zur Kultivierung embryonaler Stammzellen in gerührten Systemen mit dem Ziel der Gewinnung von Embryoidkörpern durchgeführt. Erste Versuche von Dang et al. (2002), EBs aus murinen ES Zellen in Spinnerkulturen zu bilden, scheiterten zunächst an zu starker Aggregatbildung. Durch Einkapsulierung muriner ES Zellen in Agarose gelang es der Gruppe jedoch später, eine kontrollierte Differenzierungskultur im Spinnersystem zu etablieren (Dang et al., 2004). Eine Einkapsulierung konnte in dieser Studie auch für humane ES Zellen durchgeführt werden. Weitere Veröffentlichungen zeigten, dass es möglich ist, eine Linienselektion in EB-Spinnerkulturen durchzuführen (Zandstra et al., 2003) und die Ausbeute an Kardiomyozyten durch Regulierung der Gelöst-sauerstoffkonzentration im System zu optimieren (Bauwens et al., 2005). Durch Einsatz eines Bioreaktors mit einem Pitch-Blade-Rührer konnten Schroeder et al. (2005) die Notwendigkeit für eine Agarose-Einkapsulierung der mES Zellen umgehen. Durch eine geeignete Einstellung der Scherkräfte gelang es, eine übermäßige Aggregatbildung der EBs zu verhindern und in einem 2L-Prozess $1,28 \times 10^9$ aufgereinigte Kardiomyozyten zu generieren. Dass es möglich ist, EBs auch in anderen Bioreaktortypen zu erzeugen und zu kultivieren, zeigten Gerecht-Nir et al.

(2004), die in ihrem Prozess Rotating Wall-Reaktoren einsetzten. Fok und Zandstra (2005) setzten Microcarrier-basierte Kulturen sowie Aggregatkulturen ein, um Differenzierungskulturen muriner ES Zellen zu erhalten. Diese Ansätze beinhalteten zwar auch eine temporäre Proliferation undifferenzierter Zellen; ein Hauptaugenmerk der Arbeit lag jedoch auf der Entwicklung eines Prozesses, der einen Schritt zur Expansion von mES Zellen mit einem Schritt zur Initiierung der Differenzierung in demselben Gefäß verbindet. Die erreichbare Expansionsrate in Aggregatkulturen erwies sich dabei als äußerst limitiert. Zudem konnten Zellen nicht kontinuierlich über einen längeren Zeitraum auf Microcarriern kultiviert werden, sondern wurden alle drei Tage passagiert und neu inokuliert. Da dies erhebliche manuelle Interventionen voraussetzt, schränkt diese Vorgehensweise den erreichbaren Prozessmaßstab und damit auch die mögliche Zellausbeute erheblich ein.

Dieser Überblick macht deutlich, dass der Fokus bei der Entwicklung skalierbarer Verfahren in der ES Zellkultur bislang fast ausschließlich auf der Etablierung von Prozessen für Differenzierungskulturen lag. Konnten in skalierbaren EB-Kulturen bereits große Zahlen aufgereinigter somatischer Zellpopulationen aus ES Zellen gewonnen werden, so besteht weiterhin ein entscheidender Bedarf an skalierbaren Prozessen für undifferenzierte ES Zellen. So sind EB-Kulturen außerordentlich heterogen. Hoch aufgereinigte somatische Zellpopulationen aus Large-Scale-EB-Kulturen können praktisch nur über genetische Linienselektion gewonnen werden. Als Ausgangsmaterial für EB-Kulturen sowie für EB-unabhängige Differenzierungsverfahren sind homogene und hochgradig standardisierte ES Zellpopulationen eine unumgängliche Voraussetzung. Ein skalierbarer Bioreaktorprozess ist ideal dafür geeignet, solche ES Zellpopulationen zu generieren.

4.3.2 Untersuchung konditionierter Medien aus Bioreaktor-basierten Prozessen

Sowohl für die Entwicklung eines Prozesses zur Kultivierung von hES Zellen im großen Maßstab als auch später für den etablierten Prozess werden große Mengen an Kulturmedium benötigt. Müssen diesem Medium rekombinante Wachstumsfaktoren zugesetzt werden, so stellt dies einen enormen Kostenfaktor dar. Eine kostengünstigere Alternative wäre die Entwicklung eines zweiten Prozesses zur

Erzeugung Fibroblasten-konditionierten Mediums, das wiederum in den Prozess zur hES Zellkultivierung eingespeist werden könnte. An der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lehmann Anstrengungen unternommen, einen solchen Prozess zu etablieren.

Sowohl primäre murine Fibroblasten als auch die murine Fibroblasten-Zelllinie STO sowie humane Fibroblasten wurden bereits erfolgreich in Kokulturen mit hES Zellen eingesetzt (Park et al., 2003; Richards et al., 2002; Thomson et al., 1998). In Bielefeld wurden diese drei Zelltypen verwendet, um in Microcarrier-basierten Prozessen konditioniertes Medium zu erzeugen. Während primäre murine Fibroblasten in solchen Prozessen Seneszenzerscheinungen zeigten, erwiesen sich STO-Zellen und humane Fibroblasten als gut geeignet für die Produktion von konditionierten Medien im großen Maßstab (Nottorf, 2003). Aus diesen Prozessen gewonnene STO-konditionierte Medien und von humanen Fibroblasten konditionierte Medien zeigten jedoch eine eingeschränkte Funktionalität für die Kultivierung von hES Zellen. In Spinnerprozessen erzeugtes von primären murinen Fibroblasten konditioniertes Medium erwies sich hingegen als geeignet für den Einsatz in hES Zellkulturen. Diese Ergebnisse korrelieren mit Daten, die von Xu et al. (2001) erhoben wurden. Während es in dieser Studie gelang, die Pluripotenz von hES Zellen zu erhalten, wenn diese in von primären murinen Fibroblasten konditioniertem Medium kultiviert wurden, waren in Medien, die von STO-Zellen oder humanen Fibroblasten konditioniert worden waren, so gut wie keine undifferenzierten hES Zellkolonien zu detektieren.

Während konditioniertes Medium von primären murinen Fibroblasten, das in Spinnerkulturen erzeugt wurde, durchweg für die Kultivierung humaner ES Zellen geeignet war, zeigte sich eine große Variabilität, wenn dieses Medium aus Bioreaktorprozessen gewonnen wurde. Dies könnte auf die Vorbereitung des Inokulums zurückzuführen sein. Die für den Prozess eingesetzten Microcarrier wurden in Zellkulturflaschen mit den Fibroblasten besiedelt und anschließend in den Spinner bzw. den Bioreaktor überführt. Aufgrund des wesentlich größeren Arbeitsvolumens wurden für den Bioreaktorprozess deutlich mehr Carrier eingesetzt, so dass die Besiedelungsphase einen längeren Zeitraum in Anspruch nahm. Dies könnte dazu geführt haben, dass es bereits in einer frühen Phase des

Bioreaktorprozesses zu einer Seneszenz der Zellen kam. Durch die Scherkräfte im gerührten System verursachter Zelltod würde somit nicht mehr ausgeglichen werden, was über den Prozessverlauf eine Abnahme in der Zelldichte zur Folge hätte. Dafür spräche, dass zu Beginn des Prozesses gewonnenes Medium besser zur Pluripotenzerhaltung humaner ES Zellen geeignet war als zu späteren Zeitpunkten geerntetes Medium. Versuche, den Prozess zur Gewinnung konditionierter Medien zu optimieren, führten bislang nicht zu einer verbesserten Pluripotenz-erhaltenden Wirkung der erzeugten Medien.

Als Fazit ist festzuhalten, dass es generell möglich ist, Fibroblasten-konditioniertes Medium in einem Microcarrier-basierten Prozess herzustellen, das die Proliferation undifferenzierter humaner ES Zellen unterstützt. Die Skalierung dieses Prozesses erwies sich jedoch als wesentlich schwieriger als erwartet und bleibt zu optimieren.

4.3.3 Microcarrier-basierte Kultivierung humaner ES Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Cytodex3 ein geeigneter Microcarrier für die Kultivierung humaner ES Zellen in Suspensionsreaktoren identifiziert werden. Es erwies sich als möglich, in gerührten Microcarrier-basierten Suspensionskulturen eine Population an Zellen mit ES Zelleigenschaften aufrechtzuerhalten. Schließlich konnten Wege aufgezeigt werden, um den Anteil an undifferenzierten ES Zellen in den Microcarrier-basierten Kulturen durch Modifikation der Medienzusammensetzung und durch Regulierung der Kultivierungsparameter zu optimieren.

