

**Etablierung eines Bioprozesses zur osteogenen
Differenzierung von embryonalen Stammzellen des
Weißbüschelaffens *Callithrix jacchus* in
automatisierten Suspensionsbioreaktoren.**

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
Dr. rer. nat.

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Susanne Trettner
geboren am 09.09.1981 in Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Matthias Müller
Gutachter: Prof. Dr. Andrea A. Robitzki
Prof. Dr. Frank Emmrich
Tag der Verteidigung: 28. Januar 2011

Bibliographische Darstellung

Dipl. Biol. Susanne Trettner

Etablierung eines Bioprozesses zur osteogenen Differenzierung von embryonalen Stammzellen des Weißbüschelaffens *Callithrix jacchus* in automatisierten Suspensionsbioreaktoren.

Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

Universität Leipzig

Dissertation

186 Seiten, 157 Literaturangaben, 49 Abbildungen

Die Entwicklung eines Bioprozesses zur osteogenen Differenzierung embryonaler Stammzellen des Weißbüschelaffens (*Callithrix jacchus*) in einem vollautomatisierten Suspensionsbioreaktorsystem eröffnet die Möglichkeit der industriellen Nutzung für embryotoxische Teststudien potentieller Wirkstoffkandidaten in der Humanmedizin. Es wurde die Feederzell-freie Expansion von *Callithrix jacchus* embryonalen Stammzellen (cES-Zellen) entwickelt. Diese können unter dem Einfluss von Activin A und bFGF kultiviert werden ohne ihre pluripotenten Eigenschaften zu verlieren. Zur osteogenen Differenzierung von cES-Zellen wurde das für murine Zellen beschriebene Protokoll erfolgreich übertragen. Zur Ermittlung optimaler Agitationsparameter des Bioreaktorsystems zur Differenzierung von ES-Zellen wurden zunächst murine ES-Zellen verwendet. Der Einsatz eines Blattrührers und eine Rührgeschwindigkeit von 130rpm erwiesen sich als optimal für die Bildung von Aggregaten muriner und cES-Zellen. Quantitative Analysen der in die Matrix der Zellen eingelagerten Kalziummenge zum Ende der Differenzierung zeigen eine Verminderung der osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor um rund 90% und eine Steigerung der osteogenen Differenzierung von cES-Zellen um 400% gegenüber statischer Differenzierung. Die ermittelten Speziesunterschiede unterstreichen die Notwendigkeit der Nutzung von Primatenzellen zur Ermittlung des embryotoxischen Potentials von Wirkstoffkandidaten in der Humanmedizin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Embryonale Stammzellen	7
1.2	Differenzierung embryonaler Stammzellen	8
1.3	Embryonale Stammzellen des Weißbüschelaffens <i>Callithrix jacchus</i>	11
1.4	Kultursysteme zur ES-Zell-Differenzierung	12
1.5	Knochen und Knochenaufbau	14
1.6	Osteogene Differenzierung embryonaler Stammzellen	16
1.7	Einfluss von Flüssigkeitsscherstress auf Osteoblasten	19
2	Zielsetzung	21
3	Material und Methoden	24
3.1	Zellbiologische Methoden	24
3.1.1	Kultivierung muriner ES-Zellen	24
3.1.2	Kultivierung von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen	25
3.1.2.1	Kultivierung auf Feederzellen	25
3.1.2.2	Feederzell-freie Kultivierung	26
3.1.3	Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen	27
3.1.4	Osteogene Differenzierung von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen	29
3.1.5	Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor	30
3.1.6	Differenzierung von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen im Bioreaktor	33
3.2	Analytische Methoden	35

3.2.1	Immunzytochemische Färbungen	35
3.2.1.1	Fixierung und Färbung von Zellen in Zellkulturplatten	35
3.2.1.2	Herstellung von Gefrierschnitten von Zellaggregaten	35
3.2.2	Alizarin Färbung der mineralisierten Matrix	36
3.2.3	Quantitative Analyse des Kalziums in der mineralisierten Matrix	36
3.2.4	mRNA-Isolation	37
3.2.5	Reverse Transkription der mRNA	38
3.2.6	Semiquantitative PCR	38
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.2.8	Karyotypisierung	39
3.2.9	Telomeraseaktivitätsbestimmung mittels qPCR	40
3.2.10	Durchflusszytometrische Analyse der SSEA-4 Expression	41
3.2.11	Statistische Analysen	41
3.3	Verwendete Medien	42
3.4	Verwendete Antikörper	47
3.5	Verwendete Primer	48
4	Ergebnisse	50
4.1	<i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen können auf Feederzellen und Feederzell-frei kultiviert werden	50
4.2	Vergleich der Feederzell-haltigen und Feederzell-freien <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellkultur	52
4.2.1	Immunzytochemische Färbung von Pluripotenzmarkern	52
4.2.2	Gegenüberstellung des Expressionsmusters von Pluripotenzmarkern	55
4.2.3	Nachweis einer hohen Telomeraseaktivität	56
4.2.4	Karyotypanalyse von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen nach 40 Passagen Feederzell-freier Kultur	57
4.3	Initiierung der Differenzierung von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen	58

4.4	Osteogene Differenzierung von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen in statischer Kultur mit und ohne EB-Bildungsschritt im Vergleich	64
4.4.1	Osteogene Differenzierung ohne EB-Formierung	65
4.4.2	Osteogene Differenzierung mit EB-Formierung	66
4.5	Verstärkung der <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zelldifferenzierung durch Manipulation des zeitigen Wnt-Signalweges	72
4.6	Charakterisierung des Bioreaktorsystems unter Verwendung muriner ES-Zellen	73
4.6.1	Auswirkungen des Rührertyps auf die EB-Größe und Uniformität	75
4.6.2	Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die EB-Formierung	76
4.7	Vergleich der osteogenen Differenzierung von murinen ES-Zellen im Bioreaktor und in statischer Kultur	81
4.8	Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultur	87
4.9	Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen auf einem Rotationsschüttler	89
4.10	Einfluss der EB-Bildungsstrategie auf die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen	94
4.11	Formierung von EBs von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen im Bioreaktor	97
4.11.1	Inokulation der Zellen in den Bioreaktor	97
4.11.2	Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die EB-Formierung	99
4.12	Vergleich der osteogenen Differenzierung von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen im Bioreaktor und in statischer Kultur	103
4.13	Einfluss der EB-Bildungsstrategie auf die osteogene Differenzierung von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen	105
5	Diskussion	108
5.1	Die Kultivierung von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen auf Feederzellen erhält deren Pluripotenz	108

5.2	<i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen können unter dem Einfluss von Activin A und bFGF Feederzell-frei kultiviert werden ohne ihre pluripotenten Eigenschaften zu verlieren	112
5.3	<i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen können nach initialer EB-Formierung, unter dem Einfluss von Vitamin D ₃ zu Osteoblasten differenziert werden	116
5.4	Im Suspensionsbioreaktor generierte ES-Zell-EBs besitzen das gleiche osteogenen Potential wie EBs aus statischer Formierung	122
5.5	Die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen im Suspensionsbioreaktor führt zur Inhibierung der Differenzierung	128
5.6	Die osteogene Differenzierung von <i>Callithrix jacchus</i> ES-Zellen ist im Suspensionsbioreaktor verstärkt	134
6	Zusammenfassung	138
7	Danksagung	154
8	Wissenschaftlicher Werdegang	155
9	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	157
10	Selbstständigkeitserklärung	161
	Literaturverzeichnis	162
	Abbildungsverzeichnis	182
	Abkürzungsverzeichnis	186

1 Einleitung

1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse (ICM, engl. *inner cell mass*) der Blastozyste gewonnen. Zur Isolation der ES-Zellen wird die zelluläre Blastozystenhülle - der Trophoblast mechanisch, chemisch oder durch immunologische Behandlung zerstört [1]. ES-Zellen zeichnen sich durch das Potential zur unbegrenzten Selbsterneuerung und zur Differenzierung in alle Zelltypen des Organismus aus - diese grundlegenden Eigenschaften werden als Pluripotenz bezeichnet. Zur Erhaltung der Pluripotenz *in vitro* werden isolierte ES-Zellen auf mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten der Maus (MEF), die als sogenannte Fütter- oder Feeder-Zellen bezeichnet werden, kultiviert [1, 2]. Für murine ES-Zellen wurde das Mediumadditiv *leukemia inhibitory factor* (LIF) in Verbindung mit fetalem Kälber-Serum als Ersatz für Feederzellen beschrieben [3].

Embryonale Stammzellen aus der Mausblastozyste wurden auf diese Weise das erste Mal 1981 isoliert [4, 5]. Die ES-Zell-Isolierung gelang später auch aus anderen Spezies, unter anderem aus Rhesusaffe und Weißbüschelaffe [6, 7]. Die Isolation humaner embryonaler Stammzellen erfolgte das erste Mal im Jahre 1998 durch Thomson und Mitarbeiter [2]. Zum Nachweis der embryonalen Stammzellidentität werden molekularer Marker der Pluripotenz untersucht, wie beispielsweise die Expression des Octamer-bindenden Proteins Oct-4, sowie die Expression von Nanog, einem Mitglied der homeobox Familie von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren [8, 9]. Ein Charakteristikum embryonaler Ge-

webe und somit auch embryonaler Stammzellen ist eine hohe Telomeraseaktivität [10]. Diese ermöglicht es den Zellen sich unbegrenzt zu teilen, ohne der Seneszenz zu unterliegen. Desweiteren zeichnen sich ES-Zellen durch die Expression typischer Zelloberflächenmarker, wie der *stage specific embryonic antigens* (SSEA) 1, 3 und 4 sowie der Antigene TRA-1-60 und TRA-1-81 aus. Dabei zeigt sich eine Spezies-spezifische Ausprägung dieser Zelloberflächenantigene. So exprimieren murine embryonale Stammzellen nur SSEA-1 [11, 12]. Humane Stammzellen hingegen exprimieren im undifferenzierten Stadium kein SSEA-1, dafür aber SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 und TRA-1-81 [2]. Beiden Stammzellspezies ist gemein, dass mit beginnender Differenzierung die Expression dieser Antigene herunterreguliert wird und diese auf der Zelloberfläche nicht mehr nachweisbar sind. Das Potential zur Differenzierung in alle Zelltypen des Organismus ist die spezifischste Eigenschaft embryonaler Stammzellen im Vergleich zu anderen Stammzelltypen wie z.B. adulten Stammzellen, die im Allgemeinen nur in Zelltypen des Gewebes aus welchem sie stammen differenzieren können. Dieses Potential embryonaler Stammzellen wird bei deren Charakterisierung durch den Nachweis der Expression molekularer Markergene aller drei Keimblätter - Mesoderm, Endoderm und Ektoderm während der spontanen und somit ungerichteten Differenzierung der Stammzellen *in vitro* untersucht [13].

1.2 Differenzierung embryonaler Stammzellen

Die gerichtete Differenzierung embryonaler Stammzellen *in vitro* ist eines der Hauptziele der embryonalen Stammzellforschung. Sie ermöglicht detaillierte Einblicke in die Embryonalentwicklung und somit die Erforschung bestimmter assoziierter Krankheitsbilder. Daneben ist die *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen für den Einsatz in Zell-Ersatz-Therapien ein weiteres wichtiges, jedoch noch nicht erreichtes Ziel. So könnten größere Knochendefekte, verursacht durch zum Beispiel Tumore, durch die Gabe von *in vitro* differenzierten Osteoblasten oder deren Vorläuferzellen geschlossen werden. Dabei wäre diese allogene Transplantation von differenzierten ES-Zellen von entscheidendem Vorteil

gegenüber anderen Zellquellen was die Bereitstellung von genügend Zellmaterial angeht, da ES-Zellen aufgrund ihres praktisch unendlichen Teilungsvermögens eine unerschöpfliche Zellquelle für solche Therapien darstellen. Zwar klingen Ergebnisse aus Transplantationsstudien mit kardial differenzierten humanen ES-Zellen in Nager oder Schweine vielversprechend [14, 15], jedoch ist bis zum heutigen Tag noch keine Studie veröffentlicht, welche die Transplantation humaner differenzierter ES-Zellen in den Patient „Mensch“ beschreibt. Potentielle Probleme, wie die Immunreaktion des Empfängers auf das allogene Material, sowie die Gefahr der Teratomabildung durch im Transplantat verbliebene embryonale Stammzellen werden in den nächsten Jahren noch zu lösen sein [16]. Eine Grundlage für solche Transplantationsexperimente bilden neben der Tierproduktfreien Isolierung und Kultivierung der Stammzellen robuste und sehr gut definierte Differenzierungsprotokolle. Die *in vitro* Differenzierung wird eingeleitet durch den Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren. Dies sind zumeist Feederzellen bzw. LIF. Gleichzeitig wird meist ein Zellaggregationschritt durchgeführt, welcher die Bildung von Zell-Zell-Verbindungen, ähnlich der *in vivo* Situation ermöglicht. Die Zellaggregation wird bei murinen ES-Zellen häufig über das Protokoll der hängenden Tropfen realisiert bei der gleichförmige Aggregate entstehen, welche aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem Embryo vor der Einnistung in die Gebärmutter als Embryonalkörperchen (engl. *embryoid bodies* oder EBs) bezeichnet werden [17]. Durch den Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren und dem Aggregationsschritt kommt es zur spontanen Differenzierung der Zellen in Zelltypen der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Die spontane Differenzierung geht einher mit dem Verlust der Expression von Pluripotenzmarkergenen, wie z.B. Oct4 und Nanog. *In vitro* kann die Differenzierung der Zellen in einen bestimmten Zelltyp durch ausgewählte Differenzierungsbedingungen unterstützt werden. So wird beispielsweise die kardiale Differenzierung stark beeinflusst durch die Einsaatdichte der Zellen, die Qualität des verwendeten fötalen Kälberserums (FKS) sowie die Medienzusammensetzung und die eingesetzten Wachstumsfaktoren [18]. Zusätzlich ist die verwendete ES-Zelllinie entscheidend für den Differenzierungserfolg, da

sich ES-Zelllinien, bei spontaner Differenzierung unterschiedlich gut zu Zellen der einzelnen Keimblätter entwickeln [18]. Die *in vitro* Differenzierung kann durch den Einsatz verschiedenster Zytokine stark beeinflusst werden. So wird z.B. die kardiale Differenzierung durch die Gabe von TGF- β , welches über Smad-Phosphorylierung zur Expression von kardialen Transkriptionsfaktoren wie z.B. GATA4 und Nkx2.5 führt oder Retinolsäure welche ebenfalls die Expression dieser Transkriptionsfaktoren beeinflusst, gesteigert [19, 20]. Auch die Kultivierung unter hypooxischen Bedingungen, welche zur erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species* oder ROS) führt, kann die kardiale Differenzierung beeinflussen. ROS stimulieren ebenfalls die Expression von kardialen Transkriptionsfaktoren, welche die Expression kardio-spezifischer Gene wie α -/ β -MHC, α -Aktin und Desmin nach sich zieht, und wirken somit positiv auf die kardiale Differenzierung [21–23]. Die erfolgreiche Differenzierung der ES-Zellen in den gewünschten Zielzelltyp kann *in vitro* neben dem Nachweis der Funktionalität der Zellen beispielsweise durch Expressionsanalysen typischer Zellmarkergene sowie über immunzytochemische Färbungen spezifischer Zellstrukturen nachgewiesen werden. So wird bei der kardialen Differenzierung neben der Kontraktilität häufig auch die Ausbildung der typischen Z-Scheibenbänderung durch das α -Aktinin als erfolgreiches und einfach nachzuweisendes Differenzierungskriterium herangezogen. Bei der osteogenen Differenzierung wird der Nachweis der erfolgreichen Differenzierung meist über die quantitative Analyse des in die, durch Osteoblasten gebildete, Matrix eingelagerten Kalziums geführt. Zusätzlich werden Osteoblasten-spezifische Proteine wie Osteocalcin und Bone Sialoprotein immunzytochemisch oder auf Expressionsebene nachgewiesen.

Murine embryonale Stammzellen wurden bereits in viele verschiedene Zelltypen differenziert, u.a. in Kardiomyozyten [24, 25], Neurone [26, 27] und Osteoblasten [28, 29]. Auch humane ES-Zell-Differenzierungsprotokolle sind beschrieben, u.a. für die Differenzierung in Neuron-ähnliche Zelltypen [30, 31] sowie Kardiomyozyten [32].

1.3 Embryonale Stammzellen des Weißbüschelaffens *Callithrix jacchus*

Aufgrund ihrer engeren genetischen Verwandtschaft gelten Primaten im Gegensatz zu Nagern als bessere präklinische Modelle des Menschen [33, 34]. So können Primaten, zur Etablierung von Transplantationsstrategien differenzierter embryonaler Stammzellen Prozesse des humanen Systems besser widerspiegeln. Unter Verwendung von Primaten als Modellorganismen könnten spezifischere Aussagen über die Immunreaktion des menschlichen Körpers auf die allogene Zelltransplantation getroffen und neue Differenzierungs- und Transplantationsstrategien entwickelt werden. Erste wissenschaftliche Durchbrüche auf diesem Gebiet gelangen 2007 durch Byrne und Mitarbeiter, welche die Erzeugung pluripotenter ES-Zelllinien des Rhesusaffens nach somatischem Zellkerntransfer (therapeutischem Klonen) beschrieben [35], sowie 2009 mit der Erzeugung transgener Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*), die die induzierte genetische Veränderung an ihre Nachkommen weiter gaben [36]. Dies ermöglicht u.a. die Erforschung der Immunreaktion nach Transplantation differenzierter ES-Zellen, sowie die Erzeugung spezifischer Krankheitsbilder zur Entwicklung und Erprobung von Zellersatztherapien. Auch hier bilden, neben der xenofreien Isolierung und *in vitro* Kultivierung, robuste Differenzierungsprotokolle die Grundlage für weiterführende *in vivo* Studien.

Primaten embryonale Stammzellen wurden vom Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) [6], Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) [37] und vom Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) [7, 38] isoliert. *In vitro* Differenzierungsprotokolle sind unter anderem beschrieben für die neuronale [39] und endotheliale [40] Differenzierung von Rhesus ES-Zellen, die Differenzierung von Javaneraffen ES-Zellen zu Kardiomyozyten [41] und Pigmentepithelzellen [42], sowie die kardiale [43] und hämatopoietische [44] Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen.

1.4 Kultursysteme zur ES-Zell-Differenzierung

Strategien der EB-Formierung

Doetschman beschrieb 1985, dass embryonale Stammzellen in Suspension, ähnlich wie viele embryonale Teratokarzinomazelllinien (EC-Zellen), zystische Zellaggregate bilden und somit spontan differenzieren [24]. Bei der *in vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen hat sich dieser Aggregationsschritt zur Initiierung der Differenzierung sowohl von murinen als auch von humanen Stammzellen etabliert. Nach diesem Aggregationsschritt und dem damit verbundenen Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren (MEF bzw. LIF) werden die EBs zumeist wieder in Einzelzellen aufgespalten oder als ganze Aggregate in Zellkulturschalen ausplattiert und durch die Zugabe verschiedener Mediumadditiva in die gewünschte Zielzellart differenziert. Die ersten murinen EBs wurden durch die Kultivierung der ES-Zellen in Suspension in bakteriologischen Schalen generiert und zu Kardiomyozyten differenziert [24]. Die verbreitetste Art der EB-Generierung ist jedoch das Protokoll der hängende Tropfen [25]. Dabei werden meist 20 µl große Tropfen einer Zellsuspension auf die Innenseite des Deckels einer Zellkulturschale aufgetropft und der Deckel anschließend wieder auf die Schale aufgesetzt. Diese hängenden Tropfen werden für 2-3 Tage bei 37 °C kultiviert. In dieser Zeit aggregieren die Zellen aufgrund der Schwerkraft im tiefsten Punkt des Tropfens. Im Vergleich zur einfachen EB Herstellung in bakteriologischen Schalen führt das Protokoll der hängenden Tropfen, aufgrund der gleichen Zellzahl pro Tropfen, zu gleichmäßig großen und geformten Aggregaten, was zu einem synchroneren Ablauf der Differenzierung innerhalb der EBs führt und somit Einfluss auf den Erfolg der Differenzierung hat [25, 45]. Eine schnellere Methode zur EB-Generierung als die hängende Tropfen Methode ist die Zentrifugation der Zellsuspension in 96-Kavitätenplatten mit rundem Boden, was ebenfalls zur Generierung uniformer Aggregate führt [46]. Beiden EB-Formierungsstrategien ist gemein, dass sie sehr arbeitsaufwendig sind, was gerade bei größeren Differenzierungsansätzen zu

Problemen führen kann. Neuste, speziell für die schnelle Herstellung von EBs im großen Maßstab angefertigte Mikrokavitätenplatten bilden eine gute Alternative zur hängenden Tropfen Methode [47–49].

Eine Weiterentwicklung zur statischen Generierung der EBs bilden auch EB-Formierungsstrategien unter hydrodynamischen Bedingungen, z.B. auf Rotationsschüttlern, in rotierenden Kulturgefäßen, Spinner-Flaschen und voll automatisierten Bioreaktoren [50–56]. Vorteile der hydrodynamischen Systeme sind eine verstärkte Aggregation der ES-Zellen, eine uniformere Größe der EBs gegenüber statischer Generierung, eine bessere Nährstoffversorgung der Zellen, sowie die gleichmäßige Verteilung löslicher Mediumsfaktoren und konstante Umgebungsbedingungen (Temperatur, Sauerstoff, pH) innerhalb der Kultur [57].

Trotz vieler beschriebener Strategien zur einfachen Herstellung gleichgroßer EBs ist der tatsächlich Einfluss der EB-Größe auf das Differenzierungspotenzial der Zellen noch nicht abschließend untersucht [57].

Kultursysteme zur gerichteten Stammzellendifferenzierung

Nach der Initiation der spontanen Differenzierung durch die EBs-Bildung schließt sich die gerichtete Differenzierung der Zellen in den gewünschten Zielzelltyp an. Dies geschieht meist durch die Zugabe bestimmter Mediumadditiva sowie das Aufspalten der EBs in Einzelzellen und anschließende Ausplattieren in Zellkulturschalen. Auch hier sind verschiedene Kultursysteme zur gerichteten Differenzierung von Stammzellen beschrieben. So bevorzugen einige Forschergruppen die dreidimensionale Differenzierung der Zellen, bei der die Zellaggregate über den gesamten Differenzierungszeitraum in Suspension verbleiben, gegenüber der üblichen Einzelschicht-(2D)-Differenzierung [58–60]. Die Forscher beschrieben, dass durch die Differenzierung der Zellen in einem dreidimensionalen Gefüge die Zell-Zell-Interaktionen mehr den *in vivo* Prozessen im differenzierenden Embryo nachempfunden sind als die Differenzierung im 2D-Kultursystem. Hwang und Mitarbeiter beschrieben eine verstärkte chondrogene Differenzierung von murinen ES-Zellaggregaten eingekapselt in PEG-Hydrogelkapseln gegenüber in Zellkulturschalen

ausplattierten EBs [59]. Gleiches wurde für die Differenzierung humaner ES-Zellen in Hepatozyten durch die Einkapselung in Collagen erreicht [58]. Als Nachteil dieser Methode wird die natürliche Barrierefunktion des dreidimensionalen Gebildes gegenüber löslichen Faktoren diskutiert, so können schon kleinste Faktoren nicht bis zum Inneren des 3D-Konstruktes gelangen und somit zu ungleichmäßiger Differenzierung innerhalb der einzelnen Aggregate führen [57]. Zusätzlich bietet die 3D-Differenzierung in einzeln verkapselten Aggregaten kaum Vorteile gegenüber der 2D-Kultivierung hinsichtlich des Arbeitsaufwandes und der Automatisierung der Differenzierung, was gerade bei der Bereitstellung von großen Zellmaterialmengen zur Entwicklung von Transplantationsstrategien unablässig ist. Systeme, wie Rotations- und Suspensionsbioreaktoren vereinen dagegen die Vorteile der 3D-Differenzierung mit der eines dynamischen, skalierbaren Systems. Durch die vorherrschende Flüssigkeitsströmung wird ein besserer Nährstofftransport in das Aggregat hinein, sowie der Abtransport von Stoffwechselendprodukten aus dem Aggregat heraus gewährleistet [57]. Durch die Skalierbarkeit der Kulturgefäße bis zu mehreren Litern und die Automatisierbarkeit des Versuchsablaufes durch Computergestützte Systeme wird eine Bereitstellung großer Mengen differenzierter Zellen garantiert. Die erfolgreiche kardiale Differenzierung muriner ES-Zellen in einem vollautomatisierten Suspensionsbioreaktor wurde von Schröder und Mitarbeiter beschrieben [56].

1.5 Knochen und Knochenaufbau

Knochengewebe besteht aus einem organischen Netzwerk und einem anorganischen Teil, bestehend aus Hydroxylapatit. Dieses setzt sich hauptsächlich aus Kalzium und Phosphaten zusammen und macht ca. 60% des Knochengewichts aus. Die organische Knochenmatrix wird zu 95% von Kollagen Typ I gebildet, den Rest machen Proteoglykane und Glykoproteine (Osteocalcin, Bone Sialoprotein, Osteopontin) aus. Der Prozess der Knochenbildung, auch als Osteogenese bezeichnet umfasst drei Schritte: die Produktion extrazellulärer organischer Matrix (Osteoid), die Mineralisierung dieser Matrix und der

Umbau des Knochens durch Resorption und Reformation. Die an diesen Prozessen beteiligten Zellen sind Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten. Osteoblasten sezernieren den kollagenösen Vorläufer der Knochenmatrix und regulieren deren Mineralisierung. Mit zunehmender Knochenbildung erhöht sich der Anteil an mineralisierter Matrix. Nur noch vereinzelt kleiden reife Osteoblasten, nun Osteozyten genannt, die kleinen Freiräume in der Matrix, die Lakunen, aus. Den Osteozyten bleibt im Vergleich zu Osteoblasten nur eine geringe Syntheseleistung und metabolische Aktivität. Die Osteozyten stehen über Ausläufer, welche sich durch den mineralisierten Knochen ziehen, miteinander in Verbindung. Sie fungieren im Knochen als Kalzium-Sensoren [61] und regulieren die Knochenreifung und Mineralisierung [62]. Desweiteren wird ihnen eine sensorische Rolle in der Reaktion der Knochenzellen auf mechanische Stimuli zugeschrieben, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen die den externen physikalischen Stimulus in ein intrazelluläres biochemisches Signal übersetzen noch weitgehend unbekannt sind [63]. Eine zentrale Rolle könnte dem Zytoskelett zukommen, welches über Integrine den Extrazellularraum mit intrazellulären Strukturen wie Phospholipasen und Proteinkinasen verbindet und so eine mögliche Übertragung der externen Signale ins Innere der Zelle und schließlich eine Reaktion der Zelle auf den physikalischen Stimulus zur Folge haben könnte [63].

Osteoklasten stammen nicht wie Osteoblasten von mesenchymalen Vorläuferzellen ab, sondern von hämatopoietischen Vorläufern. Die Hauptfunktion der Osteoklasten liegt in der Knochenresorption. Gesunder Knochen unterliegt einem ständigen Gleichgewicht zwischen Knochen Auf- und Abbau, realisiert durch die Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten. Knochen kann auf zwei unterschiedliche Arten gebildet werden, zum einen durch die Bildung eines Knorpelgerüsts, welches später durch Knochen ersetzt wird (chondrale Ossifikation) und zum anderen durch die direkte Bildung eines Knochengüsts durch Osteoblasten (desmale Ossifikation) wie z.B. beim Schädelknochen und Schlüsselbein. Die meisten Knochen entstehen durch chondrale Ossifikation. Für die Regulation der Knochenentwicklung sind neben den Zellen auch Hormone verantwortlich, z.B. Vitamin D₃ das für die Resorption von Kalzium benötigt wird. Innerhalb der

Knochenstruktur wirken Calcitonin und das Parathormon auf den Kalzium- und Phosphathaushalt. Die Vitamine A, B12 und Ascorbinsäure beeinflussen die Osteoblasten- und Osteoklastentätigkeit.

1.6 Osteogene Differenzierung embryonaler Stammzellen

Die statische *in vitro* Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen zu reifen knochenbildenden Osteoblasten ist bereits beschrieben [28, 29, 64]. Die osteogene Differenzierung kann dabei grob in 3 Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Abschnitt differenzieren die embryonalen Stammzellen zu mesenchymalen Zellen. Dieser Differenzierungsschritt geschieht spontan und wird eingeleitet durch den Entzug von Pluripotenz-erhaltenden Faktoren (MEF bzw. LIF). In einem zweiten Abschnitt kommt es zur Ablagerung von extrazellulärer Matrix, hauptsächlich bestehend aus Collagen I, durch reifende Osteoblasten. In einem dritten Abschnitt, in dem auch ein Teil der Osteoblasten weiter zu Osteozyten reift, erfolgt die Mineralisierung der Matrix, dabei wird hauptsächlich Kalzium in die extrazelluläre Matrix eingelagert.

Trotz der immer gleichen Abfolge der Differenzierung sind die Übergänge zwischen den einzelnen Abschnitten fließend. Daneben verläuft die Differenzierung der einzelnen Zellen nicht exakt synchron, so dass über den gesamten Differenzierungszeitraum eine Mischpopulation an unterschiedlichen Reifegraden der Osteoblasten vorhanden ist. Um einen synchroneren Ablauf der Differenzierung zu erreichen und die spontane Bildung von Mesoderm in den ersten 5 Tagen der Differenzierung voranzutreiben erfolgt der erste Abschnitt der Differenzierung zumeist in Form von EBs. Dabei hat sich das Protokoll der hängenden Tropfen für die EB-Bildung muriner embryonaler Stammzellen etabliert, da es zur Bildung uniformer und somit zeitlich synchron differenzierender Zellaggregate führt. Am Tag 5 der *in vitro* Differenzierung, etwa zum Zeitpunkt des gebildeten Mesoderms, werden die EBs enzymatisch in Einzelzellen zerlegt und auf Zellkulturplatten ausgesät.

Die Differenzierung der ES-Zellen wird nun durch die Zugabe von osteogenen Substanzen in Richtung Osteoblasten vorangetrieben. Als spezifische Medienadditiva wurden dabei Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat beschrieben [28]. Andere Studien beschreiben die Differenzierung durch den Einsatz der aktiven Form des Vitamin D₃ (1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D₃) anstelle von Dexamethason [29].

Die späten Phasen der murinen osteogenen Differenzierung sind neben der Ablagerung und Mineralisierung der Matrix durch zeitlich geordnete Expressionsmuster bestimmter Gene gekennzeichnet. So gilt Cbfa1, ein Transkriptionsfaktor der RunX-Transkriptionsfaktor-Familie und auch bekannt als Runx2, als frühester molekularer Marker reifender Osteoblasten, da seine Expression auf mesenchymale Zellen beschränkt ist, welche zu Osteoblasten oder Chondrozyten reifen [65]. Im Laufe der osteogenen Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen kommt es zum Anstieg der Cbfa1 Expression, mit einer Peak-Expression um den Differenzierungstag 25-30 [29]. Cbfa1 ist als Transkriptionsfaktor verantwortlich für die Expression weiterer Osteoblasten-spezifischer Gene, so z.B. alkalischer Phosphatase (ALP), Kollagen und Osteopontin, sowie der späten osteogenen Markergene Osteocalcin und Bone Sialoprotein [65, 66].

Ein Hauptregulator der Osteogenese ist der Wnt/ β -Catenin Signalweg [67–69]. Speziell während der osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen scheint β -Catenin als Komponente eines Transkriptionsfaktors spezifische Stadien der Differenzierung zu kontrollieren, wohingegen andere Stadien speziell vom Fehlen des β -Catenin im Nukleus abhängig sind [69]. β -Catenin wird unter anderem durch den Wnt-Signalweg reguliert. Wenn kein Wnt-Signal vorhanden ist, wird β -Catenin, gebunden in einem Proteinkomplex mit u.a. Axin, durch die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) phosphoryliert und anschließend proteosomal abgebaut. Wenn der Wnt-Signalweg durch die Bindung eines Wnt-Moleküls an seinen Rezeptor aktiviert wird, kommt es zur Inhibierung von GSK-3 β . Als Folge wird β -Catenin nicht phosphoryliert und somit nicht abgebaut. Es kommt zur Akkumulation des β -Catenins im Zytoplasma und zur Translokation in den Nukleus. Im Nukleus wirkt β -Catenin als ein Co-Aktivator für Transkriptionsfaktoren der *T-cell-factor/Lymphoid-*

Enhancer-factor (TCF/LEF1) Familie und ist somit an der Regulation der Expression von Zielgenen beteiligt [70, 71]. Die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen kann durch die gezielte Manipulation des Wnt/ β -Catenin Signalweges reguliert werden. So zeigen Vorversuche in unserem Labor, dass die Behandlung der Zellen in einer sehr frühen Differenzierungsphase mit Retinolsäure (Tag 0-3), welche eine Inhibierung der nukleären β -Catenin Aktivität zur Folge hat [67], zu einer Erhöhung der Brachyury Expression und folglich der gesamten osteogenen Differenzierung führt. Eine anschließende Behandlung mit LiCl, welche den natürlichen β -Catenin Anstieg im Nukleus zum Zeitpunkt der mesodermalen Entwicklung unterstützt, bewirkt ebenfalls eine Verstärkung der osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen (zur Nieden et al. 2010, in Veröffentlichung). Diese Hypothese wird unterstützt durch Ergebnisse von Anton und Mitarbeitern, welche durch die Behandlung differenzierender muriner ES-Zellen mit LiCl von Tag 0-3 der Differenzierung eine längere Expression von Pluripotenzmarkern und insgesamt eine verzögerte Differenzierung der Zellen beobachten konnten [72]. Somit scheint vor allem die frühe Phase der osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen stark von der zeitlich geordneten nukleären An- bzw. Abwesenheit des β -Catenin abhängig zu sein.

Sottile und Mitarbeiter beschrieben 2003 die erste osteogene Differenzierung humaner ES-Zellen unter Verwendung der osteoinduktiven Agenzien Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat [73]. Die erste osteogene Differenzierung von Javaneraffen-ES-Zellen, wurde unter Verwendung gleicher Mediumadditiva, von Yamashita und Mitarbeitern veröffentlicht [74]. Diese beschrieben jedoch nur eine schwache osteogene Differenzierung unter Verwendung von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat. Eine bessere osteogene Differenzierung wurde mit Hilfe von BMP-2 anstelle von Dexamethason erreicht. Dies zeigt die Schwierigkeit der Übertragbarkeit der osteogenen Differenzierungsprotokolle zwischen den Primatenspezies. Die Grundlage zur Entwicklung von Transplantationsstudien differenzierter Zellen bilden gut etablierte Differenzierungsprotokolle. Bis zum heutigen Tage ist keine weitere Studie veröffentlicht, welche die osteogene Differenzierung von anderen Primaten-ES-Zellen beschreibt. Desweiteren

sind keine Ergebnisse veröffentlicht, welche die Verwendung des, für murine ES-Zellen erfolgreich getesteten [29], $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D₃ anstelle von Dexamethason oder BMP-2 beschreiben.

1.7 Einfluss von Flüssigkeitsscherstress auf Osteoblasten

Wird das Skelett zu wenig beansprucht führt dies zur Verminderung der Knochenmasse [75], eine Überbeanspruchung hingegen kann ein erhöhtes Knochenwachstum verursachen [76]. Zurückzuführen ist dieses Phänomen u.a. auf den durch mechanische Belastung des Skeletts verursachten Flüssigkeitsscherstress innerhalb des Knochens [77, 78]. Dieser Scherstress führt zu intrazellulären biochemischen Veränderungen der Zellen und trägt damit letztendlich zum natürlichen Auf- und Umbau des Knochengewebes bei [78–81]. Die zugrunde liegenden Prozesse, die zur Detektion der mechanischen Stimuli durch die Zellen und deren Übersetzung in biochemische Signale führen, sind noch nicht zusammenhängend aufgeklärt, jedoch gewähren mehrere Studien an primär isolierten murinen und humanen Osteoblasten Einblicke in die Reaktion der Zellen auf künstlich erzeugten Flüssigkeitsscherstress. So führt eine Applikation von Flüssigkeitsscherstress auf isolierte Osteoblasten unter anderem zu einem schnellen Anstieg von intrazellulärem Kalzium [82, 83], welcher verantwortlich ist für die erhöhte Freisetzung von Stickstoffoxid (NO) [81, 84, 85] und Prostaglandinen [63, 81, 84]. Eine vermehrte Freisetzung dieser Signalmoleküle führt letztlich zu einer Scherstress-induzierten Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten [86]. Auch die *in vitro* Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Knochenzellen kann mit künstlich erzeugtem Scherstress positiv beeinflusst werden. So zeigen Knochenmarkszellen, welche unter Flüssigkeitsscherstress zu Osteoblasten differenziert wurden, eine erhöhte Aktivität des Enzyms alkalische Phosphatase (ALP) [87] und eine verstärkte Ablagerung mineralisierter Matrix [79, 88, 89]. Dabei scheint es, dass während des Reifungsprozesses von Präosteoblas-

ten über Osteoblasten bis hin zu Osteozyten deren Sensitivität gegenüber Flüssigkeitscherstress zunimmt [63, 80, 90–92]. Taiani und Mitarbeiter veröffentlichten 2009 Ergebnisse zur osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen in nicht automatisierten Suspensionsbioreaktoren [93]. Sie beschrieben eine geringere osteogene Differenzierung der ES-Zellen unter dynamischen Differenzierungsbedingungen. Es sind bisher keine Studien veröffentlicht welche den Einfluss von Scheerstress auf die osteogene Differenzierung von Primaten-ES-Zellen beschreiben.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es einen Prozessablauf zu etablieren, welcher die osteogene Differenzierung von Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) embryonalen Stammzellen (cES-Zellen) in einem automatisierten Suspensionsbioreaktor (Firma DASGIP) beschreibt.

Die Differenzierung von ES-Zellen in automatisierten Suspensionsbioreaktoren ermöglicht einen Differenzierungsablauf unter immer gleichen Kulturbedingungen. Dabei wird durch den Einsatz eines vollautomatischen Systems die Einflussnahme des Labormitarbeiters minimiert. Dies ermöglicht einen stabilen Labor-zu-Labor-Transfer der Differenzierungsprotokolle und -parameter und ist somit ein erster Schritt zur industriellen Nutzung von embryonalen Stammzellen. Differenzierte ES-Zellen haben ein weitreichendes Anwendungsspektrum. Neben der medizinisch relevanten Nutzung als Spenderzellen für die Zelltherapie, ergibt sich aus der Möglichkeit der *in vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen nach dem *in vivo* Vorbild, die Anwendung als Modellsystem zur Analyse der embryotoxischen Wirkung von pharmazeutischen Wirkstoffen. Auch die Auswirkungen spezifischer Wirkstoffe auf die ausdifferenzierte Zielzelle können durch ES-Zellen *in vitro* vorhergesagt werden. Dies führt auf längere Sicht zur Einsparung von Tierversuchen. Die Automatisierung der Differenzierung bildet dabei eine Grundlage für reproduzierbare Testdaten, da Störfaktoren, wie die Veränderung physikalischer Parameter während der Differenzierung, z.B. Veränderung der Temperatur durch das Öffnen der Brutschranktür, ausgeschlossen sind. In der vorliegenden Arbeit wurden gezielt kleine Suspensionsbioreaktoren, mit einem minimalen Arbeitsvolumen von 45 ml verwendet, um die Differenzierung

von ES-Zellen zur Testung des osteotoxischen Potentials von pharmakologischen Wirkstoffen zu etablieren. Dabei ist neben dem beschriebenen stabilen Differenzierungsablauf ein möglichst kleines Mediumvolumen erwünscht um die Kosten für die einzusetzende Wirkstoffmenge so gering wie möglich zu halten.

Die Entwicklung des osteogenen Differenzierungsprozesses für cES-Zellen in Suspensionsbioreaktoren beinhaltet die Kultivierung der Zellen in statischer Kultur auf Feederzellen, sowie die Etablierung einer Feederzell-freien cES-Zellkultur nach dem Protokoll von Vallier und Mitarbeitern [94]. Die Feederzell-frei kultivierten cES-Zellen sollen nach ca. 30 Passagen auf ihre Stammzeleigenschaften hin untersucht werden um Veränderungen auszuschließen. Das für die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer Kultur beschriebene Differenzierungsprotokoll [29], welches die Verwendung von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃ zur gerichteten Differenzierung vorsieht, soll auf die cES-Zellen übertragen und gegebenenfalls angepasst werden. Die erfolgreiche osteogene Differenzierung von cES-Zellen in statischer Kultur soll durch die quantitative Analyse des in die gebildete Knochenmatrix eingelagerten Kalziums gezeigt werden. Die Färbung der kalzifizierten Matrix mit Alizarin soll einen Eindruck über die Gleichmäßigkeit und Intensität der Differenzierung innerhalb der Kultur vermitteln. Die Expression spezifischer osteogener Markergene im Laufe der Differenzierung soll nachgewiesen werden. Zur Etablierung des Differenzierungsablaufes in Suspensionsbioreaktoren der Firma DASGIP sollen zunächst murine ES-Zellen zur Charakterisierung des Systems herangezogen werden. Dabei gilt es optimale Rührparameter (Geschwindigkeit, Art des Rührers) zur Kultivierung embryonaler Stammzellen zu ermitteln. Gegebenenfalls soll das Reaktorsystem in Zusammenarbeit mit der Firma DASGIP angepasst werden. Die *embryoid body* (EB)-Entwicklung und spontane Differenzierung unter den verschiedenen Rührbedingungen soll hinsichtlich Größenentwicklung und Expressionsmuster spezifischer Pluripotenz- und Differenzierungsmarker am Tag 5 der Differenzierung näher untersucht werden. Es schließt sich die Übertragung der osteogenen Differenzierungsprotokolle auf die Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor an. Dabei soll die Auswirkung des

„Rührens“ und des damit verbundenen Scheerstresses auf die osteogene Differenzierung untersucht und der statischen Differenzierung gegenübergestellt werden. Der Differenzierungserfolg soll auch hier in erster Linie durch die quantitative Analyse des eingelagerten Kalziums ermittelt werden. Die Färbung der kalzifizierten Matrix mittels Alizarin soll über die Gleichmäßigkeit der osteogenen Differenzierung innerhalb der Aggregate Aufschluss geben. Die EB-Entwicklung von cES-Zellen in den Suspensionsbioreaktoren soll, wie für murine ES-Zellen, unter den verschiedenen Rührgeschwindigkeiten untersucht werden. Das für die statische osteogene Differenzierung entwickelte Differenzierungsprotokoll soll anschließend auf die Differenzierung von cES-Zellen in Suspensionsbioreaktoren übertragen werden. Der Differenzierungserfolg wird anhand der Analyse der eingelagerten Kalziummenge überprüft und mit dem Differenzierungserfolg muriner ES-Zellen in den Suspensionsbioreaktoren, sowie statischer Differenzierung von cES-Zellen verglichen. Bewusst wurde in der vorliegenden Arbeit das Weißbüschelaffen-ES-Zell-Modell zur Entwicklung der osteogenen Differenzierung in automatisierten Suspensionsbioreaktoren gewählt, da die Vorhersagbarkeit der embryotoxischen Wirkung von Wirkstoffen auf den Menschen durch die Verwendung einer Primaten-ES-Zelllinie wesentlich höher liegt als bei der Verwendung muriner embryonaler Stammzellen. Dies liegt begründet in der engen genetischen Verwandtschaft von Affe und Mensch. Die Nutzung humaner embryonaler Stammzellen wäre wünschenswert, ist aber durch das Embryonenschutzgesetz und das Stammzellgesetz, trotz Änderung der Stichtagsregel zur Verwendung humaner ES-Zellen von 2007, in Deutschland stark eingeschränkt. Die kommerzielle Nutzung humaner ES-Zellen ist in Deutschland sogar komplett verboten, was gerade für die industrielle Anwendung des beschriebenen Prozesses hinderlich ist.

3 Material und Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung muriner ES-Zellen

Murine embryonale Stammzellen der Linie D3 wurden von *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen. Die Expansion der Zellen erfolgte in speziellen Zellkulturflaschen (*BD Primaria™* Zellkulturflaschen, 75 cm², BD Falcon). Die Kulturoberfläche dieser speziellen Zellkulturflaschen ist durch Amin- und Amidgruppen positiv geladen, dies ermöglicht eine optimale Adhärenz der Zellen ohne zusätzliche Beschichtung. Zur Erhaltung der Pluripotenz der murinen ES-Zellen wurde dem Expansionsmedium (Zusammensetzung siehe 3.3) *Leukemia inhibitory factor* (LIF) zugesetzt. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 2-3 Tage, dazu wurden ca. 5 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung in eine 75 cm² Zellkulturflasche gegeben. Nach einer ca. 5 minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde die enzymatische Dissoziation durch Zugabe von ca. 10 ml Expansionsmedium gestoppt, gefolgt von einer mechanischen Vereinzelung der Zellen durch Auf- und Abpipettieren und einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 800 rpm (*Heraeus Multifuge 3SR*, Thermo). Das Zellpellet wurde in frischem Expansionsmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels eines Zellzählgerätes (*CASY® Cell Counter*, Schärfe System) bestimmt und 8×10^5 Zellen in eine neue Zellkulturflasche in Expansionsmedium supplementiert mit LIF ausgesät.