Identifizierung eines geeigneten Microcarriers für die hES Zellkultur

Im Zuge der ersten Evaluierung verschiedener Microcarrier auf ihre Eignung für die Kultivierung undifferenzierter hES Zellen konnte das beste Wachstum auf den Carriern Cytodex1, Cytodex3, CultispherG und CultispherS beobachtet werden. Das Proliferationsverhalten korrelierte dabei nicht mit dem Verlauf des initialen Adhäsionsverhaltens an die Carrier. Da die Carrier CultispherG und CultispherS aus einer Gelatinematrix bestehen und der Microcarrier Cytodex3 eine Gelatine-Beschichtung besitzt, könnte darauf geschlossen werden, dass dem vergleichbaren Wachstum der hES Zellen auf diesen Carriern diese Gemeinsamkeit zugrunde liegt. Dem steht entgegen, dass der Carrier Cytodex1 eine unbeschichtete Dextran-

Oberfläche besitzt und die hES Zellen auf dem ebenfalls Gelatine-beschichteten Carrier FACT ein schlechtes Wachstum zeigten. Sowohl in statischen Kulturen als auch unter Scherstress konnte eine Aggregation der Zell-bewachsenen Microcarrier beobachtet werden. Die Scherung führte hierbei nicht zu einer Verringerung der Aggregatbildung. Fast keine Aggregatbildung war für Kulturen mit dem Microcarrier Cytopore zu beobachten. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die hES Zellen praktisch ausschließlich im Inneren dieses Carriers wachsen konnten und kaum Zell-Zell-Kontakte an den Carrieroberflächen bestanden. Vermutlich ist die poröse Struktur dieses Microcarriers auch für die geringe Proliferation der hES Zellen auf Cytopore-Microcarriern verantwortlich, da die Poren zu einer zu starken Isolation der hES Zellen voneinander führen und hierdurch notwendige Zell-Zell-Kontakte unterbinden. Unter leichtem Scherstress war auf dem Carrier CultispherG eine bessere Proliferation der hES Zellen zu beobachten als auf den Cytodex-Carriern, die unter statischen Kultivierungsbedingungen eine mit Cultispher-Carriern vergleichbare Performance zeigten. Dies kann durch die makroporöse Struktur der Cultispher-Carrier erklärt werden, die einen verbesserten Schutz der Zellen gegen Scherstress ermöglichte. Für den Einsatz im gerührten Glasballspinnernsystem mit seiner andersartigen Verteilung der Scherkräfte war die Proliferation der hES Zellen auf Cytodex3-Carrier jedoch derjenigen auf CultispherG-Carriern überlegen. Im gerührten System bestätigte sich, dass der Carrier Cytopore sich nicht für die Kultivierung humaner ES Zellen eignete. Der Microcarrier Cytodex3 erwies sich nicht nur aufgrund seiner guten Eigenschaften für die hES Zellproliferation als besonders geeignet für die hES Zellkultur. Zum einen war die Zellernte von diesem nicht porösen Carrier wesentlich effizienter als bei den makroporösen Carriern. Zum anderen erlaubten die guten Durchlicht-Eigenschaften von Cytodex3 eine regelmäßige mikroskopische Begutachtung der Kulturen.

Pluripotenzerhaltung von hES Zellen in Microcarrier-basierten Kulturen

Die Entstehung von hES Zell-Microcarrier-Aggregaten in Glasballspinnernkulturen führte zur Ausbildung von zwei Zellpopulationen in den Kulturen. Eine Population, die mehrheitlich als Monolayer auf den Microcarriern wuchs, wies eine Expression der Pluripotenz-assoziierten Oberflächenantigene Tra-1-60 und Tra-1-81 auf. Diese Population war nach dem Replattieren der Carrier auf Feeder-Zellen für das

Auswachsen von alkalische Phosphatase- und Oct-4-positiven Kolonien mit normaler hES Zellmorphologie verantwortlich und war in der Lage, eine Multikeimblatt-Differenzierung in EBs zu zeigen. Eine weitere Zellpopulation bildete sich jedoch im Inneren der hES Zell-Microcarrier-Aggregate. Diese Population war negativ für die Pluripotenz-assoziierten Marker Tra-1-60 und Tra-1-81 und wies somit einen Verlust der hES Zelleigenschaften auf. Aggregatbildung und damit assoziierter Pluripotenzverlust der hES Zellen stellten das zentrale Problem bei der Prozessentwicklung dar. Konnten in den durchgeführten Prozessen im Mittel hervorragende Ausbeuten von $1,5 \times 10^6 \pm 0,1$ Zellen/ml erzielt werden, so bildeten sich nach dem Replattieren nur $8,4 \times 10^{-5}$ Kolonien/eingesetzte Zelle. Dem gegenüber steht eine Ausbeute von $2,6 \times 10^{-3}$ Kolonien/eingesetzte Zelle bei Monolayerkulturen. Diese Differenz erklärt sich zum Teil dadurch, dass nur rund ein Drittel der im skalierbaren Prozess gewonnenen Zellen die Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker aufwiesen.

Optimierung der Rührparameter

Versuche, die Aggregatbildung durch Variation der Rührerdrehzahl, des Rührertyps oder der Rührersteuerung (Intervall- / Dauerrühren) zu reduzieren, erwiesen sich als erfolglos. Dies ist darauf zurückzuführen, dass alle kommerziell für Spinner erhältlichen Rührer eine radiale Förderung aufweisen. Hierdurch ergeben sich Totzonen im Spinner, in denen es zu einer Aggregatbildung kommen kann. In einem solchen System führt eine Erhöhung der Scherkräfte in dem Maße, wie sie für eine Elimination der Totzonen nötig ist, zu einer Zellschädigung.

Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration auf Microcarrier-basierte hES Zellkulturen

Eine Regulierung von Prozessparametern wie der Gelöstsauerstoffkonzentration stellt eine vielversprechende Strategie dar, um den Anteil an undifferenzierten hES Zellen in den Microcarrier-basierten Suspensionskulturen zu erhöhen. So postulierten Ezashi et al. (2005), dass hES Zellen in Monolayerkulturen unter hypoxischen Bedingungen eine verringerte Spontandifferenzierungsrate zeigen. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass auch die physiologische Umgebungskonzentration an Sauerstoff für die Innere Zellmasse der Blastozyste - als Quelle der hES Zellen - *in vivo* subatmosphärisch ist. Erste Untersuchungen im kontrollierten Minispinner-System zeigten, dass der Anteil an Tra-1-60- und Tra-1-81-positiven Zellen in Spinnerkulturen bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 5% maximiert werden

konnte. Die Gelöstsauerstoffkonzentration in einem unkontrollierten Spinner liegt bei etwa 10%; die Fraktion an Tra-1-60- und Tra-1-81-exprimierenden Zellen im unkontrollierten System war vergleichbar mit jener in einem auf 10% Gelöstsauerstoff geregelten System. Mit weiter steigender Gelöstsauerstoffkonzentration nahm der Anteil an Zellen, die die Pluripotenz-assoziierten Marker exprimierten, sowie die Überlebensrate der Zellen ab. Letzteres könnte Folge eines erhöhten oxidativen Stresses auf die Zellen sein. Die Beobachtung, dass hES Zellen bei subatmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen eine verbesserte Pluripotenz-erhaltung zeigen, steht im Einklang mit den Daten von Ezashi et al. (2005). Zugleich widerspricht dieser Befund eigenen Daten, die unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Spontandifferenzierung humaner ES Zellen in Monolayerkulturen zeigen (Ley, 2005). Unseren Ergebnissen zufolge lässt eine verminderte Proliferation der hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen, die zu einer kleineren Koloniegröße führt, den initialen Eindruck entstehen, dass eine verminderte Spontandifferenzierung vorliegt. Langzeitkulturen von hES Zellen unter hypoxischen Bedingungen weisen jedoch einen höheren Anteil an differenzierten Zellen auf. hES Zellen würden sich somit in einer hypoxischen Atmosphäre vergleichbar mit Inneren-Zellmasse-Zellen verhalten, die unter physiologischen Bedingungen eine Differenzierung zu den embryonalen Geweben unterlaufen (Terstegge et al., 2005). Zwei mögliche Erklärungen für die verminderte Differenzierung von hES Zellen in Microcarrier-basierten Kulturen bei einem Gelöstsauerstoffgehalt von 5% bieten sich an: Zum einen wurde in den Sauerstoff-geregelten Prozessen eine deutlich verringerte Zellproliferation beobachtet, die wie in den hypoxischen Monolayer-Kulturen für eine apparente Verringerung der Differenzierungsrate verantwortlich sein könnte. Dem widerspricht, dass die Abnahme der Zellproliferation in allen Sauerstoff-geregelten Prozessen auftrat, die Erhöhung des Anteils an Tra-1-60- und Tra-1-81-positiven Zellen jedoch nur bei einem Gelöstsauerstoffgehalt von 5% zu beobachten war. Zum anderen wurde weder bei der Studie von Ezashi et al. noch bei der von Ley der Gelöstsauerstoffgehalt in den Kulturen bestimmt, sondern der Luftsauerstoffgehalt geregelt. Es ist anzunehmen, dass der Gelöstsauerstoffgehalt in beiden Studien weit unter 5% lag, da bei Luftsauerstoffgehalten von 1% bis 10% gearbeitet wurde.

Alternativen zur Verringerung der Aggregatbildung in Microcarrier-basierten hES Zellkulturen

In der Literatur wurde beschrieben, dass der Einsatz von DMSO in CHO Zell-Microcarrier-Kulturen die Bildung von Zellbrücken zwischen den Carriern verhindert (Borys und Papoutsakis, 1992). Möglicherweise ist die Reduktion der Aggregatbildung jedoch auf eine Verringerung des Zellwachstums durch DMSO zurückzuführen. In der Studie von Borys und Papoutsakis wurde DMSO ausschließlich in post-konfluenten Kulturen eingesetzt, um eine Inhibierung des Zellwachstum zu vermeiden. Wenngleich abträgliche Einflüsse nicht auszuschließen sind, stellt die Verwendung von DMSO einen möglichen Ansatz zur Verminderung der Aggregatbildung in Suspensionskulturen humaner ES Zellen dar.

Als weitere Möglichkeit, eine Aggregatbildung im Spinnersystem zu verringern, erwies sich die Reduktion der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen-Konzentration im Medium. In Monolayer-Kulturen war ein 50%iger Anteil Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Mediums am Kulturmedium nicht abträglich für die Proliferation und Pluripotenzerhaltung humaner ES Zellen. In Microcarrier-basierten Spinnerkulturen erwies sich diese Medienkomposition jedoch nicht als geeignet, um eine Aggregatbildung zu vermindern. Wurde ein 75%iger Anteil Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Mediums eingesetzt, so konnte eine praktisch Aggregat-freie Kultur erzielt werden. Der Anteil an Tra-1-60- und Tra-1-81-positiven Zellen in dieser Kultur war fast vergleichbar mit dem Anteil an Monolayerkulturen. Diese Verminderung der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration im Medium führte jedoch auch zu einer enormen Reduzierung der hES Zellproliferation, die möglicherweise auf eine verringerte Adhäsion der hES Zellen an die Microcarrier zurückzuführen ist. Studien an Zelllinien belegen jedoch, dass niedrige Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen im Kulturmedium nicht generell zu einer reduzierten Proliferation in Suspensionskulturen führen. So beschrieben Keay et al. (1990) einen Prozess im 100l-Maßstab, bei dem Bowes Melanomzellen für über 4 Monate in Ca^{2+} -freiem Medium kultiviert wurden. Innerhalb von 5-7 Tagen konnte in diesen Kulturen eine Verfünffachung der Ausgangszellzahl erreicht werden. Garnier et al. (1994) zeigten, dass 293S-Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium Zelldichten von 5×10^6 Zellen/ml erreichen können, und Chillakuru et al. (1991) verwendeten Ca^{2+} -freies Medium für die Kultivierung von HeLa-Zellen. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob es

auch für hES Zellen möglich ist, die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration im Kulturmedium so einzustellen, dass ein Kompromiss zwischen optimaler Zellproliferation und Pluripotenzerhaltung möglich ist.

Zu den Ca^{2+} -abhängigen Zelladhäsionsmolekülen zählen die Cadherine. E-Cadherin, das erste Cadherin, das während der Entwicklung von Säugetieren exprimiert wird, spielt eine entscheidende Rolle bei der Zelladhäsion in embryonalen Geweben. So führt ein E-Cadherin-Block über Antikörper zu einem Verlust der Blastomerkompaktion bei Maus-Embryonen (Alberts et al., 2002). E-Cadherin wird in humanen Blastozysten (Bloor et al., 2002) und ES Zellen (Dang et al., 2004) exprimiert. Ein Eingriff in die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion stellt somit eine interessante Möglichkeit dar, um hES Zell-Aggregationen zu verhindern. Larue et al. (1994) zeigten, dass E-Cadherin^{-/-}-ES-Zellen einen Defekt in der Zell-Aggregation besitzen. Obwohl differenzierende E-Cadherin^{-/-}-ES-Zellen Differenzierungsmarker exprimierten und E-Cadherin^{-/-}-ES-Zellen auch Teratome bildeten, konnten diese Zellen innerhalb der Teratome keine Gewebe-ähnlichen Strukturen bilden und trugen darüber hinaus kaum zur Bildung chimärer Embryonen bei. Diese Studie wurde durch Dang et al. (2004) bestätigt, die eine E-Cadherin-vermittelte Agglomeration von murinen und humanen EBs durch Blockierung der E-Cadherine mittels eines α -E-Cadherin-Antikörpers sowie durch Agarose-Enkapsulierung der EBs verhindern konnten. Eine temporäre E-Cadherin-Blockierung könnte somit auch eine Aggregation in undifferenzierten hES Zellkulturen verhindern. Interferiert man mit E-Cadherin, so ist jedoch zu beachten, dass dies nicht nur eine Auswirkung auf die Strukturbildung während der Differenzierung, sondern auch Implikationen auf die β -Catenin-Aktivität haben könnte. β -Catenin verankert die Cadherine am Aktin-Cytoskelett, ist aber auch ein Ko-Aktivator für die Transkription von Wnt-Zielgenen (Alberts et al., 2002). Die Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Pluripotenzerhaltung humaner ES Zellen ist momentan noch umstritten. Während Sato et al. (2004) postulierten, dass eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs zum Pluripotenzerhalt von hES Zellen führt, konstatierten Dravid et al. (2005), dass eine Wnt-Inhibierung eine Verringerung der hESC-Proliferation auslöst, nicht jedoch eine Differenzierung. Vielmehr wurde in dieser Studie beobachtet, dass Wnt3a in Abwesenheit Pluripotenzerhaltender Faktoren eine Differenzierung von hES Zellen beschleunigt.

Zusammenfassend belegt die vorliegende Arbeit, dass es möglich ist, humane ES Zellen in Microcarrier-basierten Suspensionskulturen zu kultivieren. Sie zeigt darüber hinaus auf, welche Ansätze es ermöglichen können, den Anteil an undifferenzierten Zellen in diesen Kulturen zu optimieren.

Eine Möglichkeit, den hier beschriebenen Prozess zu optimieren, liegt in der Rührergeometrie. So sollte in Zukunft geprüft werden, ob mit einem Pitch-Blade-Rührer, der eine axiale Durchströmung erzeugt, die Aggregatbildung als grundlegendes Problem bei der Prozessführung reduziert werden kann. Es bleibt zudem zu untersuchen, ob der optimale Gelöstsauerstoffgehalt in den Spinnerkulturen weiter eingegrenzt werden kann. Darüber hinaus sollte der Prozess in Bezug auf pH-Wert und Medienzufütterung optimiert werden. Von entscheidender Bedeutung ist es zudem, die Karyotyp-Stabilität von hES Zellen, die über einen Microcarrier-basierten Prozess gewonnen wurden, zu belegen.