3.1.2 Kultivierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen

Callithrix jacchus embryonale Stammzellen (cES-Zellen) der Linie Cjes001 wurden von Frau Dr. Erika Sasaki (*Central Institut for Experimental Animals*, Japan) zur Verfügung gestellt. Zur Erhaltung der Pluripotenz wurden cES-Zellen auf Feederzellen kultiviert. Zusätzlich wurde eine Feeder-freie Kultivierung von cES-Zellen, basierend auf der von Vallier und Mitarbeitern beschriebenen Feeder-freien Kultivierung von humanen Stammzellen, etabliert [94].

3.1.2.1 Kultivierung auf Feederzellen

Gewinnung, Lagerung und Aussaat von Feederzellen

Callithrix jacchus ES-Zellen wurden zur Erhaltung ihrer pluripotenten Eigenschaften auf Feederzellen kultiviert. Als Feederzellen dienten mitotisch inaktivierte murine embryonale Fibroblasten. Embryonale Fibroblasten wurden aus Embryonen (13,5 Tage *post coitum*) des CD1-Mausstammes isoliert. Dazu wurde der Bauchraum des trächtigen Tieres geöffnet, die Uterushörner herausgetrennt und in eine mit PBS gefüllte Schale überführt. Anschließend wurden die Embryonen aus den Uterushörnern präpariert. Assoziierte Gewebe, wie Plazenta, Gliedmaßen und Kopf wurden weitestgehend mit einem Skalpell entfernt. Nach Überführung in eine neue mit PBS gefüllte Schale wurde das verbliebene Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend durch die Inkubation in 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C für ca. 10 min dissoziiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt, die enzymatische Reaktion mit Feederzellmedium (Zusammensetzung siehe 3.3) abgestoppt und die Zellsuspension für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in frischem Feederzellmedium resuspendiert und Zellen von ca. 3 Embryonen in eine 75 cm² Zellkulturflasche in 20 ml Feederzellmedium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel um in der Suspension befindliche Erythrozyten zu entfernen. Die Feederzellen wurden insgesamt 3 Passagen kultiviert und anschließend

durch eine 4 stündige Zugabe von 10 µg/ml Mitomycin C zum Medium in ihrer Proliferation gestoppt. Schließlich wurden Aliquots (4×10^6 Zellen) in Serum mit 10 % DMSO bei -80°C bis zur Verwendung als Feederzellen eingefroren. Mindestens 24 Stunden vor dem geplanten *Callithrix jacchus* ES-Zellsplit wurde ein Aliquot Feederzellen schnell bei 37°C aufgetaut, in ca. 10 ml Serum-haltigem Medium aufgenommen und bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Resuspendierung in Feederzellmedium wurden die Zellen in eine mit 0,1 %iger Gelatine beschichteten 75 cm^2 Zellkulturflasche ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Passagieren von *Callithrix jacchus* ES-Zellen auf Feederzellen

Callithrix jacchus ES-Zellen (cES-Zellen) wurden alle drei bis vier Tage in einem Verhältnis von 1:2 oder 1:3 gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, ca. 5 ml Trypsinersatz (*TrypLETM Express*, Invitrogen) zu einer 75 cm^2 Zellkulturflasche gegeben und für 5-10 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit lösten sich die cES-Zellkolonien von der Feederzellschicht. Die Kolonien wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in Zellkluster von ca. 10-20 Zellen zerlegt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit ca. 15 ml Serum-haltigem Medium (Zusammensetzung siehe 3.3) versetzt und für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in frischem cES-Zellmedium (Zusammensetzung siehe 3.3) aufgenommen und in eine neue 75 cm^2 Zellkulturflasche mit einer neuen Feederzellschicht ausgesät und bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert.

3.1.2.2 Feederzell-freie Kultivierung

Die Kultivierung der cES-Zellen ohne Feederzellen erfolgte nach dem durch Vallier und Mitarbeiter beschriebenen Protokoll [94]. Dazu wurde das cES-Zellmedium auf cES-feederfrei-Medium umgestellt (Zusammensetzung siehe 3.3). Mindestens 24 h vor der geplanten Passagierung der cES-Zellen wurden je 15 ml fetales Kälberserum (FKS)-Beschichtungsmedium (Zusammensetzung siehe 3.3) in 175 cm^2 Zellkulturflaschen ge-

geben und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die so mit Serum beschichteten Flaschen wurden kurz vor dem cES-Zellsplit mit PBS gewaschen. Die Feederzell-freien cES-Zellen wurden alle drei bis vier Tage in einem Verhältnis von 1:2 oder 1:3 gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, ca. 10 ml *TrypLE™ Express* zu einer 175 cm² Zellkulturflasche gegeben und für 5-10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Kolonien wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in Zellkluster von ca. 10-20 Zellen zerlegt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit ca. 20 ml Serum-haltigem Medium versetzt und für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in frischem cES-feederfrei-Medium aufgenommen und in eine mit FKS-beschichtete 175 cm² Zellkulturflasche ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.1.3 Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen

Die Initiierung der osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen erfolgte über das Protokoll der hängenden Tropfen von Heuer und Mitarbeitern [95] bzw. durch die EB-Formierung auf einem Rotationsschüttler [96]. Dafür wurden murine ES-Zellen durch Zugabe von ca. 5 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung in eine 75 cm² Zellkulturflasche dissoziiert. Nach einer ca. 5 minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde die enzymatische Aktivität durch Zugabe von ca. 10 ml Expansionsmedium gestoppt, gefolgt von einer mechanischen Vereinzelnung der Zellen durch Auf- und Abpipettieren und einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 800 rpm. Das Zellpellet wurde in frischem Kontrolldifferenzierungsmedium (Zusammensetzung siehe 3.3) resuspendiert und die Zellzahl mittels eines Zellzählgerätes (*CASY® Cell Counter*, Schärfe System) bestimmt. Die Zelldichte wurde mit Kontrolldifferenzierungsmedium auf 3,75x10⁴ Zellen pro Milliliter eingestellt. Zur Kultivierung auf dem Rotationsschüttler wurden je 2 ml der Zellsuspension pro Kavität einer 6 Kavitäten Suspensionsplatte pipettiert und auf dem Rotationsschüttler für 5 Tage bei 70 rpm geschüttelt. Am Tag 5 der Differenzierung wurde zur weiteren Differenzierung auf dem Rotationsschüttler das Medium auf osteogenes Differenzierungsmedium

(Zusammensetzung siehe 3.3) bzw. Kontrolldifferenzierungsmedium gewechselt. Der Medienwechsel erfolgte aller 3-5 Tage durch Zentrierung der EBs im Zentrum der Kavitäten und Überführen in neues Medium.

Zur Differenzierung der murinen ES-Zellen nach dem Protokoll der hängenden Tropfen wurden eine Zellsuspension von $3,75 \times 10^4$ Zellen, wie oben beschrieben hergestellt. Anschließend erfolgte das Auftropfen von 20 μ l großen Tropfen der Zellsuspension auf die Innenseite des Deckels einer 100 mm bakteriologischen Schale. Der Deckel samt Tropfen wurde vorsichtig auf eine mit 10 ml PBS gefüllte Petrischale gesetzt und die hängenden Tropfen so für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am tiefsten Punkt der Tropfen kommt es aufgrund der wirkenden Schwerkraft zur Ausbildung von dreidimensionalen Zellaggregaten, den sogenannten Embryonalkörperchen (engl. *embryoid bodies* oder EBs). Am dritten Tag der Differenzierung wurden die EBs von den Deckeln heruntergewaschen und die EBs zweier Schalen in eine mit 10 ml Kontrolldifferenzierungsmedium befüllte bakteriologische Schale überführt. Die Zellen wurden für weitere 48 Stunden bis Tag 5 bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Differenzierungstag 5 wurden die EBs durch gleichmäßiges Schwenken der bakteriologischen Schale im Zentrum gesammelt, mit einer Pipette aufgenommen und in eine Petrischale mit ca. 5 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung überführt. Nach ca. 5-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und die Trypsinaktivität durch die Zugabe von ca. 10 ml Serum-haltigem Medium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert, in Kontrolldifferenzierungsmedium bzw. osteogenem Differenzierungsmedium (Zusammensetzung siehe 3.3) resuspendiert und die Zellzahl mittels eines Zellzählgerätes (*CASY[®] Cell Counter*, Schärfe System) bestimmt. Für die osteogene Differenzierung wurden 50000 Zellen pro cm² auf mit 0,1%iger Gelatine beschichteten 24 Kavitäten Zellkulturplatten ausgesät. Der Medienwechsel erfolgte ab dem 10. Differenzierungstag alle zwei Tage bis Differenzierungsende (Tag 30). Zum Vergleich der osteogenen Differenzierungskapazität muriner ES-Zellen nach unterschiedlicher EB-Formierung (auf dem Rotationsschüttler oder durch das Protokoll der hängen-

den Tropfen), wurden die EBs welche für 5 Tage auf dem Rotationschüttler generiert wurden, wie für EBs aus hängender Tropfen Kultur beschrieben, enzymatisch in Einzelzellen zerlegt und auf mit 0,1 %iger Gelatine beschichteten 24 Kavitäten Zellkulturplatten ausgesät und bis Tag 30 differenziert.

3.1.4 Osteogene Differenzierung von *Callithrix jacchus*

ES-Zellen

Die Initiierung der Differenzierung von cES-Zellen erfolgte sowohl durch die Kultivierung von Zellklustern in bakteriologischen Schalen (EB-Formierung) als auch über die direkte Zugabe der Differenzierungsmedien zur Expansionskultur (ohne EB-Bildung).

Zur EB-Bildung in bakteriologischen Schalen wurden die cES-Zellkolonien durch die Zugabe von ca. 10 ml *TrypLE™ Express* zu einer 175 cm² Zellkulturflasche und anschließender Inkubation für 5-10 Minuten bei 37 °C abgelöst. Die Kolonien wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in Zellkluster von ca. 10-20 Zellen zerlegt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit ca. 20 ml Serum-haltigem Medium versetzt und für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden ca. 100 Zellkluster in 10 ml Kontrolldifferenzierungsmedium (Zusammensetzung siehe 3.3) aufgenommen und in einer 100 mm bakteriologischen Schale für 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. In dieser Zeit bildeten sich aus den Zellklustern kleine EBs. Am Tag 5 der Differenzierung wurden die EBs auf mit 0,1 %iger Gelatine beschichteten 24 Kavitäten Zellkulturplatten in einer Dichte von ca. 10 EBs pro cm² ausgesät. Die Differenzierung erfolgte ab Tag 5 in osteogenem Differenzierungsmedium (Zusammensetzung siehe 3.3) bzw. in Kontrolldifferenzierungsmedium. Das Medium wurde aller 3-5 Tage bis zum Ende der Differenzierung (Tag 30) gewechselt.

Die Differenzierung der cES-Zellen ohne EB-Bildung erfolgte über die direkte Zugabe von Kontrolldifferenzierungsmedium zur ca. 80 % konfluenten Expansionskultur der cES-Zellen. Nach 5 tägiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium auf osteogenes Medium gewechselt, bzw. für Kontrolldifferenzierungsansätze in Kontrolldif-

ferenzierungsmedium belassen. Der Medienwechsel erfolgte auch hier alle 3-5 Tage bis zum Ende der Differenzierung (Tag 30).

3.1.5 Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor

Vorbereitung der Suspensionsbioreaktoren

Mini-Suspensionsbioreaktoren der Firma DASGIP, mit einem Arbeitsvolumen von 45-100 ml wurden vor der Inokulation der ES-Zellen mit *Sigmacote*[®] (Sigma) beschichtet. *Sigmacote*[®] enthält halogenisierte Silikone, die mit den Silanolgruppen des Glases reagieren und eine neutrale, hydrophobe Glasoberfläche schaffen. Somit wird eine Adhärenz der Zellen an dem Glas verhindert. Zur Beschichtung wurden die trockenen Bioreaktoren, welche zuvor für 20 min bei 121 °C autoklaviert wurden, mit ca. 60 ml *Sigmacote*[®]-Lösung befüllt. Sofort nach der Zugabe der Lösung war die Glasoberfläche versiegelt und die Lösung konnte abgenommen werden. Nach 5 minütiger Trocknungszeit wurden die Suspensionsbioreaktoren 2 mal mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend mit 40 ml Kontrolldifferenzierungsmedium befüllt. Die Sauerstoff- und pH-Sonden wurden in die Mini-Suspensionsbioreaktoren eingebaut. Der pH-Sonden-Einbau erfolgte nach Kalibrierung der Sonden über eine Zweipunktkalibration mittels einer pH 4-Lösung und einer pH 7-Lösung und der Sterilisierung der Sonden mit Ethanol. Die Sauerstoffsonden wurden bereits mit den Suspensionsbioreaktoren autoklaviert und nur zur Beschichtung aus diesen entfernt. Die Kalibrierung der Sauerstoffsonden erfolgte nach dem Anschluss der Suspensionsbioreaktoren, an die Computer-gestützte Kontroll- und Regelungseinheit der Firma DASGIP, mittels Zweipunktkalibration bei einem Sauerstoffgehalt von 100 % DO (entspricht 21 % Luftsauerstoff) und 0 % DO.

Die Kontroll- und Regelungseinheit besteht aus 8 parallelen Einheiten, je einer Magnetrührerplatte und einer Heizmanschette, sowie Einheiten zur Steuerung des Gasgemisches, der Temperatur, des pH-Wertes und der Rührgeschwindigkeit. Jeder Einheit können dabei eigene Parameter unabhängig zu den anderen Einheiten zugewiesen werden. Sämt-

liche Einstellungen wurden per Computer überwacht und gegebenenfalls nachreguliert. Der Aufbau der 8 Einheiten ist in Abbildung 3.1 gezeigt.



Abbildung 3.1: Aufbau der 8 parallelen Mini-Suspensionsbioreaktor Einheiten.

Inokulation der ES-Zellen und osteogene Differenzierung

Zur Inokulation der Bioreaktoren mit murinen ES-Zellen wurden die Kolonien mit 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst und die Zellen vereinzelt. Nach ca. 5 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von ca. 10 ml Expansionsmedium gestoppt, gefolgt von einer mechanischen Vereinzelung der Zellen durch Auf- und Abpipettieren und einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 800 rpm. Das Zellpellet wurde in frischem Kontrolldifferenzierungsmedium resuspendiert und die Zellzahl mittels eines Zellzählgerätes (*CASY[®] Cell Counter*, Schärfe System) bestimmt. Die Zelldichte wurde mit Kontrolldifferenzierungsmedium auf $3,375 \times 10^5$ Zel-

len pro Milliliter eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 5 ml zu den bereits in den Suspensionsbioreaktoren befindlichen 40 ml Kontrolldifferenzierungsmedium gegeben. Die letztendliche Zellkonzentration in den Suspensionsbioreaktoren betrug somit $3,75 \times 10^4$ Zellen pro Milliliter. Zur Inokulation der Zellen wurden die Suspensionsbioreaktoren vom System abgekoppelt und unter einer Sterilbank geöffnet. Nach Zugabe der Zellsuspension wurden die Suspensionsbioreaktoren wieder an das System angekoppelt und mit der Computer-gestützten Regelung begonnen. Die Parameter wurden dabei bei allen Versuchsansätzen auf 37 °C, 21 % Sauerstoff und 5 % CO₂ festgelegt. Die Gasflussrate betrug 1 sL/h. Der pH-Wert wurde kontrolliert, jedoch nicht reguliert. Die Rührgeschwindigkeit lag je nach Versuchsansatz zwischen 90 und 150 rpm. Nach 5 tägiger Laufzeit wurde das Medium für die osteogenen Differenzierungsansätze auf osteogenes Differenzierungsmedium gewechselt. Dazu wurde die Regelung unterbrochen, die Bioreaktoren vom System abgekoppelt, unter einer Sterilbank geöffnet und das Medium mit den darin befindlichen EBs in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Nach einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei 800 rpm wurden die EBs in 45 ml frischem osteogenen Differenzierungsmedium bzw. Kontrolldifferenzierungsmedium aufgenommen und in die Suspensionsbioreaktoren zurückgegeben. Anschließend wurden die Suspensionsbioreaktoren wieder an das System angekoppelt und die Regelung fortgesetzt. Weitere Medienwechsel erfolgten aller 2-3 Tage bis zum Differenzierungsende (Tag 30).

Zusammen mit Ingenieuren der Firma DASGIP wurden in einem Projekt ein automatisierter Medienwechsel entwickelt welcher einen programmierten Teil-Medienwechsel der Bioreaktoren durch das System erlaubte. In späteren Versuchen wurde das Medium ausschließlich durch das System gewechselt. Dazu wurden zusätzliche Pumpeinheiten installiert. Die Medienabsaugung- und zugabe erfolgte über Silikonschläuche mit einer Flussrate von 40 ml pro Stunde. Dazu wurde die Rührung und Temperierung des Systems automatisch abgestellt. Nach einer 2 minütigen Wartezeit, in welcher es zur Sedimentation der EBs kam, wurden 20 ml des Mediums abgesaugt und aus einem Medienreservoir 20 ml frisches Medium zugegeben. Anschließend wurde die Rührung und Temperierung

wieder zugeschaltet und mit der Regelung fortgefahren. Der automatische Medienwechsel erfolgte alle 2 Tage bis zum Ende der Differenzierung (Tag 30).

Reinigen und Autoklavieren der Suspensionsbioreaktoren

Nach Beendigung eines Versuchsablaufs wurden die Medienschläuche, Sonden und Reaktoren mit Ethanol gereinigt. Zur Entfernung der *Sigmacote*[®]-Beschichtung wurden die Suspensionsbioreaktoren mit 70 ml 10 %iger NaOH-Lösung befüllt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die NaOH-Lösung entfernt und die Reaktoren mit Wasser gespült. Die gereinigten Sauerstoffsonden wurden in die Bioreaktoren eingebaut. In die Suspensionsbioreaktoren wurde 2 ml Wasser gegeben um für die Sauerstoffsonde während des Autoklavierens eine Wasserdampf-atmosphäre zu erzeugen. Die Reaktoren wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3.1.6 Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen im Bioreaktor

Die Vorbereitung der Suspensionsbioreaktoren sowie die Reinigung nach einem Versuchsablauf erfolgten wie im Abschnitt 3.1.5 beschrieben. Die Inokulation der Suspensionsbioreaktoren erfolgte mit cES-Zellklustern. Dafür wurden die cES-Zellkolonien mittels *TrypLE*[™] *Express* vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Kolonien in 10-20 Zellen große Kluster zerlegt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml-Röhrchen überführt und durch die Zugabe von ca. 20 ml Serum-haltigem Medium die Enzymreaktion gestoppt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 800 rpm. Das Zellpellet wurde in Kontrolldifferenzierungsmedium aufgenommen und ca. 1000 Zellkluster in 45 ml Medium pro Suspensionsbioreaktor inokuliert. Anschließend wurden die Suspensionsbioreaktoren an das System angeschlossen und mit der Regelung begonnen. Die Parameter wurden auch hier, wie für murine ES-Zellen auf 37 °C, 21 % Sauerstoff und 5 % CO₂ festgelegt. Die Gasflussrate betrug

1 sL/h. Der pH-Wert wurde kontrolliert, aber nicht reguliert. Die Rührgeschwindigkeit lag je nach Versuchsansatz zwischen 90 und 150 rpm. Nach 5 tägiger Laufzeit wurde das Medium auf osteogenes Differenzierungsmedium bzw. Kontrollmedium gewechselt. Dazu wurde die Regelung unterbrochen, die Bioreaktoren vom System abgekoppelt, unter einer Sterilbank geöffnet und das Medium mit den darin befindlichen EBs in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Nach einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei 800 rpm wurden die EBs in 45 ml frischem osteogenen Differenzierungsmedium bzw. Kontrollmedium aufgenommen und in die Suspensionsbioreaktoren zurückgegeben. Anschließend wurden die Suspensionsbioreaktoren wieder an das System angekoppelt und die Regelung fortgesetzt. Weitere Medienwechsel erfolgten alle 5 Tage bis zum Differenzierungsende (Tag 30).

Auch für die Differenzierung von cES-Zellen wurde später das automatische Medienwechselsystem genutzt. Jedoch konnte hier nicht, wie für murine ES-Zellen, Medium abgesaugt werden, da die cES-Zell-EBs nicht wie die murinen EBs innerhalb der Wartezeit zu Boden sanken. Auch eine Verlängerung der Wartezeit führte nicht zur Sedimentation der EBs. Daraufhin wurde auf einen echten Medienwechsel der cES-Zelldifferenzierung verzichtet und lediglich alle 5 Tage 5 ml frisches Medium aus einem Medienreservoir automatisch zugegeben.

3.2 Analytische Methoden

3.2.1 Immunzytochemische Färbungen

3.2.1.1 Fixierung und Färbung von Zellen in Zellkulturplatten

Zur immunzytochemischen Färbung von Zellen welche in Zellkulturplatten kultiviert wurden, wurde das Medium abgesaugt, die Kultur mit PBS gewaschen und anschließend mit 4%iger Paraformaldehydlösung (PFA) überschichtet und 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die fixierte Kultur 3mal mit PBS gewaschen und bis zur Färbung bei 4 °C in PBS aufbewahrt.

Die zur immunzytochemischen Färbung verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und die verwendeten Verdünnungen sind in Abschnitt 3.4 aufgelistet.

Die Zellen wurden für 15 min bei Raumtemperatur mit 0,1% Triton-X100 in PBS permeabilisiert. Nach einem 3maligen Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit Blockierlösung überschichtet, bestehend aus PBS mit 10% FKS, und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers in Blockierlösung in der entsprechenden Verdünnung. Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach 3maligem waschen mit PBS erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers und des Kernfarbstoffes DAPI (0,2 µg/ml) ebenfalls in Blockierlösung für 1,5 Stunden. Die gefärbten Zellen wurden abschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica (DMI 400B) photographiert.

3.2.1.2 Herstellung von Gefrierschnitten von Zellaggregaten

Zur immunzytochemischen Färbung von Zellaggregaten aus dem Bioreaktor wurden die intakten Aggregate in PBS gewaschen und anschließend in 4%iger PFA-Lösung für 30 min bei 4 °C fixiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift in PBS wurden die Aggregate in 30%iger Saccharoselösung aufgenommen und mindestens über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es wurden 50 µm Kryoschnitte an einem Kryotom (Leica) angefertigt

und auf Super-Frost-Objekträger aufgenommen. Die Objekträger mit den Gefrierschnitten wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Färbung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor der Färbung wurden die Objekträger aufgetaut und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit 4 %iger PFA-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur fixiert.

3.2.2 Alizarin Färbung der mineralisierten Matrix

Alizarin bildet mit zweiwertigen Metallionen rot-orange Chelatverbindungen aus. Dies ermöglicht den spezifischen Nachweis des in der mineralisierten Matrix eingelagerten Kalziums. Zur Färbung der Zellmatrix mittels Alizarin wurden die Zellen und Aggregate wie in den Abschnitten 3.2.1.1 und 3.2.1.2 beschrieben fixiert bzw. geschnitten. Diese wurden anschließend für 5 min mit einer 0,5 %igen Alizarin-Lösung überschichtet. Die Färbelösung wurde durch 3maliges Waschen mit *aqua dest.* entfernt. Es schlossen sich mehrere Waschschritte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) zum Entfernen unspezifischer Färbungen an. Die Lagerung erfolgte bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 100 % Ethanol. Die gefärbten Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica (DMI 400B) bei einer Wellenlänge von 580 nm photographiert.

3.2.3 Quantitative Analyse des Kalziums in der mineralisierten Matrix

Zur Bestimmung der Kalziummenge in der mineralisierten Matrix wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung Proteinlysate der Zellen mittels RIPA-Puffer, bestehend aus 1 % NP40, 0,5 % Na-Deoxychelate und 0,1 % SDS in PBS, genommen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mittels des DC-Protein-Kits (BioRad Laboratories, Kalifornien) nach dem Protokoll des Herstellers bestimmt. Jegliche auf der Zellkulturplatte verbliebene mineralisierte Matrix wurde über Nacht mit 1 M HCl-Lösung lysiert. Die Kalziummengen sowohl im Proteinlysat als auch in den HCl-Lysaten wurden

mittels Zugabe von Arsenazo-III-Lösung (Diagnostic Chemicals Limited, Kanada) bestimmt. Dabei wurden 25 µl des Proteinlysates mit 75 µl Arsenazo-III-Reagenz und 10 µl HCl-Lysat mit 250 µl Arsenazo-III-Reagenz überschichtet. Die Absorptionsänderung wurde bei 650 nm mittels eines Photospektrometers (Infinite 2000, Tecan) bestimmt und die Kalziummenge anhand einer Kalibrierkurve ermittelt. Die Gesamtkalziummenge einer Probe wurde durch die Addition der Kalziummenge des Protein- und des HCl-Lysates und anschließender Normalisierung auf die Proteinmenge ermittelt.

3.2.4 mRNA-Isolation

Zur Analyse der Expression spezifischer Markergene wurden RNA-Lysate der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung genommen. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy-Mini-Kit von Qiagen. Zellen aus Suspensionskultur wurden zunächst zentrifugiert und auf das Zellpellet 500-700 µl Lysepuffer (1 ml RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol) gegeben. Bei der Differenzierung der Zellen in Zellkulturplatten wurde der Lysepuffer direkt auf die Zellen gegeben. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Bis zur Aufreinigung der RNA wurde die Lysate bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen der Proben erfolgte die Fällung der DNA und Proteine mit 70 % Ethanol. Anschließend wurde das Lysat auf eine Zentrifugationssäule mit Silicagelmembran gegeben und für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Dabei erfolgte die Adsorption der RNA an die Membran. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl RW1-Puffer gewaschen und 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit je 500 µl RPE-Puffer und anschließender Zentrifugation für 15 s bei 10000 rpm. Schließlich wurde die RNA, durch die Zugabe von 30-50 µl RNase-freiem Wasser auf die Säule, eluiert. Die Säule wurde dazu für 1 min mit dem RNase-freiem Wasser inkubiert und dann für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Von der aufgereinigten RNA wurde die Konzentration mittels eines Spektralphotometers (*NanoDrop*[®], PeqLab) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Reverse Transkription der mRNA

Die Synthese der cDNA aus mRNA erfolgte durch die reverse Transkriptase. Als Primer für die Reverse Transkriptase wurde ein Random Hexamer Primer verwendet. Der Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese bestand aus 625 ng RNA, 80 Units Superscript II reverse Transkriptase (Invitrogen), 5 μ M Random Hexamer Primer, 50 Units RNase Inhibitor, 10 mM DTT, 5 mM MgCl₂ und 0,5 mM dNTPs in 1X FS Puffer (alles Fermentas). Der Reaktionsansatz wurde mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 μ l aufgefüllt. In einem Thermocycler (*T Professional*, Biometra) wurde der Ansatz für 10 min auf 25 °C temperiert. In dieser Zeit lagerten sich die Primer an die RNA-Stränge an. Anschließend erfolgte ein Elongationsschritt für 50 min bei 42 °C und die Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 70 °C für 15 min. Die cDNA wurde bis zur weiteren Amplifizierung bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Semiquantitative PCR

Die Amplifikation der cDNA erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei wurde durch die Verwendung spezifischer Primer nur ein bestimmter Teil der cDNA vervielfältigt. Die verwendeten Primer sind in Abschnitt 3.5 aufgelistet. Die PCR-Ansätze setzten sich zusammen aus jeweils 25 ng cDNA in 1X PCR-Puffer, 100 μ M dNTPs, 2,5 μ M je Primer und 0,625 Units Taq-Polymerase (alles Fermentas). Die Reaktionsansätze wurden mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 μ l aufgefüllt. Die 3-Schritt-PCR wurde in einem Thermocycler (*T Professional*, Biometra) durchgeführt. Das initiale Aufschmelzen der Einzelstränge der cDNA erfolgte bei 94 °C für 5 min. Es schlossen sich 30-40 Zyklen Denaturierung (94 °C, 45 s), Primer-Anlagerung (60 °C, 45 s) und Elongation (72 °C, 45 s) an. Die durch die PCR amplifizierten Produkte wurden anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgt in einem Agarosegel in dem sie elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgt mittels Ethidiumbromid. Nach Interkalation in die doppelsträngige Nukleinsäure ist Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar. Durch das parallele Auftragen eines Größenstandards auf das Agarosegel kann die Größe des amplifizierten Nukleinsäurestückes überprüft werden. Die Intensität der Nukleinsäure-Bande auf dem Agarosegel gibt Aufschluss über die Expressionsstärke des Gens zum analysierten Zeitpunkt der Differenzierung. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde eine entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris/Base, 50 mM Natriumazetat, 10 μ M EDTA, pH 7,8) suspendiert und in der Mikrowelle erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde, nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C, Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 μ g pro Milliliter hinzugegeben. Das Agarosegel wurde sofort in eine Gelkammer gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach dem Aushärten des Gels wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in die Laufkammer gesetzt. Die Laufkammer wurde mit TAE-Puffer befüllt und die mit 6x Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin, 0,1 % DEPC) versetzten Proben in die Probenaschen gefüllt. Die Nukleinsäuren wurden anschließend bei 100 V aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte im Geldokumentationssystem Gel Logic 1500 (Raytest). Als Größenstandard diente ein definiertes DNA-Gemisch (*50 bp extended DNA ladder*, Sigma).

3.2.8 Karyotypisierung

Die Karyotypanalyse von *Callithrix jacchus* ES-Zellen wurde von der Firma EuroGene (Leipzig, Deutschland) durchgeführt. Die Analyse erfolgte an Zellen welche 40 Passagen Feederzell-frei kultiviert wurden. Insgesamt wurden 72 Metaphasen durch GTG-Bänderung analysiert.

3.2.9 Telomeraseaktivitätsbestimmung mittels qPCR

Zur Bestimmung der Telomeraseaktivität wurden *Callithrix jacchus* ES-Zellen (cES-Zellen), sowohl auf Feederzellen als auch Feederzell-frei, bis zu einer 60-80 %igen Konfluenz kultiviert. Die Kolonien wurden durch eine ca. 10 minütige Inkubation mit *TrypLETM Express* abgelöst. Anschließend wurde die Enzymreaktion mit Serum-haltigem Medium gestoppt und die Zellen für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Um Verunreinigungen der Proben mit Feederzellen zu minimieren, wurde eine Vorinkubation der auf Feederzellen kultivierten cES-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 45 min in Zellkulturschalen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Medienüberstand mit nun fast Feederzell-freien cES-Zellen in ein 50 ml-Röhrchen überführt und für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Ca. 1×10^6 Zellen wurden mit 200 μ l Chaps-Lysepuffer (Millipore) lysiert und für 30 min auf Eis inkubiert. das Lysat wurde anschließend für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mittels des DC-Protein-Kits (BioRad) ermittelt. Die Proben wurden mit DEPC-Wasser auf eine Proteinkonzentration von 25 ng/ μ l eingestellt. Im Anschluss wurde eine quantitative PCR in einem *LightCycler[®] 480* (Roche) durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 2 μ l Proteinlösung (25ng/ μ l) in SYBR-Green qPCR-Mix (Abgene) und den beiden Primern TS (5'-AAT-CCG-TCG-AGC-AGA-GTT-3') und ACX (5'-GCG-CGG-CTA-ACC-CTA-ACC-CTA-ACC-CTA-ACC-3') in einer Konzentration von 0,5 μ M. Der Ansatz wurde für 20 min auf 25 °C temperiert, in dieser Zeit arbeitete die Telomerase. Es schloss sich die quantitative PCR an mit einem Denaturierungsschritt von 5 min bei 95 °C und 40 Amplifikationszyklen bei 95 °C für 30 s, 60 °C für 30 s und 72 °C für 60 s. Für jedes Lysat wurden Hitzeschock-Kontrollen (85 °C für 10 min) mitgeführt. Die cES-Zell-Telomeraseaktivität wurde relativ zur Telomeraseaktivität muriner ES-Zellen bestimmt.

3.2.10 Durchflusszytometrische Analyse der SSEA-4

Expression

Zur Ermittlung des prozentualen Anteils an SSEA-4 positiven cES-Zellen von Tag 0 bis Tag 4 der spontanen Differenzierung (ohne EB-Entwicklung) wurden an den jeweiligen Differenzierungstagen cES-Zellen mit 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst. Nach ca. 5 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von ca. 10 ml Serum-haltigem Medium gestoppt, gefolgt von einer mechanischen Vereinzelung der Zellen durch Auf- und Abpipettieren und einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 800 rpm. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und für 30 min in Blockierlösung (PBS mit 10 % FKS) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des SSEA-4 Antikörpers (siehe 3.4) in einer Verdünnung von 1:100. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Sekundäantikörper (siehe 3.4) in Blockierlösung zugegeben und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Analyse erfolgte mittels eines Durchflusszytometers (*C6 Flow Cytometer*, Accuri). Die Datenauswertung erfolgte mit der Software *FCS Express* (Accuri).

3.2.11 Statistische Analysen

Zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Datengruppen wurde entweder ein Student T-Test oder ein One-way-Annova (Post-Test Bonferroni) durchgeführt. Die statistischen Analysen erfolgten mittels der Software SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.).

3.3 Verwendete Medien

Im Folgenden sind die zur Expansion und Differenzierung von murinen und *Callithrix jacchus* ES-Zellen verwendeten Medien und deren Zusammensetzung aufgelistet.

Expansionsmedium (Maus)

	Konzentration	Firma
DMEM		Invitrogen
FKS	15 %	PAN
NEAA	1 %	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	0,1 mM	Invitrogen
Penicillin	50 Units/ml	Invitrogen
Streptomycin	50 μ g/ml	Invitrogen
LIF	1000 Units/ml (frisch)	Millipore

Kontrolldifferenzierungsmedium (Maus)

	Konzentration	Firma
DMEM		Invitrogen
FKS	15 %	PAN
NEAA	1 %	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	0,1 mM	Invitrogen
Penicillin	50 Units/ml	Invitrogen
Streptomycin	50 μ g/ml	Invitrogen

Osteogenes Differenzierungsmedium (Maus)

	Konzentration	Firma
DMEM		Invitrogen
FKS	15 %	PAN
NEAA	1 %	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	0,1 mM	Invitrogen
Penicillin	50 Units/ml	Invitrogen
Streptomycin	50 μ g/ml	Invitrogen
β -Glycerophosphat	10 mM	VWR
Ascorbinsäure	25 μ g/ml	Sigma
1 α ,25-Dihydroxy-Vit. D ₃	5x10 ⁻⁸ M	Sigma

Feederzellmedium

	Konzentration	Firma
DMEM		Invitrogen
FKS	15 %	PAN
NEAA	1 %	Invitrogen
Penicillin	50 Units/ml	Invitrogen
Streptomycin	50 μ g/ml	Invitrogen

Callithrix jacchus Serum-haltiges Medium

	Konzentration	Firma
DMEM		Invitrogen
FKS	15 %	PAN
NEAA	1 %	Invitrogen
Penicillin	50 Units/ml	Invitrogen
Streptomycin	50 µg/ml	Invitrogen

Callithrix jacchus ES-Zellmedium

	Konzentration	Firma
KNOCKOUT™ DMEM		Invitrogen
KNOCKOUT™ SR	20 %	Invitrogen
NEAA	1 %	Invitrogen
Penicillin	50 Units/ml	Invitrogen
Streptomycin	50 µg/ml	Invitrogen
GlutaMAX	1 mM	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	0,1 mM	Invitrogen
bFGF (human, rekomb.)	4 ng/ml	PeproTECH

FKS-Beschichtungsmedium

	Konzentration	Firma
KNOCKOUT™ DMEM		Invitrogen
FKS	15 %	PAN
GlutaMAX	2 mM	Invitrogen

cES-Feederfrei-Medium

	Konzentration	Firma
IMDM	50 %	Invitrogen
F12	50 %	Invitrogen
BSA (human)	5 mg/ml	Sigma
CD Lipid 100x	1 %	Invitrogen
Monothioglycerol	450 µM	Sigma
Insulin (human)	7 µg/ml	Roche
Transferrin (human)	15 µg/ml	Roche
Activin A	10 ng/ml	R&D
bFGF (human, rekomb.)	12 ng/ml	PeptoTECH
Penicillin	50 Units/ml	Invitrogen
Streptomycin	50 µg/ml	Invitrogen

Kontrolldifferenzierungsmedium (*Callithrix jacchus*)

	Konzentration	Firma
DMEM		Invitrogen
FKS	15 %	Invitrogen
NEAA	1 %	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	0,1 mM	Invitrogen
Penicillin	50 Units/ml	Invitrogen
Streptomycin	50 μ g/ml	Invitrogen

Osteogenes Differenzierungsmedium (*Callithrix jacchus*)

	Konzentration	Firma
DMEM		Invitrogen
FKS	15 %	Invitrogen
NEAA	1 %	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	0,1 mM	Invitrogen
Penicillin	50 Units/ml	Invitrogen
Streptomycin	50 μ g/ml	Invitrogen
β -Glycerophosphat	10 mM	VWR
Ascorbinsäure	25 μ g/ml	Sigma
1 α ,25-Dihydroxy-Vit. D ₃	5x10 ⁻⁸ M	Sigma

3.4 Verwendete Antikörper

Im Folgenden sind die zur immunzytochemischen Charakterisierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellkultur verwendeten Antikörper aufgelistet.

Primärantikörper

	Verdünnung	Firma
rabbit anti Oct3/4, IgG	1:200	Santa Cruz; SC-9081
mouse anti SSEA4, IgG3	1:200	Chemicon; MAB4304
mouse anti SSEA1, IgM	1:200	Chemicon; MAB4301
mouse anti TRA-1-60, IgM	1:50	Chemicon; MAB4360

Sekundärantikörper

	Verdünnung	Firma
donkey anti rabbit IgG-FITC	1:200	Santa Cruz; SC-2090
Alexa Fluor 546 goat anti mouse IgG	1:200	Invitrogen; A11003
Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgM	1:200	Invitrogen; A21042
Cy2 donkey anti mouse IgG	1:500	Jackson Immuno; 715-225-151

3.5 Verwendete Primer

Im Folgenden sind die verwendeten Primer zur Analyse der Expression von Pluripotenzgenen, sowie osteogenen Markergenen von murinen und *Callithrix jacchus* ES-Zellen aufgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Primer3 Software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) von RefSeq mRNA Sequenzen generiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Das Genom von *Callithrix jacchus* ist noch nicht vollständig sequenziert, deshalb wurden die verwendeten Primer von humanen Sequenzen abgeleitet.

Maus Primer

Primer	Sequenz	
GAPDH	sense	GCA-CAG-TCA-AGG-CCG-AGA-AT
	antisense	GCC-TTC-TCC-ATG-GTG-GTG-AA
Oct4	sense	GCC-TTG-CAG-CTC-AGC-CTT-AA
	antisense	CTC-ATT-GTT-GTC-GGC-TTC-CTC
Nanog	sense	ATG-CCT-GCA-GTT-TTT-CAT-CC
	antisense	GAG-GCA-GGT-CTT-CAG-AGG-AA
Brachyury	sense	CCC-TGC-ACA-TTA-CAC-ACC-AC
	antisense	GTC-CAC-GAG-GCT-ATG-AGG-AG
AFP	sense	AGC-TGC-GCT-CTC-TAC-CAG-AC
	antisense	GAG-TTC-ACA-GGG-CTT-GCT-TC
NF68	sense	AGT-GGC-TTT-CTG-GCT-TGC-TG
	antisense	TCT-GTG-TGA-TTC-ACA-TTG-CCA-TAG

Callithrix jacchus **Primer**

Primer	Sequenz	
β -Actin	sense	GGC-ATC-CTC-ACC-CTG-AAG-TA
	antisense	GGG-GTG-TTG-AAG-GTC-TCA-AA
Oct4	sense	CGA-CCA-TCT-GCC-GCT-TTG-AG
	antisense	CCC-CCT-GTC-CCC-CAT-TCC-TA
Nanog	sense	CAG-AAG-GCC-TCA-GCA-CCT-AC
	antisense	GAA-TTT-GGC-TGG-AAC-TGC-AT
Brachyury	sense	CTG-CYT-AYC-AGA-AYG-AGG-AGA
	antisense	GGT-TGG-AGA-RTT-GTT-CCG-ATG
AFP	sense	CAG-AAA-YAC-ATC-SAG-GAG-AG
	antisense	GAG-CTT-GGC-ACA-GAT-CCT-TG
β -III-Tubulin	sense	CAT-GTC-CAT-GAA-GGA-GGT-GGA
	antisense	GTG-AAC-TCC-ATC-TCA-TCC-ATG
Cbfa1	sense	TTA-CTT-ACA-CCC-CGC-CAG-TC
	antisense	TCA-GCG-TCA-ACA-CCA-TCA-TT
BSP	sense	AAA-ACG-AAG-AAA-GCG-AAG-CA
	antisense	TTG-TGG-TGG-GGT-TGT-AGG-TT
OCN	sense	GGC-AGC-GAG-GTA-GTG-AAG-AG
	antisense	CTA-GAC-CGG-GCC-GTA-GAA-G

4 Ergebnisse

4.1 *Callithrix jacchus* ES-Zellen können auf Feederzellen und Feederzell-frei kultiviert werden

Die Kultivierung embryonaler Stammzellen von *Callithrix jacchus* (cES-Zellen) ist vergleichbar mit der Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen. Diese werden zur Erhaltung der Pluripotenz auf mitotisch inaktivierten Maus embryonalen Fibroblasten (MEF) kultiviert. Für die Kultivierung von cES-Zellen wurden MEF des Maustammes CD1 isoliert und 3 Passagen kultiviert. Die mitotische Inaktivierung der Zellen erfolgte durch eine Behandlung mit Mitomycin C (siehe dazu 3.1.2.1). Anschließend wurden die MEF eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Eine Lagerungszeit von 3 Monaten wurde dabei nicht überschritten somit können keine Aussagen über eine maximale Lagerungszeit der inaktivierten MEF getroffen werden. 24 Stunden vor der Passagierung der cES-Zellen wurden mitotisch inaktivierte MEF aufgetaut und in Zellkulturflaschen ausgesät. Dabei erwies sich eine Aussaatdichte von 5×10^4 Zellen pro cm^2 als ideal zur Kultivierung von cES-Zellen. Die Zellen wurden auf diese Weise ohne morphologische Veränderung über 100 Passagen in Kultur gehalten (Abb. 4.1 A,B). Zu Beginn eines Experimentes mussten die cES-Zellen weitestgehend von den MEF getrennt werden, da es sonst zu Verfälschungen der spezifisch eingestellten Zellzahl sowie sämtlicher Analysen kam. Die cES-Zell-MEF-Mischpopulation wurde dazu nach Ablösen

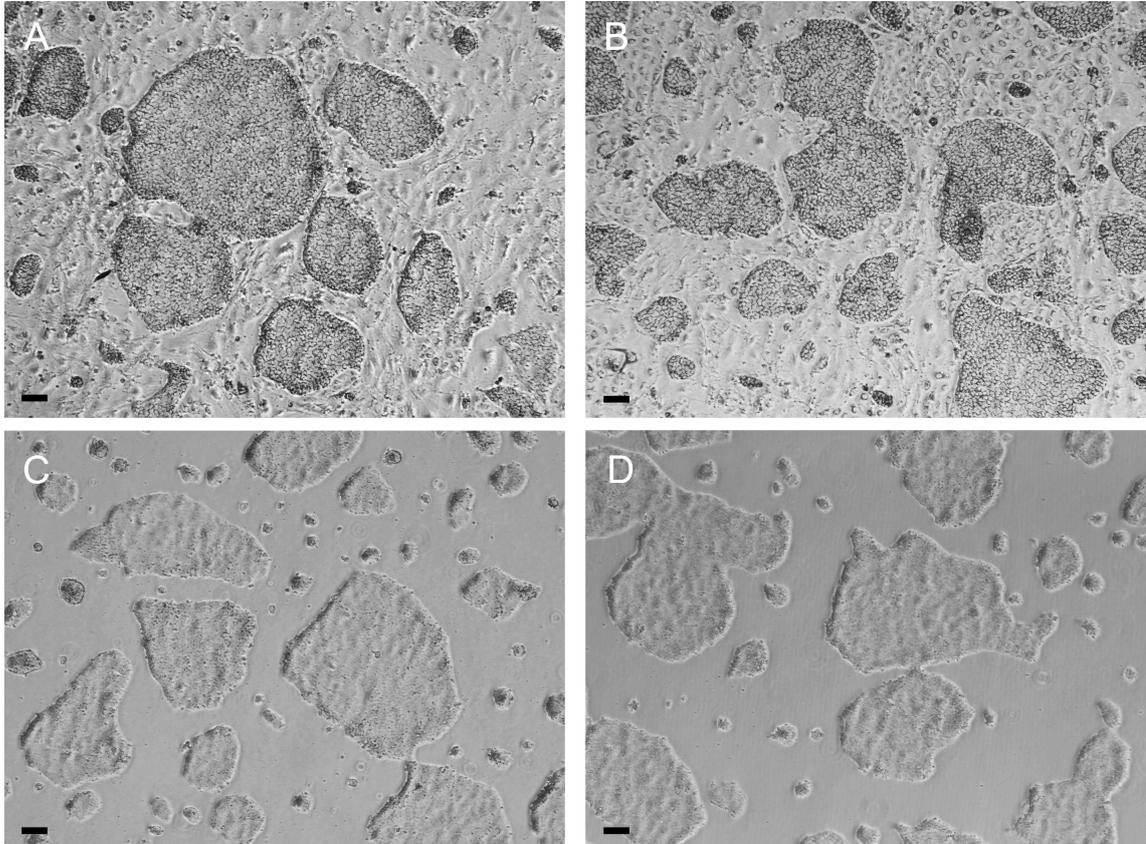


Abbildung 4.1: cES-Zellen kultiviert auf Feederzellen und Feeder-frei. **A** zeigt cES-Zellkolonien kultiviert auf Feederzellen in Passage 83, in **B** ist die Kultur nach weiteren 30 Passagen gezeigt. **C** zeigt die cES-Kultur nach 10 Passagen Feederzell-freier Kultivierung (Passage 83) in chemisch definiertem Medium mit 12 ng/ml bFGF und 10 ng/ml Activin A. **D** zeigt die Feeder-freie Kultur nach 40 Passagen. (Messbalken 100 µm)

durch *TrypLE™ Express* in eine Zellkulturschale gegeben und eine Stunde bei 37 °C in Serum-haltigem Medium inkubiert. In dieser Zeit adhärten die MEF wohingegen die cES-Zellen weitestgehend noch in Suspension vorlagen. Diese Vorgehensweise basiert auf den Untersuchungen von Friedenstein 1976 zur Isolation von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark [97]. Dabei machte sich Friedenstein die schnelle Adhärenz der Fibroblasten-Vorläuferzellen an Zellkulturplatten zur groben Aufreinigung der Knochenmarks-Mischpopulation zu nutze. Zwar kann durch diese Vorinkubation der

cES-Zell-MEF-Mischpopulation ein großer Teil der MEF abgetrennt werden, jedoch kann keine 100 %ige Reinheit der cES-Zellen garantiert werden. Bei der Etablierung einer standardisierten osteogenen Differenzierung sind unterschiedliche Anteile von MEF Resten in der Differenzierungskultur dem Ziel der Standardisierung nicht zuträglich, deshalb wurde eine MEF-freie (Feeder-freie) Kultur der cES-Zellen etabliert. Die Feeder-freie Kultivierung von humanen embryonalen Stammzellen ist bereits beschrieben [94]. Das von Vallier und Mitarbeitern beschriebene Protokoll, welches die Kultivierung der Zellen in chemisch definiertem Medium mit 12 ng/ml bFGF und 10 ng/ml Activin A (siehe auch 3.3) beschreibt, wurde auf die Kultivierung von cES-Zellen übertragen (siehe 3.1.2.2). Der Übergang von Feeder-haltiger zu Feeder-freier Kultur wurde erreicht durch die Passagierung der Zellen ohne neue Feederzellschicht. Dafür wurden cES-Zellen wie unter 3.1.2.2 beschrieben mit *TrypLE™ Express* von der Kulturflasche abgelöst und in eine mit FKS beschichtete Kulturflasche ohne neue Feederzellschicht ausgesät. Das Medium wurde ab dieser Passage auf Feeder-freies ES-Medium (siehe 3.3) umgestellt. Durch die mitotische Inaktivierung der MEF kam es in den folgenden Passagen zum Ausdünnen der restlichen Feederzellen. Nach insgesamt 5 Passagen war eine komplett Feeder-freie cES-Zellkultur erreicht (Abb. 4.2). cES-Zellen konnten über mehr als 40 Passagen Feeder-frei kultiviert werden ohne ihre morphologischen Eigenschaften zu verändern (Abb. 4.1 C,D). Die cES-Zell-Kolonien sind flach, kompakt und scharf abgegrenzt. Die Zellen innerhalb der Kolonien sind, sowohl auf Feederzellen als auch Feederzell-frei kultiviert, klein und dicht gepackt.

4.2 Vergleich der Feederzell-haltigen und

Feederzell-freien *Callithrix jacchus* ES-Zellkultur

4.2.1 Immunzytochemische Färbung von Pluripotenzmarkern

Zur Charakterisierung der Feeder-freien cES-Zellen wurden diese hinsichtlich ihrer Pluripotenz untersucht und der Kultivierung auf MEF gegenübergestellt. Abb. 4.3 und Abb. 4.4

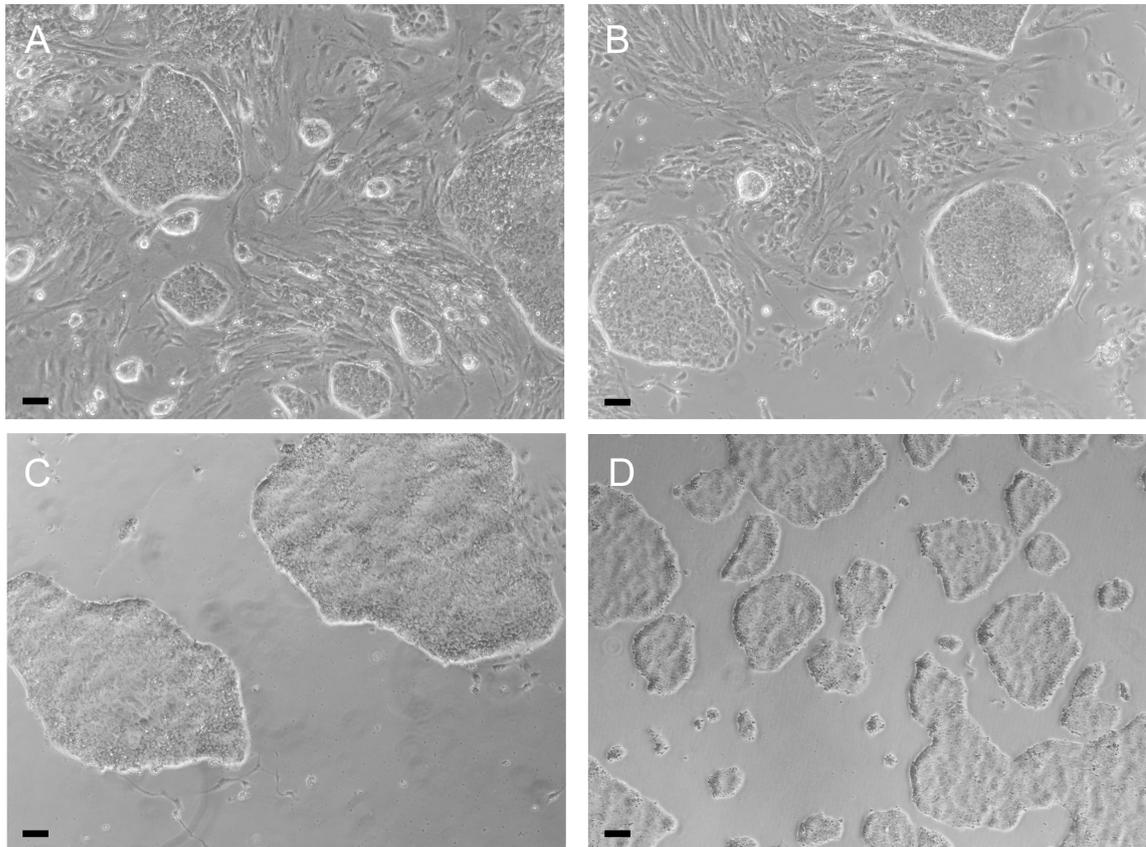


Abbildung 4.2: Übergang von Feeder-haltiger zu Feeder-freier cES-Zellkultur.

In **A** ist die cES-Zellkultur 1 Passage nach der Feeder-freien Aussaat gezeigt. Es sind noch viele Feederzellreste vorhanden. Im Laufe der nächsten Passagen ohne neue Feederzellschicht kommt es zum Ausdünnen der Feederzellen. **B** zeigt die Kultur 2 Passagen nach der Feeder-freien Aussaat. In **C** ist die komplett Feederzell-freie Kultur nach insgesamt 5 Passagen gezeigt. **D** zeigt die Zellen nach insgesamt 10 Passagen Feederzell-freier Kultivierung. (Messbalken 100 μm)

zeigen immunzytochemische Färbungen typischer Pluripotenzmarker von Primaten ES-Zellen. So können sowohl in der Kultur auf Feederzellen (Abb. 4.3) wie auch in der Feeder-freien Kultur (Abb. 4.4) die Pluripotenzmarker Oct4, SSEA-4 und TRA-1-60 gleichermaßen nachgewiesen werden. Die Oct4-Färbung ist dabei auf den Zellkern beschränkt da Oct4 als Transkriptionsfaktor im Kern aktiv ist. Das SSEA-4 ist als spezi-

fisches embryonales Antigen genauso wie TRA-1-60 auf der Zelloberfläche nachweisbar. Die Färbung zeigt jedoch sowohl für cES-Zellen auf Feederzellen als auch für die Feederfreie Kultur eine ungleichmäßige Verteilung des TRA-1-60 innerhalb der Kolonie.

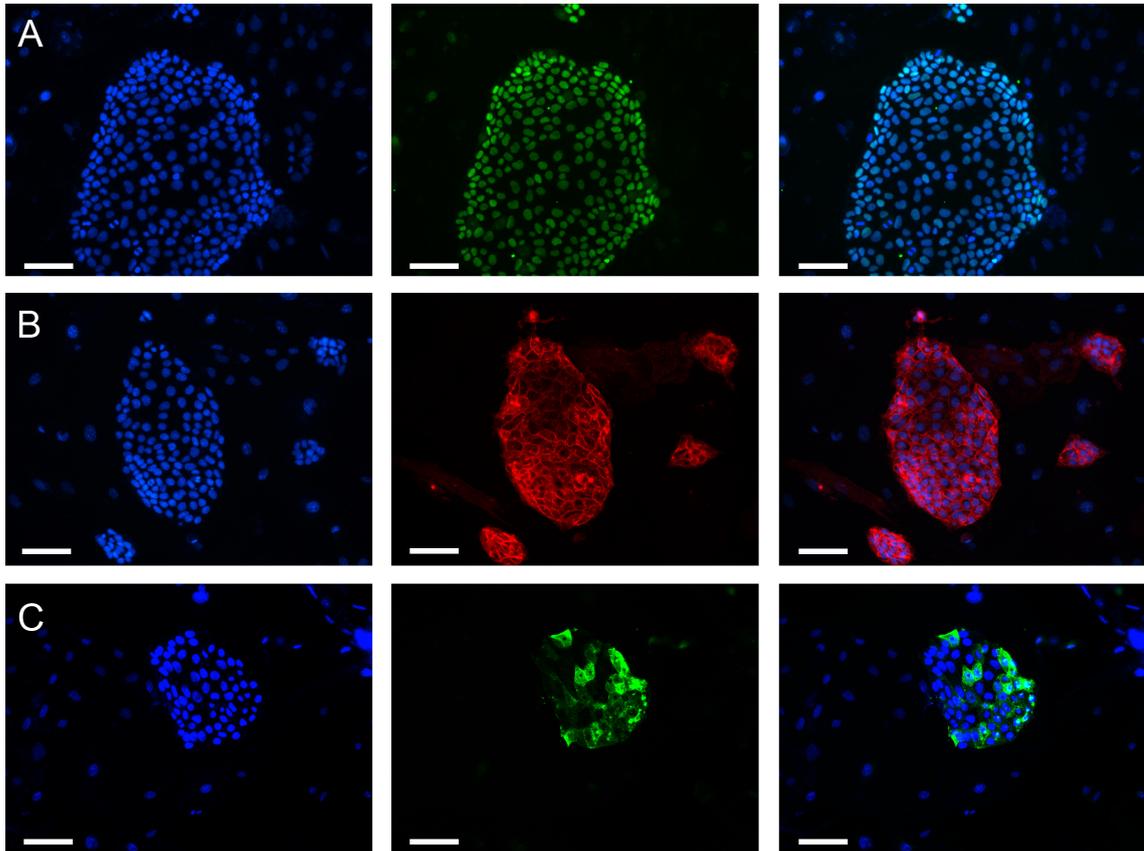


Abbildung 4.3: Immunocytochemische Charakterisierung der cES-Zellen kultiviert auf Feederzellen. Dargestellt sind die Färbungen des Transkriptionsfaktors Oct4 (**A**) und der beiden für Primaten-ES-Zellen spezifischen Oberflächenantigene SSEA-4 (**B**) und TRA-1-60 (**C**). Als Sekundärantikörper wurden *donkey anti rabbit IgG-FITC* (**A**), *Alexa Fluor 546 goat anti mouse IgG* (**B**) und *Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgM* (**C**) verwendet. Gezeigt ist die Zellkernfärbung mit DAPI (links), des Pluripotenzmarkers (mitte) und die Überlagerung (rechts). (Messbalken 100 μm)

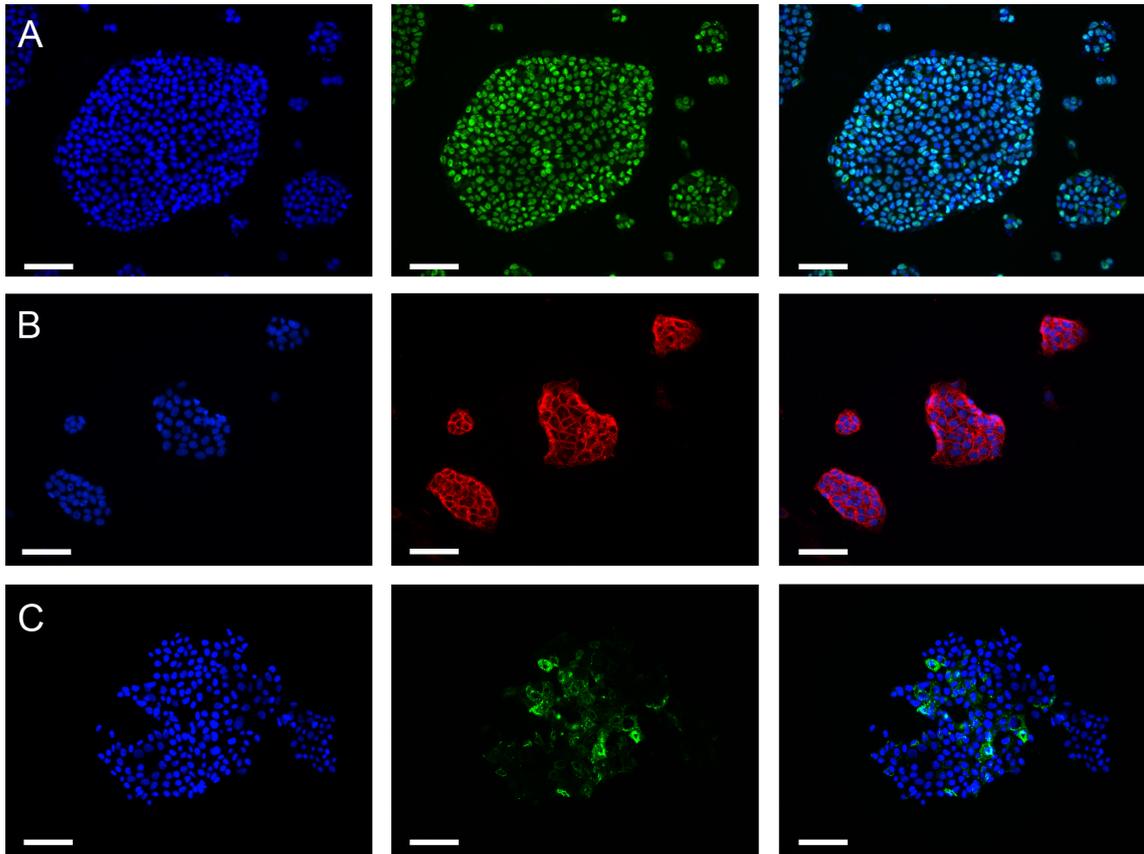


Abbildung 4.4: Immunocytochemische Charakterisierung von cES-Zellen nach 30 Passagen Feederzell-freier Kultur. Dargestellt sind die Färbungen des Transkriptionsfaktors Oct4 (**A**), und der beiden für Primaten-ES-Zellen spezifischen Oberflächenantigene SSEA-4 (**B**) und TRA-1-60 (**C**). Gezeigt ist die Zellkernfärbung mit DAPI (links), des Pluripotenzmarkers (mitte) und die Überlagerung (rechts). Als Sekundärantikörper wurden *donkey anti rabbit IgG-FITC* (**A**), *Alexa Fluor 546 goat anti mouse IgG* (**B**) und *Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgM* (**C**) verwendet. (Messbalken 100 μm)

4.2.2 Gegenüberstellung des Expressionsmusters von Pluripotenzmarkern

Die Expression typischer Pluripotenz-Gene (Oct4, Nanog) von cES-Zellen auf Feederzellen (cESC feeder) und Feeder-freien cES-Zellen (cESC ff) wurde, wie in Abschnitt 3.2.6

beschrieben, mittels semiquantitativer PCR durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine gleichermaßen hohe Expression der mRNA des Octamer-4 bindenden Proteins (Oct4), sowie der mRNA von Nanog einem Mitglied der Homöobox-Familie von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren (Abb. 4.5). Feederzellen zeigten keine Expression von Oct4 und Nanog. Zusätzlich zu Pluripotenz-Genen wurde die Expression der Keimblatt-Gene β -III-Tubulin (Ektoderm), α -Fetoprotein (AFP; Endoderm) und T-Brachyury (Bra; frühes Mesoderm) untersucht, um eine mögliche Differenzierung der Zellen zu detektieren. Sowohl für cES-Zellen auf Feederzellen als auch für Feeder-freie cES-Zellen kann keine Expression der Keimblatt-spezifischen Gene in der Expansionskultur nachgewiesen werden (Abb. 4.5). Eine Feeder-freie Kultivierung der cES-Zellen führt somit auch nach 40 Passagen weder zu einer Abnahme der Expression von Pluripotenz-Genen noch zu einer Zunahme der Expression von Differenzierungs-Marker-Genen. Beide Kultivierungssysteme sind gleichermaßen zur Erhaltung der Pluripotenz über mehrere Passagen geeignet.

4.2.3 Nachweis einer hohen Telomeraseaktivität

Ein spezifisches Merkmal embryonaler Stammzellen ist eine hohe Telomeraseaktivität. Diese Enzymaktivität verleiht embryonalen Stammzellen das Potential zur unbegrenzten Selbsterneuerung. Unter optimalen Kulturbedingungen sind embryonale Stammzellen über mehrere Jahre in Kultur haltbar. Sie unterliegen keiner Seneszenz. Zur Charakterisierung der Feeder-freien cES-Zellkultur wurde die Telomeraseaktivität der Zellen, nach 40 Passagen Feeder-freier Kultivierung im Vergleich zu cES-Zellen, kultiviert auf MEF, mittels quantitativer PCR untersucht (siehe dazu 3.2.9). Hierzu wurde die Telomeraseaktivität relativ zu murinen ES-Zellen (mESC) bestimmt. Sowohl cES-Zellen auf Feederzellen als auch Feeder-freie cES-Zellen zeigen eine relative Telomeraseaktivität von $87,9\% \pm 1,7$ (cES-Zellen auf Feeder) bzw. $87,6\% \pm 1,2$ (Feeder-freie cES-Zellen) (Abb. 4.6). Die Feeder-freie Kultivierung der cES-Zellen führt somit auch nach 40 Passagen nicht zum Verlust der ES-Zell-typischen Telomeraseaktivität.

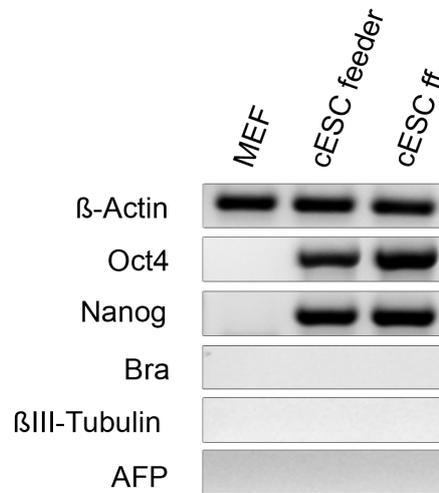


Abbildung 4.5: Gegenüberstellung der Genexpression von cES-Zellen auf Feederzellen (cESC feeder) und Feeder-freien cES-Zellen (cESC ff) nach 40 Passagen Feederzell-freier Kultur. Es ist die Expression der Pluripotenzgene Oct4 und Nanog dargestellt, sowie der Keimblattmarkergene β -III-Tubulin (Ektoderm), α -Fetoprotein (AFP; Endoderm) und T-Brachyury (Bra; frühes Mesoderm). Zum Vergleich wurde die Expression des Haushaltsgens β -Actin mit untersucht. Als Negativkontrolle ist die Expression der einzelnen Gene von Feederzellen (MEF) dargestellt.

4.2.4 Karyotypanalyse von *Callithrix jacchus* ES-Zellen nach 40 Passagen Feederzell-freier Kultur

Um eine Veränderung des Chromosomensatzes, wie beispielsweise eine Aneuploidie, durch die Feeder-freie Kultivierung der cES-Zellen auszuschließen, wurde eine Karyotypanalyse der cES-Zellen nach 40 Passagen Feeder-freier Kultivierung durch die Firma EuroGene GmbH durchgeführt (siehe 3.2.8). Das Ideogramm wurde von Mitarbeitern der Firma EuroGene GmbH auf Basis publizierter cES-Zell-Daten [38] erstellt (Abb. 4.7). cES-Zellen zeigen auch nach mehreren Passagen Feeder-freier Kultivierung einen normalen 46XX Karyotyp.

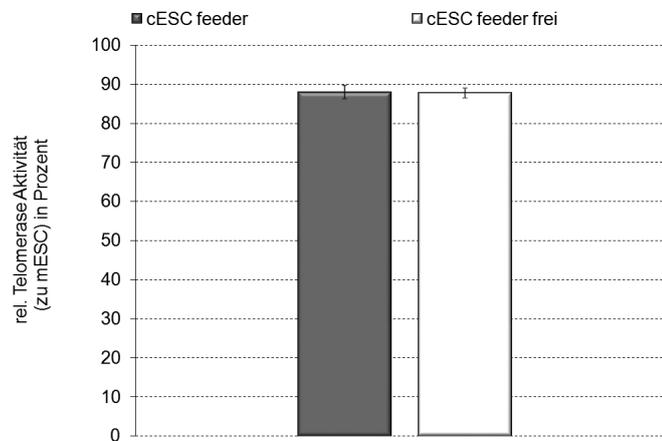


Abbildung 4.6: Analyse der Telomeraseaktivität von cES-Zellen auf Feederzellen (cESC feeder) und Feeder-freien cES-Zellen (cESC feeder-frei) nach 40 Passagen Feederzell-freier Kultur. Die Aktivität der Telomerase ist relativ zur Telomeraseaktivität muriner ES-Zellen dargestellt. (n=3, \pm SD)

4.3 Initiierung der Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen

Durch den Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren (Feederzellen bzw. bFGF/Activin A) kann die Differenzierung von cES-Zellen eingeleitet werden. Dies geht einher mit dem Verlust der Expression von Pluripotenzmarkergenen. Zur Initiierung der spontanen Differenzierung wurde das cES-Feederfrei-Medium einer ca. 80% konfluenten cES-Feeder-frei Expansionskultur auf Kontrolldifferenzierungsmedium umgestellt. cES-Zellen auf Feederzellen wurden zur Initiierung der spontanen Differenzierung in Kontrolldifferenzierungsmedium auf Gelatine-beschichtete Zellkulturplatten ohne Feederzellschicht ausgesät. Die Expression der spezifischen Pluripotenzmarkergene Oct4 und Nanog wurde für Tag 0 bis Tag 6 der spontanen Differenzierung mittels semiquantitativer PCR (siehe 3.2.6) untersucht (Abb. 4.8). Es zeigt sich sowohl für cES-Zellen kultiviert auf Feederzellen (cESC fee) als auch für Feeder-frei kultivierte cES-Zellen (cESC ff) ein Verlust

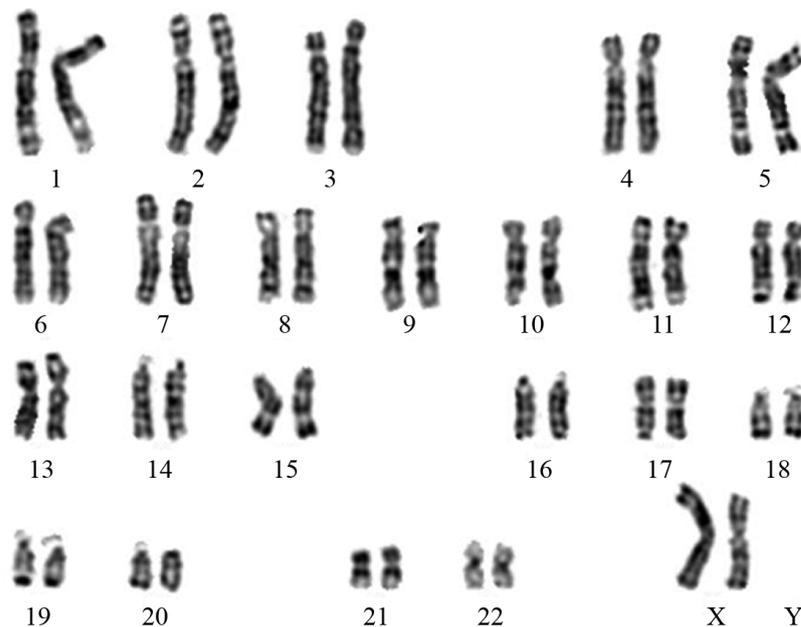


Abbildung 4.7: Karyotypanalyse von cES-Zellen nach 40 Passagen Feederzellfreier Kultivierung. Das Ideogramm wurde von Mitarbeiter der Firma EuroGene GmbH erstellt. Die Feeder-freien cES-Zellen zeigen einen normalen Karyotyp von 46 XX.

der Expression der beiden Pluripotenzgene Oct4 und Nanog innerhalb der ersten 6 Tage nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren. Die Expression von Nanog ist nach 3-4 Tagen drastisch herunterreguliert. Die Regulation der Oct4 Expression ist langsamer, aber auch hier ist nach 5-6 Tagen ein starker Abfall der Expression detektierbar.

Zusätzlich zur Expressionsanalyse von Oct4 und Nanog wurden am Beispiel der Feederzellfrei kultivierten cES-Zellen spezifische ES-Zellmarkerproteine mittels immunozytochemischer Färbung über die ersten 4 Tage der spontanen Differenzierung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Der Transkriptionsfaktor Oct4 kann schon 1-2 Tage nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren (bFGF/Activin A) immunozytochemisch nicht mehr nachgewiesen werden. Auch bei den beiden Primaten-spezifischen ES-Zellmarkerproteinen TRA-1-60 und SSEA-4 zeigt sich eine geringere Expression der Proteine auf der Zelloberfläche im Laufe der spontanen Differenzierung bis Tag 4 (Abb. 4.9). Der Anteil an SSEA-4 positiven Zellen wurde zusätzlich mittels Durchflusszyto-

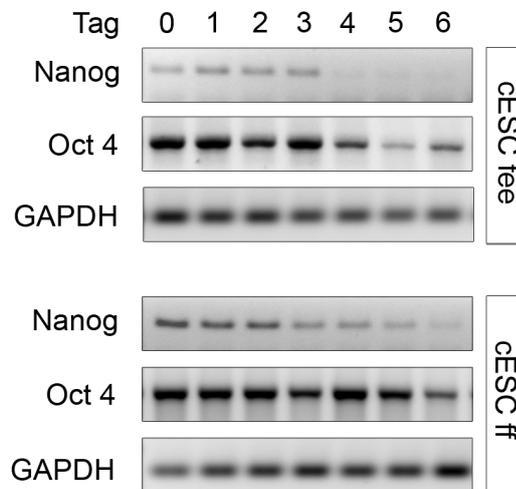


Abbildung 4.8: Expressionsanalyse der Pluripotenzgene Oct4 und Nanog in cES-Zellen nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren. Dargestellt sind die Expressionsprofile von Oct4 und Nanog über die ersten 6 Tage spontaner Differenzierung von cES-Zellen kultiviert auf Feederzellen (cESC fee) und Feeder-frei kultivierten cES-Zellen (cESC ff). Bei beiden Kultursystemen werden Pluripotenzgene innerhalb der ersten 6 Tage nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren herunterreguliert. Die Expression des Haushaltgens GAPDH wurde an den einzelnen Tagen als Kontrollgen mit untersucht.

metrie über die ersten 4 Tage der Differenzierung ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Dabei zeigt sich ein signifikanter Abfall der SSEA-4 positiven Zellen im Laufe der ersten 4 Differenzierungstage von $84,7\% \pm 1,7$ an Tag 0 der Differenzierung auf $11,0\% \pm 1,3$ an Tag 4 der spontanen Differenzierung. Die durchflusszytometrischen Daten zeigen hierbei besser den starken Verlust der SSEA-4 Ausprägung auf der Zelloberfläche als die immunzytochemische Färbung. Im Unterschied zu murinen ES-Zellen exprimieren cES-Zellen kein SSEA-1 auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 4.9). Jedoch wird die Expression bei der spontanen Differenzierung der Zellen hochreguliert und das Protein ist ca. 2-3 Tage nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren auf der Zelloberfläche der cES-Zellen nachweisbar (Abb. 4.9).

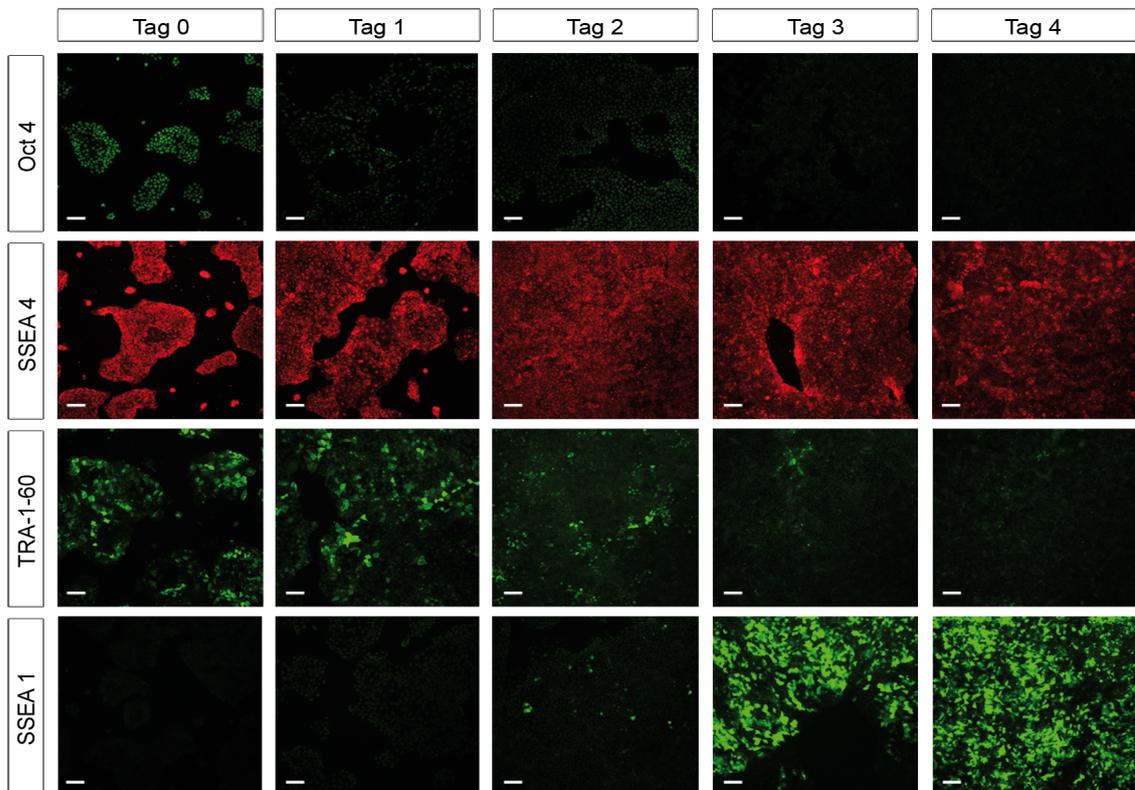


Abbildung 4.9: Immunocytochemische Färbung charakteristischer cES-Zellmarkerproteine nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren. Dargestellt sind die immunocytochemischen Färbungen von cES-Zellen während der ersten 4 Tage der spontanen Differenzierung. Als Sekundärantikörper wurden *donkey anti rabbit IgG-FITC* (Oct4), *Alexa Fluor 546 goat anti mouse IgG* (SSEA-4) und *Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgM* (TRA-1-60 und SSEA-1) verwendet. (Messbalken 100 μm)

Die spontane Differenzierung von cES-Zellen kann somit durch den Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren eingeleitet werden. Dabei kommt es zu einem raschen Verlust der embryonalen Stammzeleigenschaften, wie der Oct4 und Nanog Expression sowie der Ausprägung der Zelloberflächenantigene SSEA-4 und TRA-1-60.

Zur Initiierung der spontanen Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen ist das Protokoll der hängenden Tropfen beschrieben [25]. Dies ermöglicht durch die Bildung *in vivo* ähnlicher Embryonalkörperchen (engl. *embryoid bodies*, EBs) einen kontrollier-

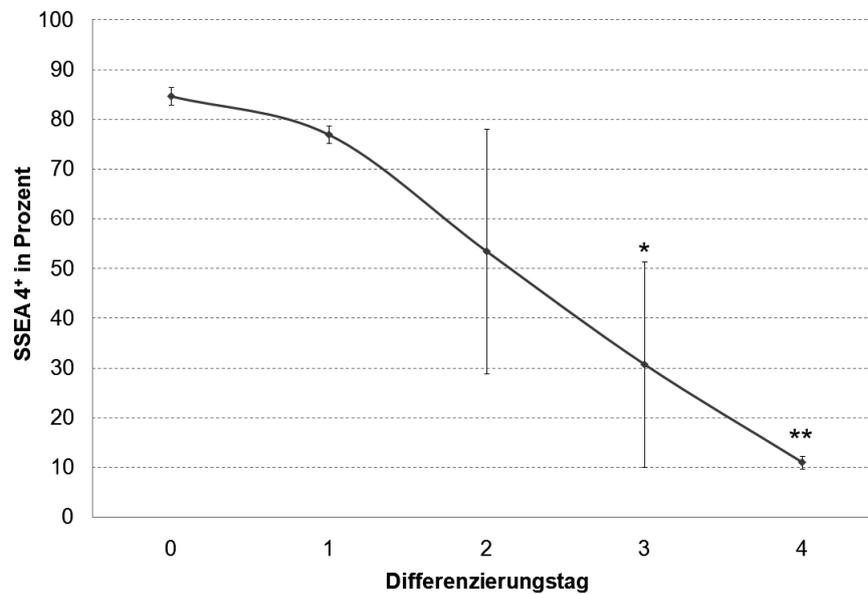


Abbildung 4.10: Durchflusszytometrische Analyse der SSEA-4 positiven cES-Zellen nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren. Der Anteil an SSEA-4 positiven cES-Zellen sinkt im Laufe der spontanen Differenzierung von 84,7%±1,7 an Tag 0 der Differenzierung auf 11,0%±1,3 an Tag 4. (n=3,±SD, statistische Analyse zu Tag 0)

ten und synchronisierten Ablauf der ersten Differenzierungsschritte und wirkt sich somit auf den gesamten Differenzierungsverlauf in den gewünschten Zielzelltyp aus. Das Protokoll der hängenden Tropfen sieht am Tag 0 der Differenzierung die Dissoziation der Zellkolonien in Einzelzellen vor. Anschließend wird die Zellsuspension in 20 µl großen Tropfen auf die Innenseite des Deckels einer bakteriologischen Schale pipettiert, wobei die Zelldichte auf 750 Zellen pro Tropfen ($3,75 \times 10^4$ Zellen pro ml) in Kontrollmedium eingestellt wird. Anschließend wird der Deckel wieder auf die Schale aufgesetzt und die so hängenden Tropfen für 3 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. In dieser Zeit aggregieren die Zellen aufgrund der Schwerkraft am tiefsten Punkt des Tropfens. Nach 3 Tagen werden die Tropfen samt Zellaggregaten vom Deckel abgewaschen, in Suspension überführt und für weitere 2 Tage kultiviert. Dieses Protokoll hat sich zur Initiierung der murinen ES-Zelldifferenzierung bewährt. Überträgt man dieses Protokoll auf *Callithrix jacchus*

ES-Zellen entstehen bis Tag 5 kaum Aggregate (siehe Abbildung 4.11 A), da in Einzelzellen dissoziierte cES-Zellen nicht wieder reaggregieren. Das Protokoll der hängenden Tropfen ist somit für die Initiierung der Differenzierung von cES-Zellen ungeeignet.

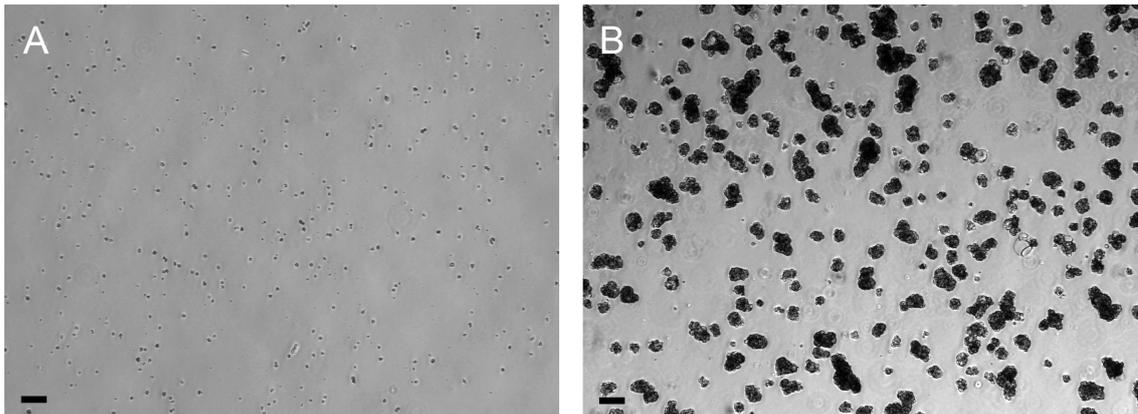


Abbildung 4.11: Initiierung der Differenzierung von cES-Zellen mit dem Protokoll der hängenden Tropfen und mittels Zellcluster-Methode. Das für murine ES-Zellen zur EB-Bildung etablierte Protokoll der hängenden Tropfen ist für die EB-Generierung von cES-Zellen ungeeignet. Bis Tag 5 der Differenzierung entstehen kaum Zellaggregate (**A**). Durch die Dissoziation der Zellen an Tag 0 der Differenzierung in Zellkluster und die 5 tägige Kultivierung in Suspension kann eine Bildung EB-ähnlicher Zellaggregate erreicht werden (**B**). (Messbalken 100 μm)

Eine weitere Möglichkeit der EB-Bildung stellt die teilweise Dissoziation der ES-Zellen an Tag 0 dar [73]. Dabei werden die ES-Zellkolonien durch die Verwendung weniger aggressiver Enzyme wie Collagenase IV in Zellkluster von wenigen Zellen zerlegt und anschließend in Suspension für 5-6 Tage kultiviert. In dieser Zeit wachsen die Zellkluster zu kleinen EB-ähnlichen Zellaggregaten aus. Für die EB-Bildung von cES-Zellen wurden die Kolonien durch die Verwendung des Trypsinersatzes *TrypLETM Express* in Zellkluster von 10-20 Zellen (optische Kontrolle) zerlegt und anschließend für 5 Tage in Suspension in Kontrolldifferenzierungsmedium kultiviert. Die so entstandenen EBs sind in Abbildung 4.11 B gezeigt. Trotz der hohen Größenvariation der entstandenden cES-Zellaggregate bietet die EB-Bildung mittels der Zellklustermethode eine adequate Ersatzlösung zur EB-Bildung

mittels hängender Tropfen. Die Vorteile der Initiierung der osteogenen Differenzierung von cES-Zellen mit EB-Bildung gegenüber der Differenzierung ohne EB-Bildungsschritt sind in Abschnitt 4.4.1 beschrieben.

4.4 Osteogenen Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen in statischer Kultur mit und ohne EB-Bildungsschritt im Vergleich

Zur osteogenen Differenzierung von *Callithrix jacchus* embryonalen Stammzellen (cES-Zellen) wurde das Protokoll zur osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen übertragen [29]. Das murine Differenzierungsprotokoll sieht die Initiierung der Differenzierung durch die hängende Tropfen Methode zur EB-Bildung vor. Am Tag 5 der Differenzierung werden die *embryoid bodies* in Einzelzellen dissoziiert und auf Gelatine beschichtete Zellkulturplatten ausgesät. Ab Tag 5 wird durch die Zugabe von osteogenen Substanzen (Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat, $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D₃) zum Medium die Differenzierung der Zellen in Richtung Osteoblasten vorangetrieben. In den folgenden 25 Tagen kommt es zur Ablagerung von extrazellulärer Matrix durch die differenzierenden Osteoblasten. Diese Matrix besteht zunächst hauptsächlich aus Collagen Typ I und wird in späteren Phasen der Differenzierung durch die Einlagerung von Kalzium mineralisiert. Die zunehmende Mineralisierung ist ohne weitere Färbung unter dem Lichtmikroskop erkennbar, da mineralisierte Bereiche schwarz erscheinen. So kann die Differenzierung bereits während des laufenden Prozesses qualitativ beurteilt werden. Schließlich kann über die quantitative Analyse der in die Matrix eingelagerten Kalziummenge der Erfolg der Differenzierung beurteilt und mit Kontrolldifferenzierungen ohne osteogene Zusätze verglichen werden. Die osteogene Differenzierung ist zudem durch die Expression bestimmter osteogener Markergene gekennzeichnet. So wird Cbfa1, ein Transkriptionsfaktor der RunX-Transkriptionsfaktor-Familie und Marker für reifende Osteoblasten bereits früh in

der Differenzierung exprimiert. Als Folge dessen kommt es zum Expressionsanstieg von Zielgenen von *Cbfa1* wie den beiden späten osteogenen Markergenen Osteocalcin und Bone Sialoprotein.

Wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, ist eine Initiierung der cES-Zell-Differenzierung mittels der hängenden Tropfen Methode nicht möglich. Deshalb wurde das Protokoll abgeändert und die Differenzierung über die Zellkluster-Methode eingeleitet. Am Tag 5 der Differenzierung wurden die entstandenen EBs auf Gelatine beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und die Differenzierung durch die Zugabe osteogener Substanzen vorangetrieben. Die osteogene Differenzierung mit dieser Art der EB-Bildung ist im Folgenden der Differenzierung ohne EB-Bildung, bei der die Differenzierungsmedien direkt zur Expansionskultur gegeben werden, gegenübergestellt. Der Vergleich soll den Einfluss des EB-Bildungsschrittes auf die osteogene Differenzierung von cES-Zellen zeigen.

4.4.1 Osteogene Differenzierung ohne EB-Formierung

Zur osteogenen Differenzierung von cES-Zellen ohne EB-Bildung wurde Kontrolldifferenzierungsmedium für 5 Tage direkt zur Expansionskultur gegeben. Nach 5 Tagen wurde das Medium auf osteogenes Differenzierungsmedium mit den Zusätzen Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D₃ gewechselt.

Die osteogene Differenzierung von cES-Zellen ohne EB-Bildung führt nur zu einer geringen Bildung von Osteoblasten. Die Mineralisierung an Tag 30 ist nur schwach ausgeprägt. Es sind nur wenige schwarze Bereiche in der osteogen differenzierten Kultur gegenüber der Kontrolldifferenzierung erkennbar (Abb. 4.12). Auch die quantitative Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums über den gesamten Differenzierungszeitraum zeigt keinen signifikanten Anstieg der Kalziumkonzentration der osteogen differenzierten Zellen gegenüber der Kontrolldifferenzierung (Abb. 4.13).