Berücksichtigt man, dass seit der erstmaligen Gewinnung humaner ES Zelllinien durch Thomson (1998) weltweit kein skalierbarer Prozess für die Kultivierung undifferenzierter humaner ES Zellen und auch für die Kultivierung undifferenzierter muriner ES Zellen nur ein erster, unbefriedigender Ansatz (Fok und Zandstra, 2005) entwickelt wurde, so wird deutlich, dass die Entwicklung skalierbarer Verfahren für die Kultivierung von hES Zellen nicht trivial ist. Skalierbare und automatisierte Prozesse zur kontrollierten und reproduzierbaren Generierung großer Zahlen an undifferenzierten hES Zellen stellen jedoch die Voraussetzung für eine breite Anwendung hES Zell-basierter Produkte dar. Nur unter Einsatz von Bioreaktortechnologie und Automatisierungslösungen wird es möglich sein, das Potential hES Zell-abgeleiteter somatischer Zellpopulationen im pharmakologischen Wirkstoffscreening, als transgene zelluläre Krankheitsmodelle und in der Therapie voll auszuschöpfen. Ein erster Schritt auf diesem Weg konnte durch diese Dissertation geleistet werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Verfahren zur automatisierten und zur skalierbaren Kultivierung humaner ES Zellen erarbeitet. Hierfür wurde zunächst die manuelle humane ES Zellkultur in Gegenwart von Fibroblasten sowie unter Verwendung Fibroblasten-konditionierten Mediums etabliert. Die hierbei gewonnenen Erfahrungen bildeten die Grundlage für die Entwicklung eines automatisierten Systems für die murine und die humane ES Zellkultur, die in Kooperation mit Hamilton Life Science Robotics durchgeführt wurde. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass ein automatisiertes System dafür geeignet ist, mES und hES Zellkulturen über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten, ohne die Proliferation oder das *in vitro*-Differenzierungspotenzial dieser Zellen zu beeinflussen. Die mittlere spezifische Wachstumsrate von über vier Wochen automatisiert kultivierten ES Zellen war mit $0,72 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$ für mES Zellen bzw. mit $0,22 \pm 0,003 \text{ d}^{-1}$ für hES Zellen vergleichbar zu der manuell kultivierter Zellen. $96 \pm 2\%$ der mES Zellen und $96 \pm 1\%$ der hES Zellen zeigten im Anschluss an diesen Kultivierungszeitraum eine Expression des Pluripotenz-assoziierten Markers Oct-4. Für das Oberflächenantigen SSEA-1 waren $94 \pm 2\%$ der Zellen in mES Zellkulturen immunreaktiv. hES Zellkulturen wiesen eine stabile Tra-1-60- ($87 \pm 4\%$) und Tra-1-81-Expression ($89 \pm 2\%$) auf. Der Karyotyp der automatisiert kultivierten hES Zellen blieb stabil.

Des Weiteren wurde in dieser Dissertation ein skalierbarer Prozess zur Microcarrier-basierten Suspensionskultur humaner ES Zellen entwickelt. Unter Verwendung des Carriers Cytodex3 sowie eines Glasballrührers bei einer Rührerdrehzahl von 20rpm und Intervallrühren konnten mittlere spezifische Wachstumsraten von $0,34 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ erreicht werden. Diese Wachstumsrate ist mit der konventioneller Monolayerkulturen ($0,26 \pm 0,09 \text{ d}^{-1}$) mindestens vergleichbar. Über diesen Prozess konnte eine Zellpopulation gewonnen werden, die die Expression Pluripotenz-assoziiierter Marker sowie ihr *in vitro*-Differenzierungspotenzial aufrechterhielt. Strategien zur Optimierung dieses Prozesses wurden entwickelt.

In Zusammenarbeit mit der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld (Prof. Dr. Lehmann) konnte gezeigt werden, dass konditioniertes Medium aus Microcarrier-basierten Suspensionskulturen primärer muriner Fibroblasten prinzipiell für die

Pluripotenzhaltung humaner ES Zellen geeignet ist. Die Skalierung dieses Prozesses könnte es ermöglichen, Medien für die hES Zellkultur auf kostengünstige Weise im großen Maßstab zu gewinnen.

Insgesamt demonstriert diese Arbeit, dass es möglich ist, humane ES Zellen bei Erhalt ihrer charakteristischen Eigenschaften unter automatisierten Bedingungen sowie über skalierbare Verfahren zu expandieren.

Die in dieser Arbeit entwickelten Verfahren stellen eine Grundlage für die Entwicklung ES Zell-basierter Screeningsysteme dar. Ein skalierbarer Prozess für die standardisierte Produktion großer Zahlen an hES Zellen wäre dafür geeignet, das Ausgangsmaterial für kontrollierte Differenzierungsprozesse zur Verfügung zu stellen. Diese Differenzierungsverfahren könnten in Zukunft mit Hilfe eines automatisierten Zellkultursystems deutlich besser standardisiert werden. Die Automatisierung würde es zudem erlauben, ES Zell-abgeleitete somatische Zellen im Mikrotiterplatten-Format zu plattieren und der pharmazeutischen Industrie in validierter Form zur Verfügung zu stellen. Über die Verwendung nativer gewebespezifischer Zellen hinaus kann es möglich werden, auf der Basis von hES Zellen transgene Modelle auf zellulärer Ebene für zahlreiche Erkrankungen zu erzeugen. Humane Stammzelllinien mit krankheitsspezifischen genetischen Veränderungen könnten es erlauben, die molekulare Pathogenese von Erkrankungen auf einem humanen Hintergrund zu entschlüsseln und auf Grundlage dieser Informationen neue Angriffspunkte für eine medikamentöse Intervention zu identifizieren. hES Zell-abgeleitete somatische Zellpopulationen könnten es in Zukunft erlauben, die Wirksamkeit neu entwickelter Pharmaka direkt an humanen Zellen zu evaluieren, die nicht nur den Phänotyp des betroffenen Gewebes repräsentieren, sondern auch molekulare Charakteristika der betreffenden Erkrankung widerspiegeln.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*, 4th edn (New York: Garland Science).

Amersham Pharmacia Biotech (1999). *Microcarrier cell culture: principles & methods*, AA edn (Uppsala).

Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J., und Thomson, J. A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* *227*, 271-278.

Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R., und Itskovitz-Eldor, J. (2003). Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod* *68*, 2150-2156.

Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., und Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* *70*, 837-845.

Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K. L., und Tzukerman, M. (2001). Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* *50*, 1691-1697.

Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N. Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A. L., Bruses, J., Rubio, M. E., Topf, N., *et al.* (2003). Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* *21*, 1200-1207.

Bauwens, A. (2005) *Bioreaktorbasierte Produktion und massenspektrometrische Analyse konditionierter Medien*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Bielefeld.

Bauwens, C., Yin, T., Dang, S., Peerani, R., und Zandstra, P. W. (2005). Development of a perfusion fed bioreactor for embryonic stem cell-derived cardiomyocyte generation: oxygen-mediated enhancement of cardiomyocyte output. *Biotechnol Bioeng* *90*, 452-461.

- Benninger, F., Beck, H., Wernig, M., Tucker, K. L., Brüstle, O., und Scheffler, B. (2003). Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in hippocampal slice cultures. *J Neurosci* *23*, 7075-7083.
- Bloor, D. J., Metcalfe, A. D., Rutherford, A., Brison, D. R., und Kimber, S. J. (2002). Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod* *8*, 237-245.
- Borys, M. C., und Papoutsakis, E. T. (1992). Formation of bridges and large cellular clumps in CHO-cell microcarrier cultures: effects of agitation, dimethyl sulfoxide and calf serum. *Cytotechnology* *8*, 237-248.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., und Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* *309*, 255-256.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I., und Blau, H. M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* *290*, 1775-1779.
- Brüstle, O., Jones, K. N., Learish, R. D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O. D., Duncan, I. D., und McKay, R. D. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* *285*, 754-756.
- Carpenter, M. K., Rosler, E. S., Fisk, G. J., Brandenberger, R., Ares, X., Miura, T., Lucero, M., und Rao, M. S. (2004). Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn* *229*, 243-258.
- Castilho, L. R., und Medronho, R. A. (2002). Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol* *74*, 129-169.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., und Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* *113*, 643-655.
- Chillakuru, R. A., Ryu, D. D., und Yilma, T. (1991). Propagation of recombinant vaccinia virus in HeLa cells: adsorption kinetics and replication in batch cultures. *Biotechnol Prog* *7*, 85-92.
- Chmiel, H. (1991). *Bioprozeßtechnik* (Stuttgart: Gustav Fischer).

- Chu, L., und Robinson, D. K. (2001). Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr Opin Biotechnol* *12*, 180-187.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S. J., Johnson, J., Meisner, L., und Lanza, R. (2005). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* *439*, 216-219.
- Clark, J. M., und Hirtenstein, M. D. (1981). High yield culture of human fibroblasts on microcarriers: a first step in production of fibroblast-derived interferon (human beta interferon). *J Interferon Res* *1*, 391-400.
- Crespi, C. L., und Thilly, W. G. (1981). Continuous cell propagation using low-charge microcarriers. *Biotechnol Bioeng* *23*, 983-993.
- Daheron, L., Opitz, S. L., Zaehres, H., Lensch, W. M., Andrews, P. W., Itskovitz-Eldor, J., und Daley, G. Q. (2004). LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* *22*, 770-778.
- Dang, S. M., Gerecht-Nir, S., Chen, J., Itskovitz-Eldor, J., und Zandstra, P. W. (2004). Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells* *22*, 275-282.
- Dang, S. M., Kyba, M., Perlingeiro, R., Daley, G. Q., und Zandstra, P. W. (2002). Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol Bioeng* *78*, 442-453.
- Department of Health and Human Services (2001). *Stem cells: Scientific progress and future research directions: National Institutes of Health*.
- Dravid, G., Ye, Z., Hammond, H., Chen, G., Pyle, A., Donovan, P., Yu, X., und Cheng, L. (2005). Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* *23*, 1489-1501.
- Evans, M. J., und Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 154-156.
- Ezashi, T., Das, P., und Roberts, R. M. (2005). Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 4783-4788.

- Fischer, B., und Bavister, B. D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* *99*(2), 673-679.
- Fok, E. Y., und Zandstra, P. W. (2005). Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. *Stem Cells* *23*, 1333-1342.
- Garnier, A., Cote, J., Nadeau, I., Kamen, A., und Massie, B. (1994). Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology* *15*, 145-155.
- Gerecht-Nir, S., Cohen, S., und Itskovitz-Eldor, J. (2004). Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. *Biotechnol Bioeng* *86*, 493-502.
- Gilbert, S. F. (2003). *Developmental biology*, 7th edn (Sunderland: Sinauer Associates).
- Glaser, T., Perez-Bouza, A., Klein, K., und Brustle, O. (2005). Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells. *Faseb J* *19*, 112-114.
- Graves, K. H., und Moreadith, R. W. (1993). Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* *36*, 424-433.
- Henderson, J. K., Draper, J. S., Baillie, H. S., Fishel, S., Thomson, J. A., Moore, H., und Andrews, P. W. (2002). Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* *20*, 329-337.
- Iannaccone, P. M., Taborn, G. U., Garton, R. L., Caplice, M. D., und Brenin, D. R. (1994). Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol* *163*, 288-292.
- Inzunza, J., Gertow, K., Stromberg, M. A., Matilainen, E., Blennow, E., Skottman, H., Wolbank, S., Ahrlund-Richter, L., und Hovatta, O. (2005). Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* *23*, 544-549.

- Keay, L., Walsh, J. M., Buchholz, R. M., und Terando, J. M. (1990). Production of recombinant human erythropoietin in Bowes melanoma cells in suspension culture. *Appl Microbiol Biotechnol* *34*, 198-202.
- Kehat, I., Khimovich, L., Caspi, O., Gepstein, A., Shofti, R., Arbel, G., Huber, I., Satin, J., Itskovitz-Eldor, J., und Gepstein, L. (2004). Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *22*, 1282-1289.
- Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* *19*, 1129-1155.
- Keller, G. M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* *7*, 862-869.
- Kim, H. S., Oh, S. K., Park, Y. B., Ahn, H. J., Sung, K. C., Kang, M. J., Lee, L. A., Suh, C. S., Kim, S. H., Kim, D. W., und Moon, S. Y. (2005). Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* *23*, 1228-1233.
- Klug, M. G., Soonpaa, M. H., Koh, G. Y., und Field, L. J. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*, 216-224.
- Kretzmer, G. (2002). Industrial processes with animal cells. *Appl Microbiol Biotechnol* *59*, 135-142.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., und Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8263-8267.
- Leese, H. J. (1995). Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum Reprod Update* *1(1)*, 63-72.
- Leon-Quinto, T., Jones, J., Skoudy, A., Burcin, M., und Soria, B. (2004). In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* *47*, 1442-1451.

Levenstein, M. E., Ludwig, T. E., Xu, R. H., Llanas, R. A., Vandenheuvel-Kramer, K., Manning, D., und Thomson, J. A. (2005). Basic FGF Support of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells* 24, 568-574.

Ley, B. H. (2005) Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen, Diplomarbeit, Fachhochschule Weihenstephan, Weihenstephan.

Li, Y., Powell, S., Brunette, E., Lebkowski, J., und Mandalam, R. (2005). Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnol Bioeng* 91, 688-698.

Lo, C. M., Keese, C. R., und Giaever, I. (1994). pH changes in pulsed CO₂ incubators cause periodic changes in cell morphology. *Exp Cell Res* 213, 391-397.

Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., *et al.* (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24, 185-187.

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.

Meier, S. M., Huebner, H., und Buchholz, R. (2005). Single-cell-bioreactors as end of miniaturization approaches in biotechnology: progresses with characterised bioreactors and a glance into the future. *Bioprocess Biosyst Eng* 28, 95-107.

Mered, B., Albrecht, P., Hopps, H. E., Petriccioni, J. C., und Salk, J. (1981). Propagation of poliovirus in microcarrier cultures of three monkey kidney cell lines. *J Biol Stand* 9, 137-145.

Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., und McKercher, S. R. (2000). Turning blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., und Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is

required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631-642.

Molofsky, A. V., Pardal, R., und Morrison, S. J. (2004). Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 700-707.

Murray, P., und Edgar, D. (2004). The topographical regulation of embryonic stem cell differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *359*, 1009-1020.

Nichols, J., Chambers, I., Taga, T., und Smith, A. (2001). Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* *128*, 2333-2339.

Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., und Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* *12*, 2048-2060.

Nottorf, T. (2003) Bioreaktorbasierte Produktion konditionierter Medien zur Expansion pluripotenter humaner embryonaler Stammzellen, Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Bielefeld.

Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., und Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* *60*, 461-472.

Pain, B., Clark, M. E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J., und Etches, R. J. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* *122*, 2339-2348.

Park, J. H., Kim, S. J., Oh, E. J., Moon, S. Y., Roh, S. I., Kim, C. G., und Yoon, H. S. (2003). Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod* *69*, 2007-2014.

Pyle, A. D., Lock, L. F., und Donovan, P. J. (2006). Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival. *Nat Biotechnol* *24*, 344-350.

Richards, M., Fong, C. Y., Chan, W. K., Wong, P. C., und Bongso, A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *20*, 933-936.

- Rogers, M. B., Hosler, B. A., und Gudas, L. J. (1991). Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development* 113, 815-824.
- Rosler, E. S., Fisk, G. J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M. S., und Carpenter, M. K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 229, 259-274.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., und Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10, 55-63.
- Schroeder, M., Niebruegge, S., Werner, A., Willbold, E., Burg, M., Ruediger, M., Field, L. J., Lehmann, J., und Zweigerdt, R. (2005). Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. *Biotechnol Bioeng* 92, 920-933.
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., und Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- Solter, D., und Knowles, B. B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 5099-5102.
- Solter, D., und Knowles, B. B. (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5565-5569.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E., und Scott, E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545.
- Terstegge, S., Ley, B. H., und Brustle, O. (2005). Scalable process for the controlled expansion of undifferentiated human embryonic stem cells. Program No. 255.3. 2005 Abstract Viewer and Itinerary Planner Washington, DC: Society for Neuroscience CD-ROM.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshal, V. S., und Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145-1147.

Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., und Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 7844-7848.

van Wezel, A. L. (1967). Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature* *216*, 64-65.

van Wezel, A. L., und van Steenis, G. (1978). Production of an inactivated rabies vaccine in primary dog kidney cells. *Dev Biol Stand* *40*, 69-75.

Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukhareenko, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V., und Kuliev, A. (2005). Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online* *10*, 105-110.

Wernig, M., Benninger, F., Schmandt, T., Rade, M., Tucker, K. L., Bussow, H., Beck, H., und Brüstle, O. (2004). Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo. *J Neurosci* *24*, 5258-5268.

Wheeler, M. B. (1994). Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* *6*, 563-568.

Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., und Gough, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* *336*, 684-687.

Winter, F. (2005) Cell type specific response to laser activated nano particle mediated cell elimination, Bachelorarbeit, Fachhochschule Bonn-Rhein-Sieg, Rheinbach.

Xiao, L., Yuan, X., und Sharkis, S. J. (2006). Activin A maintains self-renewal and regulates FGF, Wnt and BMP pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* *24*, 1476-1486.

Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., und Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *19*, 971-974.