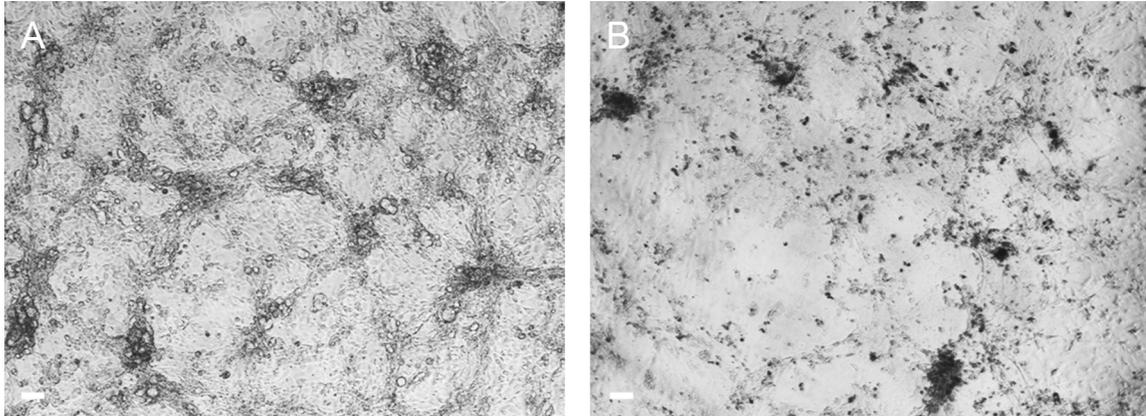


Abbildung 4.12: Osteogene Differenzierung von cES-Zellen ohne EB-Bildung. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen (**B**) osteogen differenzierter cES-Zellen ohne EB-Bildung und (**A**) der Kontrolldifferenzierung am Tag 30 der Differenzierung. (Messbalken 100 µm)

4.4.2 Osteogene Differenzierung mit EB-Formierung

Vergleichend zur osteogenen Differenzierung von cES-Zellen ohne EB-Bildung wurde die Differenzierung mit EB-Bildung untersucht. Wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, ist eine Initiierung der cES-Zell-Differenzierung mittels der hängenden Tropfen Methode wie sie für murine ES-Zellen beschrieben ist nicht möglich. Deshalb wurde die Differenzierung über die Zellkluster-Methode eingeleitet. Am Tag 5 der Differenzierung wurden die entstandenen EBs auf Gelatine beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und die Differenzierung durch die Zugabe von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D_3 zum Medium in Richtung Osteoblasten vorangetrieben. In Abbildung 4.14 ist die Mineralisierung der osteogenen Differenzierungskultur von cES-Zellen aus Feederzell-haltiger und Feederzell-freier Kultur gegenübergestellt. Mineralisierte Bereiche erscheinen schwarz. Dabei ist in der Kontrolldifferenzierung ohne osteogene Substanzen keine Mineralisierung erkennbar. In der osteogenen Differenzierungskultur (VD3) sind sowohl für cES-Zellen aus Feederzell-haltiger (cESC feeder) als auch aus Feederzell-freier Kultur (cESC feeder frei) von Tag 15 an schwarze Bereiche detektierbar, welche sich bis Tag 30 der Differenzierung über die gesamte Kulturschale ausbreiten. Der Mineralisierungsgrad

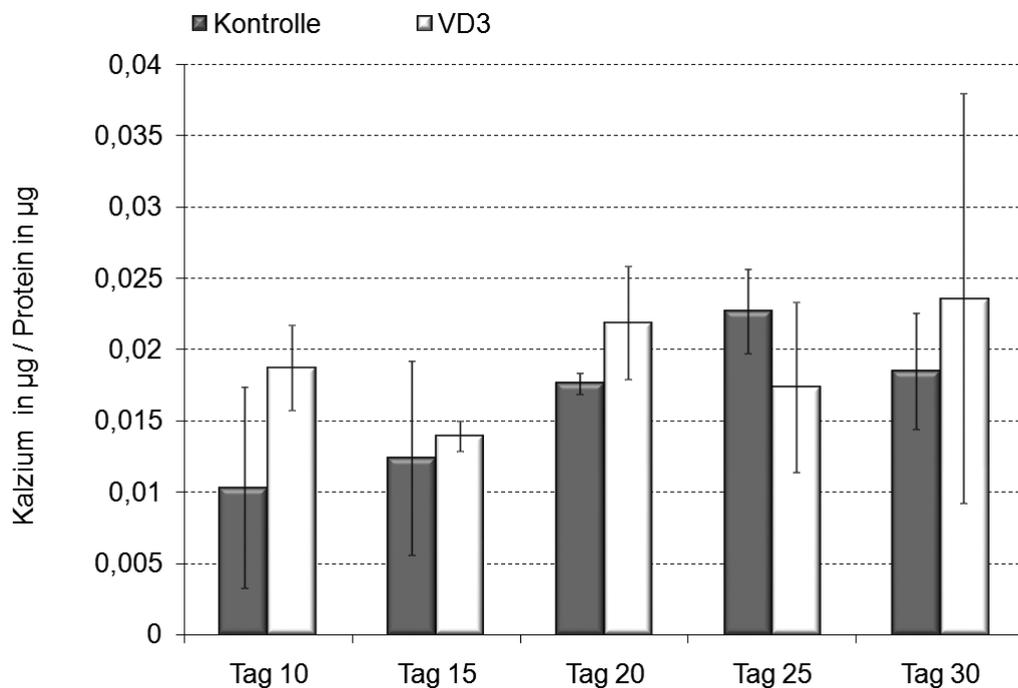


Abbildung 4.13: Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter cES-Zellen ohne EB-Bildung. Dargestellt ist die Menge des in die Matrix eingelagerten Kalziums pro μg Protein zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Vergleichend ist die Analyse für osteogen- und kontrolldifferenzierte cES-Zellen dargestellt. ($n=3, \pm \text{SD}$)

zwischen cES-Zellen aus Feederzell-haltiger und Feederzell-freier Kultur unterscheidet sich dabei optisch kaum. Dies wird auch durch die Färbung des in der Matrix eingelagerten Kalziums mittels Alizarin Red S am Tag 30 der Differenzierung deutlich (Abb. 4.15). Dabei ist wieder die Kontroll- und osteogene Differenzierung von cES-Zellen aus Feederzell-haltiger und Feederzell-freier Kultur gegenübergestellt. Die Lokalisation der Alizarin Färbung stimmt mit den schwarzen Bereichen welche in den osteogen differenzierten Kulturen lichtmikroskopisch sichtbar sind überein. Kontrolldifferenzierungen zeigen keine Alizarin Färbung und somit keine kalzifizierten Bereiche.

Die quantitative Analyse des in die Matrix der Zellen inkorporierten Kalziums zeigt einen Anstieg der Kalziummenge in den osteogen differenzierten Kulturen von cES-Zellen aus Feeder-haltiger und Feederzell-freier Kultur von Tag 15 an. Dabei zeigen cES-Zellen aus

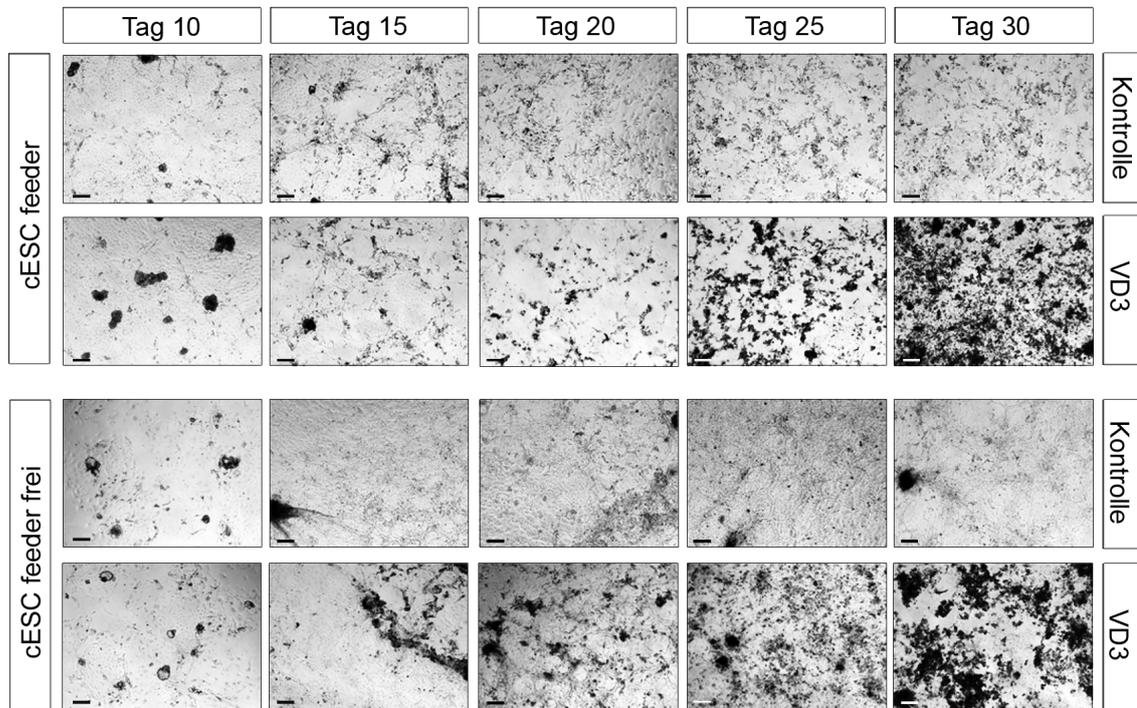


Abbildung 4.14: Osteogene Differenzierung von cES-Zellen mit EB-Bildungsschritt. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der differenzierenden cES-Zellen aus Feederzell-haltiger (cESC feeder) und Feederzell-freier (cESC feeder frei) Kultur. Dabei sind Aufnahmen der osteogenen Differenzierung (VD3) der Kontrolldifferenzierung ohne osteogene Substanzen (Kontrolle) gegenübergestellt. (Messbalken 100 μm)

Feederzell-haltiger Kultur einen kontinuierlichen Kalziummengenanstieg bis Tag 30 der Differenzierung, wohingegen osteogen differenzierte cES-Zellen aus Feeder-freier Kultur nur einen Anstieg bis Tag 25 der Differenzierung zeigen (Abb. 4.16). Von Tag 25 bis Tag 30 fällt die Kalziumkonzentration (in μg pro μg Protein) wieder. Die Analyse zeigt eine Einlagerung von $0,9 \mu\text{g} \pm 0,1$ Kalzium pro μg Protein am Tag 30 der osteogenen Differenzierung von Feederzell-frei kultivierten cES-Zellen und $1,1 \mu\text{g} \pm 0,3$ Kalzium pro μg Protein für cES-Zellen aus Feederzell-haltiger Kultur (Abb. 4.16). Am Tag 30 der Differenzierung besteht somit kein signifikanter Unterschied in der eingelagerten Kalzium-

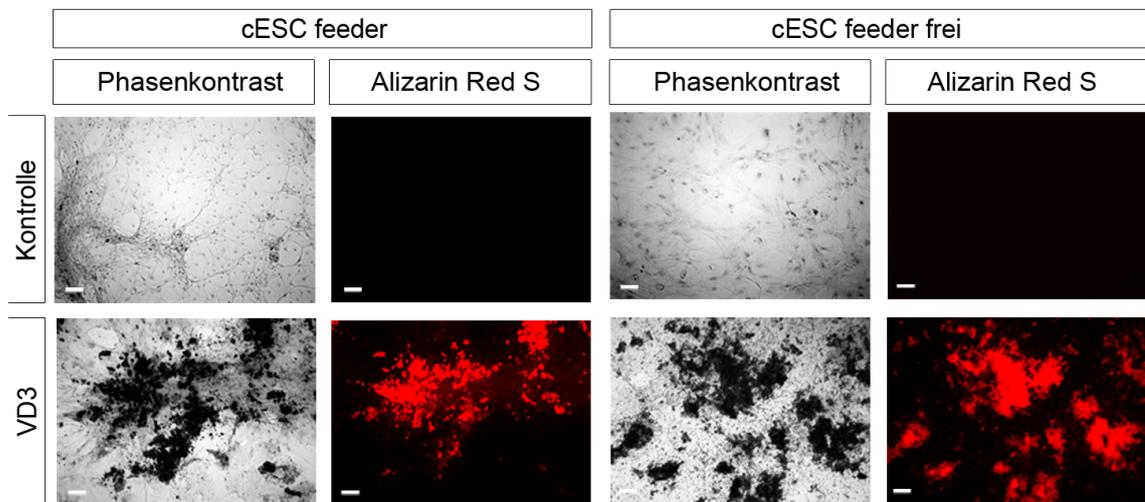


Abbildung 4.15: Alizarin Färbung kalzifizierter Bereiche osteogen differenzierter cES-Zellen am Tag 30 der Differenzierung. Dargestellt sind licht- sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der differenzierenden cES-Zellen aus Feederzell-haltiger (cESC feeder) und Feederzell-freier (cESC feeder frei) Kultur. Die osteogen differenzierte Kultur (VD3) ist dabei der Kontrolldifferenzierung ohne osteogene Substanzen (Kontrolle) gegenübergestellt. Alizarin bildet mit zweiwertigen Metallionen rot-orange Chelatverbindungen aus und ermöglicht somit den spezifischen Nachweis des in der mineralisierten Matrix eingelagerten Kalziums. (Messbalken 100 μm)

menge zwischen beiden Kultursystemen. Anders verhält es sich am Tag 25 der Differenzierung. Hier ist eine signifikant ($p=0,009$) höhere Kalziummenge für cES-Zellen aus Feederzell-freier Kultur detektierbar ($1,3 \mu\text{g} \pm 0,2$ Kalzium pro μg Protein) gegenüber cES-Zellen aus Feeder-haltiger Kultur ($0,6 \mu\text{g} \pm 0,1$ Kalzium pro μg Protein). Die eingelagerten Kalziummengen der Kontrolldifferenzierung ohne osteogene Substanzen wurde vergleichend für beide Kultursysteme mit analysiert. Diese zeigen keinen signifikanten Anstieg der Kalziummenge über den Differenzierungszeitraum und liegen auch an Tag 30 der Differenzierung auf einem Basiswert von $0,008 \mu\text{g} \pm 0,005$ Kalzium pro μg Protein (cESC feeder Kontrolle) und $0,05 \mu\text{g} \pm 0,03$ Kalzium pro μg Protein (cESC feeder frei Kontrolle).

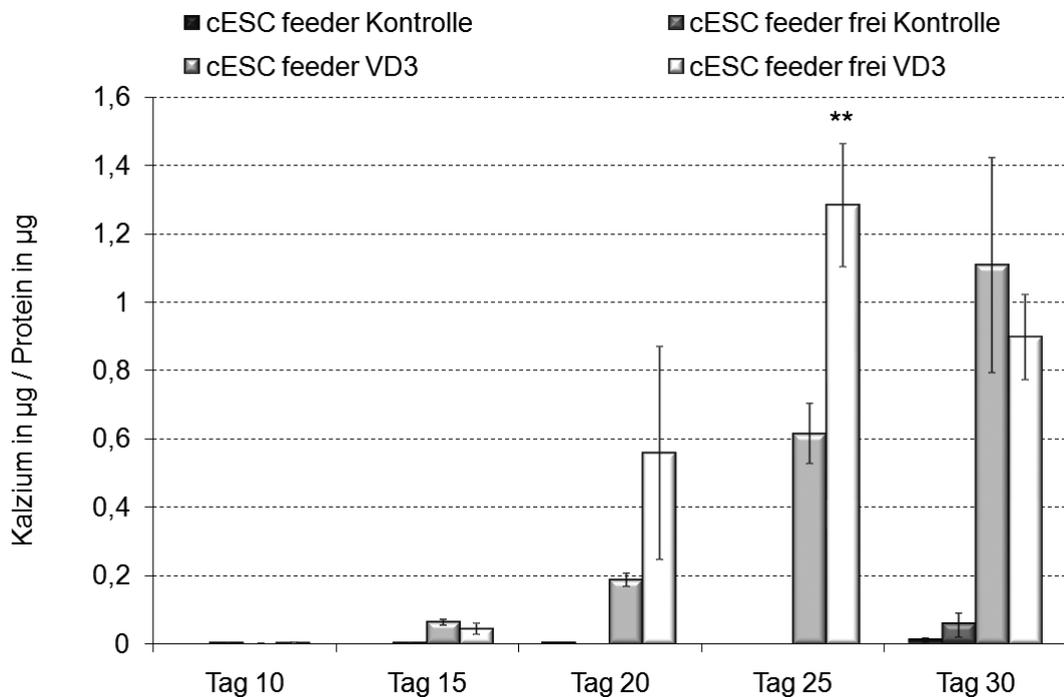


Abbildung 4.16: Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter cES-Zellen mit EB-Bildung. Dargestellt ist die Menge des in die Matrix eingelagerten Kalziums pro μg Protein zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Dabei sind die Kalziumkonzentrationen differenzierter cES-Zellen aus Feederzell-haltiger (cESC feeder) und Feederzell-freier Kultur (cESC feeder frei) gegenübergestellt. Vergleichend ist die Analyse für kontrolldifferenzierte cES-Zellen mit dargestellt. ($n=3, \pm \text{SEM}$, statistische Auswertung zu cESC feeder VD3 Tag 25)

Zusätzlich zur Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums wurde die Expression typischer osteogener Markergene über den Differenzierungszeitraum mittels semiquantitativer PCR (siehe Abschnitt 3.2.6) analysiert. In Abbildung 4.17 sind die Ergebnisse der PCR für cES-Zellen aus Feeder-freier Kultur dargestellt. Osteogen differenzierte Zellen (VD3) zeigen eine maximale Expression des osteoblasten-spezifischen Transkriptionsfaktors Cbfa1 an Tag 15 der Differenzierung. Zielgene von Cbfa1, wie Osteocalcin (OCN) und Bone Sialoprotein (BSP) zeigen eine frühe Expression an Tag 10 und einen terminalen,

Osteoblasten-spezifischen Expressionsanstieg an Tag 25 der osteogenen Differenzierung. Zellen der Kontrolldifferenzierung (Kontrolle) zeigen ein ähnliches Expressionsmuster der Markergene, jedoch ist die frühe Expression der Markergene erst an späteren Tagen während der Differenzierung detektierbar. Die terminale Expression des reifen Osteoblastenmarkers Osteocalcin ist auf die osteogen differenzierten Zellen an Tag 30 beschränkt (Abb.4.17). Anhand der Analyse der Expression von Osteoblastenmarkergenen sowie der hohen Kalziumkonzentration in der Matrix osteogen differenzierender cES-Zellen, sowie des hohen Mineralisierungsgrades gegenüber der Kontrolldifferenzierung zeigt sich, dass die osteogene Differenzierung von cES-Zellen mit EB-Formierungsschritt gegenüber der Differenzierung ohne EB-Formierung verstärkt ist.

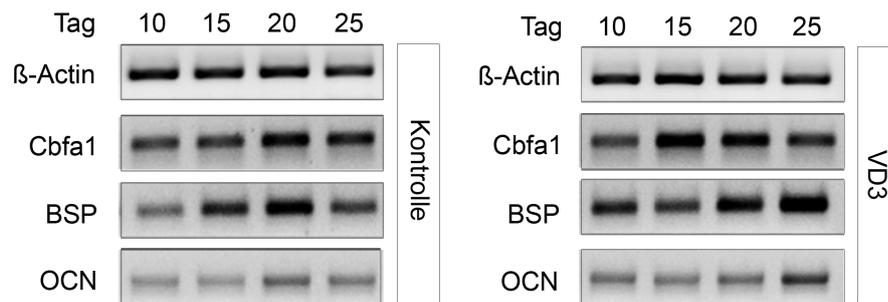


Abbildung 4.17: Analyse der Expression Osteoblasten-spezifischer Markergene während der Differenzierung von cES-Zellen aus Feederzell-freier Kultur. Die Expression der Gene Cbfa1, Bone Sialoprotein und Osteocalcin wurden an Tag 10, 15, 20 und 25 der osteogenen Differenzierung (VD3) mittels semiquantitativer PCR untersucht. Die Expression der Gene während der spontanen Differenzierung (Kontrolle) wurde zum Vergleich mit analysiert. Als Kontrollgen wurde das Haushaltsgen β -Actin mitgeführt.

4.5 Verstärkung der *Callithrix jacchus*

ES-Zelldifferenzierung durch Manipulation des zeitigen Wnt-Signalweges

Im Folgenden wurde untersucht, ob die osteogene Differenzierung von cES-Zellen, ähnlich wie die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen, durch die gezielte Manipulation des Wnt/ β -Catenin Signalweges in frühen Phasen der Differenzierung, beeinflusst werden kann. Die osteogene Differenzierung wurde mittels der Zellkluster-Methode (siehe 4.4.2) initiiert.

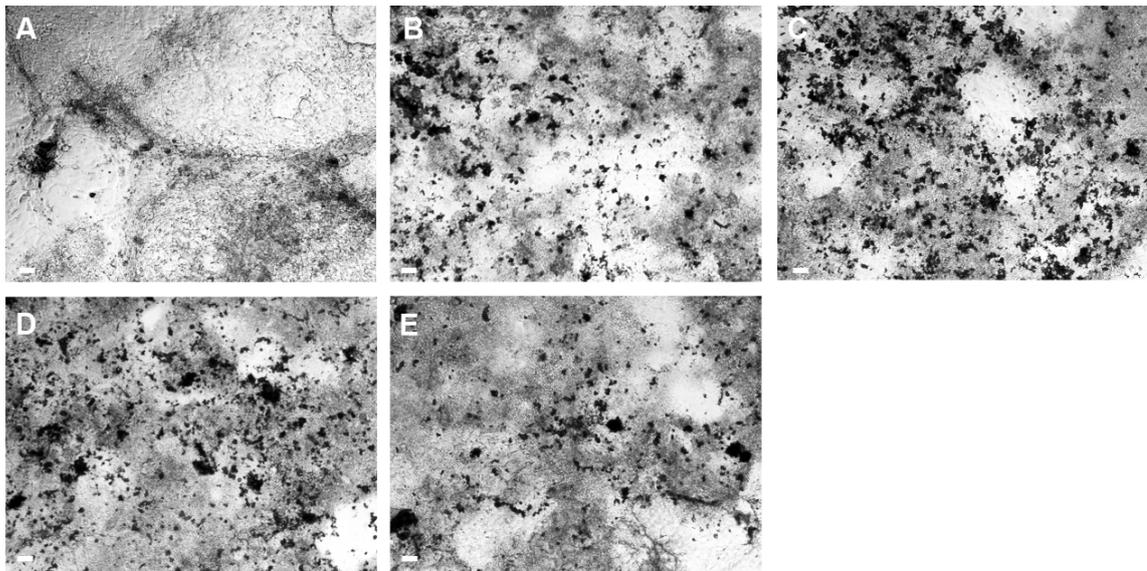


Abbildung 4.18: Osteogene Differenzierung von cES-Zellen unter dem Einfluss von Retinolsäure und LiCl. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen von Tag 30 der Differenzierung von (A) kontrolldifferenzierten cES-Zellen, (B) osteogen (VD3) differenzierten Zellen und osteogen differenzierten Zellen unter dem Einfluss von (C) Retinolsäure von Tag 0-3, (D) Retinolsäure von Tag 0-3 und LiCl von Tag 3-6, sowie (E) LiCl von Tag 3-6. (Messbalken 100 μm)

Von Tag 0-3 der Differenzierung wurde dem Medium Retinolsäure zugesetzt welche die nukleäre Aktivität des β -Catenins inhibiert. In einem zweiten Ansatz wurde zusätzlich von Tag 3-6 LiCl zugesetzt, um gezielt die β -Cateninmenge im Nukleus von Tag 3-6 zu erhöhen. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt welcher lediglich LiCl von Tag 3-6 der Differenzierung enthielt. In Abbildung 4.18 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Ansätze am Tag 30 der Differenzierung gezeigt. In der Kontrolldifferenzierung, ohne osteogene Zusätze sind keine schwarzen Bereiche (Mineralisierung) erkennbar. Die osteogene Differenzierung mit Retinolsäure von Tag 0-3 (Abb. 4.18 C) und zusätzlich mit LiCl von Tag 3-6 (Abb. 4.18 D) zeigen einen etwas höheren Mineralisierungsgrad als die osteogene Differenzierung ohne Retinolsäure und LiCl (Abb. 4.18 B). Die osteogene Differenzierung mit LiCl von Tag 3-6 zeigt etwas weniger Mineralisierung als die osteogene Differenzierung ohne Retinolsäure und LiCl (Abb. 4.18 E). Die Ergebnisse können durch die Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums bestätigt werden (Abb. 4.19). Eine Behandlung der Zellen mit Retinolsäure von Tag 0-3 führt zu einer Kalziummenge an Tag 30 der Differenzierung von $2,5 \mu\text{g} \pm 0,3$ Kalzium pro μg Protein, dies ist etwa 2,5 fach mehr im Vergleich zur unbehandelten osteogenen Differenzierung (VD3) mit einer Kalziummenge von $1,1 \mu\text{g} \pm 0,1$ Kalzium pro μg Protein. Eine einzelne Behandlung mit LiCl von Tag 3-6 führt zu keiner Erhöhung der Kalziummenge ($0,7 \mu\text{g} \pm 0,2$ Kalzium pro μg Protein) gegenüber der unbehandelten osteogenen Kontrolle. Auch in Kombination mit Retinolsäure kann durch die zusätzliche Gabe von LiCl keine weitere Erhöhung der Kalziummenge ($2,4 \mu\text{g} \pm 0,4$ Kalzium pro μg Protein) erreicht werden (Abb. 4.19).

4.6 Charakterisierung des Bioreaktorsystems unter Verwendung muriner ES-Zellen

Die Charakterisierung des Suspensions-Bioreaktorsystems der Firma DASGIP erfolgte mit murinen ES-Zellen. Es wurde das für murine ES-Zellen beschriebenen Protokoll zur osteogenen Differenzierung in statischer Kultur (siehe Abschnitt 3.1.3) auf die Differen-

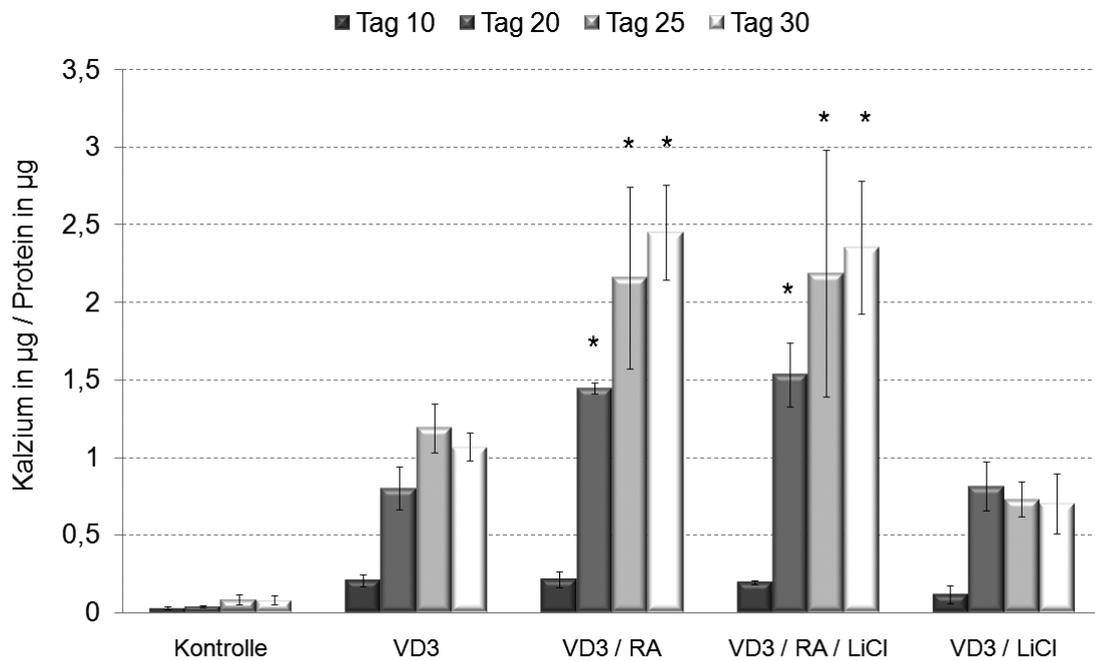


Abbildung 4.19: Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter cES-Zellen unter dem Einfluss von Retinolsäure und LiCl. Dargestellt ist die Menge des in die Matrix eingelagerten Kalziums pro μg Protein osteogen differenzierter cES-Zellen, welche von Tag 0-3 mit Retinolsäure behandelt wurden (VD3/RA) bzw. von Tag 0-3 mit Retinolsäure und von Tag 3-6 mit LiCl (VD3/RA/LiCl) bzw. von Tag 3-6 mit LiCl (VD3/LiCl). Vergleichend ist die Analyse für unbehandelte osteogen differenzierte Zellen (VD3) sowie kontrolldifferenzierte cES-Zellen ohne osteogene Substanzen (Kontrolle) dargestellt. ($n=3, \pm \text{SD}$, statistische Analyse zu VD3)

zierung im Bioreaktor übertragen. Zunächst wurde dafür die EB-Bildung im Bioreaktor unter dem Einfluss verschiedener Rührertypen (Blatt- und Propellerrührer) sowie unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten getestet. Anschließend wurden murine ES-Zellen für 30 Tage im Bioreaktor unter dem Einfluss von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D_3 zu Osteoblasten differenziert und die Menge des in die Matrix eingelagerten Kalziums mit Ergebnissen der statischen Differenzierung verglichen.

4.6.1 Auswirkungen des Rührertyps auf die EB-Größe und Uniformität

Es wurde die EB-Formierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor unter dem Einfluss zwei verschiedener Rührertypen (Propeller- und Blattrührer) verglichen. In Abbildung 4.20 A und B sind die Strömungsbilder der beiden verwendeten Rührer dargestellt. Der Propellerrührer (Abb. 4.20 A), welcher zu den axial fördernden Rührern gehört, fördert je nach Drehrichtung die Flüssigkeit primär nach unten oder nach oben. Vergleichbar ist das Prinzip mit dem einer Schiffsschraube, sie bewegt das Schiff je nach Drehrichtung vorwärts oder rückwärts.

Der Blattrührer ist ein radial fördernder Rührer (Abb. 4.20 B), welcher unabhängig zur Drehrichtung zu einer gleichzeitigen Verwirbelung der Flüssigkeit ober- und unterhalb des Rührers führt. In Abbildung 4.20 C und D sind Momentaufnahmen der laufenden Rührer bei 130rpm gezeigt. Dabei wurde das Medium (Wasser) mit Flitter versetzt um das Strömungsbild sichtbar zu machen. Der Flitter soll dabei die entstehenden EBs simulieren. Unter dem Einfluss des Blattrührers (Abb. 4.20 D) zeigt sich eine bessere Durchmischung der Suspensionskultur als unter dem Einfluss des Propellerrührers (Abb. 4.20 C). Um die Auswirkungen der beiden Rührertypen auf die EB-Entwicklung zu beurteilen wurden murine ES-Zellen wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben als Einzelzellen in die Bioreaktoren inokuliert. In Abbildung 4.21 sind murine EBs nach 5 tägiger Kultivierung im Suspensionsbioreaktor unter dem Einfluss von Propellerrührer (Abb. 4.21 A) und Blattrührer (Abb. 4.21 B) bei 130rpm gezeigt. EBs, generiert mit dem Propellerrührer (Abb. 4.21 A) sind größer und inhomogener als EBs welche unter dem Einfluss des Blattrührers generiert wurden (Abb. 4.21 B). Aufgrund der homogeneren EB-Bildung wurde für sämtliche weitere Versuche der Blattrührer verwendet.

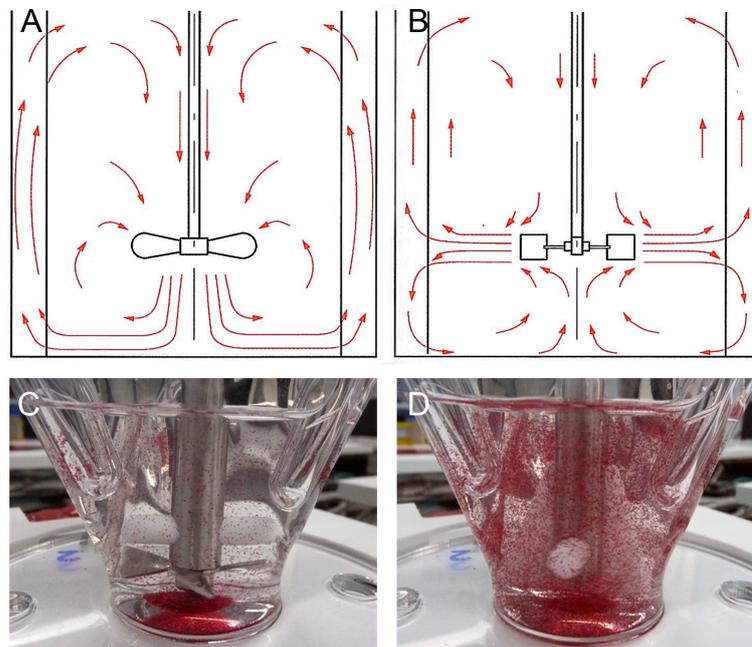


Abbildung 4.20: Strömungsbilder von Propeller- und Blattrührer. Dargestellt sind die Schemata der erzeugten Strömung von **A** Propellerrührer und **B** Blattrührer im Suspensionsbioreaktor. **C** und **D** zeigen Momentaufnahmen der laufenden Rührer bei 130rpm. Dabei wurde das Medium (Wasser) mit Flitter versetzt um die Strömungsbilder sichtbar zu machen. **C** zeigt den Suspensionsbioreaktor mit laufendem Propellerrührer bei 130rpm und Rührung im Uhrzeigersinn. **D** zeigt den laufenden Blattrührer bei 130rpm, ebenfalls mit Rührung im Uhrzeigersinn.

4.6.2 Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die EB-Formierung

Der Suspensionsbioreaktor der Firma DASGIP erlaubt unter den gewählten Einstellungen eine Rührgeschwindigkeit von bis zu 150rpm. Der auf die Zellen und Zellaggregate einwirkende Scherstress (Kraft pro bewegter Fläche) steigt mit zunehmender Rührgeschwindigkeit. Um den Einfluss verschieden hohen Scherstress auf die EB-Bildung zu untersuchen wurden murine ES-Zellen wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben als Einzelzellen in den Bioreaktor inokuliert.

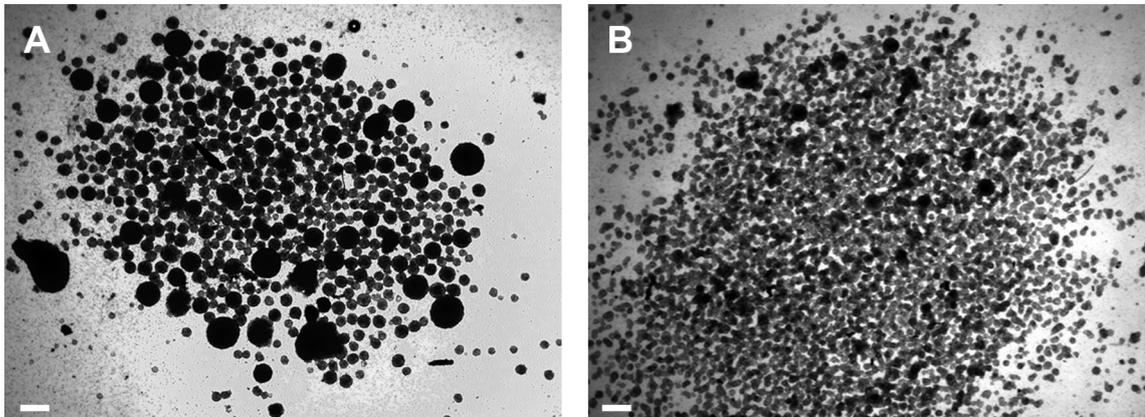


Abbildung 4.21: EB-Generierung muriner ES-Zellen im Suspensionsbioreaktor mit Propeller- und Blattrührer. **A** zeigt die resultierenden EBs nach 5 tägiger Kultivierung im Suspensionsbioreaktor mit Propellerrührer bei 130rpm. In **D** sind die EBs nach 5 tägiger Rührung mit dem Blattrührer bei 130rpm gezeigt. (Messbalken 100 μ m)

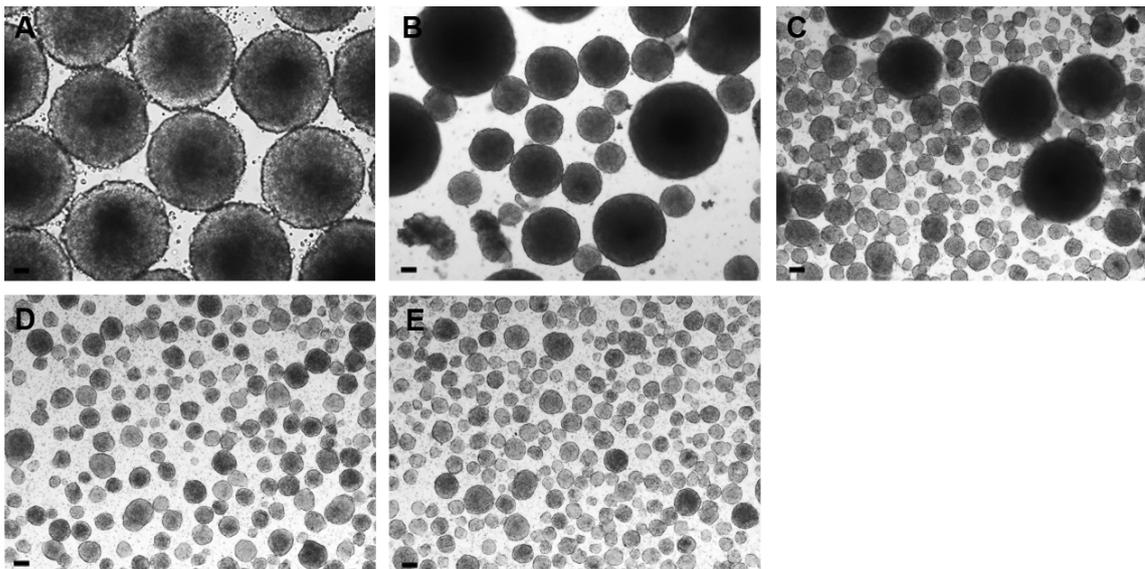


Abbildung 4.22: Murine EBs am Tag 5 der Differenzierung in statischer Kultur und im Bioreaktor unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen von murinen EBs nach 5 tägiger statischer Kultivierung nach dem hängenden Tropfen Protokoll (**A**) und im Bioreaktor bei einer Geschwindigkeit von **B** 90rpm, **C** 110rpm, **D** 130rpm und **E** 150rpm. (Messbalken 100 μ m)

Versuche mit niedrigen Rührgeschwindigkeiten zeigten, dass eine minimale Rührgeschwindigkeit von 90rpm notwendig ist um eine Aggregatbildung zu ermöglichen. Bei Rührgeschwindigkeiten kleiner 90rpm kommt es zur ungenügenden Durchmischung des Mediums. Die Zellen werden nicht regelmäßig aufgewirbelt und entstehende Aggregate kommen unterhalb des Rührers zum liegen (nicht gezeigt). Deshalb wurden zum Vergleich der EB-Bildung unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten die Geschwindigkeiten 90rpm, 110rpm, 130rpm und 150rpm gewählt. Vergleichend dazu wurde eine statische EB-Generierung nach dem Protokoll der hängenden Tropfen mitgeführt. In Abbildung 4.22 sind die resultierenden EBs unter den verschiedenen Rührgeschwindigkeiten sowie aus der statischen EB-Generierung am Tag 5 gezeigt. EBs, welche mit dem hängenden Tropfen Protokoll generiert wurden sind sehr gleichmäßig in Form und Größe.

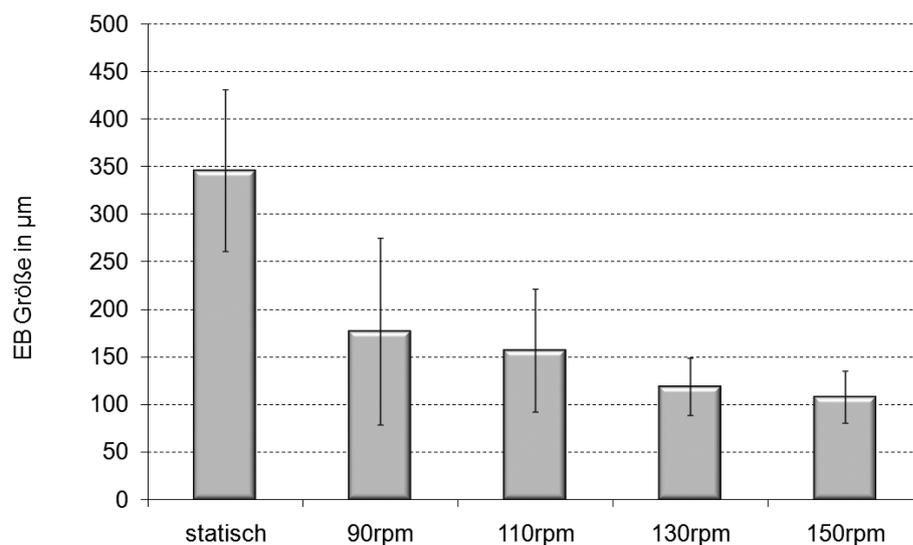


Abbildung 4.23: Größe muriner EBs an Tag 5 der Differenzierung unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten. Dargestellt sind die mittleren Größen muriner EBs an Tag 5 der Differenzierung aus statischer Differenzierung nach dem Protokoll der hängenden Tropfen (statisch) und im Bioreaktor bei einer Geschwindigkeit von 90rpm, 110rpm, 130rpm und 150rpm. ($n > 500, \pm \text{SEM}$)

Im Bioreaktor generierte EBs sind generell kleiner als die aus der hängenden Tropfen Kultur. Mit zunehmender Rührgeschwindigkeit werden die EBs kleiner. Dabei scheinen EBs bei höheren Rührgeschwindigkeiten (130 und 150rpm) gleichmäßiger in Form und Größe zu sein als EBs bei niedrigeren Rührgeschwindigkeiten (90 und 110rpm). Dieser optische Eindruck wird durch die Analyse der EB-Größen am Tag 5 bestätigt (Abb. 4.23). So haben EBs aus statischer Kultur am Tag 5 eine Größe von $345 \mu\text{m} \pm 84$. Mit zunehmender Rührgeschwindigkeit werden die EBs kleiner. So haben EBs aus dem Bioreaktor bei 90rpm eine Größe von $176 \mu\text{m} \pm 98$, bei 110rpm von $156 \mu\text{m} \pm 64$, bei 130rpm von $118 \mu\text{m} \pm 30$ und bei 150rpm von $107 \mu\text{m} \pm 27$. Auch die zunehmende Homogenität der EBs lässt sich durch die Auswertung der gemessenen EB-Größen unter den verschiedenen Bedingungen bestätigen (Abb. 4.24).

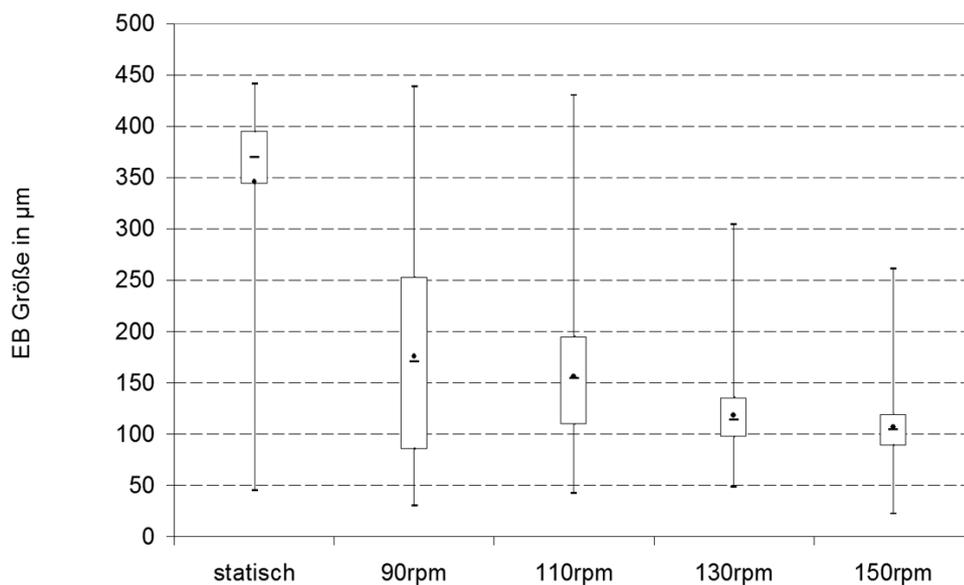


Abbildung 4.24: Boxplot-Darstellung der EB-Größen muriner ES-Zellen am Tag 5 der Differenzierung. Dargestellt ist das Boxplot-Diagramm für EBs am Tag 5 der statischen Differenzierung und der Differenzierung im Bioreaktor unter 90rpm, 110rpm, 130rpm und 150rpm. (- Mittelwert, · Median)

So zeigt die Boxplot-Darstellung der EB-Größen, dass mit zunehmender Rührgeschwindigkeit im Bioreaktor die Größenverteilung der EBs abnimmt, so zeigen 50% der EBs bei 90rpm eine Größe zwischen $86 \mu\text{m}$ und $252 \mu\text{m}$, dies umfasst eine Größenspanne von $166 \mu\text{m}$. Bei einer Rührgeschwindigkeit von 110rpm liegen 50% der EBs in einem Größenbereich zwischen $110 \mu\text{m}$ und $195 \mu\text{m}$ (Spanne $85 \mu\text{m}$), bei 130rpm zwischen $97 \mu\text{m}$ und $135 \mu\text{m}$ (Spanne $38 \mu\text{m}$) und bei 150rpm zwischen $89 \mu\text{m}$ und $119 \mu\text{m}$ (Spanne $30 \mu\text{m}$). In der statischen EB-Generierung über das hängende Tropfen Protokoll liegen 50% der EBs in einem Größenbereich zwischen $344 \mu\text{m}$ und $395 \mu\text{m}$ (Spanne $51 \mu\text{m}$). Dabei entspricht die Breite der Größenverteilung der statischen EB-Bildung (Spanne der Größe von 50% der EBs) in etwa der Breite der Verteilung im Bioreaktor bei 130rpm. Zusätzlich zur Analyse der Größe der murinen EBs unter den verschiedenen Rührgeschwindigkeiten wurde die Expression von Pluripotenzgenen und Differenzierungsgenen mittels semiquantitativer PCR (siehe Abschnitt 3.2.6) untersucht.

In Abbildung 4.25 ist vergleichend die Expression der beiden Pluripotenzgene *Nanog* und *Oct4* von murinen Zellen am Tag 5 der statischen Differenzierung nach dem Protokoll der hängenden Tropfen und im Bioreaktor bei 90rpm, 110rpm, 130rpm und 150rpm dargestellt. Zellen im Bioreaktor zeigen eine leicht erhöhte Expression der beiden Pluripotenzgene gegenüber den Zellen aus statischer Differenzierung. Der frühe mesodermale Differenzierungsmarker *Brachyury* (*Bra*) ist bei Rührgeschwindigkeiten von 90rpm, 110rpm und 130rpm geringer exprimiert als in statischer Kultur. Bei 150rpm liegt die Expressionsstärke von *Brachyury* etwa auf dem Niveau der statischen Differenzierung. Der endodermale Marker α -Fetoprotein (*AFP*) ist generell nur sehr schwach exprimiert. Wobei die Expressionsstärke des *AFP* von Zellen aus statischer Kultur mit der von Zellen aus dem Bioreaktor bei 130rpm vergleichbar ist. Die Expression des ektodermalen Markers *Neurofilament 68* (*NF68*) zwischen statischer Kultur und Bioreaktorkultivierung bei 90rpm ist vergleichbar. Mit steigender Rührgeschwindigkeit sinkt die Expression des *NF68* (Abb. 4.25). Aufgrund der Größenverteilung der EBs und der Auswertung der Genexpression unter den verschiedenen Rührgeschwindigkeiten im Bioreaktor im Vergleich

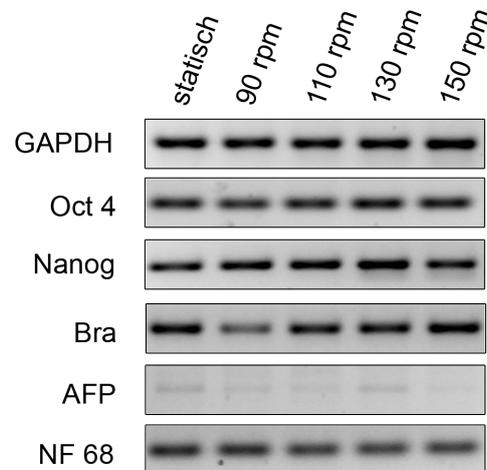


Abbildung 4.25: Semiquantitative Analyse der Genexpression muriner EBs an Tag 5 der Differenzierung. Dargestellt ist die Expression der beiden Pluripotenzgene Oct4 und Nanog, sowie der Differenzierungsmarker Brachyury (Bra, Mesoderm), α -Fetoprotein (AFP, Endoderm) und Neurofilament 68 (NF68, Ektoderm) für murine EBs am Tag 5 der statischen Differenzierung nach dem Protokoll der hängenden Tropfen und im Bioreaktor bei einer Rührgeschwindigkeit von 90rpm, 110rpm, 130rpm und 150rpm. Als Kontrollgen wurde das Haushaltsgen GAPDH mitgeführt.

zur statischen EB-Generierung wurde in allen weiteren Versuchen eine Rührgeschwindigkeit von 130rpm gewählt.

4.7 Vergleich der osteogenen Differenzierung von murinen ES-Zellen im Bioreaktor und in statischer Kultur

Im Folgenden ist die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer Kultur der osteogenen Differenzierung im Suspensionsbioreaktor bei 130rpm gegenübergestellt. Der Versuch soll den Einfluss der 3D Kultivierung unter gerührten Bedingungen auf die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen aufzeigen. Murine ES-Zellen wurden über

30 Tage im Bioreaktor wie unter Abschnitt 3.1.5 beschrieben differenziert. Vergleichend wurde eine statische Differenzierung wie unter Abschnitt 3.1.3 beschrieben mitgeführt.

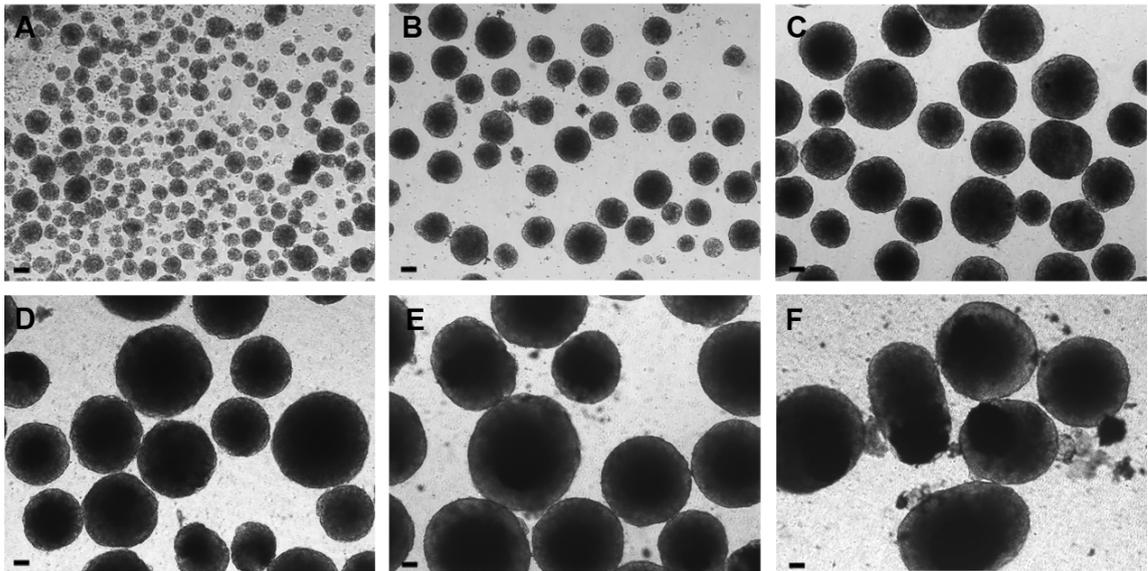


Abbildung 4.26: Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen im Suspensionsbioreaktor. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogen differenzierten Zellaggregate im Bioreaktor bei 130rpm, zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. **A** zeigt EBs am Differenzierungstag 5, **B** am Tag 10, **C** am Tag 15, **D** am Tag 20, **E** am Tag 25 und **F** am Tag 30. (Messbalken 100 μm)

In Abbildung 4.26 sind osteogen differenzierte Aggregate muriner ES-Zellen aus dem Suspensionsbioreaktor zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung gezeigt. Im Laufe der Differenzierung nehmen die Aggregate an Größe zu. Eine erhöhte Ausbreitung schwarzer Bereiche innerhalb der Zellaggregate, was für eine Mineralisierung der Matrix sprechen würde, sind aufgrund der hohen Packungsdichte der vitalen Zellen innerhalb der Aggregate nicht erkennbar. Lediglich am Tag 30 der Differenzierung (Abb. 4.26 F) sind aus den Aggregaten herausgelöste Kluster erkennbar, welche eine tief schwarze Färbung aufweisen. Die Analyse der Größe der Aggregate im Verlauf der Differenzierung im Bioreaktor bei 130rpm zeigt eine kontinuierliche Größenzunahme der Aggregate von $120 \mu\text{m} \pm 42 \mu\text{m}$ am Tag 5 der Differenzierung bis zu $560 \mu\text{m} \pm 170 \mu\text{m}$ am Tag 30 für

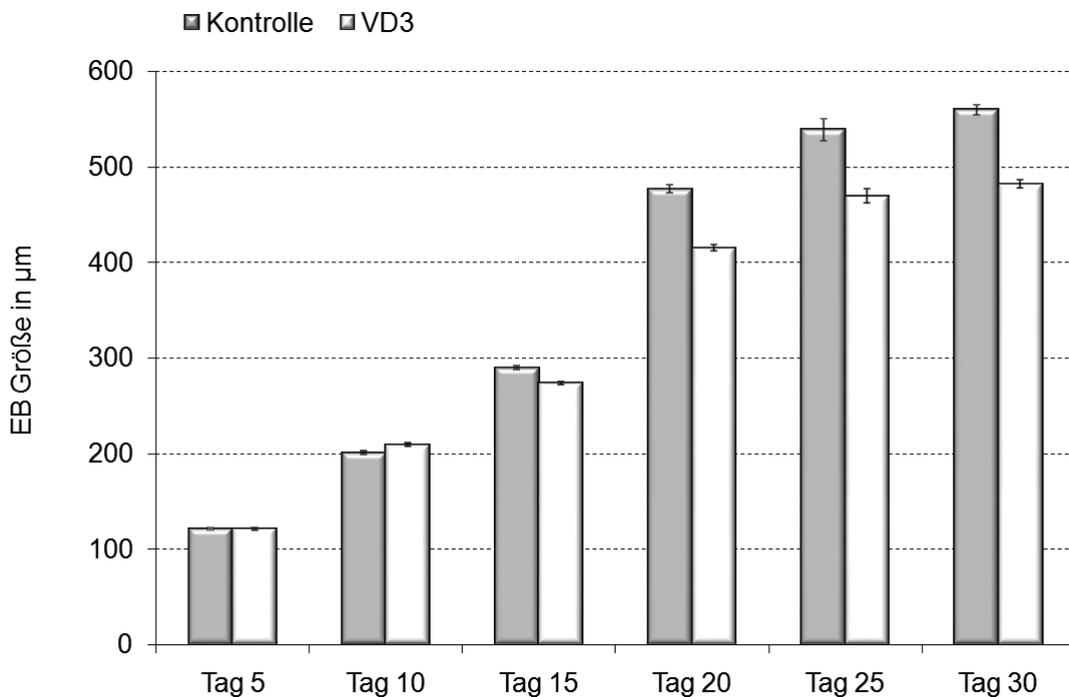


Abbildung 4.27: Größendarstellung der differenzierenden Aggregate muriner ES-Zellen im Bioreaktor. Dargestellt sind die mittleren Größen differenzierender muriner ES-Zellaggregate im Bioreaktor zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Dabei sind die Größen osteogen differenzierender Aggregate (VD3) und die Größe der Aggregate aus der Kontrolldifferenzierung ohne osteogene Zusätze (Kontrolle) gegenübergestellt. ($n > 500, \pm \text{SEM}$)

kontrolldifferenzierte Zellen und $482 \mu\text{m} \pm 137 \mu\text{m}$ für osteogen differenzierte Zellen. Der Größenunterschied zwischen kontroll- und osteogen differenzierten Aggregaten ist dabei statistisch nicht relevant.

Die statische Differenzierung muriner ES-Zellen zu Osteoblasten mittels Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D_3 ist in Abbildung 4.28 dargestellt. Während der Differenzierung kommt es zur Einlagerung von Kalzium in die durch Osteoblasten gebildete Matrix. Dieses Kalzium ist unter dem Lichtmikroskop ohne weitere Färbung als schwarzer Bereich sichtbar. Im Laufe der Differenzierung vergrößern sich diese

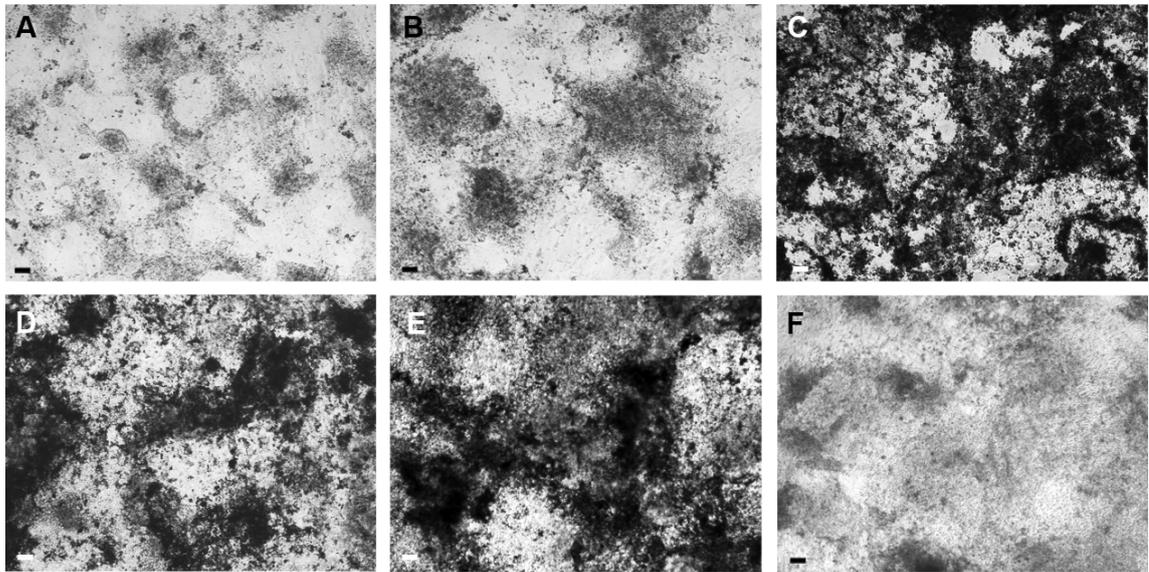


Abbildung 4.28: Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer Kultur. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen osteogen differenzierter muriner ES-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. **A** zeigt die osteogene Differenzierung am Tag 10, **B** am Tag 15, **C** am Tag 20, **D** am Tag 25 und **E** am Tag 30. In **F** ist die Kontrolldifferenzierung ohne osteogene Zusätze am Tag 30 der Differenzierung gezeigt. (Messbalken 100 μm)

schwarzen Bereiche, was für eine zunehmende Mineralisierung spricht. Etwa ab Tag 20 der statischen Differenzierung muriner ES-Zellen ist eine starke Kalzifizierung der Matrix erreicht (Abb. 4.28). Die Kontrolldifferenzierung ohne osteogene Medienzusätze zeigt an Tag 30 keine mineralisierten Bereiche (Abb. 4.28 F). Die quantitative Auswertung des in die Matrix eingelagerten Kalziums zeigt einen kontinuierlichen Kalziummengenanstieg für osteogen differenzierte Zellen in statischer Kultur auf bis zu $1,1 \mu\text{g} \pm 0,2$ Kalzium pro μg Protein am Tag 30. Im Vergleich dazu steigt die Kalziummenge im Bioreaktor nur auf einen signifikant ($p=0,0005$) niedrigeren Wert von $0,1 \mu\text{g} \pm 0,02$ Kalzium pro μg Protein am Tag 30 (Abb. 4.29).

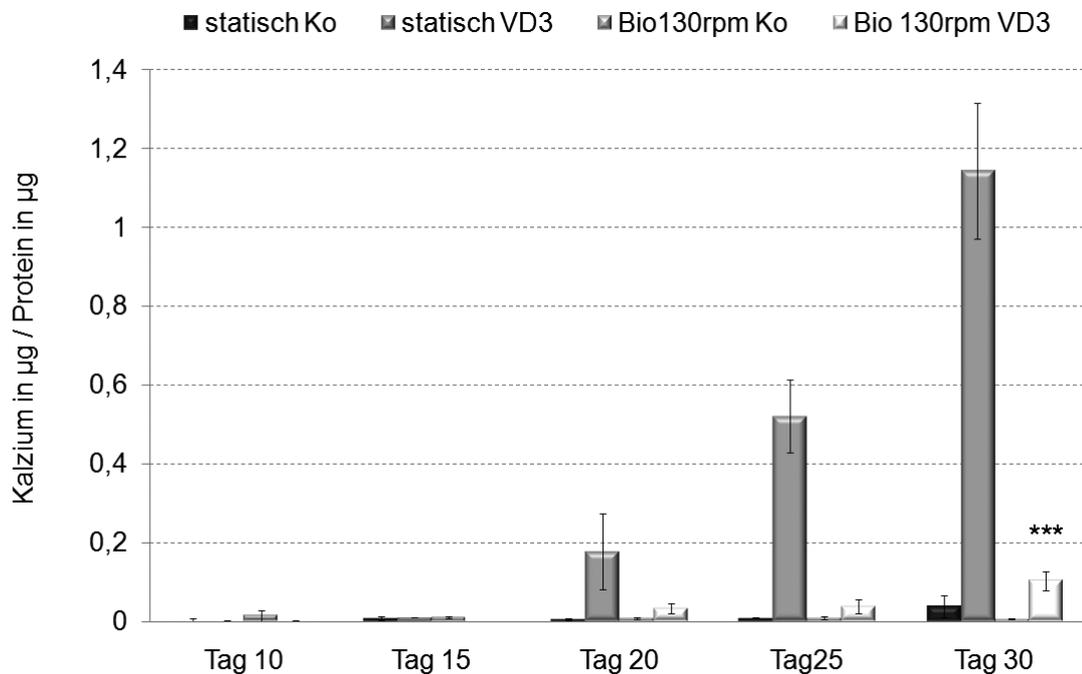


Abbildung 4.29: Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter muriner ES-Zellen im Bioreaktor im Vergleich zur statischen Differenzierung. Dargestellt ist die Menge des in die Matrix eingelagerten Kalziums pro μg Protein, über den gesamten Differenzierungszeitraum osteogen differenzierter muriner ES-Zellen im Bioreaktor bei 130rpm und in statischer Differenzierung (VD3). Vergleichend ist jeweils die Analyse für kontrolldifferenzierten Zellen ohne osteogene Zusätze (Kontrolle) mit dargestellt. ($n=3, \pm \text{SD}$, statistische Analyse zu statisch VD3 Tag 30)

In den Kontrolldifferenzierungen kommt es zu keinem signifikanten Anstieg der Kalziummenge. Die in die Matrix eingelagerte Kalziummenge von im Bioreaktor bei 130rpm differenzierten Zellen liegt somit nur bei rund 9% der Kalziummenge in statischer Kultur differenzierter Zellen. Auch die Färbung der mineralisierten Matrix mit Alizarin zeigt für statisch differenzierte murine ES-Zellen eine hohe Kalziumeinlagerung ab Tag 20 der Differenzierung (Abb. 4.30). Die Alizarinfärbung von geschnittenen Aggregaten aus dem Bioreaktor lässt eine Kalzifizierung der Aggregate ab Tag 25 der Differenzierung erken-

nen. Die Mineralisierung ist jedoch nicht gleichmäßig über das gesamte Aggregat verteilt, sie scheint auf Kernbereiche des Aggregats beschränkt zu sein (Abb. 4.30).

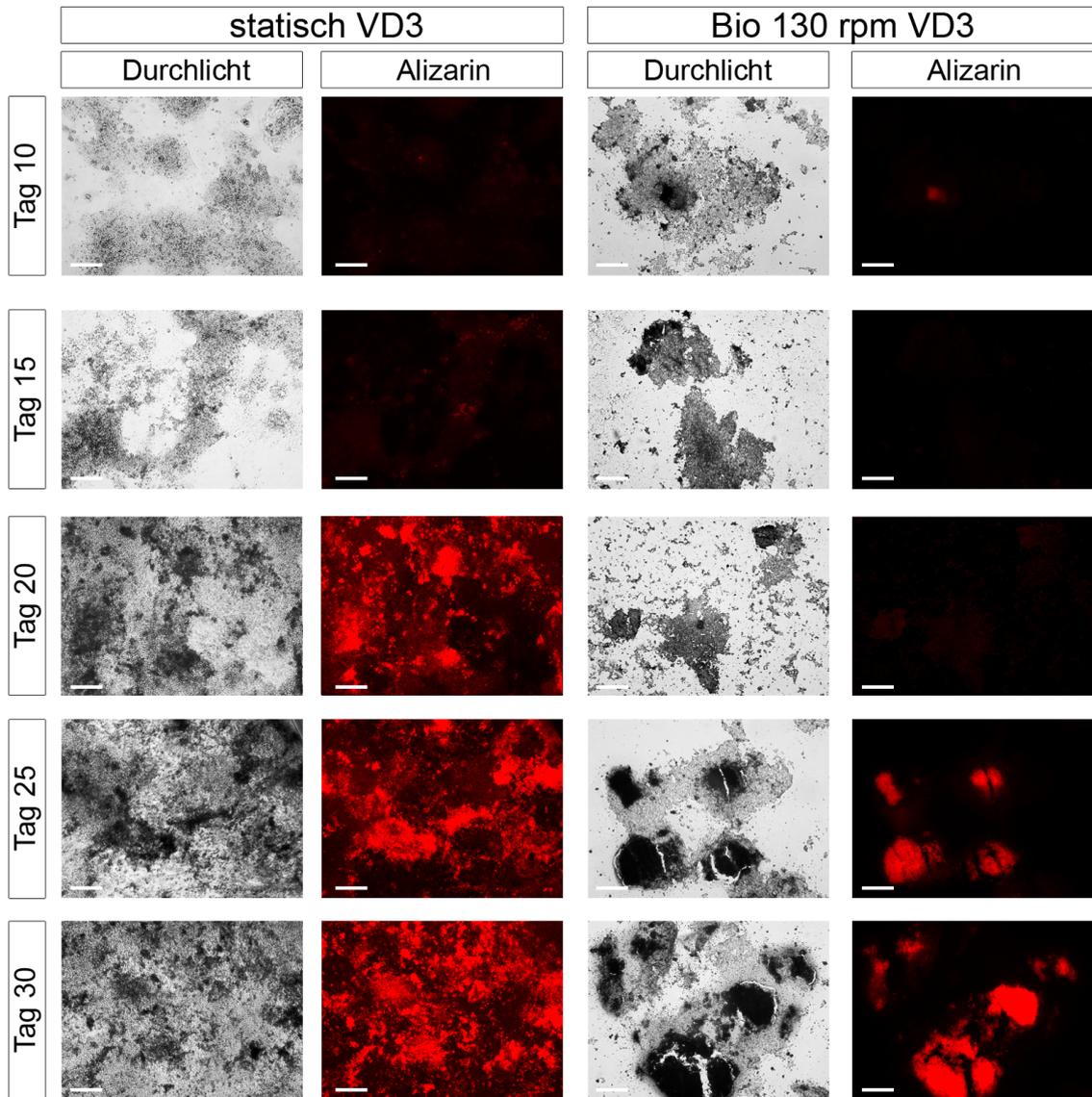


Abbildung 4.30: Alizarin Färbung kalzifizierter Bereiche osteogen differenzierter muriner ES-Zellen in statischer Kultur und im Bioreaktor. Dargestellt sind licht- sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der differenzierenden murinen ES-Zellen in statischer Kultur und im Bioreaktor. Zur Färbung wurden Kryoschnitte (Schnittdicke 50 μm) der Aggregate aus dem Bioreaktor verwendet. (Messbalken 100 μm)

4.8 Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultur

Im Abschnitt 4.7 wurde die Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor der statischen Differenzierung gegenübergestellt. Die Kultivierung im Bioreaktor unterscheidet sich zur statischen Kultivierung hauptsächlich in zwei Dingen: (1) die Zellen werden im Bioreaktor in einer 3D-Struktur (Aggregat) kultiviert und (2) sie werden gerührt. Um den Einfluss der 3D-Kultivierung auf die Differenzierung zu begutachten, wurde die Differenzierung im Bioreaktor der Differenzierung in statischer, nicht gerührter 3D-Kultur gegenübergestellt. Dazu wurden murine EBs mit der hängenden Tropfen Methode, wie unter Abschnitt 3.1.3 beschrieben, generiert. Am Tag 5 der Differenzierung wurden die EBs jedoch nicht enzymatisch in Einzelzellen zerlegt und ausplattiert sondern weiter bis Tag 30 der Differenzierung in Suspensionsplatten als intakte EBs kultiviert. In Abbildung 4.31 sind die Aggregate zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung gezeigt. Die Aggregate sind bereits am Tag 10 der Differenzierung sehr groß und nehmen bis Tag 30 kaum weiter an Größe zu. Sie sind sehr heterogen in ihrer Form und verwachsen teilweise miteinander (siehe Abb.4.31 C,D). Auch hier können aufgrund der hohen Packungsdichte der Zellen innerhalb der Aggregate kaum schwarze, mineralisierte Bereiche ausgemacht werden. Jedoch sind auch hier, wie für die Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor beschrieben (siehe dazu 4.7) am Tag 30 aus dem Aggregatverband herausgelöste, tief schwarze Kluster erkennbar (Abb.4.31 F). Die EBs, generiert über die hängende Tropfen Methode sind an Tag 5 mit $416 \mu\text{m} \pm 27 \mu\text{m}$ (Abb. 4.32) sehr viel größer als die EBs aus dem Bioreaktor bei 130rpm am Tag 5, mit $120 \mu\text{m} \pm 42 \mu\text{m}$ (siehe Abschnitt 4.7). In den folgenden Differenzierungstagen ist nur noch eine leichte Größenzunahme der EBs bis Tag 10 auf $480 \mu\text{m} \pm 111 \mu\text{m}$, für osteogen differenzierte Aggregate und $521 \mu\text{m} \pm 133 \mu\text{m}$ für kontrolldifferenzierte Aggregate, zu erkennen. Bis Tag 30 der Differenzierung bleibt die EB-Größe etwa stabil und erreicht an Tag 30 einen Wert von $460 \mu\text{m} \pm 212 \mu\text{m}$, für osteogen differenzierte Aggregate und $488 \mu\text{m} \pm 210 \mu\text{m}$ für kontrolldifferenzierte Aggre-

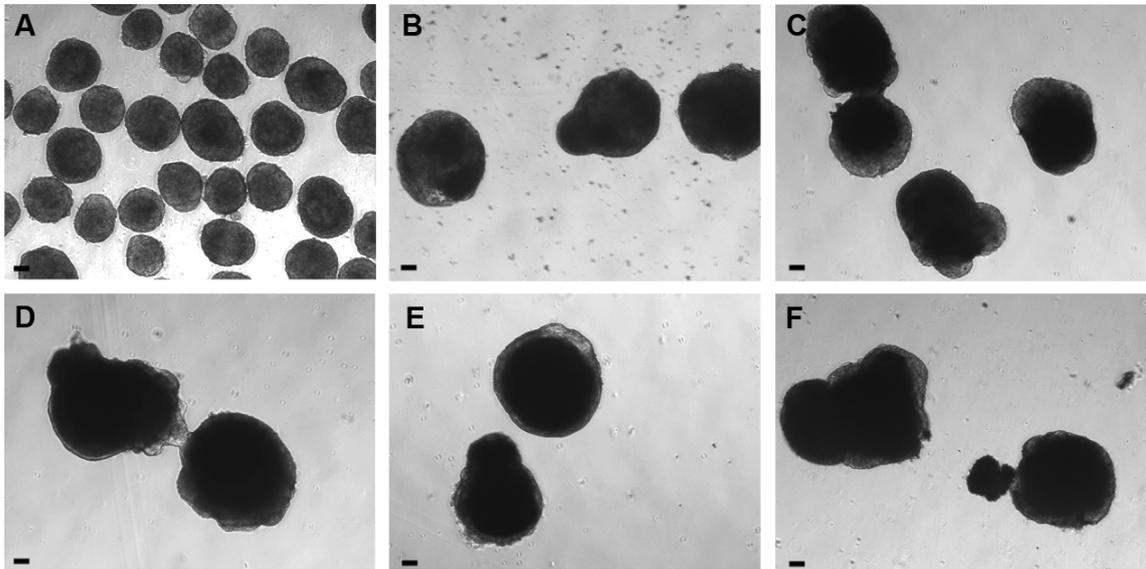


Abbildung 4.31: Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultur. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogen differenzierten Zellaggregate in statischer 3D-Kultur, zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. **A** zeigt EBs am Differenzierungstag 5, **B** am Tag 10, **C** am Tag 15, **D** am Tag 20, **E** am Tag 25 und **F** am Tag 30. (Messbalken 100 μm)

gate (Abb. 4.32). Zwischen kontroll- und osteogen differenzierten Aggregaten besteht dabei kein statistisch relevanter Unterschied.

Die quantitative Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums zeigt gegenüber der statischen 2D-Differenzierung, bei welcher die EBs an Tag 5 enzymatisch in Einzelzellen zerlegt und auf Zellkulturplatten ausgesät werden, einen Kalziumgehalt von $30\% \pm 9\%$ am Tag 30 der osteogenen Differenzierung (Abb. 4.33). Im Vergleich zur Differenzierung im Bioreaktor, mit einer Kalziummenge von $9\% \pm 3\%$ am Tag 30 (relativ zur statischen 2D-Kultivierung) liegt die Kalziummenge der statischen 3D-Kultur jedoch signifikant ($p=0,02$) höher. Die Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultur, also in intakten Aggregaten, führt somit im Vergleich zur statischen 2D-Kultur, bei welcher die Zellen ab Tag 5 in einer Einzelschicht kultiviert werden, zu einer geringeren eingelagerten Kalziummenge. Jedoch ist die Ausbeute gegenüber der osteogenen Differenzierung der Aggregate im Bioreaktor, also in gerührter 3D-Kultur, höher.

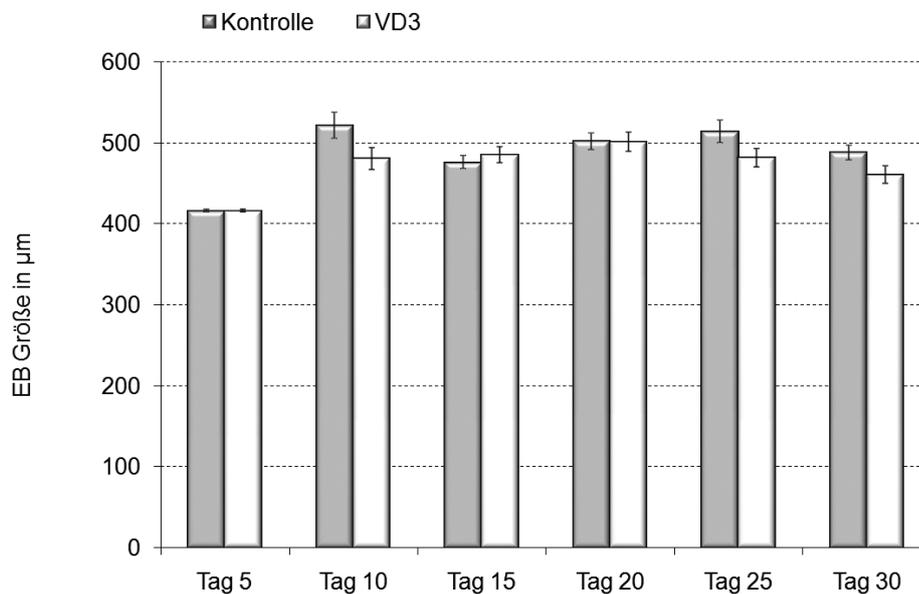


Abbildung 4.32: Größendarstellung der differenzierenden Aggregate muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultur. Dargestellt sind die mittleren Größen differenzierender muriner ES-Zellaggregate in statischer 3D-Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Dabei sind die Größen osteogen differenzierender Aggregate (VD3) und die Größe der Aggregate aus der Kontrolldifferenzierung ohne osteogene Zusätze (Kontrolle) gegenübergestellt. ($n > 500, \pm \text{SEM}$)

4.9 Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen auf einem Rotationsschüttler

Im Abschnitt 4.8 wurde die Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultur der Differenzierung im Bioreaktor gegenübergestellt. Dadurch konnte der Einfluss der Rührung der 3D-Aggregate auf die osteogene Differenzierung ermittelt werden. Die Kultivierung im Bioreaktor, und die damit verbundene Rührung hat die Erzeugung von Scherstress auf die Zellen bzw. Aggregate zur Folge.

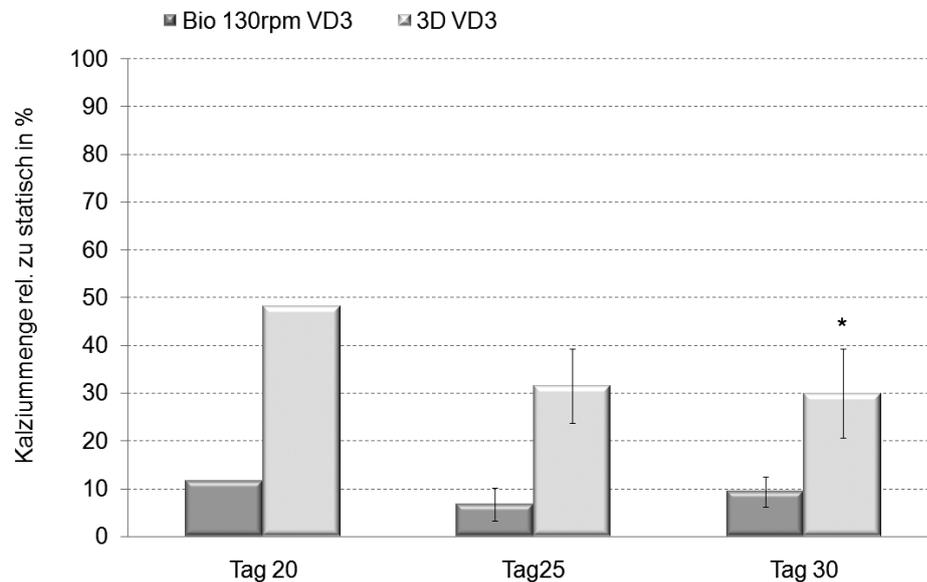


Abbildung 4.33: Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultivierung im Vergleich zur Kultivierung im Bioreaktor. Gezeigt sind die relativen Mengen des in die Matrix eingelagerten Kalziums von Tag 20, Tag 25 und Tag 30 der statischen 3D- und der Bioreaktor-Differenzierung (VD3). Die Daten sind prozentual zur statischen Einzelzellschicht-Differenzierung dargestellt. (n=3, \pm SD, statistische Analyse zu statisch VD3 Tag 30)

Jedoch ist die Rührung in einem Bioreaktor, bei der durch einen speziell gewählten Rührertyp die Aggregate immer wieder aufgewirbelt werden, nicht die einzige bekannte Methode zur Erzeugung von Scherstress auf Zellen bzw. Aggregate. So beschrieben Carpenedo und Mitarbeiter den Einsatz eines Rotationsschüttlers zur Erzeugung von uniformen EBs aus murinen ES-Zellen [52]. Im Folgenden ist die EB-Formierung und anschließende osteogene Differenzierung auf einem Rotationsschüttler bei 70rpm gezeigt und der Bioreaktordifferenzierung gegenübergestellt. Das Experiment soll die Vergleichbarkeit verschiedener Scherstress-erzeugender Systeme auf die Osteoblastenausbeute der gerichteten Differenzierung muriner ES-Zellen zeigen. Murine ES-Zellen wurden wie in Abschnitt 3.1.5 für die Inokulation der Zellen in die Suspensionsbioreaktoren beschrie-

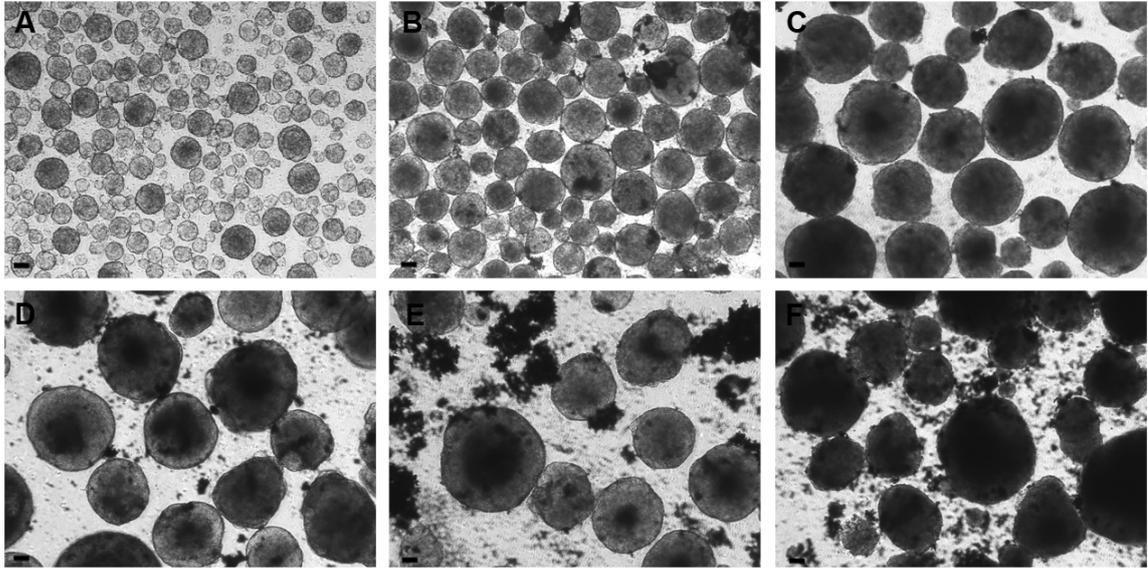


Abbildung 4.34: Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen auf einem Rotationsschüttler. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogen differenzierten Zellaggregate auf einem Rotationsschüttler, zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. **A** zeigt EBs am Differenzierungstag 5, **B** am Tag 10, **C** am Tag 15, **D** am Tag 20, **E** am Tag 25 und **F** am Tag 30. (Messbalken 100 μm)

ben, enzymatisch in Einzelzellen zerlegt und die Zellzahl pro ml Medium eingestellt. Die Zellsuspension wurde dann in 6-Kavitäten Suspensionplatten bei 70rpm auf einem Rotationsschüttler in Kontrolldifferenzierungsmedium geschüttelt. Am Tag 5 der Differenzierung wurde zur osteogenen Differenzierung Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D_3 dem Medium zugesetzt. Die entstandenen Aggregate wurden anschließend für weitere 25 Tage auf dem Rotationsschüttler geschüttelt. In Abbildung 4.34 sind die Aggregate zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung gezeigt. Die EBs nehmen im Laufe der Differenzierung an Größe zu. Aus den Aggregaten herausgelöste schwarze Kluster sind ab Tag 20 der osteogenen Differenzierung erkennbar (Abb. 4.34), ihre Anzahl bzw. Größe nimmt bis Tag 30 noch zu. Die Größe der EBs steigt kontinuierlich von $73 \mu\text{m} \pm 15 \mu\text{m}$ ab Tag 5 der Differenzierung bis auf einen Wert von $470 \mu\text{m} \pm 148 \mu\text{m}$ für kontrolldifferenzierte und $562 \mu\text{m} \pm 153 \mu\text{m}$ für osteogen dif-

ferenzierte EBs am Tag 30 der Differenzierung (Abb. 4.35). Die EBs auf dem Rotationsschüttler sind somit am Tag 5 der Differenzierung etwa gleich groß zu EBs aus dem Bioreaktor, welche eine Größe von $120 \mu\text{m} \pm 42 \mu\text{m}$ haben (siehe Abschnitt 4.7). Am Tag 30 der Differenzierung sind osteogen differenzierte Aggregate sowohl aus dem Bioreaktor ($482 \mu\text{m} \pm 137 \mu\text{m}$, siehe 4.7) als auch aus der statischen 3D-Kultur ($460 \mu\text{m} \pm 212 \mu\text{m}$, siehe 4.8) in ihrer Größe mit den Aggregaten vom Rotationsschüttler ($562 \mu\text{m} \pm 153 \mu\text{m}$) vergleichbar.

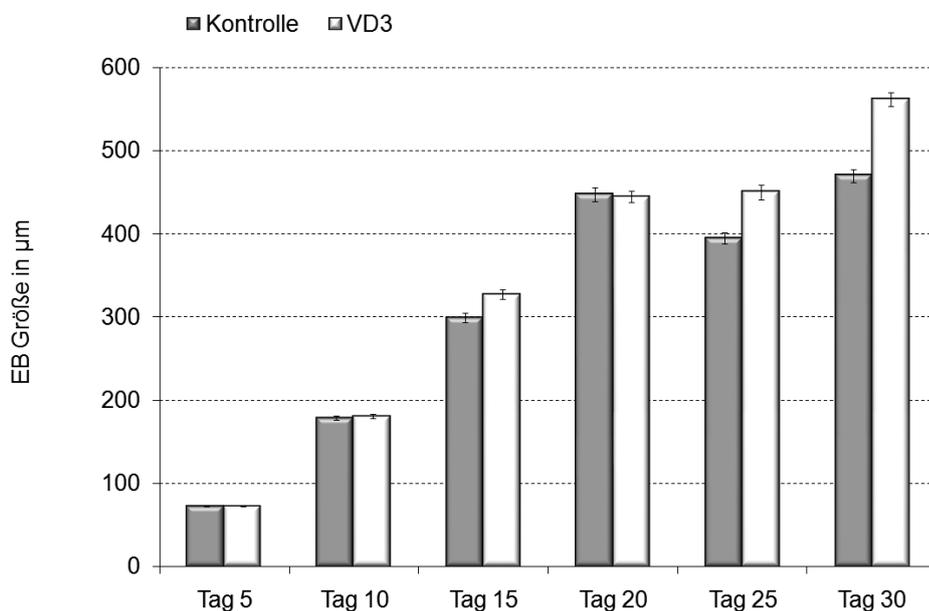


Abbildung 4.35: Größendarstellung der differenzierenden Aggregate muriner ES-Zellen auf einem Rotationsschüttler. Dargestellt sind die mittleren Größen differenzierender muriner ES-Zellaggregate auf einem Rotationsschüttler zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Dabei sind die Größen osteogen differenzierender Aggregate (VD3) und die Größe der Aggregate aus der Kontrolldifferenzierung ohne osteogene Zusätze (Kontrolle) gegenübergestellt. ($n > 500, \pm \text{SEM}$)

Die quantitative Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums zeigt gegenüber der statischen 2D-Differenzierung, bei welcher die EBs an Tag 5 in enzymatisch in Einzelzellen zerlegt und auf Zellkulturplatten ausgesät werden, einen Kalziumgehalt von

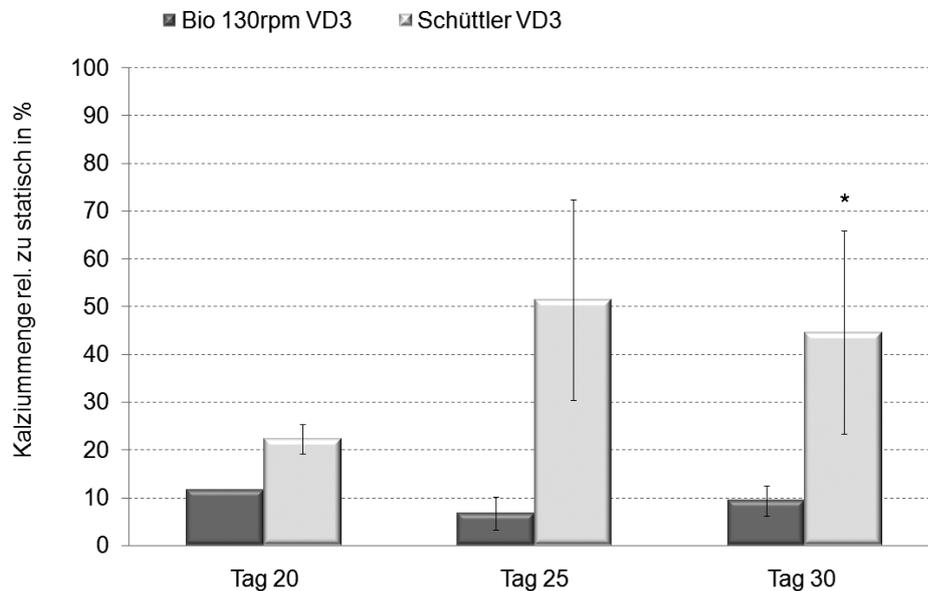


Abbildung 4.36: Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter muriner ES-Zellen auf einem Rotationsschüttler im Vergleich zur Kultivierung im Bioreaktor. Gezeigt sind die relativen Mengen des in die Matrix eingelagerten Kalziums von Tag 20, Tag 25 und Tag 30 der osteogen differenzierten Zellen auf einem Rotationsschüttler und im Bioreaktor (VD3). Die Daten sind prozentual zur statischen Einzelzellschicht-Differenzierung dargestellt. (n=3, \pm SD, statistische Analyse zu statisch VD3 Tag 30)

45 % \pm 21 % am Tag 30 der osteogenen Differenzierung (Abb. 4.36). Im Vergleich zur Differenzierung im Bioreaktor, mit einer Kalziummenge von 9 % \pm 3 % am Tag 30 (relativ zur statischen 2D-Kultivierung) liegt die Kalziummenge der Differenzierung auf dem Rotationsschüttler signifikant ($p=0,047$) höher. Die Differenzierung muriner ES-Zellen auf einem Rotationsschüttler führt somit im Vergleich zur statischen 2D-Kultur, bei welcher die Zellen ab Tag 5 in einer Einzelzellschicht kultiviert werden, zu einer geringeren Osteoblastenausbeute. Jedoch ist die Ausbeute gegenüber der osteogenen Differenzierung der Aggregate im Bioreaktor höher. Die Menge des in die Matrix eingelagerten Kalziums ist dabei zwischen der statischen, nicht gerührten 3D-Kultivierung (30 % \pm 9 %,

relativ zur statischen 2D-Kultivierung) und der osteogenen Differenzierung auf einem Rotationsschüttler ($45 \% \pm 21 \%$) vergleichbar.