Xu, C., Rosler, E., Jiang, J., Lebkowski, J. S., Gold, J. D., O'Sullivan, C., Delavan-Boorsma, K., Mok, M., Bronstein, A., und Carpenter, M. K. (2005a). Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells* *23*, 315-323.

Xu, R. H., Chen, X., Li, D. S., Li, R., Addicks, G. C., Glennon, C., Zwaka, T. P., und Thomson, J. A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* *20*, 1261-1264.

Xu, R. H., Peck, R. M., Li, D. S., Feng, X., Ludwig, T., und Thomson, J. A. (2005b). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* *2*, 185-190.

Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., und Smith, A. (2003a). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* *115*, 281-292.

Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P., und Smith, A. G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* *416*, 545-548.

Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., und Smith, A. (2003b). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* *21*, 183-186.

Zandstra, P. W., Bauwens, C., Yin, T., Liu, Q., Schiller, H., Zweigerdt, R., Pasumarthi, K. B., und Field, L. J. (2003). Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng* *9*, 767-778.

Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brüstle, O., und Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *19*, 1129-1133.

7. DANKSAGUNG

Prof. Dr. Oliver Brüstle möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit auf einem so spannenden Gebiet durchführen zu können. Danke für Unterstützung und Kritik, für die Freiheit zu eigenen Entscheidungen und für immer neue Herausforderungen, die mich fachlich und persönlich geprägt haben.

Prof. Dr. Michael Hoch danke ich für seine nicht selbstverständliche Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu betreuen.

Prof. Dr. Joseph Itskovitz-Eldor, Michal Amit und Sharon Gerech-Nir bin ich dankbar für die Einladung nach Israel, die es mir ermöglichte, vor Ort einen Einblick in die humane ES Zellkultur zu bekommen.

Dr. Jörg Pochert, Dr. Peter Kiesau, Dieter Erkenrath und Claudia Schmude von Hamilton Life Science Robotics danke ich herzlich für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Prof. Dr Thomas Noll (Technische Fakultät, Universität Bielefeld) sowie Dr. Matthias Arnold und Dr. Christof Knocke (DASGIP AG) danke ich besonders für die Bereitstellung des kontrollierten Minispinnensystems und die technische Unterstützung.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Jürgen Lehmann, Tobias Nottorf und Andreas Bauwens von der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld für die Kooperation.

Bei Dr. Elmar Endl (Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie) möchte ich mich für die Einweihung in die Geheimnisse der Durchflusszytometrie bedanken.

Alexander Rigort (Institut für Zellbiologie) danke ich für die Unterstützung bei der Rasterelektronenmikroskopie und Christina Ergang (Institut für Humangenetik) für Hilfe bei der Karyotypisierung.

Ganz besonders dankbar bin ich Iris Laufenberg und Barbara Ley für ihren unermüdlichen Einsatz und das ausgezeichnete Klima in der Bioengineering Group. Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Rekonstruktive

Neurobiologie für die gute Zusammenarbeit. Vor allem danke ich Andrea Biegler, Rachel Konang, Barbara Steinfarz und Nina Limbach für ihre Unterstützung sowie Corinne Benzing und Anke Leinhaas für die erste gemeinsame Zeit mit den hES Zellen. Ein herzlicher Dank geht an das Sekretariat: Beate Pörsch, Alexandra Rabe und ganz besonders an Karin Frangenberg für ihr Mitleiden und Mitfreuen. Mark Hermann danke ich für seine Hilfe bei IT-Problemen.

Klaus Meier und der Meier IT-Connect GmbH danke ich für die großzügige Unterstützung beim Druck dieser Dissertation.

Ich danke meinen Eltern und meiner unvergessenen Großmutter für alles, was sie mir ermöglicht haben, für tatkräftige Hilfe und aufmunternde Worte, für Lob und Kritik und dafür, dass sie mir beigebracht haben, nie aufzugeben.

Christian danke ich für das Zuhören, die Geduld und den weiten Weg, den er in all den Jahren auf sich genommen hat.

Diese Arbeit wurde ermöglicht durch die Finanzierung der Hertie-Stiftung, der DFG und des Kompetenznetzwerks Stammzellforschung Nordrhein-Westfalen.

8. ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbständig und ausschließlich unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die Daten, die im Rahmen einer Kooperation gewonnen wurden, sind ausnahmslos gekennzeichnet. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind ebenfalls unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich habe noch keinen früheren Promotionsversuch unternommen. Diese Dissertation wurde an der nachstehend aufgeführten Stelle auszugsweise veröffentlicht.

Terstegge S., Laufenberg I., Pochert J., Schenk S., Itskovitz-Eldor J., Endl E. und Brüstle O. (2006). Automated Maintenance of Embryonic Stem Cell Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. Online publiziert: 7. September 2006. DOI: 10.1002/bit.21061.

9. ANHÄNGE

9.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial

1ml Injektionsspritzen
 15 cm Zellkulturschalen
 Deckgläser
 Einmal-Pipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)
 Einmal-Pipettenspitzen (10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)
 Falcon-Röhrchen
 Filtereinheit (0,2 μ m)
 Glaskugeln (\varnothing 4mm)
 Glaswaren
 Kanülen Microlance 3
 Kryoröhrchen
 Küvetten
 Microcarrier:
 Biosilon
 Cultispher G, Cultispher S
 Cytodex1, Cytodex3, Cytopore
 FACT, Pronectin
 Nylonzellsieb (40 μ m)
 Objektträger
 Reaktionsgefäße
 Reaktionsgefäßstreifen für die qPCR
 Sechs-Well-Zellkulturplatten
 Stericup-Filtriereinheit (0,22 μ m)
 Sterilfilter (0,2 μ m)
 T175-Zellkulturflaschen

Hersteller, Ort

BD Bioscience, Heidelberg
 TPP, Trasadingen, CH
 Engelbrecht, Edermünde
 Falcon, Heidelberg
 ART, San Diego, USA

 Falcon, Heidelberg
 Nalgene, Hereford, UK
 Faust, Schaffhausen
 Schott, Mainz
 BD Bioscience, Heidelberg
 Nunc, Wiesbaden
 Eppendorf, Hamburg

 Sigma, Deisenhofen
 Perbio, Bonn
 GE Healthcare, Freiburg
 Nunc, Wiesbaden
 BD Bioscience, Heidelberg
 Menzel, Braunschweig
 Eppendorf, Hamburg
 Biozym, Hess. Oldendorf
 Nunc, Wiesbaden
 Millipore, Schwalbach
 PALL, Ann Arbor, USA
 BD Bioscience, Heidelberg

9.2 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Bildbearbeitung	Photoshop	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
	Openlab	Improvision, Coventry, GB
	Zeiss	Carl Zeiss, Jena
	CytoVision Ultra	Applied Imaging Inc., San Jose, USA
Binokular	SMZ 1500	Nikon, Düsseldorf
Brutschränke	HERAcell	Thermo Electron, Waltham, USA
Datenauswertung	Flowjo	Tree Star Inc, Ashland, USA
Durchflussszytometrie		
Digitalkamera	C 5050 Zoom	Olympus Optical, Hamburg
Durchflussszytometer	LSRII	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophorese	Agagel Mini	Biometra, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 2	Carl Zeiss, Jena
Gefrierbehälter	Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Hereford, UK
Geldokumentation	Geldoc2000	Bio-Rad, München
Glukose-Laktat-Analyzer	YSI 2700 Select	YSI Inc., Yellow Springs, USA
Inverses Lichtmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Fluoview1000	Olympus, Hamburg
Kontrolliertes Minispinnerssystem mit Software	Cellferm-pro	DASGIP, Jülich
Kryostat	HM560	Mikrom, Walldorf
Kühlzentrifuge	5415R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer mit Steuereinheit	Variomag Biosystem	Thermo Electron, Waltham, USA
Mikroskop Karyotypisierung	Diaplan 68236	Leitz, Wetzlar
pH-Elektroden	pH+	AppliSens, Schiedam, NL
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetboy	Brand, Wertheim
Pipetten	10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
qPCR-Analysesystem und -Software	iCycler	Bio-Rad, München
Rasterelektronenmikroskop	XL 30 SEM	Philips
Reinstwasseranlage	milliQ Synthesis A10	Millipore, Schwalbach
Sauerstoffelektroden	InPro6900	Mettler Toledo.Giessen
Spinner mit Glasballtaumelrührer	100ml Spinner	Bellco, Vineland, USA
Spinner mit Paddelrührer	125ml Spinner	Wheaton, Millville, USA
Spinner mit Blattrührer	125ml Spinner	Corning, Wiesbaden
Sterile Werkbank (horizontal)	HERAguard	Thermo Electron, Waltham, USA
Sterile Werkbank (vertikal)	Holten Safe 2000	Thermo Electron, Waltham, USA
Thermocycler	T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge Pico	Thermo Electron, Waltham, USA
Überkopfschüttler	REAX 2	Heidolph Instruments, Schwabach
Vakuum-Absaugpumpe	Vacuubrand	Brand, Wertheim
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