4.10 Einfluss der EB-Bildungsstrategie auf die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die osteogene Differenzierung in statischer 2D- und 3D-Kultur der Differenzierung im Bioreaktor und auf einem Rotationsschüttler gegenübergestellt. Je nach Kultivierungsart ergaben sich, unterschiedlich hohe Mengen an in die Matrix eingelagertem Kalzium an Tag 30 der Differenzierung. Im Folgenden soll der Einfluss der ersten 5 Differenzierungstage, also bis zum Zeitpunkt des gebildeten Mesoderms, auf die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen untersucht werden. Dabei wird die EB-Generierung (Tag 0 bis Tag 5) durch die hängende Tropfen Methode der EB-Generierung unter gerührten bzw. geschüttelten Bedingungen (Bioreaktor und Rotationsschüttler) gegenübergestellt. Um das osteogene Differenzierungspotential der unter den verschiedenen Bedingungen generierten EBs zu vergleichen wurden alle EBs ab Tag 5 enzymatisch in Einzelzellen zerlegt und in Zellkulturplatten, wie für die statische 2D-Kultivierung beschrieben (Abschnitt 3.1.3) ausgesät. Ab diesem Tag wurde das Medium zur gerichteten osteogenen Differenzierung der Zellen mit Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D_3 versetzt und die Zellen für weitere 25 Tage kultiviert. In Abbildung 4.37 sind Aufnahmen der generierten EBs am Tag 5 der Differenzierung gezeigt. Die mittels der hängenden Tropfen Methode generierten EBs sind wesentlich größer als EBs vom Rotationsschüttler und aus dem Bioreaktor (Abb. 4.37). EBs aus dem Bioreaktor sind etwas kleiner als EBs vom Rotationsschüttler. Die Analyse der Genexpression der Zellen aus den verschieden generierten EBs am Tag 5 der Differenzierung (Abb. 4.38) zeigt eine leicht erhöhte Expression des Pluripotenzgens Oct4 durch die Kultivierung im Bioreaktor und auf dem Rotationsschüttler im Vergleich zur EB-Generierung durch die hängende Tropfen Methode (statisch). Der Pluripotenzmarker

Nanog zeigt eine gleich hohe Expression bei allen drei Kultivierungssystemen. Durch die Kultivierung im Bioreaktor ist die Expression des frühen Mesodermmarkers Brachyury (Bra) am Tag 5 der Differenzierung niedriger als in statischer EB-Generierung. Durch die EB-Generierung auf dem Rotationsschüttler hingegen ist die Brachyury-Expression am Tag 5 der Differenzierung erhöht, im Gegensatz zur statischen Kultivierung. Der endodermale Marker α -Fetoprotein (AFP), sowie der extodermale Marker Neurofilament 68 (NF68) sind in allen drei Kultursystemen am Tag 5 nur schwach exprimiert. Ihre Expressionsstärke ist für alle Systeme vergleichbar (Abb. 4.38).

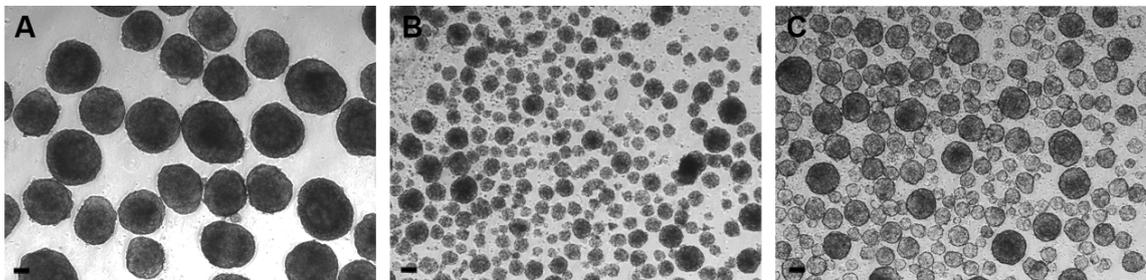


Abbildung 4.37: EB-Generierung durch das Protokoll der hängenden Tropfen, im Bioreaktor und auf dem Rotationsschüttler im Vergleich. Gezeigt sind Aufnahmen von murinen EBs am Tag 5, generiert durch **A** das hängende Tropfen Protokoll **B** im Bioreaktor bei 130rpm und **C** auf einem Rotationsschüttler bei 70rpm. (Messbalken 100 μ m)

In Abbildung 4.39 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung nach EB-Generierung in statischer Kultur, auf dem Rotationsschüttler und im Bioreaktor gezeigt. Bereiche kalzifizierter Matrix erscheinen unter dem Lichtmikroskop ohne zusätzlich Färbung schwarz. Der Anteil der schwarzen Bereiche ist in den osteogenen Differenzierungskulturen der drei verschiedenen Ansätzen etwa gleich (Abb 4.39). Auch die quantitative Analyse des in die Matrix der Zellen eingelagerten Kalziums zeigt keinen signifikanten Unterschied in den Kalziummengen der osteogenen Differenzierung der drei verschiedenen Kultursysteme (Abb. 4.40). So zeigt die osteogene Differenzierungskul-

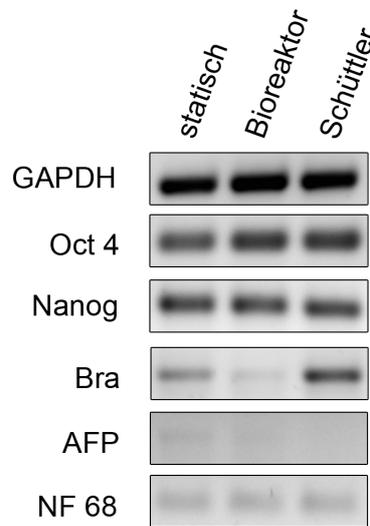


Abbildung 4.38: Analyse der Genexpression muriner EBs aus hängender Tropfen Kultur, aus dem Bioreaktor und vom Rotationsschüttler am Tag 5. Dargestellt ist die Expression der beiden Pluripotenzgene Oct4 und Nanog, sowie der Differenzierungsmarker Brachyury (Bra, Mesoderm), α -Fetoprotein (AFP, Endoderm) und Neurofilament 68 (NF68, Ektoderm) für murine EBs am Tag 5 der statischen Differenzierung nach dem Protokoll der hängenden Tropfen, im Bioreaktor bei 130rpm und auf einem Rotationsschüttler bei 70rpm. Als Kontrollgen wurde das Haushaltsgen GAPDH mitgeführt.

tur von im Bioreaktor generierten EBs einen Kalziumgehalt von $110\% \pm 31\%$ (relativ zur osteogenen Differenzierung von EBs aus hängender Tropfen Kultur). Die osteogene Kultur von auf dem Rotationsschüttler generierten EBs hat am Tag 30 der Differenzierung einen relativen Kalziumgehalt von $106\% \pm 42\%$ (Abb. 4.40).

Die Art der EB-Generierung, ob statisch, geschüttelt oder gerührt, hat somit einen Einfluss auf die Expressionsstärke des mesodermalen Markers Brachyury am Tag 5 der Differenzierung, jedoch keinen Einfluss auf die in die Matrix der Zellen eingelagerte Kalziummenge an Tag 30 der Differenzierung.

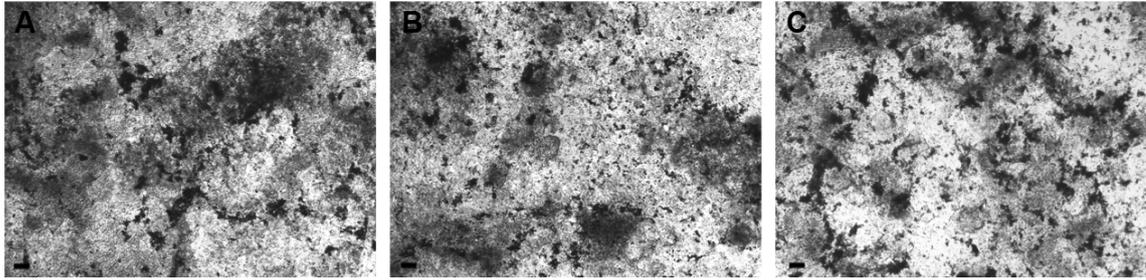


Abbildung 4.39: Osteogene Differenzierung muriner EBs generiert durch das hängende Tropfen Protokoll, im Bioreaktor und auf einem Rotationsschüttler. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierungskultur muriner EBs generiert **A** in statischer Kultur durch das Protokoll der hängenden Tropfen, **B** im Bioreaktor bei 130rpm und **C** auf einem Rotationsschüttler bei 70rpm. (Messbalken 100 µm)

4.11 Formierung von EBs von *Callithrix jacchus*

ES-Zellen im Bioreaktor

Zur osteogenen Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen im Suspensionsbioreaktor wurde zunächst die EB-Entwicklung im Bioreaktor bis Tag 5 der Differenzierung untersucht. Dies beinhaltete den Vergleich der EB-Bildung nach Inokulation von Einzelzellen und nach der Inokulation von Zellklustern, sowie die Untersuchung der Größenentwicklung und Genexpression der *Callithrix jacchus* EBs bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten.

4.11.1 Inokulation der Zellen in den Bioreaktor

Murine ES-Zellen werden zur osteogenen Differenzierung als Einzelzellen in den Suspensionsbioreaktor inokuliert. Diese Einzelzellen wachsen in den ersten Tagen zu Zellaggregaten, den EBs aus. Die entstandenen EBs sind, wenn auch geringerer Größe, mit EBs generiert durch das Protokoll der hängenden Tropfen vergleichbar (siehe Abschnitt

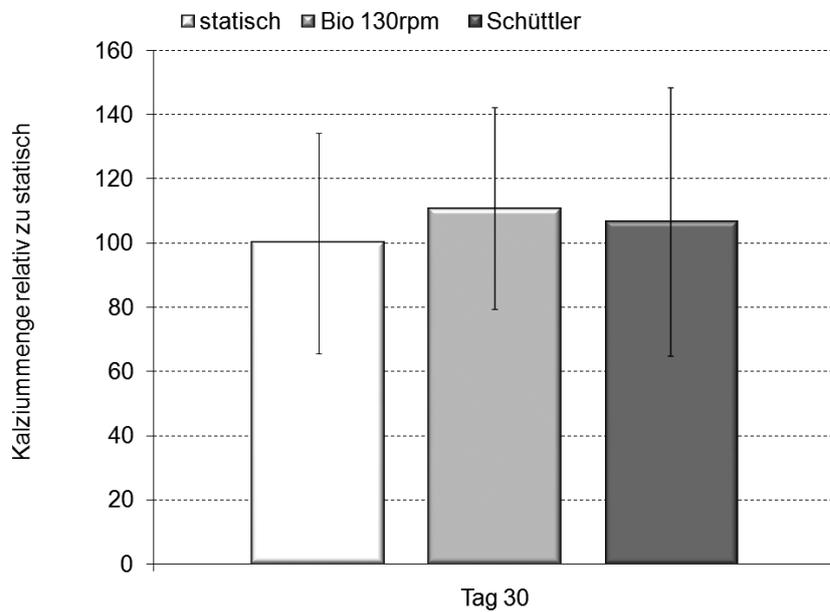


Abbildung 4.40: Quantitative Analyse des Kalziums an Tag 30 der osteogenen Differenzierung nach EB-Generierung durch hängende Tropfen, im Bioreaktor und auf dem Rotationsschüttler. Gezeigt sind die relativen Mengen des in die Matrix eingelagerten Kalziums am Tag 30 der osteogen differenzierten Zellen nach 5 tägiger EB-Generierung im Bioreaktor bei 130rpm und auf einem Rotationsschüttler (VD3). Die Daten sind prozentual zur statischen Einzelzellschicht-Differenzierung (statisch VD3) dargestellt. (n=3, ± SD)

4.6.2). Bei der *Callithrix jacchus* EB-Generierung in statischer Kultur konnte gezeigt werden, dass einmal enzymatisch in Einzelzellen zerlegte cES-Zellen kaum wieder zu Zellaggregaten auswachsen. Eine EB-Entwicklung aus *Callithrix jacchus* ES-Zellen ist nur durch die teilweise Dissoziation der ES-Zellkolonien in Zellcluster möglich. Diese Zellcluster werden für 5 Tage in Suspensionsplatten kultiviert und wachsen in dieser Zeit zu EBs aus (siehe Abschnitt 4.3). Zur EB-Bildung im Bioreaktor wurde nun ebenfalls untersucht, ob eine EB-Bildung aus Einzelzellen möglich ist, oder ob auch hier eine Inokulation von Zellclustern nötig ist. Dazu wurden cES-Zellkolonien, wie murine ES-Zellen in Einzelzellen dissoziiert (siehe 3.1.3), bzw. wie unter Abschnitt 3.1.6 beschrieben in Zellcluster

zerlegt und in den Bioreaktor inokuliert. Zur Untersuchung der EB-Entwicklung von cES-Zellen im Bioreaktor wurde zunächst eine Rührgeschwindigkeit von 130rpm gewählt. In Abbildung 4.41 sind die resultierenden EBs an Tag 5 der Differenzierung nach Inokulation von Einzelzellen und nach Inokulation von Zellklustern gezeigt. Auch im Bioreaktor kann nach Dissoziation der cES-Zellen in Einzelzellen keine Aggregatbildung beobachtet werden (4.41 A). Die cES-Zellen liegen am Tag 5 der Differenzierung immer noch in Einzelzellen vor. Durch die Inokulation von Zellklustern kann, wie auch für die statische EB-Generierung, eine gute EB-Bildung gezeigt werden (4.41 B).

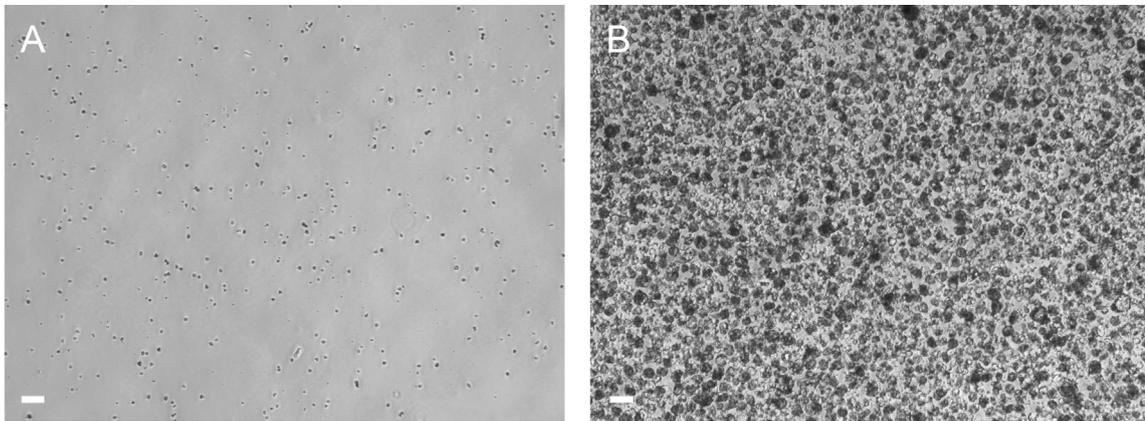


Abbildung 4.41: *Callithrix jacchus* EB-Entwicklung im Bioreaktor bei 130rpm, nach Inokulation von Einzelzellen und Zellklustern. Dargestellt sind Aufnahmen der EBs an Tag 5 der cES-Zelldifferenzierung im Bioreaktor bei 130rpm, nach Inokulation von **A** Einzelzellen und von **B** Zellklustern. (Messbalken 100 µm)

4.11.2 Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die EB-Formierung

Im Folgenden wurde der Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die EB-Entwicklung von cES-Zellen im Bioreaktor untersucht. Dazu wurden cES-Zellen wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben als Zellkluster in die Bioreaktoren mit einer Rührgeschwindigkeit von 90rpm, 110rpm, 130rpm und 150rpm inokuliert. In Abbildung 4.42 sind die resultierenden EBs

an Tag 5 der Differenzierung gezeigt und der statischen EB-Generierung in Suspensionschalen gegenübergestellt. Im Bioreaktor gegenerierte EBs sind generell etwas kleiner als EBs aus statischer Kultivierung. Zwischen den EBs der einzelnen Rührgeschwindigkeiten sind kaum Größenunterschiede erkennbar (Abb. 4.42 B-F). In Abbildung 4.43 sind die mittleren Größen der EBs an Tag 5 der Differenzierung gezeigt. EBs aus statischer Kultur haben am Tag 5 eine Größe von $82 \mu\text{m} \pm 38 \mu\text{m}$.

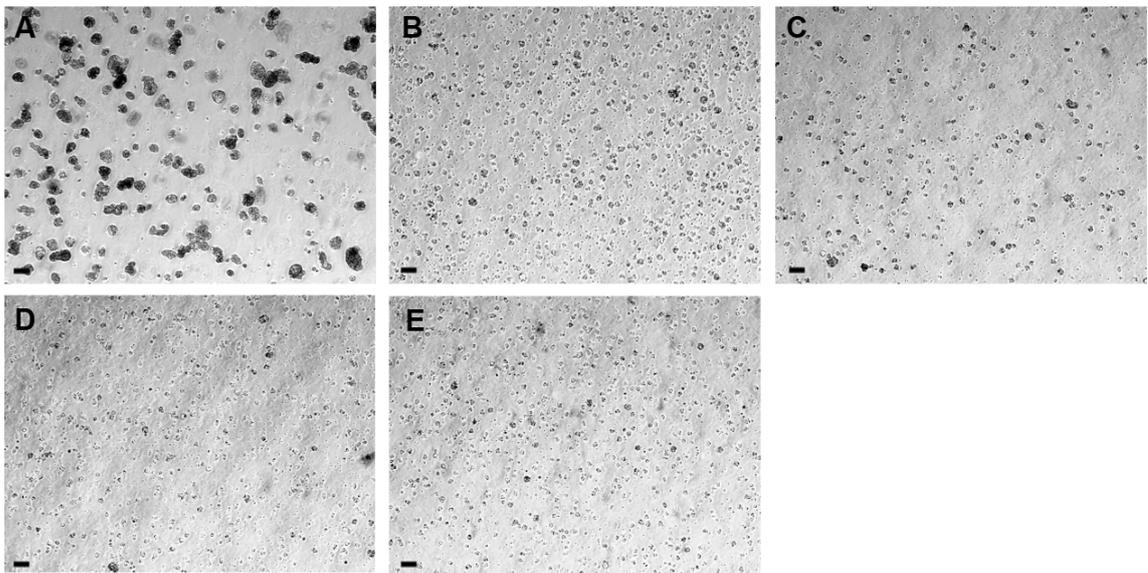


Abbildung 4.42: *Callithrix jacchus* EBs am Tag 5 der Differenzierung in statischer Kultur und im Bioreaktor unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen von EBs nach 5 tägiger statischer Kultivierung in Suspensionsplatten (A) und im Bioreaktor bei einer Geschwindigkeit von B 90rpm, C 110rpm, D 130rpm und E 150rpm. (Messbalken 100 μm)

Die Auswertung der Größe der EBs aus dem Bioreaktor zeigt, dass die Rührgeschwindigkeit bis Tag 5 der Differenzierung keinen signifikanten Einfluss auf die EB-Größe hat. So haben EBs bei 90rpm eine durchschnittliche Größe von $69 \mu\text{m} \pm 18 \mu\text{m}$, EBs bei 110rpm von $76 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$, bei 130rpm von $79 \mu\text{m} \pm 13 \mu\text{m}$ und bei 150rpm von $78 \mu\text{m} \pm 12 \mu\text{m}$. Interessanterweise besteht auch nur ein geringer Größenunterschied zwischen EBs aus statischer Kultivierung und EBs aus dem Bioreaktor. Jedoch sind EBs aus dem Bioreak-

tor generell homogener in ihrer Größe, was an einer geringeren Standardabweichung von der mittleren Größe erkennbar ist (Abb. 4.43). Zusätzlich zur Analyse der Größe der EBs unter den verschiedenen Rührgeschwindigkeiten wurde die Expression von Pluripotenzgenen und Differenzierungsgenen mittels semiquantitativer PCR (siehe Abschnitt 3.2.6) untersucht.

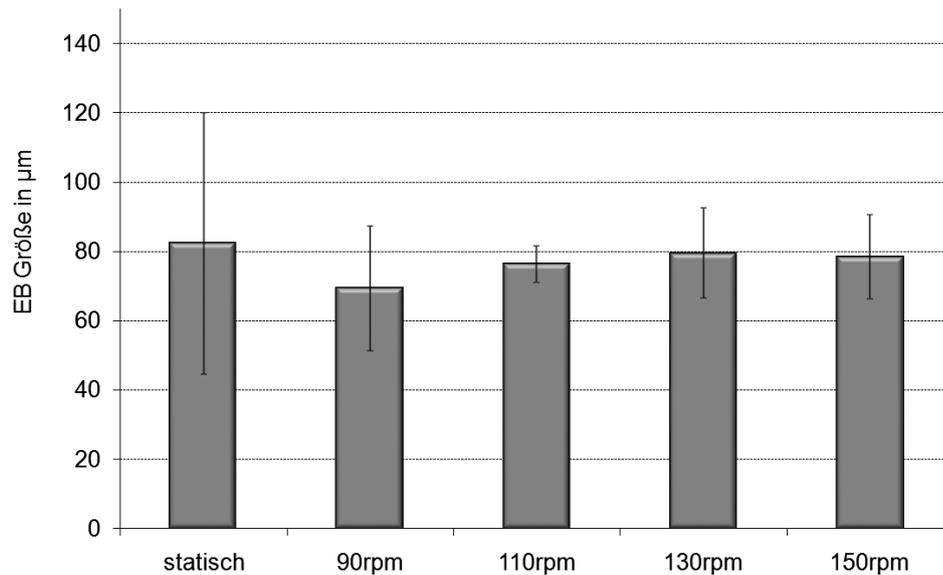


Abbildung 4.43: Größe von *Callithrix jacchus* EBs an Tag 5 der Differenzierung unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten. Dargestellt sind die mittleren Größen der EBs an Tag 5 der Differenzierung aus statischer Differenzierung (statisch) und im Bioreaktor bei einer Geschwindigkeit von 90rpm, 110rpm, 130rpm und 150rpm. ($n > 500, \pm SD$)

In Abbildung 4.44 ist vergleichend die Expression der beiden Pluripotenzgene Nanog und Oct4 von cES-Zellen am Tag 5 der statischen EB-Generierung und der im Bioreaktor bei 90rpm, 110rpm, 130rpm und 150rpm dargestellt. Zellen im Bioreaktor zeigen eine stark erhöhte Expression des Pluripotenzgens Oct4 gegenüber den Zellen aus statischer Differenzierung. Weder Zellen aus dem Bioreaktor noch Zellen aus statischer Differenzierung zeigen am Tag 5 eine Expression des Pluripotenzgens Nanog. Für den frühen mesodermale Differenzierungsmarker Brachyury (Bra), sowie den endodermalen Marker

α -Fetoprotein (AFP) kann ebenfalls an Tag 5 der Differenzierung keine Expression nachgewiesen werden. Der Ektodermmarker β -III-Tubulin ist im Bioreaktor am Tag 5 der Differenzierung stärker exprimiert als in statischer Kultur. Mit höherer Rührgeschwindigkeit nimmt jedoch die Expressionstärke des β -III-Tubulin ab. Es ist somit eine klare Abhängigkeit der Expression des ektodermalen Markers von der Rührgeschwindigkeit erkennbar (Abb. 4.44). Aufgrund der verstärkten Genexpression des Ektodermmarkers bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten wurde für weitere Versuche zur osteogenen Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen im Bioreaktor eine höhere Drehzahl (130rpm oder 150rpm) bevorzugt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit murinen ES-Zellen wurde die Rührgeschwindigkeit zur osteogenen Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen auf 130rpm festgelegt.

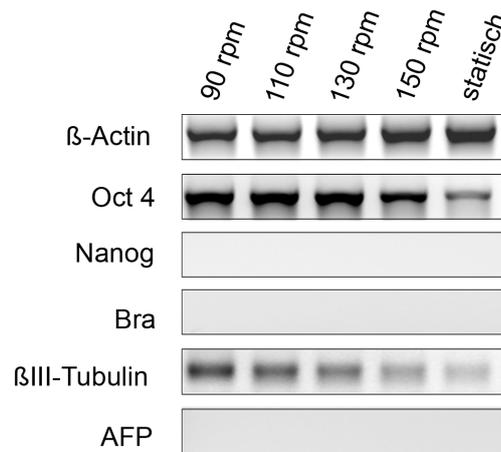


Abbildung 4.44: Semiquantitative Analyse der Genexpression der EBs von *Callithrix jacchus* an Tag 5 der Differenzierung. Dargestellt ist die Expression der beiden Pluripotenzgene Oct4 und Nanog, sowie der Differenzierungsmarker Brachyury (Bra, Mesoderm), β -III-Tubulin (Ektoderm) und α -Fetoprotein (AFP, Endoderm) für EBs am Tag 5 aus statischer Kultivierung und aus dem Bioreaktor bei einer Rührgeschwindigkeit von 90rpm, 110rpm, 130rpm und 150rpm. Als Kontrollgen wurde das Haushaltsgen β -Actin mitgeführt.

4.12 Vergleich der osteogene Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen im Bioreaktor und in statischer Kultur

Im Folgenden ist die osteogene Differenzierung von cES-Zellen in statischer Kultur der osteogenen Differenzierung im Suspensionsbioreaktor bei 130rpm gegenübergestellt. Der Versuch soll den Einfluss der 3D-Kultivierung unter gerührten Bedingungen auf die osteogene Differenzierung von cES-Zellen aufzeigen. Dazu wurden cES-Zellen über 30 Tage im Bioreaktor wie unter Abschnitt 3.1.6 beschrieben differenziert. Vergleichend wurde eine statische Differenzierung wie unter Abschnitt 3.1.4 beschrieben mitgeführt.

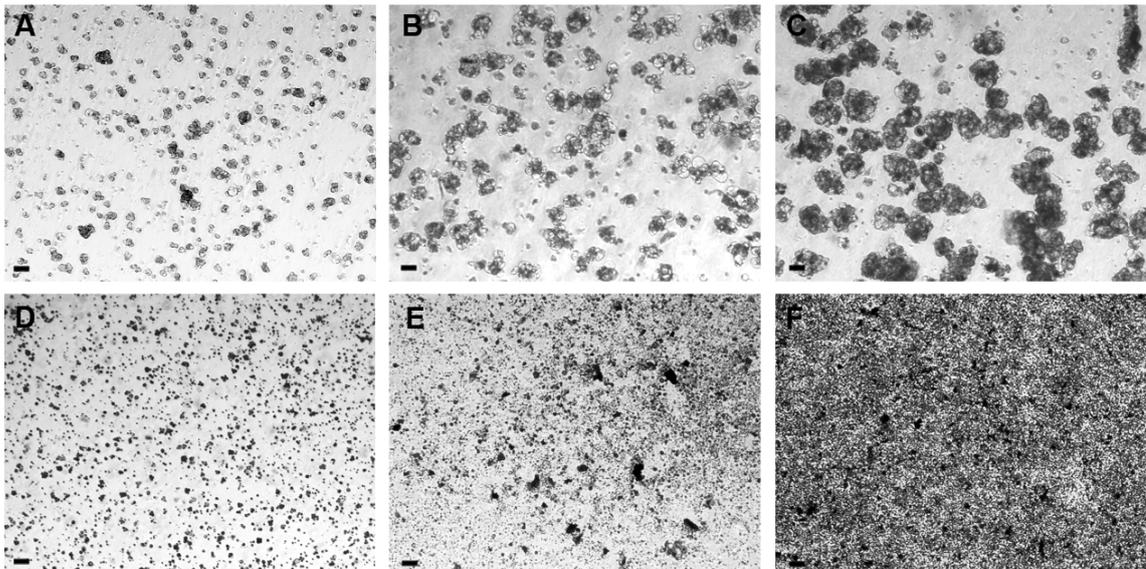


Abbildung 4.45: Osteogene Differenzierung von cES-Zellen im Suspensionsbioreaktor. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen der differenzierten Zellaggregate im Bioreaktor bei 130rpm, zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung von kontroll- und osteogen differenzierten Zellen. **A-C** zeigen EBs der Kontrollkultur am Differenzierungstag 10 (**A**), 20 (**B**) und 30 (**C**). **D-F** zeigen EBs der osteogenen Differenzierung am Tag 10 (**D**), 20 (**E**) und 30 (**F**). (Messbalken 100 µm)

In Abbildung 4.45 sind Aggregate der kontroll- und osteogenen Differenzierung im Bioreaktor am Tag 10, 20 und 30 gezeigt. Aggregate in der Kontrolldifferenzierung ohne osteogene Zusätze nehmen bis Tag 30 der Differenzierung stark an Größe zu (Abb. 4.45 A-C). Schwarze, mineralisierte Bereich innerhalb der Aggregate sind nicht erkennbar. Aggregate der osteogenen Differenzierung sind bereits ab Tag 10 der Differenzierung wesentlich kleiner als Aggregate der Kontrolldifferenzierung. Mit voranschreitender Differenzierung zerfallen diese immer mehr (Abb. 4.45 D-F). Eine zunehmende Schwarzfärbung der Aggregate bis Tag 30 der Differenzierung ist erkennbar.

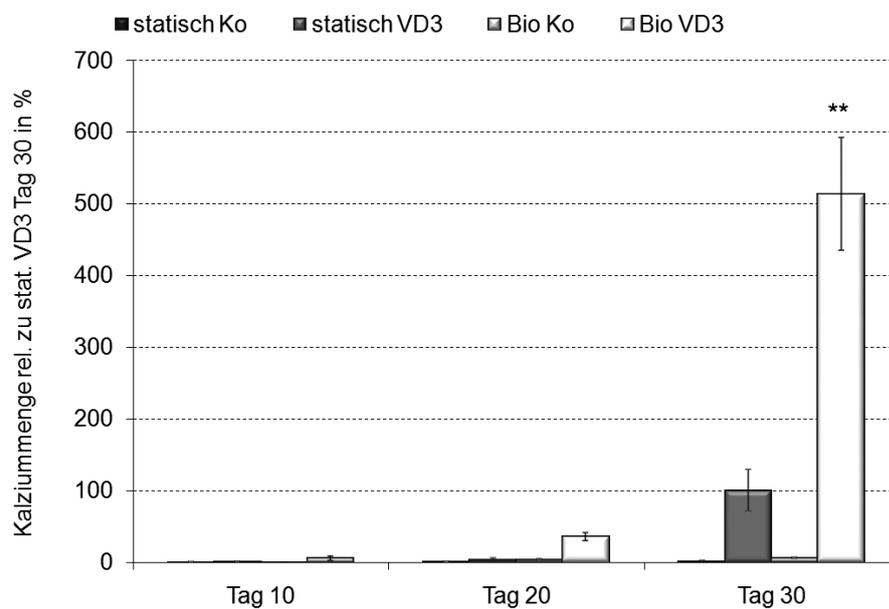


Abbildung 4.46: Quantitative Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums im Bioreaktor differenzierter cES-Zellen. Gezeigt sind die relativen Mengen des in die Matrix eingelagerten Kalziums am Tag 10, 20 und 30 der Differenzierung von cES-Zellen im Bioreaktor bei 130rpm und in statischer Kultur. Die Daten sind prozentual zur statischen Differenzierung an Tag 30 (statisch VD3 Tag 30) dargestellt. (n=3, ± SD)

Die quantitative Auswertung des Kalziumgehaltes der statischen Differenzierung und der Differenzierung im Bioreaktor ist in Abbildung 4.46 gegenübergestellt. Die Kalziummengen sind relativ zur Kalziummenge am Tag 30 der statischen, osteogenen Differenzierung

dargestellt. Im Bioreaktor bei 130rpm differenzierte cES-Zellen zeigen im Vergleich zu statisch differenzierten Zellen an Tag 30 einen signifikant ($p=0,002$) höheren Kalziumgehalt von $513\% \pm 78\%$. Die Kontrolldifferenzierung zeigt keine signifikante Kalzifizierung. Am Tag 30 liegt der Kalziumgehalt (relativ zur statischen, osteogenen Differenzierung) bei $5,7\% \pm 0,48\%$ (Abb. 4.46).

4.13 Einfluss der EB-Bildungsstrategie auf die osteogene Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen

In Abschnitt 4.12 wurde die osteogene Differenzierung von cES-Zellen im Bioreaktor der statischen Differenzierung gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass durch die Differenzierung unter gerührten Bedingungen (Bioreaktor) ein 5-fach höherer Kalziumgehalt der osteogen differenzierten Kultur erreicht werden kann (siehe 4.12). Im Folgenden sind Ergebnisse dargestellt, welche den Einfluss der EB-Generierungsart (Tag 0 bis Tag 5) auf die osteogene Differenzierung zeigen. So wurden EBs von cES-Zellen in statischer Kultur, wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben und im Bioreaktor bei 130rpm, wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben, generiert. Am Tag 5 der Differenzierung wurde die EBs beider Ansätze in Zellkulturplatten ausgesät und unter der Zugabe von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D₃ zu Osteoblasten differenziert. Im Bioreaktor generierte EBs, welche anschließend statisch zu Osteoblasten differenziert wurden, zeigen am Tag 20 einen signifikant ($p=0,0005$) höheren Kalziumgehalt von $36,3\% \pm 2,3\%$ (relativ zu statisch VD3 Tag 30) als die komplett statische Differenzierung mit einem Kalziumgehalt von $2,9\% \pm 2,6\%$. Somit kann durch die EB-Generierung von cES-Zellen unter gerührten Bedingungen (Bioreaktor) eine schnellere Mineralisierung der osteogenen Differenzierungskultur erreicht werden, welche jedoch am Tag 30 der Differenzierung den Kalziumgehalt, mit einem Wert von $111\% \pm 23\%$, den Kalziumgehalt der osteogenen

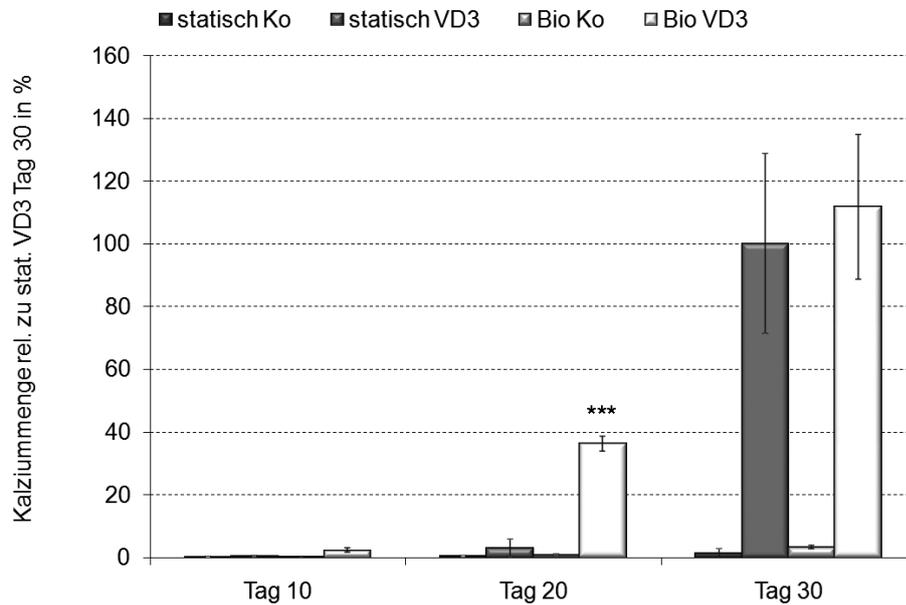


Abbildung 4.47: Quantitative Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums statisch differenzierter cES-Zellen, nach EB-Generierung in statischer Kultur und im Bioreaktor. Gezeigt sind die relativen Mengen des in die Matrix eingelagerten Kalziums am Tag 10, 20 und 30 der statischen Differenzierung von cES-Zellen nach 5 tägiger EB-Generierung im Bioreaktor bei 130rpm und in statischer Kultur. Die Daten sind prozentual zur statischen Differenzierung an Tag 30, nach Generierung der EBs in Suspensionsplatten (statisch VD3 Tag 30) dargestellt. (n=3, ± SD, statistische Auswertung zu statisch VD3 Tag 20)

Differenzierung mit statischer EB-Bildung ($100\% \pm 28,5\%$) nicht signifikant übersteigt. In Abbildung 4.48 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierungskultur der beiden Ansätze am Tag 30 der Differenzierung gezeigt. So ist hinsichtlich der Ausprägung schwarzer, kalzifizierter Bereich optisch kein Unterschied zwischen der statischen Differenzierung von cES-Zellen nach anfänglicher EB-Bildung in statischer Kultur oder im Bioreaktor erkennbar. Aufgrund dieser Ergebnisse kann gezeigt werden, dass die Art der EB-Bildung von cES-Zellen, ob statisch oder gerührt, keinen signifikanten Einfluss auf die Menge des in die Matrix eingelagerten Kalziums an Tag 30 der Differenzierung hat. Die erheblich höhere Kalzifizierung der osteogenen Differenzierungskultur

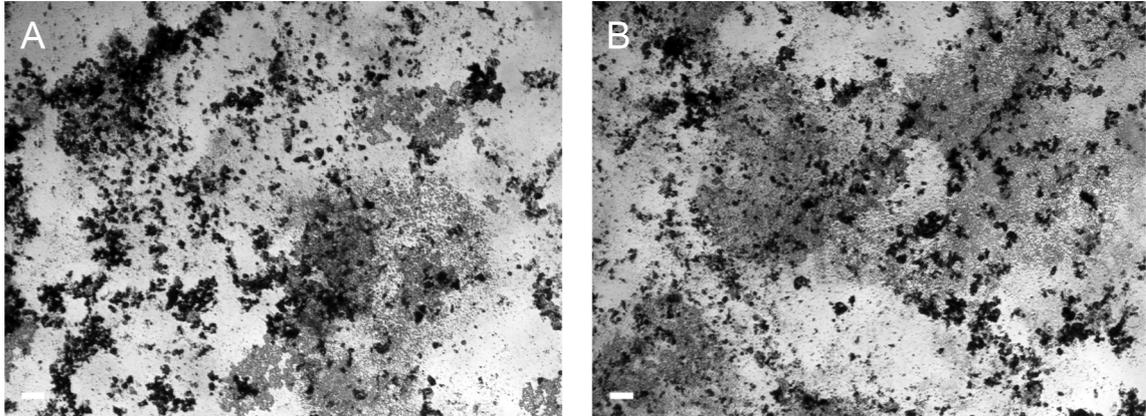


Abbildung 4.48: Statische Differenzierung von cES-Zellen nach EB-Generierung im Bioreaktor und in statischer Kultur. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen statisch differenzierter cES-Zellen an Tag 30 der osteogenen Differenzierung nach anfänglicher 5 tägiger EB-Bildung in **A** statischer Kultur und **B** im Bioreaktor bei 130rpm. (Messbalken 100 μm)

aus dem Bioreaktor, wie sie in Abschnitt 4.12 dargestellt ist, liegt somit in der Bioreaktorkultivierung von Tag 5 bis Tag 30 der Differenzierung begründet und nicht in den ersten 5 Tagen der EB-Bildung.

5 Diskussion

5.1 Die Kultivierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen auf Feederzellen erhält deren Pluripotenz

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) haben das Potential in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) sowie in Zellen der Keimbahn auszudifferenzieren. Sie werden daher als pluripotent bezeichnet. Pluripotente ES-Zellen unterliegen nicht der Seneszenz, sie sind somit fast unbegrenzt teilungsfähig. Dieses Potential der ES-Zellen bei deren Kultivierung *in vitro* muss künstlich erhalten werden, da die Zellen sonst spontan differenzieren und somit ihre pluripotenten Eigenschaften verlieren [98]. Die ersten aus murinen Blastozysten isolierten ES-Zellen wurden auf murinen embryonalen Fibroblasten (Feederzellen) kultiviert um deren pluripotente Eigenschaften zu erhalten [4, 5]. Später konnte für murine ES-Zellen *leukemia inhibitory factor* (LIF) beschrieben werden, welches in Verbindung mit fetalem Kälber-Serum zur Erhaltung der Pluripotenz muriner ES-Zellen geeignet ist [3]. Die Funktionalität des LIF zur Erhaltung der pluripotenten Eigenschaften von *Callithrix jacchus* und humanen ES-Zellen konnte bei deren initialen Isolierung nicht bestätigt werden [2, 7]. Primaten ES-Zellen werden somit zumeist, zur Erhaltung ihrer pluripotenten Eigenschaften, auf Feederzellen kultiviert.

Die Grundlage zur Kultivierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Callithrix jacchus* ES-Zellen (cES-Zellen) bildet das im Jahr 2005 von Sasaki und Mitarbeiter veröffentlichte und in den darauffolgenden Jahren weiterentwickelte Protokoll zur Kultivierung von cES-Zellen auf Feederzellen [38, 43]. Die Zellen werden dazu auf murinen embryonalen Fibroblasten in einem Medium supplementiert mit Serum-Ersatz (Serum-Replacer, Invitrogen) und bFGF kultiviert. In der vorliegenden Arbeit wurden murine embryonale Fibroblasten des Mausstammes CD1 verwendet, welche vor der Verwendung als Feederzellen, durch die Zugabe von Mitomycin C zum Medium mitotisch inaktiviert wurden. Eine mitotische Inaktivierung der Feederzellen ist notwendig, da es sonst zum Überwachsen der ES-Zellkultur mit Feederzellen kommt. Zur Inaktivierung von Feederzellen sind 2 Methoden beschrieben, (1) die mitotische Inaktivierung der Zellen durch γ -Bestrahlung und (2) die Inaktivierung durch die 2-4 stündige Zugabe von Mitomycin C zum Medium der Zellen [99]. Dabei ist die γ -Bestrahlung die schnellere und weniger zeitaufwendigere Inaktivierungsmethode, jedoch bedarf sie einer Bestrahlungsquelle. Beide Inaktivierungsmethoden wurden als gleichermaßen wirksam zur Erhaltung der Pluripotenz von cES-Zellen beschrieben [38, 43, 100]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Feederzellen mittels Mitomycin C Behandlung inaktiviert. Anders als für die Kultivierung von cES-Zellen beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit kein Trypsin-EDTA zur Dissoziation der Zellkolonien verwendet. Stattdessen wurde ein rekombinanter Trypsinersatz (*TrypLETM Express*, Invitrogen) verwendet. Durch den Einsatz von *TrypLETM Express* war nach der Passagierung eine höhere Kolonienanzahl zu beobachten als durch den Einsatz von Trypsin-EDTA. Diese Beobachtung stimmt überein mit den Ergebnissen von Ellerström und Mitarbeitern, welche ebenfalls bei der Passagierung von humanen ES-Zellen eine höhere Kolonienzahl durch die Verwendung von *TrypLETM Express* erreichten [101]. Gleiches wurde für die Passagierung von bovinen ES-Zell-ähnlichen Zellen durch Gong und Mitarbeiter beschrieben [102]. Dabei konnten Gong und Mitarbeiter zeigen, dass die Verwendung von *TrypLETM Express* keine Einfluss auf die pluripotenten Eigenschaften und den Karyotyp der Zellen hatte [102]. Die cES-Zellen wurden in der vorliegenden

Arbeit über 100 Passagen auf Feederzellen kultiviert, ohne die für cES-Zellen beschriebenen morphologischen und pluripotenten Eigenschaften zu verlieren [7, 38]. Dies wurde im Rahmen der Charakterisierung der Feederzell-freien cES-Zellkultur untersucht und beinhaltete die Analyse der Expression typischer Pluripotenzmarker, wie Oct4 und Nanog, sowie des immunzytochemischen Nachweises der Oberflächenantigene SSEA-4 und TRA-1-60 von auf Feederzellen kultivierten cES-Zellen. Die Zellen exprimieren in hohem Maße Oct4 und Nanog. Das Stadien-spezifische Antigen 4 (SSEA-4) konnte durch immunzytochemische Färbung nachgewiesen werden. Durch die gleichzeitige Färbung der Kolonien mit dem Kernfarbstoff DAPI, konnte die Lokalisation des SSEA-4 auf der Zelloberfläche gezeigt werden. Gleiches gilt für das Antigen TRA-1-60. Ähnlich wie durch Thomson und Mitarbeiter beschrieben, ist das TRA-1-60 nicht gleichmäßig über die ganze cES-Zellkolonie verteilt, sondern nur auf einzelne Zellen der Kolonie beschränkt [7]. Für auf Feederzellen kultivierte cES-Zellen konnte, anhand der Untersuchung der Expression von verschiedenen Keimblattmarkern, keine spontane Differenzierung nachgewiesen werden. So zeigen die Zellen keine Expression für Brachyury (frühes Mesoderm), α -Fetoprotein (primitives Endoderm) und β -III-Tubulin (Ektoderm). Dies stimmt weitestgehend mit Analysen von Sasaki, sowie Chen und Mitarbeitern überein welche ebenfalls die Expression verschiedener Keimblattmarker in undifferenzierten cES-Zellen untersuchten. So konnte Sasaki und Mitarbeiter eine hohe Expression der beiden Pluripotenz-assoziierten Gene Oct4 und Nanog zeigen, jedoch keine Expression von α -Fetoprotein (primitives Endoderm) und CD34 (Mesoderm, hämatopoietisches System). Jedoch zeigten sie eine Expression des ektodermalen Markers Nestin in undifferenzierten cES-Zellen, welche sie jedoch nicht näher diskutierten [38]. Chen und Mitarbeiter beschrieben ebenfalls eine hohe Expression von Oct4 und Nanog, und keine Expression für Brachyury und α -Fetoprotein [43].