Waagen	Grobwaage BL610 Analysenwaage LA310S	Sartorius, Göttingen
Wärmeplatte	OTS40	Medite, Burgdorf
Wasserbad		Memmert, Schwabach
Wippschüttler	WS10	Edmund Bühler, Tübingen
Zählkammer	Fusch-Rosenthal	Faust, Halle
Zellkultur-Kühlzentrifuge	Megafuge 1.0R	Thermo Electron, Waltham, USA

9.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Ort
1kb plus DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
6x DNA Laufpuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Accustain	Sigma, Deisenhofen
Accutase II	PAA, Pasching, Österreich
Agarose, PeqGold Universal	PeqLab, Erlangen
Bactotrypsin	BD Bioscience, Heidelberg
Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Borax	Sigma, Deisenhofen
BrdU	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
Colcemid	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI	Sigma, Deisenhofen
DEPC	Fluka, Seelze
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM ohne Kalziumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DTT	Roche, Mannheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP	Roche, Mannheim
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Expand Reverse Transcriptase	Roche, Mannheim
FGF-2	Invitrogen, Karlsruhe
Fluorescein	Sigma, Deisenhofen
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
FCS, definiert	Hyclone, Logan, USA
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
HCl	Sigma, Deisenhofen
Hoechst 33258	Sigma, Deisenhofen
Gelatine Typ A	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Knockout-DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Knockout-Serum Replacement	Invitrogen, Karlsruhe
Kollagenase Typ IV	Invitrogen, Karlsruhe
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
LIF (ESGRO)	Chemicon, Hofheim
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
Matrigel	BD Bioscience, Heidelberg
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Minimum Essential Medium Eagle, Spinner Modification	Sigma, Deisenhofen
Mowiol	Sigma, Deisenhofen

Mycoplasma Plus PCR Primer Set	Stratagene, Amsterdam, NL
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
Oligo-(dT) ₁₅ -Primer	Roche, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
RepelSilane	GE Healthcare, Freiburg
Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor	Roche, Mannheim
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
SYBR Green I	Sigma, Deisenhofen
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Tissue Tek	Sakura, Zoeterwoude, NL
Tris-HCl	ICN Biomedicals, Eschwege
Triton-X100	Sigma, Deisenhofen
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan-Blau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Zitronensäure	Sigma, Deisenhofen

9.4 Primäre Antikörper

Antigen	Antigen-Beschreibung	Art	Verdünnung	Besonderheiten	Hersteller Ort
Alpha-Fetoprotein (AFP)	Entoderm-assoziiert (Foetale Leber, foetaler Intestinaltrakt, embryonaler Dottersack)	Kaninchen IgG	1:200	Triton-X100	Dako Cytomation Hamburg
BrdU	Uridin-Derivat, das anstelle von Thymidin in die DNA inkorporiert werden kann	Maus IgG	1:33	Triton-X100, Denaturierung der DNA	Becton Dickinson San Jose, USA
Desmin	Mesoderm-assoziiert (Muskelzellen)	Kaninchen IgG	1:100	Triton-X100	Chemicon Temecula, USA
Nanog	Pluripotenz-assoziiertes Transkriptionsfaktor	Kaninchen polyklonal	1:5000	Triton-X100	Chemicon Temecula, USA
Oct-4	Pluripotenz-assoziiertes Transkriptionsfaktor	Kaninchen IgG	1:400	Triton-X100	Santa Cruz Santa Cruz, USA
SSEA-1	Pluripotenz-assoziiertes Oberflächenantigen (murine ES Zellen) Differenzierungs-assoziiertes Oberflächenantigen (humane ES Zellen)	Maus IgM	1:80		DSHB Iowa City, USA
Tra-1-60	Pluripotenz-assoziiertes Oberflächenantigen (humane ES Zellen)	Maus IgM	1:500	Lebendfärbung	Chemicon Temecula, USA
Tra-1-81	Pluripotenz-assoziiertes Oberflächenantigen (humane ES Zellen)	Maus IgM	1:500	Lebendfärbung	Chemicon Temecula, USA
Zytokeratin	Ektoderm-assoziiert (Epithel)	MausIgG	1:200	Triton-X100	Chemicon Temecula, USA

9.5 Sekundäre Antikörper

Konjugat	Art	Verdünnung	Hersteller Ort
Cy3	Ziege anti-Maus IgM+IgG	1:500	Jackson Immuno Research West Grove, USA
Cy3	Ziege anti-Kaninchen IgG	1:200	Jackson Immuno Research West Grove, USA
Cy5	Ziege anti-Maus IgM	1:500	Jackson Immuno Research West Grove, USA
FITC	Ziege anti-Kaninchen IgG	1:200	Jackson Immuno Research West Grove, USA
Rhodamin	Ziege anti-Maus IgG	1:100	Jackson Immuno Research West Grove, USA

9.6 Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	Annealing-Temperatur (°C)	Zyklen	MgCl ₂ -Konzentration (mM)	Länge des Produkts (bp)	Schmelzpunkt des Produkts (°C)
h α -Fetoprotein	FW AGCTTGGTGGTGGATGAAAC RV TCCAACAGGCCTGAGAAATC	60	35	1,5	200	85,5
β -Aktin	FW ACCCACACTGTGCCCATCTA RV GCCACAGGATTCCATACCCA	58	30	1,5	341	89
h β -Aktin	FW ATCGAGCACGGCATCGTCA RV GGAGCTGGAAGCAGCCGTG	58	30	1,5	492	88
hGAPDH	FW CTGCTTTTAACTCTGGTAAAGT RV GCGCCAGCATCGCCCCA	58-64	30	1,5	213	86,5
Nanog	FW GCTTGCCTTGCTTTGAAGCA RV TTCTTGACTGGGACCTTGTC	63	35	1,5	255	86,5
hNestin	FW GCCCTCACCCTCCAGTTTA RV GGAGTCCTGGATTTCTTCC	63	35	1,5	200	86,5
Oct-3/4	FW AGAACAATGAGAACCTTCAGGAGA RV CTGGCGCCGGTTACAGAACCAA	60	35	1	286	89,0
Rex-1	FW GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA RV CAGCATCCTAACAGCTCGCAGAAT	58	35	1,5	306	87,0
hVimentin	FW GGGACCTCTACGAGGAGGAG RV CGCATTGTCAACATCCTGTC	64-66	35	1,5	200	91,5

9.7 Lösungen

9.7.1 Lösungen für die Zellkultur

CM (Konditioniertes Medium)

50 ml hES-Zellmedium ohne FGF-2 pro 10^6 mitotisch inaktivierte Fibroblasten
 Inkubation über Nacht bei 37°C, 5% CO₂
 Am Folgetag Abnahme und Filtration des Mediumüberstands
 Lagerung bei -20°C
 Vor Gebrauch Zugabe von 4ng/ml FGF-2

EB-Medium

FCS	20%
Nicht-essentielle Aminosäuren	1%
L-Glutamin	1mM
in Knockout-DMEM	

Gelatine

Gelatine Typ A	0,1%
in ddH ₂ O (Millipore, steril)	
Zur Beschichtung wurden die Schalen für mindestens 20 Minuten inkubiert.	

hES-Gefriermedium

DMSO	10%
FCS, definiert	20%
in Knockout-DMEM	

hES-Zellmedium

Knockout-Serum Replacement	20%
Nicht-essentielle Aminosäuren	1%
L-Glutamin	1mM
2-Mercaptoethanol	0,1mM
FGF-2	4ng/ml
in Knockout-DMEM	

hES-Zellmedium ohne FGF-2

Knockout-Serum Replacement	20%
Nicht-essentielle Aminosäuren	1%
L-Glutamin	1mM
2-Mercaptoethanol	0,1mM
in Knockout-DMEM	

Kollagenase

Kollagenase Typ IV	1mg/ml
in Knockout-DMEM	
Sterilfiltrieren	

Matrigel

Matrigel	3,3%
in Knockout-DMEM	
Zur Beschichtung wurden die Schalen entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.	