Ein weiteres Merkmal pluripotenter Stammzellen ist eine hohe Telomeraseaktivität. Die Telomerase verlängert immer wieder die bei der DNA-Replikation verloren gegangenen Telomerstücke. Anders als bei somatischen Zellen unterliegen die ES-Zellen somit keiner

ständigen Chromosomenverkürzung und somit keiner endlichen Anzahl an Zellteilungen. Der Nachweis der Telomeraseaktivität von cES-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit durch die quantitative TRAP-Methode geführt [103], bei welcher die Telomerase aus den Zellen isoliert wird und anschließend ein künstliches Substrat, welches ähnlich zu den natürlichen Telomeren aufgebaut ist, durch das Enzym verlängert wird. Je höher die Enzymaktivität, desto mehr Verlängerung pro Zeit. Das Produkt kann anschließend mittels PCR amplifiziert und quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine hohe Telomeraseaktivität für cES-Zellen nachgewiesen werden, die vergleichbar ist mit der Telomeraseaktivität pluripotenter muriner ES-Zellen.

Der eindeutigste Nachweis der Pluripotenz von ES-Zellen lässt sich über die Formierung von Teratomas führen. Dazu werden die ES-Zellen in immundefiziente Mäuse gespritzt. Die gebildeten Mischtumore (Teratomas) werden nach einigen Wochen entnommen und auf die Existenz von Zellen aus den verschiedenen Keimblättern untersucht. Dieser Nachweis wurde von Sasaki und Mitarbeitern bei der initialen Isolierung und Kultivierung von cES-Zellen erfolgreich geführt [38]. Vallier und Mitarbeiter verzichteten, bei der Charakterisierung ihrer Feederzell-freien humanen ES-Zellkultur, auf den Nachweis der Teratomabildung [94]. Ihrer Einschätzung nach, beschreiben genügend Studien einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von Pluripotenzfaktoren und der Bildung von Teratomen, weshalb nach geführter *in vitro* Charakterisierung der Zellen auf eine zusätzliche Teratomabildung verzichtet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls auf den Nachweis der Teratomabildung von cES-Zellen verzichtet. Die Zellen wurden aufgrund der Expression von Pluripotenzmarkern, des Fehlens der Expression von Keimblattmarkern, dem Vorhandensein cES-Zell-typischer Oberflächenantigene, sowie der hohen Telomeraseaktivität als pluripotent eingeschätzt.

5.2 *Callithrix jacchus* ES-Zellen können unter dem Einfluss von Activin A und bFGF Feederzell-frei kultiviert werden ohne ihre pluripotenten Eigenschaften zu verlieren

Durch die Kultivierung auf Feederzellen werden cES-Zellen in ihrem pluripotenten Zustand gehalten. Jedoch hat die Kultivierung auf Feederzellen Nachteile in Hinblick auf die Differenzierung der cES-Zellen. So kann zwar vor einem Experiment eine Vorinkubation des ES-Feederzell-Gemisches auf Zellkulturplatten zur Abtrennung der Feederzellen durchgeführt werden, jedoch ist dadurch keine 100%ige Reinheit der ES-Zellen zu erreichen [104]. Jedes Experiment ist somit möglicherweise mit unterschiedlichen Anteilen an Feederzellen verunreinigt. Dies führt zur Verfälschung der Ergebnisse [105]. So wird z.B. bei der Quantifizierung des in die Matrix der Zellen eingelagerten Kalziums, der Kalziumgehalt auf die Proteinmenge in der Probe bezogen. Durch die Verunreinigung mit Feederzellen kommt es hierbei zur Erhöhung der Proteinmenge und somit zu einem falschen Kalzium-Protein-Verhältnis. Ein weiterer Nachteil der Feederzellen ist ihr von Präparation zu Präparation unterschiedlich gutes Vermögen die pluripotenten Eigenschaften von ES-Zellen zu erhalten. So gleichen Feederzellen der einen Präparation, in ihren Eigenschaften, nicht unbedingt der nächsten Präparation [106]. Auch bestehen Unterschiede zwischen murinen embryonalen Fibroblasten der verschiedenen Mausstämme [100], was einen Inter-Labor-Transfer der Kultivierungsprotokolle von der Verfügbarkeit des jeweiligen Mausstammes am Laborstandort abhängig macht. Die Kultivierung von cES-Zellen auf Feederzellen ist somit für die Etablierung eines standardisierten osteogenen Differenzierungsprotokolls ungeeignet. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein Protokoll zur Feederzell-freien Expansion der cES-Zellen entwickelt.

Xu und Mitarbeiter kultivierten im Jahre 2001 das erste Mal humane ES-Zellen oh-

ne Feederzell-Schicht [107]. Die Pluripotenz der humanen ES-Zellen wurde durch die Kultivierung der Zellen in zuvor durch Feederzellen konditioniertem Medium erreicht. Zwar konnte auf diese Weise der direkte Kontakt und damit die Verunreinigung der anschließenden Experimente mit Feederzellen vermieden werden, jedoch blieb das Medium weiterhin, durch die ungenaue Zusammensetzung der durch die Feederzellen abgegebenen Cytokine, undefiniert. Erneut war die Gleichheit der Zusammensetzung des Mediums der verschiedenen Konditionierungen nicht garantiert. Amit und Mitarbeiter konnten schließlich im Jahr 2004 zeigen, dass humane ES-Zellen durch Zugabe von TGF β -1 und bFGF zum Medium pluripotent gehalten werden können, auch ohne vorherige Konditionierung des Mediums durch Feederzellen [108]. Gleiche Ergebnisse erzielten Vallier und Mitarbeiter im Jahre 2005, welche humane ES-Zellen durch die Zugabe von Activin und bFGF zum Medium in einem pluripotenten Zustand hielten. Activin aktiviert dabei ebenfalls wie TGF β -1 den Smad2/Smad3 Signalweg und damit die spezifische Transkription von Zielgenen, jedoch über andere Rezeptoren [94]. Das bFGF dient dem Activin als unterstützender Faktor, so konnten beide Faktoren alleine die Pluripotenz der ES-Zellen nicht erhalten. Eine Kombination von Activin und bFGF führte jedoch in humanen ES-Zellen, auch nach 10 Passagen Feederzell-freier Kultivierung, zu einer hohen Expression von Pluripotenzmarkern [94].

In der vorliegenden Arbeit, diente das von Vallier und Mitarbeitern beschriebene Protokoll als Grundlage zur Feederzell-freien Kultivierung von cES-Zellen. Dazu wurden cES-Zellen in chemisch definiertem Medium, welches sich durch die Verwendung von bovinem Serum-Albumin (BSA) anstelle von fötalem Kälberserum auszeichnet, kultiviert [109]. Zusätzlich wurde diesem Grundmedium 10 ng/ml Activin A und 12 ng/ml rekombinantes humanes bFGF zugesetzt. Zur besseren Adhärenz der ES-Zellen an der Kulturoberfläche wurde diese zuvor mit fötalem Kälberserum-haltigem Medium beschichtet. So erlaubt die Kultivierung der cES-Zellen unter den beschriebenen Bedingungen zwar eine Feederzell-freie Kultivierung, welche für die standardisierte osteogene Differenzierung der Zellen unablässig ist, jedoch keine Tierprodukt-freie Kultivierung, wie sie für die Expansion der

Zellen für Zelltransplantationsexperimente wünschenswert wäre [110]. cES-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit, unter den beschriebenen Bedingungen, für mehr als 40 Passagen Feederzell-frei kultiviert. Die Analyse der pluripotenten Eigenschaften nach 40 Passagen der Feederzell-freien Kultivierung zeigt keinen signifikanten Unterschied zu cES-Zellen gleicher Passage kultiviert auf Feederzellen. Die quantitative Analyse der Telomeraseaktivität zeigt eine vergleichbare Enzymaktivität in beiden Kultivierungssystemen. Zusätzlich konnte für Feeder-frei kultivierte cES-Zellen, vergleichbar mit Zellen kultiviert auf Feederzellen, eine hohe Expression der beiden Pluripotenzgene Oct4 und Nanog und keine Expression der Keimblatt-spezifischen Differenzierungsmarker Brachyury (frühes Mesoderm), α -Fetoprotein (primitives Endoderm) und β -III-Tubulin (Ektoderm) nachgewiesen werden. Auch die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung der Zelloberflächenantigene SSEA-4 und TRA-1-60 ist mit der von cES-Zellen kultiviert auf Feederzellen vergleichbar. Zusätzlich wurde nach 40 Passagen Feederzell-freier Kultivierung der Karyotyp der cES-Zellen überprüft und mit der initialen Karyotypanalyse der verwendeten cES-Zelllinie (cjes001, Dr.Sasaki (*Central Institut for Experimental Animals*, Japan), verglichen [111]. Durch die Feeder-freie Kultivierung konnte kein Einfluss auf den Karyotyp der cES-Zellen (46XX) erkannt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Analysen von Vallier und Mitarbeitern überein, welche für Feederfrei-kultivierte humane ES-Zellen keine Karyotypveränderung feststellen konnten [94]. Eine Anhäufung abnormaler Translokationen und Trisomien, wie sie für Langzeit-kultivierte humane ES-Zellen durch Draper und Mitarbeiter gezeigt wurden, können für cES-Zellen, welche 40 Passagen Feederzell-frei kultiviert wurden, nicht bestätigt werden [112].

In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es bei Entzug von Activin A und bFGF zu einem spontanen Verlust der Expression von Oct4 und Nanog innerhalb der ersten 5 Tage kommt. Dies stimmt mit Ergebnissen der Expressionsanalyse von Javaneraffen ES-Zellen [113], *Callithrix jacchus* ES-Zellen [38], Rhesus ES-Zellen [114, 115] und humanen ES-Zellen [30, 116, 117] nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren, überein. Die beiden Oberflächenmarker SSEA-4 und TRA-1-60

sind nach 4 Tagen ebenfalls kaum noch immunzytochemisch auf der Zelloberfläche nachweisbar. Das Absinken der Menge an SSEA-4 positiven Zellen wurde zusätzlich per FACS quantifiziert. So waren im undifferenzierten Zustand noch 85% der Zellen positiv für SSEA-4, so sind es nach 4tägigem Entzug der pluripotenzerhaltenden Faktoren nur noch rund 10%. Der für murine ES-Zellen typische Oberflächenmarker SSEA-1, welcher im undifferenzierten Zustand weder in cES-Zellen noch in anderen Primaten ES-Zellen exprimiert ist, wird bei spontaner Differenzierung der Zellen zunehmend exprimiert. Der spontane Verlust der typischen Zelloberflächenmarker SSEA-4 und TRA-1-60 und das spontane Auftreten des Maus-spezifischen Oberflächenmarkers SSEA-1, nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren ist für alle Primaten ES-Zellen typisch und wurden ursprünglich für humane embryonale Karzinomazellen beschrieben [118, 119].

In der vorliegenden Arbeit konnte somit anhand der hohen Expression der Pluripotenz-gene Oct4 und Nanog, des Fehlens der Expression von Keimblatt-assoziierten Differenzierungsgenen, des Nachweises cES-Zell-typischer Oberflächenantigene, einer hohen Telomeraseaktivität und eines stabilen Karyotypes, die Pluripotenz der Feederzell-frei kultivierten cES-Zellen gezeigt werden. cES-Zellen können somit durch die Supplementierung des Mediums mit Activin A und bFGF Feederzell-frei kultiviert werden, ohne ihre pluripotenten Eigenschaften zu verlieren. Durch den Entzug von Activin A und bFGF kommt es zu einem raschen Verlust der mit dem pluripotenten Stadium von cES-Zellen assoziierten Eigenschaften, was das Ergebnis, dass cES-Zellen durch den Einfluss von Activin A in Kombination mit bFGF pluripotent gehalten werden können, untermauert.

5.3 *Callithrix jacchus* ES-Zellen können nach initialer EB-Formierung, unter dem Einfluss von Vitamin D₃ zu Osteoblasten differenziert werden

Die *in vitro* Differenzierung muriner ES-Zellen zu Knochen-bildenden Osteoblasten ist bereits beschrieben [28, 29, 64]. Dabei wird die Differenzierung muriner ES-Zellen, ausgehend von einer Einzelzellsuspension, durch das Protokoll der hängenden Tropfen initiiert. Die dadurch entstehenden Embryonalkörper-ähnlichen Aggregate (engl. *embryoid bodies*, EBs) differenzieren zunächst spontan. Anschließend werden die EBs in Einzelzellen dissoziiert und auf Zellkulturplatten ausgesät. Die osteogene Differenzierung wird dabei durch die Zugabe von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat induziert [28, 64]. Zur Nieden und Mitarbeiter konnten eine starke osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen unter der Supplementierung des Mediums mit Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und der aktiven Form des Vitamin D₃ (1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D₃), ab Tag 5 der Differenzierung nachweisen [29]. Dabei scheint die osteogene Differenzierung in allen Phasen der Differenzierung von einem zentralen Molekül beeinflusst zu sein, dem β -Catenin [69]. β -Catenin ist eine zentrale Komponente des kanonischen Wnt-Signalweges. Dabei aktivieren Wnt-Moleküle den kanonischen Signalweg durch die Bindung an Rezeptoren der *Frizzeld* Familie [120, 121]. Diese Bindung führt letztendlich zur Inhibierung der Phosphorylierung von β -Catenin, welches dadurch nicht mehr für den proteosomalen Abbau markiert ist und in der Zelle akkumuliert [122, 123]. Anschließend wird β -Catenin in den Zellkern transloziert wo es als Co-Aktivatoren für Transkriptionsfaktoren agiert und so zur Transkription verschiedener Gene beiträgt [124–126]. Der kanonische Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in Prozessen wie Körperachsenformierung und Entwicklung des zentralen Nervensystems [127, 128]. β -Catenin ist zusätzlich zum kanonischen Signalweg

auch noch an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt, da es in einem Cadherin-Catenin-Komplex an der Verankerung der Catherine (Familie der Zelladhäsionsmoleküle) mit den Aktinfilamenten des Zytoskelettes beteiligt ist [129].

Der gesamte Prozess der osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen scheint von dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von β -Catenin im Nukleus abhängig zu sein [67–69]. In sehr frühen Phasen der Differenzierung (Tag 1-3 nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren) kommt es zum raschen Absinken des β -Cateningehaltes im Nukleus. Ab Tag 3 der Differenzierung ist die β -Cateninmenge im Nukleus wieder erhöht. Es kommt zur Expression früher mesendodermaler Markergene wie z.B. Brachyury. Fehlt die β -Cateninaktivität in dieser mesodermalen Phase der Differenzierung, differenzieren die Zellen in Chondrozyten anstatt Osteoblasten [130, 131]. Durch den gezielten Einsatz von Vitamin D₃ ab Tag 5 der Differenzierung, welches die nukleäre Funktion des β -Catenins wieder inhibiert und die Zugabe von BMP-2 in der späten Phase der osteogenen Differenzierung, was zu einer erneuten Erhöhung des nukleären β -Cateninspiegels führt, konnten zur Nieden und Mitarbeiter eine rund 90%ige Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten erreichen [67]. Das letzte Stadium der osteogenen Differenzierung, welches durch den erneuten Anstieg an nukleärem β -Catenin gekennzeichnet ist, geht einher mit der starken Mineralisierung der Matrix der Zellen. Die *in vitro* Mineralisierung der Zellmatrix ist ein Indiz für das Vorhandensein von Knochen-bildenden Osteoblasten [132]. Je mehr Osteoblasten, desto stärker ist die Mineralisierung. Von diesen Osteoblasten entwickelt sich ein Großteil weiter zu Osteozyten, welche *in vivo* innerhalb des reifen Knochens lokalisiert sind. Diese Osteozyten haben im Vergleich zu Osteoblasten eine nur noch sehr geringe metabolische Aktivität.

Der osteogenen Differenzierung von cES-Zellen in der vorliegenden Arbeit, liegt das durch zur Nieden und Mitarbeiter im Jahre 2003 beschriebene Protokoll zur osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen zu grunde [29]. Dabei ist die Initiierung der Differenzierung durch die EB-Bildung aus Einzelzellen, nach dem Protokoll der hängenden Tropfen, vorgesehen. Durch die Kultivierung der cES-Zellen in hängenden Tropfen konnte

keine Aggregatbildung erreicht werden. Dies scheint darin begründet zu liegen, dass in Einzelzellen dissoziierte cES-Zellen nicht mehr reaggregieren und sich nicht mehr teilen. Diese Eigenschaft scheint cES-Zellen und andere Primaten ES-Zellen gemein zu sein. So wird selbst bei der Expansion von Rhesus ES-Zellen und humanen ES-Zellen auf eine Vereinzelnung der Zellen beim Passagieren verzichtet, um das Teilungspotential der Zellen aufrecht zu erhalten [2, 6, 30]. Die EB-Formierung der cES-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Kultivierung von Zellklustern in Suspensionsschalen erreicht, wie sie unter anderem auch für die Differenzierung humaner ES-Zellen in neurale Zellen und Kardiomyozyten beschrieben wurde [32, 133]. Auf diese Weise konnte eine EB-ähnliche Aggregatbildung der cES-Zellen innerhalb der ersten fünf Differenzierungstage erreicht werden. Ein Nachteil dieser EB-Formierung ist, dass die entstehenden EBs stark in ihrer Größe und Form variieren. Die Bildung uniformer Aggregate, wie sie durch die hängende Tropfen Methode erreicht wird, kann einen synchroneren Ablauf der Differenzierung der Zellen zur Folge haben. [25, 45].

Nach initialer EB-Formierung wurden die cES-Zellen am Tag 5 der Differenzierung auf Zellkulturplatten ausgesät und, genau wie für die Differenzierung muriner ES-Zellen beschrieben, für weitere 25 Tage in Medium supplementiert mit Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und der aktiven Form des Vitamin D₃, kultiviert. Während dieser Zeit kam es zur sichtbaren Mineralisierung der Kultur und auch die quantitative Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums bestätigte den hohen Mineralisierungsgrad. Dabei war die absolute Kalziummenge zwischen murinen differenzierten Zellen und cES-Zellen, mit rund 1 μ g Kalzium pro μ g Protein am Tag 30 der Differenzierung, vergleichbar. Auch der Differenzierungserfolg zwischen cES-Zellen welche zur Expansion auf Feederzellen bzw. Feederzell-frei kultiviert wurden, war vergleichbar. Die Expressionsanalyse osteoblastärer Markergene ergab eine Peakexpression für Cbfa1, einem direkten Zielgen des Wnt/ β -Catenin Signalweges [134] und frühestem molekularem Marker reifender Osteoblasten, zwischen Tag 15 und 20 der Differenzierung. Zielgene von Cbfa1, wie Osteocalcin und Bone Sialoprotein zeigten eine erhöhte Expression an Tag 25 der Differenzierung. Die-

se Expressionsmuster stimmen weitestgehend mit Ergebnissen der osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen überein, wie sie von zur Nieden und Mitarbeitern beschrieben wurden [29]. Sottile und Mitarbeiter beschrieben 2003 die osteogene Differenzierung von humanen ES-Zellen mittels Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat. Sie untersuchten die Expression von Cbfa1, Osteocalcin und Bone Sialoprotein am Tag 15 der Differenzierung. Sie konnten, durch die Differenzierung der humanen ES-Zellen unter dem Einfluss der osteogenen Substanzen, für alle drei Markergene eine Expression nachweisen [73]. Auch die Zunahme des in die Matrix der Zellen eingelagerten Kalziums der differenzierten humanen ES-Zellen über die Zeit ist mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen für cES-Zellen vergleichbar. Jedoch ist ein direkter Vergleich der absoluten Kalziummengen hier nicht möglich, da Sottile und Mitarbeiter die Kalziummenge pro Kulturfläche ermittelten und nicht pro Proteinmenge. Variationen in der Zelldichte wurden von Sottile und Mitarbeitern somit nicht in die Berechnung mit einbezogen. Gleiches gilt für die osteogene Differenzierung von Javaneraffen ES-Zellen durch Yamashita und Mitarbeiter, welche ebenfalls eine Zunahme der Kalziummenge über die Zeit beobachteten, jedoch ebenfalls ermittelt als Kalziummenge pro Fläche [74]. Sottile und Mitarbeiter beschrieben den induktiven Effekt der initialen EB-Formierung auf die osteogene Differenzierung. So konnten sie zwar eine zunehmende Mineralisierung der Zellen auch ohne EB-Formierungsschritt erkennen, diese wurde jedoch als verzögert im Gegensatz zur Differenzierung mit EB-Formierungsschritt beschrieben [73]. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Karp und Mitarbeitern, welche die verstärkte und schnellere osteogene Differenzierung humaner Stammzellen, ohne initialen EB-Bildungsschritt, gegenüber einer Differenzierung mit EB-Bildung beschrieben [135]. In der vorliegenden Arbeit wurde die osteogene Differenzierung von cES-Zellen mit und ohne EB-Bildungsschritt verglichen. Ohne initiale EB-Bildung konnte kein signifikanter Anstieg der Kalziummenge über die Differenzierungszeit gezeigt werden. Die EB-Bildung, welche auch auf die Differenzierung humaner ES-Zellen in andere Zelltypen einen induktiven Effekt hat [31, 136], ist für die osteogene Differenzierung von cES-Zellen vorteilhaft.

Zusätzlich zur Übertragung des osteogenen Differenzierungsprotokolls muriner ES-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob durch die gezielte Manipulation des zeitigen Wnt/ β -Catenin Signalweges die osteogene Differenzierung von cES-Zellen genauso beeinflusst werden kann wie bei murinen ES-Zellen. So zeigen Vorversuche mit murinen ES-Zellen in unserem Labor, dass durch die Behandlung der Zellen mit Retinolsäure von Tag 0-3 der Differenzierung, was eine Inhibierung der nukleären β -Catenin Aktivität zur Folge hat und anschließender Behandlung mit LiCl, was den mesodermalen β -Cateninanstieg im Nukleus unterstützt, eine Verstärkung der osteogenen Differenzierung erreicht werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden gleiche Experimente für cES-Zellen nachgestellt. Dazu wurden cES-Zellen von Tag 0-3 der Differenzierung mit Retinolsäure behandelt und von Tag 3-6 mit LiCl. Als Kontrolle wurde eine Differenzierung nur mit Retinolsäure von Tag 0-3 und eine nur mit LiCl von Tag 3-6 mitgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass auch die osteogene Differenzierung von cES-Zellen durch die Behandlung der Zellen mit Retinolsäure verstärkt werden kann. LiCl hingegen, kann weder einzeln, noch in Kombination mit Retinolsäure die osteogene Differenzierung weiter verstärken. Somit führt eine Unterstützung der zeitigen β -Catenin-Inhibierung wie für murine ES-Zellen postuliert, auch zur Verstärkung der osteogenen Differenzierung von cES-Zellen. Die gezielte Manipulation der β -Cateninaktivität zu Zeiten des für murine ES-Zellen beschriebenen Mesodermstadiums zeigt jedoch keine Auswirkung auf die Differenzierung von cES-Zellen. Somit scheint zwar die osteogene Differenzierung von cES-Zellen durch die gezielte Manipulation der β -Catenin Funktion beeinflussbar zu sein, jedoch scheinen die Zeitpunkte der β -Catenin An- bzw. Abschaltung in cES-Zellen zeitlich nicht mit denen muriner ES-Zellen übereinzustimmen. Zur spezifischeren Klärung der Vergleichbarkeit der zeitlich geordneten β -Cateninfluktuation in differenzierenden murinen ES-Zellen mit der von cES-Zellen, müssten, in weiterführenden Experimenten, Zeitpunkte der β -Catenin Akkumulation in den cES-Zellen über den gesamten Zeitraum der osteogenen Differenzierung untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass cES-Zellen nach initialem EB-Formierungsschritt, unter dem Einfluss von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und der aktiven Form des Vitamin D₃, ähnlich wie für murine ES-Zellen beschrieben, osteogen differenziert werden können. Sie zeigen im Laufe der Differenzierung einen signifikanten Anstieg der Mineralisierung welche durch die Analyse der in die Matrix der Zellen eingelagerten Kalziummenge quantifizierbar ist. Auch die Expression des osteoblastären Differenzierungsmarkers Cbfa1 und der terminalen osteoblasten-typischen Marker Osteocalcin und Bone Sialoprotein ist mit der muriner ES-Zellen vergleichbar. Die osteogene Differenzierung kann lediglich durch die Manipulation des sehr zeitigen Wnt/ β -Catenin Signalweges verstärkt werden. Somit scheinen der Differenzierung von cES-Zellen ähnliche zelluläre Prozesse zu Grunde zu liegen wie murinen ES-Zellen, jedoch scheint deren zeitliche Aktivierung zwischen den beiden Spezies zu variieren.

5.4 Im Suspensionsbioreaktor generierte ES-Zell-EBs besitzen das gleiche osteogenen Potential wie EBs aus statischer Formierung

Die Differenzierung muriner und humaner ES-Zellen wird zumeist durch die Bildung von Embryonalkörperchen (EBs) eingeleitet [24, 133]. Die zellulären Entwicklungsprozesse in einem EB entsprechen dabei denen eines sich entwickelnden Embryos, einschließlich der meso-, ekto- und endodermalen Differenzierung der Zellen [137, 138]. Bei der EB-Formierung *in vitro* ist die Regulierung der EB-Größe von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung der Zellen innerhalb des Aggregats. Der Nährstoff und Sauerstofftransport innerhalb eines Aggregates geschieht über Diffusion [139]. Dadurch kann es, gerade bei großen Aggregaten, zur Ausbildung von Konzentrationsgefällen bis hin zur Unterversorgung von Zellen im Zentrum der Aggregate kommen [140]. Durch die unterschiedlichen Nährstoff-Bedingungen für die Zellen, je nach Lage innerhalb des Aggregates, kommt es zur unterschiedlichen Differenzierung der Zellen. Gleichzeitig bildet sich in jedem Aggregat eine eigene Mikroumwelt aus verschiedenen zusammengesetzten interzellulären Signalmolekülen welche die Differenzierung der Zellen innerhalb des Aggregates zusätzlich beeinflusst [140]. Die Vereinheitlichung der Aggregatgröße zur Einleitung der gerichteten *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen scheint somit von entscheidender Bedeutung für einen synchronen Differenzierungsablauf und damit für die Entwicklung standardisierter Differenzierungsprotokolle zu sein. Die Bildung homogener EBs kann auf verschiedene Weise realisiert werden. So wurden EB-Separierungsprotokolle entwickelt, welche das Zusammenwachsen der Aggregate verhindern. Dazu zählt das hängende Tropfen Protokoll [25], sowie die Zentrifugation der Zellsuspension in 96-Kavitätenplatten mit rundem Boden, was ebenfalls zur separaten Generierung uniformer Aggregate führt [46]. Ein großer Nachteil dieser Methoden, ist der hohe Arbeitsaufwand. Eine EB-Formierung in größerem Maßstab, wie sie z.B. für Zellersatztherapien benötigt wird, kann durch diese

arbeitsaufwendigen Methoden praktisch nicht realisiert werden.

Eine Lösung stellen Zellkultursysteme, wie Rotationsschüttler, Spinnerflaschen oder automatisierte Bioreaktoren dar, welche neben der Skalierbarkeit der Ansätze auch noch die Vorteile eines hydrodynamischen Zellkultursystems haben. So kommt es durch die Suspendierung der Zellen im Medium zu einer einheitlichen Verteilung von Nährstoffen und Sauerstoff innerhalb des Mediums. Somit herrschen gleiche Umweltbedingungen für alle Aggregate innerhalb der Kultur [57]. Zusätzlich kommt es durch die Suspendierung zur Bildung von Flüssigkeitsscherstress für die Zellen [140]. Die Stärke des Scherstressses kann hauptsächlich durch die Agitationsgeschwindigkeit beeinflusst werden. In Spinnerflaschen und Bioreaktoren spielen zusätzliche Parameter wie Gefäß- und Rührergröße, sowie deren Geometrie eine Rolle [141]. Hinzu kommt die Scherstresserhöhung durch das Vorhandensein von Messsonden in einigen Bioreaktorsystemen [141]. Dabei scheint die Menge des Scherstressses von entscheidender Bedeutung für die EB-Bildung zu sein. So führt zu wenig Scherstress zu einer Verklumpung der Zellaggregate, wohingegen zuviel Scherstress zu einer Beschädigung der Zellmembran führt. Beides hat die Beeinträchtigung der Zellentwicklung innerhalb der Aggregate zur Folge [140].

In der vorliegenden Arbeit wurde die EB-Generierung von murinen und *Callithrix jacchus* ES-Zellen in dem Mini-Suspensionsbioreaktorsystem der Firma DASGIP mit der in statischer Kultur verglichen. Die statische EB-Generierung muriner ES-Zellen erfolgte dabei über das Protokoll der hängenden Tropfen. Die EB-Generierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen (cES-Zellen) über die hängende Tropfen Methode ist nicht möglich, da eine Reaggregation der Zellen nicht erfolgt. Deshalb wurden cES-Zell-EBs über die Kultivierung von Zellklustern in Suspensionschalen generiert. Es wurde die Auswirkung zwei verschiedener Rührergeometrien (Propeller- und Blattrührer) auf die EB-Formierung muriner ES-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich eine gleichmäßigere EB-Formierung durch den Blattrührer im Vergleich zum Propellerrührer. Durch den Einsatz des Propellerrührers kam es vermehrt zur Verklumpung der Aggregate. Die beiden Rührergeometrien unterschieden sich in der Art der erzeugten Strömung. So ist der Propellerrührer ein

axial fördernder Rührer, welcher je nach Drehrichtung die Zellen entweder nach oben oder unten fördert, vergleichbar mit dem Prinzip einer Schiffsschraube. Der Blattrührer hingegen führt zu einer radialen Strömung, wobei die Zellen seitlich an die Wand des Reaktors katapultiert und gleichmäßig oberhalb und unterhalb des Rührers verteilt werden. Die homogenere EB-Bildung mittels des Blattrührers ist dabei möglicherweise auf die Entstehung höherer Scherkräfte zurückzuführen, welche durch die veränderte Strömung und das Auftreffen der Aggregate auf die Reaktorwand entstehen. Der entstandene Scherstress durch die beiden Rührer konnte im verwendeten System, selbst von Ingenieuren der Herstellerfirma (DASGIP AG), aufgrund der Komplexität des Gefäßaufbaus mit seitlichen Armen für Messsonden, nicht berechnet werden, somit ist der Scherstress nicht quantifizierbar. Jedoch zeigen Flitterversuche in der vorliegenden Arbeit eindeutig die bessere Durchmischung des Mediums durch die Verwendung des Blattrührers. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu Ergebnissen von Schröder und Mitarbeitern, welche zur murinen ES-Zell-EB-Bildung einen Propellerrührer gegenüber einem Blattrührer bevorzugten. Jedoch räumten auch sie die Möglichkeit ein, dass je nach Reaktorgeometrie und Größe die Strömungsverhältnisse der Rührer variieren könnten, und so möglicherweise nicht jede Rührergeometrie in jedem System zu gleichen Ergebnissen führt [56]. Die Rührergeometrie muss somit an das jeweilige System angepasst und die Auswirkungen auf die Zellen neu begutachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wird, zur ES-Zell-EB-Generierung im verwendeten Mini-Suspensionsbioreaktorsystem der Firma DASGIP, der Blattrührer dem Propellerrührer vorgezogen.

Zusätzlich zur Rührergeometrie wird der Scherstress durch die Agitationsgeschwindigkeit beeinflusst [141]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des erhöhten Scherstress bei erhöhter Agitation auf die Formierung muriner ES-Zell-EBs und cES-Zell-EBs untersucht. Mit zunehmender Rührgeschwindigkeit (90-150rpm) sind murine ES-Zell-Aggregate am Tag 5 der Differenzierung kleiner. Dies bestätigt den Einfluss der Agitation und des damit verbundenen Scherstress auf die EB-Größe. Gleiche Ergebnisse erhielten Sen und Mitarbeiter bei der EB-Formierung neuronaler Stammzellen, welche ebenfalls mit

zunehmender Agitationsrate einen kleineren Durchmesser hatten [140]. Zusätzlich konnte von Sen und Mitarbeitern eine höhere Homogenität der EB-Größe mit zunehmender Rührgeschwindigkeit gezeigt werden. Gleiches konnte für murine EBs in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Durch die Kontrolle der Aggregatgröße und damit der Diffusionsdistanz für Nährstoffe und Sauerstoff, kann eine gleichmäßig gute Versorgung aller Zellen innerhalb des Aggregates sichergestellt werden [142]. Die Größen-Homogenität muriner EBs aus statischer hängender Tropfen Kultur entspricht dabei etwa der im Bioreaktor bei 130rpm.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Genexpression muriner EBs am Tag 5 der Differenzierung unter den verschiedenen Rührgeschwindigkeiten verglichen und der statischen EB-Generierung gegenübergestellt. Dabei zeigt sich eine leicht verzögerte Differenzierung der murinen Zellen im Bioreaktor, angezeigt durch die etwas stärkere Expression der beiden Pluripotenzmarker Oct4 und Nanog am Tag 5 der Differenzierung. Dies konnte gleichermaßen von Cormier und Mitarbeitern gezeigt werden, welche an Tag 4 der murinen ES-Zelldifferenzierung in Spinnerflaschen ebenfalls mehr Oct4 nachweisen konnten als in statischer Differenzierung [143]. Der endodermale Marker α -Fetoprotein ist durch die Kultivierung im Bioreaktor nicht beeinflusst. Der ektodermale Marker NF68 ist in der vorliegenden Arbeit am Tag 5 der Differenzierung lediglich unter höheren Agitationsraten geringer exprimiert als in statischer Kultur, dies entspricht ebenfalls den Ergebnissen von Cormier und Mitarbeitern, welche bei 100rpm keinen Expressionsunterschied von α -Fetoprotein und NF68 zu statischen EBs feststellen konnten [143]. Die Expression des frühen mesodermalen Markers Brachyury ist bei höheren Agitationsraten (130rpm und 150rpm) mit der von EBs aus statischer Kultur vergleichbar, bei niedrigeren Rührgeschwindigkeiten ist Brachyury geringer exprimiert und so möglicherweise die gesamte Mesodermbildung negativ beeinflusst. Cormier und Mitarbeiter beschrieben in Spinnerflaschen bei 100rpm ebenfalls eine geringere Brachyury Expression als in statischer EB-Generierung [143]. Es lässt sich somit vermuten, dass die EB-Generierung unter niedrigen Agitationsraten zu einer verminderten osteogenen Differenzierung der Zellen führt,

da Knochenzellen aus Teilen des Mesoderms generiert werden. Zur osteogenen Differenzierung wurde, aufgrund der gleichen Expression von Brachyury und der vergleichbaren Größen-Homogenität der EBs zu statischer Kultur, eine Rührgeschwindigkeit von 130rpm bevorzugt.

Zum direkten Vergleich der osteogenen Differenzierung der EBs aus statischer Kultur und aus dem Bioreaktor bei 130rpm, wurden diese gleichermaßen am Tag 5 der Differenzierung auf Zellkulturplatten ausgesät und unter dem Einfluss von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und der aktiven Form des Vitamin D₃ osteogen differenziert. Die quantitative Analyse des in die Matrix der Zellen eingelagerten Kalziums am Tag 30 der Differenzierung zeigt eine gleich große Kalziummenge und somit ein gleich hohes osteogenes Differenzierungspotential muriner ES-Zell-EBs aus statischer hängender Tropfen Kultur und aus dem Bioreaktor bei 130rpm. Ähnliche Ergebnisse konnten von Wang und Mitarbeitern für die kardiale Differenzierung muriner ES-Zellen gezeigt werden. Auch hier wurden EBs in einem Bioreaktor (RCCS) und in statischer Kultur generiert, die das gleiche Differenzierungspotential besitzen [144].

Die EB-Generierung im Bioreaktor aus *Callithrix jacchus* ES-Zellen wurde ebenfalls unter den verschiedenen Rührgeschwindigkeiten untersucht. Dazu wurden Zellkluster in den Bioreaktor inokuliert. Eine Einzelzellinokulation führte auch hier wie in der statischen EB-Generierung nicht zur EB-Bildung. Dies wurde ebenfalls bei humanen ES-Zellen beobachtet, welche aus diesem Grund häufig für 1-2 Tage als Zellkluster in Suspensionsplatten vorinkubiert werden und die entstandenen EBs erst dann in Spinnerflaschen inokuliert werden [145, 146]. Durch die Kultivierung unter den verschiedenen Rührgeschwindigkeiten ließ sich, anders als bei murinen ES-Zell-EBs, kein signifikanter Unterschied in der EB-Größe an Tag 5 der Differenzierung ermitteln. Dies ist wahrscheinlich auf die geringere Teilungsrate der cES-Zellen gegenüber murinen ES-Zellen zurückzuführen. So scheint es, dass die cES-Zell-EBs mit durchschnittlich etwa 80 μ m Durchmesser an Tag 5 der Differenzierung unterhalb der Größe liegen, bei welcher diese durch den Scherstress beeinflusst wird. Betrachtet man hingegen die Expression des Pluripotenzmarkers Oct4 am

Tag 5 der Differenzierung, so lässt sich eine generell höhere Expression des Markers im Bioreaktor gegenüber der statischen EB-Kultivierung erkennen, was auf eine verzögerte Differenzierung der Zellen im Bioreaktor hindeutet. Die Oct4 Expression ist jedoch durch die unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten nicht signifikant beeinflusst. Dies entspricht Ergebnissen der murinen EB-Bildung. Anders als bei murinen ES-Zellen ist die ektodermale Markerexpression bei niedrigeren Rührgeschwindigkeiten im Vergleich zu statischer Kultivierung erhöht. Mesodermale und Endodermale Marker sind durch die Bioreaktorkultivierung nicht beeinflusst.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollten EBs bei höheren Agitationsgeschwindigkeiten für die Differenzierung von cES-Zellen bevorzugt werden. Es wurde, für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen muriner und *Callithrix jacchus* Differenzierung, eine Rührgeschwindigkeit von 130rpm für alle weiteren Experimente festgelegt. Zur Untersuchung des osteogenen Differenzierungspotentials von cES-Zell-EBs aus statischer Kultur und aus dem Bioreaktor wurden die EBs, wie für murine ES-Zellen, am Tag 5 in Zellkulturplatten ausgesät und osteogen differenziert. Die quantitative Analyse des Kalziums an Tag 30 der Differenzierung zeigt auch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen EBs generiert in statischer Kultur und im Bioreaktor bei 130rpm.

Der verwendete Suspensionsbioreaktor erlaubt somit eine EB-Formierung muriner und *Callithrix jacchus* ES-Zellen, ähnlich der EB-Generierung in statischer Kultur, wobei die initiale Differenzierung der Zellen bei beiden Spezies durch die Bioreaktorkultivierung leicht verzögert ist. Das osteogene Differenzierungspotential der ES-Zellen ist jedoch bei beiden Spezies durch die EB-Formierung im Bioreaktor nicht beeinflusst und auf gleichem Niveau zum Potential statisch generierter EBs. Somit kann durch die Verwendung des Suspensionsbioreaktors eine EB-Generierung in großem Maßstab realisiert werden, welche in statischer Kultivierung, durch den erheblich höheren Arbeitsaufwand, nicht zu erreichen wäre.

5.5 Die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen im Suspensionsbioreaktor führt zur Inhibierung der Differenzierung

In der vorliegenden Arbeit konnte die erfolgreiche EB-Generierung muriner ES-Zellen in Suspensionsbioreaktoren der Firma DASGIP gezeigt werden. Anschließend wurde nun das für die statische Differenzierung muriner ES-Zellen etablierte osteogene Differenzierungsprotokoll auf die murine ES-Zell Differenzierung im Bioreaktor übertragen. Eine Kombination aus automatisierter Kultivierung im Suspensionbioreaktorsystem und osteogener Differenzierung eröffnet die Möglichkeit der industriellen Nutzung des osteogenen Differenzierungsprozesses für z.B. embryotoxische Teststudien eines neuen Wirkstoffes. Der automatisierte Differenzierungsprozess würde sich, unabhängig vom durchführenden Mitarbeiter, einfach zwischen den Laboren transferieren lassen. Ein zusätzlicher Vorteil des verwendeten Bioreaktorsystems ist die Möglichkeit des parallelen Betriebes mehrerer Bioreaktoreinheiten. So wurde das System in der vorliegenden Arbeit mit 8 parallelen Einheiten betrieben. Dies erlaubt eine gleichzeitige Testung mehrerer Wirkstoffkonzentrationen unter exakt gleichen Kulturbedingungen, wie es für embryotoxische Testverfahren vorgesehen ist [147].

Zur Untersuchung der osteogenen Differenzierung wurden murine ES-Zell-EBs für 5 Tage im Bioreaktor bei 130rpm generiert. Anschließend wurde das Kulturmedium, wie in statischer Differenzierung, auf osteogenes Differenzierungsmedium, mit den Zusätzen Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃, umgestellt. Die Zellen wurden für weitere 25 Tage unter konstanten Rührbedingungen im Bioreaktor differenziert. Eine Analyse des in die Matrix der Zellen eingelagerten Kalziums am Tag 30 der Differenzierung schloss sich an. Zusätzlich wurden Schnitte der EBs aus dem Bioreaktor angefertigt und das eingelagerte Kalzium mit Alizarin angefärbt um die Verteilung des Kalziums innerhalb der EBs zu untersuchen. Die quantitative Analyse des Kalziums zeigt eine stark

verminderte osteogene Differenzierung im Bioreaktor gegenüber der statischen Kultur. So war die Menge des eingelagerten Kalziums gegenüber statischer Differenzierung um rund 90% vermindert. Die Alizarinfärbung des Kalziums zeigte eine Konzentration des Kalziums auf einige wenige Zentren innerhalb der EBs. Die starke Verminderung der osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor ist überraschend. So zeigen veröffentlichte Studien eine stärkere Kalzifizierung osteoblastärer Kulturen unter dem Einfluss von Scherstress [79, 89, 148]. Dies entspricht der Hypothese, dass Osteoblasten, genauso wie Osteoklasten und Osteozyten *in vivo* einem ständigen Flüssigkeitsscherstress ausgesetzt sind, welcher durch die mechanische Beanspruchung und dem damit verbundenen Flüssigkeitsstrom innerhalb der Knochenkanälchen verursacht wird [77, 78]. Dieser Flüssigkeitsscherstress trägt *in vivo* zum ständigen Um- und Aufbau des Knochens bei [149].