MEF-Gefriermedium

DMSO	20%
FCS	20%
in DMEM	

MEF-Medium

FCS	10%
Natriumpyruvat	1%
Nicht-essentielle Aminosäuren	1%
in DMEM	

mES-Gefriermedium

DMSO	10%
FCS	15%
in DMEM	

mES-Zellmedium

FCS	20%
LIF	10 ⁶ U/l
Nicht-essentielle Aminosäuren	1%
L-Glutamin	1mM
2-Mercaptoethanol	0,1mM
in DMEM	

Trypsin-EDTA 1x

Trypsin-EDTA (10x)	10%
in PBS	

Trypsin-EDTA 1,5x

Trypsin-EDTA (10x)	15%
in PBS	

9.7.2 Lösungen für die Bakterienkultur**LB-Medium (pH 7,5)**

Trypton	10g/l
Hefeextrakt	5g/l
Natriumchlorid	5g/l
Ampicillin	25µg/ml

9.7.3 Lösungen für analytische Methoden

9.7.3.1 Zellzahlbestimmung

Kristallviolettlösung

Kristallviolett	0,1%
Triton	0,1%
Zitronensäure	0,1M
in ddH ₂ O (Millipore)	

9.7.3.2 Immunzytochemie

Blockierungslösung 1

FCS	5%
in PBS	

Blockierungslösung 2

FCS	5%
Triton-X100	0,1%
in PBS	

Boratpuffer (pH 7,5)

Borax	0,1M
in ddH ₂ O (Millipore)	

Mowiol

Glycerol	6g
Mowiol	2,49g
0,2M Tris-HCl (pH 8,5)	12ml
in 6 ml ddH ₂ O (Millipore, steril)	

PFA

Paraformaldehyd	4%
in PBS	

Saccharoselösung

Saccharose	30%
in PBS	

9.7.3.3 RNA-Isolierung und PCR

Agarosegele

PeqGold Universal Agarose	1%
Ethidiumbromid	10µg/ml
in TAE (pH 7,8)	

DEPC-Wasser

DEPC 0,2%
in ddH₂O (Millipore)
Über Nacht geöffnet unter den Abzug stellen, am Folgetag autoklavieren.

TAE (pH 7,8)

Tris-HCl 40mM
Natriumacetat 5mM
EDTA 1mM
in ddH₂O

9.7.3.4 Karyotypisierung**Fixativ**

Methanol 75%
Eisessig 25%

Giemsa-Lösung

Accustain 5%
in ddH₂O (Millipore)

KCl-Lösung

Kaliumchlorid 0,075M
in ddH₂O (Millipore)

9.8 Lebenslauf

Veröffentlichungen

Deringer W., Feldermann D., Klein R., Schulz S., Terstegge G., Terstegge S. und Wilmes A. (1999). Linder Biologie Lehrmaterialien zur 21. Auflage. Schroedel-Verlag.

Terstegge G. und Terstegge S. (1999). Biologische Strukturen. BOD.

Terstegge G. und Terstegge S. (1999). Energie bewegt. BOD.

Terstegge S., Pochert J. und Brüstle O. (2004). Hamilton's new cellhost system for full automation of embryonic stem cell cultures. Application Note, Nature Methods 1(3), 271-272.

Koch P., Biegler A., Pfennig A., Müller T., Klein-Vehne A., Terstegge S., Itskovitz-Eldor J. und Brüstle O. (2005). Automated generation of human stem cell clones by Image-Activated Cell Selection (IACS™). Application Note, Nature Methods, 2(11), i-ii.

Terstegge S., Laufenberg I., Pochert J., Schenk S., Itskovitz-Eldor J., Endl E. und Brüstle O. (2006). Automated Maintenance of Embryonic Stem Cell Cultures. Biotechnology and Bioengineering. Online publiziert: 7. September 2006. DOI: 10.1002/bit.21061.

Terstegge S. und Brüstle O. (2006). Stammzellen – Bedeutung für die klinische Medizin; in: Taschenlehrbuch Humangenetik, Hrsg. Murken J., Grimm T. und Holinski-Feder E., Georg Thieme-Verlag.

Terstegge S. und Brüstle O. (im Druck). Stammzelltechnologie und Kerntransfer; in : Technologieführer, Hrsg. VDI.

Büscher K.*, Terstegge S.*, Koch P., Kurth R., Itskovitz-Eldor J., Brüstle O. und Denner J. (zur Publikation eingereicht). High Level of Expression of the Human Endogenous Retrovirus HERV-K in Human Embryonic Stem Cells is Decreased During Differentiation. *equal contribution

Terstegge S., Ley B.H., Itskovitz-Eldor J., Endl E. und Brüstle O. (in Vorbereitung). Hypoxic Culture Conditions Induce the Spontaneous Differentiation of Human Embryonic Stem Cells.

Patente

Terstegge S. und Burcin M. (2004). Mediumsupplemente zur Förderung der Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) in Suspensionen. Deutsche Patentanmeldung 10 2004 014 116.9-11.

Terstegge S. und Brüstle O. (2004). Skalierbarer Prozess zur Kultivierung undifferenzierter Stammzellen in Suspension. Europäische Patentanmeldung PCT-EP-2005-009611.

Kongressbeiträge

Terstegge S., Esser S., Willbold E., Rüdiger M. und Burcin, M. (2003). Generation of Insulin Producing Cells from Mouse Embryonic Stem Cells. Poster, Keystone Symposium "From Stem Cells to Therapy", 29. März-3. April, Steamboat Springs, Colorado, USA.

Nottorf T.*, Terstegge S.*, Bauwens A., Büntemeyer H., Brüstle O. und Lehmann J. (2004). Bioreactor Based Production of Conditioned Media for the Expansion of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells. Poster, 2nd International Meeting of the Stem Cell Network North Rhine Westphalia, 1.-2. April, Bonn-Bad Godesberg. *equal contribution

Adjaye J., Terstegge S., Herwig R., Itskovitz-Eldor J., Lehrach H. und Brüstle O. (2004). Comparative molecular profiles of the human embryonic stem cell lines H9 and H9.2 as deduced by cDNA microarrays. Poster, 2nd International Meeting of the Stem Cell Network North Rhine Westphalia, 1.-2. April, Bonn-Bad Godesberg.

Terstegge S., Laufenberg I., Pochert J. und Brüstle O. (2004). An Automatized System for Embryonic Stem Cell Culture. Poster, 10. Jahrestreffen der Society for Biomolecular Screening, 11.-15. September, Orlando, Florida, USA.

Benzing C., Koch P., Terstegge S., Nolden L., Siemen H., Steinfarz B., Edenhofer F., Rüschemschmidt C., Beck H., Itskovitz-Eldor J. und Brüstle O. (2004). Neural Differentiation and Genetic Engineering of Human Embryonic Stem Cells. Vortrag, Interne Klausurtagung des Kompetenznetzwerks Stammzellforschung Nordrhein-Westfalen, 19.-20. November, Herne.

Terstegge S., Laufenberg I., Pochert J. und Brüstle O. (2005). An Automated System for Embryonic Stem Cell Culture. Poster, Semester-Meeting des Bonner Forums Biomedizin, 12.-13. Februar, Bornheim Walberberg.

Terstegge S., Ley B.H., Endl E., Noll T. und Brüstle O. (2005). Process design for commercial stem cell production. Vortrag, Interne Klausurtagung des Kompetenznetzwerks Stammzellforschung Nordrhein-Westfalen, 4.-5. November, Herne.

Terstegge S., Ley B.H. und Brüstle O. (2005). Scalable process for the controlled expansion of undifferentiated human embryonic stem cells. Poster, 35. Jahrestreffen der Society for Neuroscience, 12.-16. November, Washington, DC, USA.

Ley B.H., Terstegge S., Endl E. und Brüstle O. (2006). Hypoxic cultivation of human embryonic stem cells induces spontaneous differentiation. Poster, Semester-Meeting des Bonner Forums Biomedizin, 4.-5. März, Bad Breisig.

Ley B.H.*, Terstegge S.* und Brüstle O. (2006). Hypoxic cultivation of human embryonic stem cells induces spontaneous differentiation. Poster, 3rd International Meeting of the Stem Cell Network North Rhine Westphalia, 15.-16. Mai, Münster.
*equal contribution