Die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor wurde bereits durch Hwang und Mitarbeiter 2009 durchgeführt. Diese verwendeten Bioreaktoren, welche einen geringen Scherstress verursachen. Zusätzlich wurden die ES-Zellen in Alginate verkapselt, was zusätzlich noch zur Verminderung der auf die Zellen einwirkenden Scherkräfte führt [150]. Zwar konnten Hwang und Mitarbeiter das Vorhandensein funktionaler Osteoblasten in der Differenzierungskultur zeigen, jedoch wurden keine quantitativen Vergleiche zur statischen Differenzierung durchgeführt. Gleiches gilt für Taiani und Mitarbeiter, welche die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor unter dem Einfluss von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃ untersuchten [93]. Sie konnten ebenfalls die erfolgreiche osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor zeigen, jedoch wieder ohne vergleichende Analysen zur statischen Differenzierung. Interessanterweise erwarteten Taiani und Mitarbeiter eine verstärkte, fast vollständige, osteogene Differenzierung der Zellen unter Scherstress. Sie konnten diese Hypothese in den durchgeführten Experimenten jedoch nicht bestätigen und zeigten nach 30tägiger osteogener Differenzierung im Bioreaktor eine Teratomabildung nach Injektion der Zellen in immundefiziente Mäuse, welche nach ihren Angaben bei der statischen Differenzierung

der Zellen nicht gezeigt werden konnte [93]. Die Bildung von Teratomas lässt auf das Vorhandensein undifferenzierter, pluripotenter Zellen in der osteogenen Differenzierungskultur schließen und damit auf eine unvollständige osteogene Differenzierung durch die Kultivierung der Zellen im Bioreaktor.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine stark verminderte osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor gegenüber der statischen Differenzierung gezeigt. Betrachtet man die Unterschiede der beiden Kultivierungsarten, so lassen sich zwei signifikante Punkte unterscheiden: (1) die Zellen in statischer Differenzierung werden im Monolayer kultiviert, wohingegen die Zellen im Bioreaktor über den gesamten Differenzierungszeitraum als dreidimensionale Aggregate kultiviert werden und (2) zusätzlich zur dreidimensionalen Kultivierung sind die Zellen im Bioreaktor, über den gesamten Differenzierungszeitraum, Scherstress ausgesetzt. Beide Tatsachen, sowohl die 3D-Kultivierung als auch die Differenzierung unter Scherstress könnten somit zur Verminderung der osteogenen Differenzierung der Zellen beitragen. Dabei scheinen die Differenzierungstage 5-30 von größerer Bedeutung zu sein als die ersten 5 Differenzierungstage, wie der Vergleich der osteogenen Differenzierung von in statischer Kultur und im Bioreaktor generierten EBs zeigt.

Um den Einfluss der vollständigen 3D-Kultivierung auf die Differenzierung zu untersuchen, wurden in statischer Kultur generierte EBs über den gesamten Differenzierungszeitraum als intakte EBs in Suspensionsschalen unter dem Einfluss von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃ differenziert. Am Tag 30 wurde die Menge des in die Matrix der Zellen eingelagerten Kalziums vergleichend zur statischen 2D-Kultivierung im Monolayer untersucht. Dabei zeigte sich eine Verminderung der Kalziummenge durch die 3D-Kultivierung von 70% gegenüber der 2D-Kultivierung. Somit führt bereits die Differenzierung der murinen ES-Zellen in 3D-Aggregaten ohne Scherstress zur starken Verminderung der osteogenen Differenzierung. Diese Ergebnisse sind überraschend, bedenkt man, dass die Differenzierung in Aggregaten mehr der komplexen dreidimensionalen *in vivo* Embryogenese entspricht als eine Kultivierung der Zellen im 2D-Monolayer.

So zeigten Chen und Mitarbeiter, dass durch die Differenzierung von Rhesus-ES-Zellen in einem 3D-Kollagen-Trägermaterial die Expression von Keimblatt-spezifischen Differenzierungsmarkern gegenüber der zweidimensionalen Differenzierung der Zellen erhöht ist [151]. Baharvand und Mitarbeiter konnten durch die dreidimensionale Differenzierung humaner ES-Zellen eine Verstärkung der Differenzierung zu Hepatozyten erreichen [58]. Jedoch liegt beiden Studien die Differenzierung der Zellen in einem künstlichen Kollagen-Trägermaterial zu grunde, wobei die Zellen als Einzelzellen in das Material eingebracht wurden, somit ist zwar die Kultivierung in einer dreidimensionalen kollagenösen Umgebung erfolgt, was der *in vivo* Situation wesentlich ähnlicher ist als die 2D-Kultivierung, jedoch sind die Ergebnisse schwer mit den Ergebnissen der 3D-Kultivierung in komplexen Zellaggregaten, wie in der vorliegenden Arbeit, zu vergleichen.

Eine denkbare Ursache für die geringere osteogene Differenzierung der Zellen in der 3D-Kultur gegenüber der 2D-Kultur könnte ein Konzentrationsgefälle der osteogenen Substanzen innerhalb des Aggregates sein. Bedenkt man, dass die Nährstoffversorgung der Zellen in einem Aggregat über einfache Diffusion geschieht und die übereinanderliegenden Zellschichten innerhalb des Aggregates als natürliche Diffusionsbarriere fungieren, liegt folglich im Inneren des Aggregates eine wesentlich geringere Nährstoffkonzentration und demzufolge auch eine niedrigere Konzentration der osteoinduktiven Substanzen vor. Dies steht im Unterschied zur 2D-Kultivierung in Zellkulturplatten, bei welcher, durch die Kultivierung der Zellen in einer Einzelzellschicht alle Zellen der gleichen Substanzkonzentration ausgesetzt sind. Jedoch spricht gegen diese Hypothese, dass wie durch die Alizarinfärbung des Kalziums innerhalb der Aggregate aus dem Bioreaktor gezeigt wurde, die kalzifizierten Bereiche häufig auf das Zentrum der Aggregate beschränkt sind und Randbereiche der Aggregate, welche der tatsächlichen Konzentration der osteogenen Substanzen ausgesetzt sind, häufig keine Kalzifizierung zeigen. Eine weitere Hypothese könnte sein, dass jedes Aggregat eine eigene kleine Mikroumgebung ist, welche sich eher selbst durch die Zusammensetzung und Konzentration von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die durch die verschiedenen Zellen innerhalb des Aggregates abgegeben werden

reguliert, als durch die Beeinflussung von außen. Dies entspricht exakt der Einschätzung von Carpenedo und Mitarbeitern, welche die Manipulation der 3D-Aggregate von innen durch das Einbringen von abbaubaren PLGA Mikrokügelchen, welche die induktive Substanz enthielten, der Manipulation von außen durch die Supplementierung des Mediums mit der induktiven Substanz, vorzogen [152]. Sie konnten dadurch eine effektivere und synchronere Differenzierung der Zellen innerhalb der Aggregate erreichen.

Trotz der Annahme, dass die dreidimensionale osteogene Differenzierung der Zellen durch die Ausbildung einer Mikroumwelt innerhalb der Aggregate vermindert ist, ist die noch weiter verminderte osteogene Differenzierung durch die Kultivierung der Aggregate unter Scherstress, also im Bioreaktor, weiterhin unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen auf einem Rotationsschüttler, als ein weiteres Scherstress-induzierendes System untersucht und mit Daten der Bioreaktor- und statischen Differenzierung verglichen. Durch die Differenzierung muriner ES-Zellen auf dem Rotationsschüttler kam es ebenfalls zur Verminderung der osteogenen Differenzierung gegenüber der statischen 2D-Kultivierung. Jedoch war die Kalzifizierung mit rund 55% Verminderung gegenüber der statischen 2D-Kultivierung höher als durch den Bioreaktor mit rund 90% Verminderung gegenüber der statischen Differenzierung. Im Vergleich zur statischen 3D-Kultivierung war die osteogene Differenzierung auf dem Rotationsschüttler leicht verstärkt.

Sowohl für den Bioreaktor, als auch für den Rotationsschüttler kann aufgrund deren Komplexität, der auf die Zellen wirkenden Scherstress nicht exakt berechnet werden. Jedoch ist zu vermuten, dass der Scherstress auf dem Rotationsschüttler, bei welchem die Zellen im Medium nur horizontal geschwenkt werden und der Scherstress lediglich durch den Kontakt bzw. die Reibung der Aggregate mit dem Suspensionsplattenboden erhöht wird, niedriger ist, als im Bioreaktorsystem. Bei der Klassifizierung der im Knochen vorherrschenden Kräfte wird unterteilt in Flüssigkeitsscherstress, hydrostatischen Druck und Zell- und extrazelluläre Matrix-Deformation, wobei die größere Bedeutung für den Auf- und Umbau des Knochens dem vorherrschenden Flüssigkeitsscherstress zu-

geschrieben wird [80, 81, 153]. Bioreaktor und Rotationsschüttler könnten sich aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen (Suspension durch einen radial fördernden Rührer und horizontales Schütteln) in der Zusammensetzung der auftretenden Kräfte unterscheiden. Durch die schwierige Bewertung der in beiden Systemen vorherrschenden physikalischen Kräfte und da weder die Auswirkungen von Flüssigkeitsscherstress, noch von hydrostatischem Druck oder Deformationsereignissen auf osteogen differenzierende ES-Zellen untersucht sind, ist eine abschließende Bewertung der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse nicht möglich. Weiterführende Untersuchungen des Einflusses der einzelnen physikalischen Kräfte auf osteogen differenzierende ES-Zellen könnten zur genaueren Klärung der zugrunde liegenden Prozesse beitragen. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte verminderte osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor, ist wahrscheinlich auf ein Zusammenspiel veränderter Nährstoffversorgung, Mikromilieu-bildung innerhalb der Aggregate und Scherstress-induzierter Signalkaskadenaktivierung zurückzuführen.

5.6 Die osteogene Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen ist im Suspensionsbioreaktor verstärkt

In der vorliegenden Arbeit wurde die statische osteogene Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen (cES-Zellen) nach dem ursprünglich für murine ES-Zellen etablierten Differenzierungsprotokoll durchgeführt. Ziel war es nun dieses osteogene Differenzierungsprotokoll auf die Differenzierung der cES-Zellen im Bioreaktor zu übertragen. Die erfolgreiche EB-Generierung im Suspensionsbioreaktor konnte gezeigt werden. Dabei besitzen EBs aus dem Bioreaktor das gleiche osteogene Differenzierungspotential wie EBs generiert in statischer Kultur.

Zur vollständigen osteogenen Differenzierung im Bioreaktor wurden cES-Zell-EBs für 5 Tage im Bioreaktor bei 130rpm generiert. Anschließend wurde das Kulturmedium, wie in statischer Differenzierung, auf osteogenes Differenzierungsmedium, mit den Zusätzen Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃, umgestellt. Die Zellen wurden für weitere 25 Tage im Bioreaktor differenziert. Am Tag 30 der Differenzierung wurde das in die Matrix der Zellen eingelagerte Kalzium quantitativ analysiert. Im Gegensatz zur murinen ES-Zell-Differenzierung im Bioreaktor, ist die osteogene Differenzierung von cES-Zellen im Bioreaktor verstärkt. So zeigt sich am Tag 30 eine um 400% erhöhte Kalziummenge gegenüber statischer Differenzierung.

Vergleicht man die murine Differenzierung im Bioreaktor mit der cES-Zelldifferenzierung im Bioreaktor, zeigt sich ein Unterschied hinsichtlich der Aggregatentwicklung über den Differenzierungszeitraum. Die unter dem Einfluss von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃ differenzierten Aggregate zerfallen im Laufe der Differenzierung. Dies scheint von entscheidender Bedeutung für die osteogene Differenzierung zu sein. Durch das Zerfallen der Aggregate kann, die für murine Aggregate diskutierte Nährstoffunterversorgung der Zellen innerhalb des Aggregates, ausgeschlossen werden. Auch die durch

die Zellschichten im Aggregat vorhandene Diffusionsbarriere, gegenüber den osteoinduktiven Substanzen, ist somit für differenzierende cES-Zellen nicht vorhanden. Auch die diskutierte Mikroumwelt, welche sich möglicherweise in Aggregaten ausbildet und somit zur Verminderung der osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen beiträgt, gilt für cES-Zellen nicht, da keine intakten Aggregate vorhanden sind. Durch das Zerfallen der cES-Zell-Aggregate im Laufe der osteogenen Differenzierung im Bioreaktor kommt es somit nicht zur Inhibierung der Differenzierung durch den Einfluss der dreidimensionalen Kultivierung, wie er für murine ES-Zellen mit rund 70% Verminderung gegenüber der statischen 2D-Kultivierung gezeigt wurde. Das Ausbleiben des inhibierenden Effektes ist somit möglicherweise auf die unterschiedliche Aggregatausprägung von murinen und cES-Zellen während der Differenzierung zurückzuführen.

Interessanterweise bleibt jedoch während der osteogenen Differenzierung von cES-Zellen im Bioreaktor nicht nur der inhibierende Effekt aus, sondern die osteogene Differenzierung ist sogar noch signifikant verstärkt. Dabei könnte das Zerfallen der Aggregate ein Indiz dafür sein, dass β -Catenin welches in der osteogenen Differenzierung eine zentrale Rolle spielt, ebenfalls bei der Verstärkung der osteogenen Differenzierung von cES-Zellen unter Scherstress eine Rolle spielt. So ist β -Catenin nicht nur im Zuge der Wnt-Signalkaskade im Zellkern in einem Transkriptionskomplex, an der Transkription von Zielgenen beteiligt, sondern ebenfalls in einem Membrankomplex mit E-Cadherin mit der Zell-Zell-Adhäsion assoziiert [129]. Eine Überexpression von Cadherinen führt zur Verringerung der nukleären β -Cateninaktivität [154]. Die Auflösung des Cadherin-Cateninkomplexes an der Zellmembran führt hingegen zum Anstieg an freiem cytoplasmatischem β -Catenin, welches anschließend in den Zellkern transloziert wird und dort im Komplex mit LEF/TCF die Transkription von Zielgenen, unter anderem Cbfa1, welches wiederum Osteocalcin als Zielgen hat aktiviert [70]. Die Auflösung des Membrankomplexes scheint somit in Verbindung mit der erhöhten Expression osteoblastärer Differenzierungsmarker zu stehen. So könnte der Verlust des Zell-Zellkontaktes der cES-Zellaggregate im Bioreaktor in Zusammenhang mit der Auflösung der Cadherin-Cateninkomplexe an der Zellmem-

bran stehen und als Folge zur Verstärkung der osteogenen Differenzierung führen. Der Verlust der Zell-Zell-Kontakte könnte dabei tatsächlich auf den vorhandenen Scherstress zurückzuführen sein. So beschrieben Arnsdorf und Mitarbeiter eine verstärkte Auflösung der β -Catenin/N-Cadherin Verbindung in mesenchymalen Stammzellen durch die Applikation von Scherstress [155]. Gleiches konnte von Norvell und Mitarbeitern in Ratten Osteoblasten gezeigt werden, wobei diese zusätzlich einen inhibierenden Effekt des Scherstress auf GSK-3 β zeigen konnten, jene Kinase die den ständigen proteosomalen Abbau des cytoplasmatischen β -Catenins verursacht. Als Folge des Scherstress kommt es somit zusätzlich noch zur Inhibierung des β -Cateninabbaus und somit zur erhöhten nukleären Transkriptionsaktivität des β -Catenins [156]. Eine weitere Hypothese wäre, dass die erhöhte osteogene Differenzierung nicht eine Folge der zerfallenden Aggregate ist, sondern das Zerfallen der Aggregate eine Folge der erhöhten osteogenen Differenzierung unter dem Einfluss von β -Catenin. So ist zwar die Hypothese, dass eine verstärkte nukleäre β -Cateninaktivität zur Rekrutierung des β -Catenins von der Zellmembran und damit zum Auflösen der Membrankomplexe führt nicht bestätigt, jedoch ist bekannt, dass durch die Nutzung gleicher Bindungsstellen des β -Catenins durch E-Cadherin und LEF/TCF eine ausgesprochene Bindungskonkurrenz zwischen den Membrankomplexen und den Transkriptionskomplexen besteht [70, 157]. Somit könnte das Zerfallen der cES-Zellaggregate im Bioreaktor gleichermaßen die Ursache wie auch eine Folge der verstärkten osteogenen Differenzierung sein.

Eine abschließende Klärung der Ursache für die verstärkte osteogene Differenzierung der cES-Zellen im Bioreaktor ist in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Jedoch scheint das β -Catenin in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen. Die Regulierung der β -Cateninaktivität durch möglicherweise Scherstress-induzierte Signalkaskaden ist jedoch noch ungeklärt. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Aktivierung und Inhibierung intrazellulärer Signalkaskaden durch Scherstress sind zur Klärung notwendig. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls nicht abschließend geklärt werden, wieso es bei *Callithrix jacchus* ES-Zellen zu einer Verstärkung der osteogenen Differenzierung

im Bioreaktor kommt und bei murinen ES-Zellen zu einer Verminderung. Möglicherweise liegen hier Spezies-spezifische Unterschiede in der Regulierung der osteogenen Differenzierung unter Scherstress vor. Dies würde den Vorteil der Vorhersagbarkeit von Toxizitätsstudien für den Menschen, durch die Verwendung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen anstelle von murinen ES-Zellen, unterstreichen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines 3D-Bioprozesses zur osteogenen Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen in einem Suspensionsbioreaktor. In der vorliegenden Arbeit konnte die erfolgreiche osteogene Differenzierung von cES-Zellen im Bioreaktor unter dem Einfluss von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃ gezeigt werden. Die erfolgreiche Differenzierung der Zellen in dem verwendeten, vollautomatisierten Suspensionsbioreaktorsystem ermöglicht die Differenzierung der Zellen unter standardisierten Kulturbedingungen und erlaubt somit einen einfachen Labor-zu-Labortransfer des Prozesses, unabhängig vom durchführenden Personal. Damit eröffnet sich die Möglichkeit der industriellen Nutzung des Differenzierungsprozesses, z.B. zur Testung des embryotoxischen Potentials neuer Wirkstoffkandidaten. Jedoch sollten vor der eigentlichen Wirkstofftestung vergleichende embryotoxische Studien zwischen statisch und im Bioreaktor differenzierten Zellen durchgeführt werden, da eine unterschiedliche oder anders stark ausgeprägte Wirkung der Wirkstoffe im statischen System und im Bioreaktor durch die unklare Wirkung des Scherstress auf die osteogene Differenzierung, nicht ausgeschlossen werden kann.

6 Zusammenfassung

Eine Grundlage für die industrielle Nutzung embryonaler Stammzellen als Modellsysteme für Toxizitätsstudien, sind standardisierte Differenzierungsprotokolle. Dabei muss die Unabhängigkeit des Differenzierungsprozesses von örtlichen und personellen Bedingungen gewährleistet sein. Eine maximale Standardisierung kann nur durch eine vollständige Automatisierung des Differenzierungsprozesses unter akkurat definierten Bedingungen erreicht werden.

Die *in vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) ist mittlerweile für viele verschiedene Zelltypen beschrieben. So können sowohl murine als auch humane ES-Zellen in hochspezialisierte kardiale, neuronale und hämatopoetische, wie auch osteogene Zelltypen differenziert werden. In der vorliegenden Arbeit soll die gerichtete Differenzierung von ES-Zellen des Weißbüschelaffens (*Callithrix jacchus*) zu Osteoblasten etabliert werden. Zusätzlich soll die Differenzierung in ein vollautomatisiertes Mini-Suspensionsbioreaktorsystem der Firma DASGIP übertragen werden. Das Suspensionssystem ist dabei durch den Einsatz von Mini-Bioreaktoreinheiten (Arbeitsvolumen 45-100 ml) speziell auf die industrielle Anwendung zur Ermittlung des embryotoxischen Potentials von Testsubstanzen ausgerichtet. Die Nutzung humaner ES-Zellen wäre in diesem Zusammenhang wünschenswert, um eine exakte Vorhersagbarkeit der embryotoxischen Wirkungen einer Testsubstanz auf den menschlichen Organismus zu treffen, ist jedoch durch das Embryonenschutzgesetz und das Stammzellgesetz in Deutschland stark eingeschränkt. Eine kommerzielle Nutzung humaner ES-Zellen ist sogar vollständig verboten. Das *Callithrix jacchus* Modellsystem bietet, aufgrund der engen Verwand-

schaft zum Menschen, eine höhere Vorhersagbarkeit der Toxizitätstestergebnisse für den Menschen, als es bereits etablierte murine embryonale Testsysteme ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurden *Callithrix jacchus* embryonale Stammzellen (cES-Zellen) zunächst auf mitotisch inaktivierten embryonalen Mausfibroblasten (Feederzellen) kultiviert. Die Kultivierung embryonaler Stammzellen auf Feederzellen dient der Erhaltung der pluripotenten Eigenschaften der Zellen *in vitro* und ist sowohl für murine als auch für Primaten ES-Zellen beschrieben. Die Kultivierung der ES-Zellen auf Feederzellen ist jedoch bei deren gerichteten Differenzierung hinderlich. So kann zwar durch eine Vorinkubation des ES-Zell-Feederzell-Gemisches in Zellkulturplatten vor einem Experiment der Großteil der Feederzellen, aufgrund deren schnelleren Adhärenz an der Zellkulturplatte, abgetrennt werden, jedoch ist eine 100%ige Reinheit der ES-Zellen nicht sichergestellt. Somit ist jedes Experiment möglicherweise zu unterschiedlichen Anteilen mit Feederzellen kontaminiert. Dies führt zur Verfälschung der Ergebnisse. Eine Feederzell-freie Expansion der ES-Zellen wäre somit wünschenswert. Die Feederzell-freie Kultivierung muriner ES-Zellen ist durch den Einsatz des *Leukemia inhibitory factor* (LIF) möglich. LIF ersetzt dabei im Zusammenspiel mit fötalem Kälberserum vollständig die Funktion der Feederzellen. Für Primaten ES-Zellen konnte die Wirksamkeit des LIF zur Erhaltung der Pluripotenz nicht bestätigt werden. So scheint zur Erhaltung der Eigenschaften von Primaten ES-Zellen nicht wie für murine ES-Zellen die Aktivierung des STAT3-Signalweges entscheidend zu sein, sondern die Aktivierung der Smad2/Smad3-Signalkaskade. In der vorliegenden Arbeit wurde die Feederzell-freie Expansion der cES-Zellen etabliert. Dazu wurde der Smad2/Smad3-Signalweg durch die Verwendung von Activin A und bFGF aktiviert. cES-Zellen konnten auf diese Weise über 40 Passagen Feederzell-frei kultiviert werden. Die Eigenschaften der cES-Zellen wurden nach 40 Passagen Feederzell-freier Kultivierung überprüft und der Expansion der Zellen auf Feederzellen gegenübergestellt. Die Expressionsanalyse typischer Pluripotenz-assoziiierter Markergene, wie Oct4 und Nanog, zeigen eine hohe Expression nach 40 Passagen Feederzell-freier Kultivierung. Diese ist gleich zur Expression der Gene in cES-Zellen

welche auf Feederzellen kultiviert wurden. Ebenso können Primaten ES-Zell-typische Zelloberflächenantigene, wie SSEA-4 und TRA-1-60 durch immunzytochemische Färbung gleichermaßen auf Feederzell-freien cES-Zellen und auf Feederzellen kultivierten cES-Zellen, nachgewiesen werden. Beide Zellsysteme zeigen eine ES-Zell-typische hohe Telomeraseaktivität. Der Karyotyp ist durch die Feederzell-freie Kultivierung ebenfalls nicht verändert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es durch den Entzug von Activin A und bFGF zu einer spontanen Differenzierung der cES-Zellen kommt, angezeigt durch den Verlust der Genexpression von Oct4 und Nanog, sowie der Zelloberflächenantigene SSEA-4 und TRA-1-60 innerhalb weniger Tage. In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass cES-Zellen durch die Supplementierung des Mediums mit Activin A und bFGF Feederzell-frei expandiert werden können, ohne ihre pluripotenten Eigenschaften zu verlieren.

Die gerichtete osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen ist bereits beschrieben. Die Initiierung der Differenzierung erfolgt durch einen 5 tägigen Aggregationsschritt, meist über das Protokoll der hängenden Tropfen. Diese Aggregate werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu frühen embryonalen Strukturen als Embryonalkörperchen (engl. *embryoid bodies* oder EBs) bezeichnet. Nach diesem anfänglichen EB-Bildungsschritt werden die Zellen als Einzelzellschicht auf Zellkulturplatten ausgesät und unter dem Einfluss von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und der aktiven Form des Vitamin D₃ in Richtung Osteoblasten differenziert. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Protokoll auf die Differenzierung von cES-Zellen übertragen. Dabei zeigte sich, dass die Aggregatbildung von cES-Zellen durch das Protokoll der hängenden Tropfen nicht möglich ist. Das Protokoll der hängenden Tropfen sieht einen initialen Dissoziationsschritt der ES-Zellkolonien vor. Die so vorliegenden Einzelzellen werden in einer Zellsuspension mit definierter Zellzahl als 20 μ l große Tropfen auf die Innenseite eines Zellkulturschalendeckels aufgetropft. Dieser wird anschließend wieder auf die Zellkulturschale aufgesetzt. In den so hängenden Tropfen bilden sich aufgrund der Schwerkraft Zellaggregate am tiefsten Punkt des Tropfens. Diese Aggregatbildung konnte in der vorliegenden Arbeit bei cES-Zellen nicht

beobachtet werden, da sich einmal in Einzelzellen disoziierte cES-Zellen nicht mehr teilen und auch nicht wieder reaggregieren. Die Differenzierung von cES-Zellen wurde deshalb über die Kultivierung von Zellklustern von 10-20 Zellen in Suspensionsschalen, ähnlich wie für humane ES-Zellen beschrieben, initiiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die entstandenen cES-Zell-EBs am Tag 5 der Differenzierung auf Zellkulturplatten ausgesät und die osteogene Differenzierung anschließend durch die Zugabe von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃, wie für murine ES-Zellen beschrieben, in Richtung Osteoblasten vorangetrieben. Der Erfolg der osteogenen Differenzierung wurde anhand der in die, durch Osteoblasten gebildeten, Matrix eingelagerten Kalziummenge, sowie der Genexpression typischer osteoblastärer Markergene beurteilt. So zeigen cES-Zellen im Laufe der Differenzierung einen Anstieg der Kalziummenge, was für einen Anstieg der abgelagerten Matrixmenge und somit das zunehmende Vorhandensein reifer Osteoblasten spricht. Die Kalziummenge zum Ende der cES-Zell-Differenzierung entspricht dabei in etwa der Kalziummenge osteogen differenzierter muriner ES-Zellen. Zusätzlich konnte unter dem Einfluss von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃ eine im Laufe der Differenzierung zunehmende Expression von Cbfa1, einem frühen Marker osteogen differenzierender Zellen, sowie eine Expression der terminalen Osteoblastenmarker Osteocalcin und Bone Sialoprotein nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die initiale EB-Formierung von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der osteogenen Differenzierung von cES-Zellen ist, da eine Initiierung der Differenzierung ohne diesen EB-Formierungsschritt nicht zum typischen Anstieg der Kalziummenge über den Differenzierungszeitraum führt. Diese Ergebnisse stehen im Unterschied zur, für humane ES-Zellen beschriebenen, verstärkten Differenzierung der Zellen ohne EB-Bildungsschritt. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Vergleichbarkeit des murinen und des *Callithrix jacchus* Differenzierungsmodells hinsichtlich zugrunde liegender Signalkaskaden untersucht. Zwar sind die der osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen zugrunde liegenden Signalwege nicht vollständig geklärt, jedoch scheint der Wnt/ β -Catenin Signalweg eine zentrale Rolle zu spielen. Dabei scheint eine zeit-

lich strikt terminierte Inhibierung und Aktivierung des β -Catenins von entscheidender Bedeutung für die osteogene Differenzierung der Zellen zu sein. So zeichnen sich pluripotente ES-Zellen durch eine hohe nukleäre β -Cateninaktivität aus, welche bei spontaner Differenzierung herunterreguliert ist. Zum Zeitpunkt des gebildeten Mesoderms (ca. Tag 5 der Differenzierung) kommt es zum erneuten Anstieg der nukleären β -Cateninaktivität. Bleibt diese Aktivierung aus, wird die weitere Differenzierung in Richtung Chondrozyten anstatt Osteoblasten vorangetrieben. Auch in späteren Phasen der osteogenen Differenzierung ist eine erneute Inhibierung und anschließende Aktivierung der nukleären β -Cateninaktivität zu beobachten. Vorversuche an murinen ES-Zellen zeigen, dass durch die zeitlich gezielte Regulation der β -Cateninaktivität durch Retinolsäure (Inhibierung der β -Cateninaktivität) und LiCl (Aktivierung der β -Cateninaktivität) in frühen Phasen der Differenzierung, die osteogene Differenzierung verstärkt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die osteogene Differenzierung von cES-Zellen durch die Manipulation der β -Cateninaktivität in gleicher Weise wie für murine ES-Zellen zu verstärken. Dabei zeigte sich, durch die quantitative Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums, dass die cES-Zell-Differenzierung durch den Einsatz von Retinolsäure von Tag 0-3 der Differenzierung signifikant verstärkt werden kann. Eine erneute Aktivierung der β -Cateninaktivität von Tag 3-6 mit LiCl führte jedoch zu keiner weiteren Verstärkung der osteogenen Differenzierung. Somit konnte gezeigt werden, dass der Wnt/ β -Catenin Signalweg ebenfalls in die Differenzierung von cES-Zellen involviert ist, jedoch in frühen Phasen offensichtlich einer anderen zeitlichen Regulierung unterliegt als bei murinen ES-Zellen.

Die osteogene Differenzierung von cES-Zellen in Suspensionsbioreaktoren wurde in einem vollautomatisierten Bioreaktorsystem der Firma DASGIP durchgeführt. Die Charakterisierung des Systems wurde mittels muriner ES-Zellen durchgeführt und anschließend auf die Kultivierung der cES-Zellen übertragen. Dabei galt es optimale Rührbedingungen (Rührertyp, Rührgeschwindigkeit) für die Differenzierung von Stammzellen ohne Trägermaterial zu ermitteln. Dazu wurde zunächst die EB-Formierung muriner ES-Zellen

über 5 Tage unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten und unter dem Einsatz zwei verschiedener Rührergeometrien (Propeller- und Blattrührer) begutachtet. Entscheidend für die erfolgreiche EB-Bildung im Bioreaktor ist die Menge des auf die Zellen wirkenden Scherstress, welcher unter anderem durch die Suspendierung und den damit verbundenen Flüssigkeitsstrom im Medium entsteht. Zuviel Scherstress führt zur Zerstörung der Aggregate und Beschädigung der Zellmembran. Zu wenig Scherstress verursacht eine Verklumpung der Aggregate. Beides beeinflusst die Differenzierung der Zellen negativ. Sowohl für murine (Einzelzellinokulierung) als auch für cES-Zellen (Zellclusterinokulierung) konnte für das verwendete System eine gute Aggregatbildung bei einer Rührgeschwindigkeit von 90-150rpm ermittelt werden. Die Verwendung des Blattrührers zeigte sich dabei, aufgrund der besseren Suspendierungseigenschaften, als geeigneter für die Kultivierung der ES-Zellen als die Verwendung des Propellerrührers. Sowohl für murine als auch für cES-Zellen wurde die Größenentwicklung und Uniformität, sowie die Expression von Pluripotenz-Markergenen und Keimblatt-spezifischen Differenzierungsmarkergenen der Aggregate am Tag 5 der Differenzierung unter den verschiedenen Rührgeschwindigkeiten (90rpm, 110rpm, 130rpm und 150rpm) untersucht. Für murine ES-Zell-Aggregate konnte mit zunehmender Rührgeschwindigkeit eine Verkleinerung der Aggregate und eine Zunahme der Uniformität der Aggregate gezeigt werden. Die Größe von cES-Zell-Aggregaten ist durch die Rührgeschwindigkeit nicht beeinflusst. Dies ist möglicherweise auf die geringe Teilungsrate der cES-Zellen zurückzuführen. So sind cES-Zellaggregate mit einer Durchschnittsgröße von $80\mu\text{m}$ sehr klein und liegen somit offensichtlich unterhalb der durch den vorherrschenden Scherstress beeinflussbaren Größe der Aggregate. Die Expressionsanalyse der Pluripotenz-assoziierten Gene Oct4 und Nanog zeigt für beide Spezies eine höhere Expression der beiden Gene am Tag 5 der Differenzierung gegenüber statischer EB-Generierung, was für eine leicht verzögerte Differenzierung der ES-Zellen im Bioreaktor gegenüber statischer Differenzierung spricht. Die Verwendung niedriger Rührgeschwindigkeiten (90rpm und 110rpm) führt bei murinen ES-Zellen zu einer verringerten Expression des mesodermalen Markergens Brachyury im Vergleich zur

statischen Differenzierung. Da Osteoblasten aus Teilen des Mesoderms differenzieren und so durch die Verwendung niedriger Rührgeschwindigkeiten eine verminderte osteogene Differenzierung der Zellen zu erwarten war, wurde die Rührgeschwindigkeit zur osteogenen Differenzierung muriner ES-Zellen auf 130rpm festgelegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse und aufgrund der erhöhten ektodermalen Markerexpression bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten, wurde die osteogene Differenzierung von cES-Zellen ebenfalls bei 130rpm durchgeführt. Für beide Spezies wurde das osteogene Differenzierungspotential von im Bioreaktor bei 130rpm generierten EBs mit denen aus statischer Kultur verglichen. Dazu wurden die EBs aus dem Bioreaktor und aus statischer Generierung am Tag 5 in Zellkulturplatten ausgesät und anschließend unter dem Einfluss von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃ osteogen differenziert. Die quantitative Analyse des in die Matrix der Zellen eingelagerten Kalziums zeigt, sowohl für murine als auch für cES-Zellen, ein vergleichbares osteogenes Differenzierungspotential von EBs generiert in statischer Kultur und im Bioreaktor bei 130rpm. Der verwendete Suspensionsbioreaktor erlaubt somit eine EB-Formierung muriner und *Callithrix jacchus* ES-Zellen, ähnlich der EB-Generierung in statischer Kultur, wobei die initiale Differenzierung der Zellen bei beiden Spezies durch die Bioreaktorkultivierung leicht verzögert ist. Das osteogene Differenzierungspotential der ES-Zellen ist bei beiden Spezies durch die EB-Formierung im Bioreaktor nicht beeinflusst und auf gleichem Niveau zum Potential statisch generierter EBs. Somit kann durch die Verwendung des Suspensionsbioreaktors eine EB-Generierung in großem Maßstab realisiert werden, welche durch die, in statischer Kultur als äußerst zeitaufwendig beschriebene EB-Generierung, nicht zu erreichen wäre. Zur vollständigen osteogenen Differenzierung der ES-Zellen im Bioreaktor wurde sowohl das Medium muriner als auch von cES-Zell-EBs am Tag 5 der Differenzierung mit Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Vitamin D₃ supplementiert. Nach insgesamt 30 Tagen im Bioreaktor wurde die in die Matrix der Zellen eingelagerte Kalziummenge analysiert und mit Ergebnissen der statischen Differenzierung verglichen. Die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen im Bioreaktor ist dabei gegenüber statischer Differen-

zierung um etwa 90% verringert. Zusätzliche Experimente zur Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultur, bei welcher die EBs am Tag 5 nicht in Einzelzellen zerlegt werden, sondern die Differenzierung über 30 Tage in intakten Aggregaten in Suspensionschalen erfolgt, zeigen dass die Kultivierung der Zellen in dreidimensionalen Aggregaten einen entscheidenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung hat. So ist bereits durch die ungerührte 3D Kultivierung die osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen gegenüber der statischen 2D-Kultivierung (Kultivierung in Einzelschicht) um 70% verringert. Die Kultivierung dieser 3D-Aggregate unter Scherstress (Bioreaktor) führt zusätzlich noch zur weiteren Verringerung der osteogenen Differenzierung um rund 20%. Wahrscheinlich ist diese verminderte osteogene Differenzierung in 3D-Aggregaten auf die Bildung einer Mikroumwelt innerhalb jeden Aggregates zurückzuführen, bei welcher sich die Entwicklung der Zellen eher durch die von den Zellen abgegebenen Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren selbst reguliert, als durch die Beeinflussung von außen durch die Supplementierung des Mediums mit osteoinduktiven Substanzen. Die zusätzliche Verminderung der osteogenen Differenzierung unter Scherstress im Bioreaktor ist vermutlich auf die noch weitgehend ungeklärte Aktivierung bestimmter Differenzierungssignalwege durch Scherstress zurückzuführen und konnte in der vorliegenden Arbeit auch durch zusätzliche Experimente zur osteogenen Differenzierung auf einem Rotationschüttler, als ein weiteres Scherstress-induzierendes System, nicht abschließend geklärt werden.

Die Übertragung des osteogenen Differenzierungsprotokolls auf die Differenzierung von cES-Zellen im Bioreaktor zeigte eine Erhöhung der in die Matrix der Zellen eingelagerten Kalziummenge um 400% gegenüber der statischen Differenzierung von cES-Zellen. Auch hier ist die Verstärkung der osteogenen Differenzierung unter Scherstressbedingungen unklar, jedoch lässt sich ein Zusammenhang mit der nukleären β -Cateninaktivität vermuten. Die unterschiedlichen Auswirkungen des Scherstress auf die osteogene Differenzierung von murinen und cES-Zellen kann in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht geklärt werden. Weiterführende Experimente hinsichtlich Spezies-spezifischer Signalkaskadenaktivierung durch Scherstress wären zur endgültigen Klärung erforderlich. Jedoch unter-

streichen die ermittelten Speziesunterschiede die Verwendung von Primaten ES-Zellen für embryonale Toxizitätsstudien potentieller humanmedizinischer Wirkstoffe gegenüber der Verwendung muriner ES-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die erfolgreiche osteogene Differenzierung Feederzellfrei expandierter *Callithrix jacchus* ES-Zellen in einem vollautomatisierten Suspensionsbioreaktorsystem gezeigt werden. Dies ermöglicht die industrielle Nutzung dieses Differenzierungsprozesses zur Testung des osteotoxischen Potentials potentieller Wirkstoffkandidaten der Humanmedizin. Auch eine Nutzung der Bioreaktor-gestützten Differenzierung von cES-Zellen zur Erprobung möglicher Zelltransplantationsstrategien in der regenerativen Zelltherapie, wäre denkbar.

Zusammenfassung in englischer Sprache

Standardized differentiation protocols are the basis for the industrial use of embryonic stem cells (ESCs) for embryo toxicity tests. These differentiation protocols must be robust enough to provide consistent results independently of environmental parameters. This goal can be reached by the complete automation of the differentiation process through the use of computer controlled cultivation systems. The *in vitro* differentiation of ESCs has already been described for many cell types. This includes the differentiation of murine as well as human ESCs to highly specialized cardiac cells, neuronal cell types, bone cells and cell types of the hematopoietic system. In the present work the differentiation of marmoset (*Callithrix jacchus*) ESCs to osteoblasts was established. Additionally, this differentiation procedure was transferred to a fully automated suspension bioreactor system (DASGIP company). By using mini-bioreactors (working volume 45-100 ml) the system is optimal for industrial application of osteogenic differentiation for drug testing. For the reliable prediction of the toxicity of test compounds for human medicine, the use of human ESCs would be desirable. In Germany however, the commercial use of human ESCs is outlawed. Because of their evolutionary relationship, *Callithrix jacchus* ESCs (cESCs) serve as an adequate cell model to substitute for human ESCs. Thus using cESC differentiation for prediction of toxicity of test compounds for the human organism is more precise than using established murine ESC test systems. In the present work cESCs were initially cultivated on feeder cells (mitotically inactivated murine embryonic fibroblasts) to maintain their pluripotent characteristics as it is described for both, the cultivation of murine and human ESCs. One disadvantage of feeder cells is the difficulty of removing them when differentiation is initiated. Because feeder cells adhere faster to plastic surfaces than ESCs do, one possibility to remove feeder cells is the short pre-incubation of the ESC-feeder-mix on cell culture plates prior differentiation. However, the complete removal of feeder cells is not guaranteed. Thus experiments are possibly contaminated with different amounts of feeder cells which in

turn alter experimental data. Therefore it will be more advantageous to establish a feeder free protocol for the expansion of cESCs. The feeder free cultivation of murine ESCs is already described and can be realized by the use of leukaemia inhibitory factor (LIF), which alone is sufficient to maintain pluripotency of the cells. For primate ESCs however, the ineffectiveness of LIF is described. Thus different signalling pathways seem to be involved in the maintenance of pluripotency of primate and murine ESCs. For murine ESCs the STAT 3 signalling pathway seems to be crucial for maintaining pluripotency. For human ESCs the Smad2/Smad3 signal cascade seems to substitute for STAT 3 signalling. In the present work the feeder free expansion of cESCs was established. For that, Activin A and bFGF, both known to be involved in the activation of Smad signalling, were used to maintain pluripotency of cESCs. Doing so, cESCs were cultivated feeder free for more than 40 passages without losing their pluripotent properties. Comparisons of the expression of pluripotency markers, such as Oct4 and Nanog showed similar expression levels to cESCs of the same passage which were cultivated on feeder cells. The existence of SSEA-4 and TRA-1-60, both typical surface markers for primate ESCs, could be demonstrated for both culture systems by immunocytochemical staining of cESC colonies. Both, cESCs cultivated on feeder cells, as well as feeder free cESCs showed a high telomerase activity, as typical for ESCs. The karyotype of the cells is also not altered by feeder free expansion of the cESCs as shown by the karyotype analysis after 40 passages. Additionally the spontaneous differentiation of cESCs could be shown after withdrawal of Activin A and bFGF, by the rapid loss of Oct4 and Nanog as well as SSEA-4 and TRA-1-60. In the present work the feeder free expansion of cESCs was demonstrated. By the use of Activin A and bFGF cESCs were cultivated for more than 40 passages without losing their pluripotent characteristics. The guided differentiation of murine ESCs into osteoblasts has already been described. Commonly, differentiation is initiated by a cell aggregation step called the hanging drop protocol in which ESC colonies are enzymatically dissociated into single cells. Afterwards cell suspension with a well-defined cell concentration is pipetted as small droplets (20 μ l) to the inner surface of a petri

dish lid. The lid is then switched back into its original position. Within 5 days, so called embryoid bodies (EBs) form in the center of these hanging drops. On day 5 of differentiation these EBs are dissociated into single cells and plated onto cell culture plates. Osteoblasts are differentiated by the addition of ascorbic acid, β -glycerophosphate and the active form of vitamin D₃ to the culture medium. In the present work this protocol was transferred to cESCs. Interestingly, the formation of aggregates with the hanging drop protocol is insufficient for cESCs, because once dissociated into single cells, cESCs stop proliferating and do not reaggregate properly. Thus for the formation of cESC EBs, the cell cluster technique was used, which is also described for the EB formation of human ESCs. For that, cESC colonies were dissociated into cell clusters of 10-20 cells and cultured in petri dishes for 5 days. On day 5, EBs were plated to cell culture plates and differentiated as described for murine ESCs. The success of differentiation was estimated by the measurement of calcium, which was incorporated to the cell matrix made by osteoblasts and the expression of bone marker genes. While differentiating, cESCs start to mineralize, indicated by the increase of calcium level. In the present work final calcium content of differentiated cESCs could be shown to be equal to murine differentiation results. Additionally the expression of *Cbfa1*, an early osteogenic differentiation marker and the mature osteogenic markers osteocalcin and bone sialoprotein were shown to increase during cESC differentiation. Thereby the initial EB formation step is of vital importance for the differentiation success. The osteogenic differentiation of cESCs without EBs could be shown to lack the typical calcium increase over the duration of the differentiation. This is contradictory to results described for human ESCs, where the differentiation without the EB formation step led to enhanced mineralization of the culture. In the present work the involvement of *wnt*/ β -catenin signalling in the early osteogenic differentiation of cESCs was investigated. Indeed the underlying processes for osteogenic differentiation of ESCs are not fully understood, preliminary data from murine ESC differentiation show the importance of a timely regulated activation and inactivation of β -catenin for successful differentiation. Thus, pluripotent murine ESCs show a

high level of nuclear β -catenin activity. Upon differentiation this activity is decreased. Around day 5 of differentiation, namely the time of mesoderm formation, nuclear β -catenin activity increases again. Lacking the increased β -catenin activity on day 5, cells differentiate into chondrocytes instead of osteoblasts. Another activation/inactivation switch can be recognized in the late stage of osteogenic differentiation. Data from murine ESC differentiation experiments show that the early β -catenin activity (day 0-3 and 3-6) can be manipulated by retinoic acid (inhibition of β -catenin) and LiCl (activation of β -catenin) leading to enhanced mineralization of the culture. In the present work retinoic acid and LiCl were used to manipulate the cESC β -catenin signalling in a similar way as shown for murine ESCs. The influence of the osteogenic differentiation of cESCs was investigated by calcium measurements. Addition of retinoic acid from day 0-3 of differentiation enhanced the mineralization of the cESCs culture. Further calcium increase by the additional reactivation of β -catenin from day 3-6 of differentiation by LiCl could not be shown. This indicates the involvement of β -catenin signalling in early differentiation processes of cESCs but probably differently timed compared to murine ESC differentiation. The osteogenic differentiation of cESCs in suspension bioreactors was done in a fully automated system of the DASGIP company (Germany). For characterization of the system murine ESCs were used. Parameters, such as stirrer type and agitation speed for optimal EB formation were determined. Afterwards these parameters were transferred to cESCs. For an optimal EB formation the strength of shear force, which occurs by the agitation is of vital importance. Shear forces above a certain level lead to disruption of cell membranes, shear forces which are too low induce agglomeration of EBs, both known to be disadvantageous for the differentiation of ESCs. The strength of the shear force is influenced by agitation speed and stirrer geometry. Thus, the influence of two different stirrer types (paddle and propeller) and different agitation rates to the EB formation of ESCs was investigated. For murine ESCs, which were inoculated as single cells, as well as for cESCs, which were inoculated as cell clusters, a good EB formation could be shown by using agitation speed between 90 and 150 rpm. In the present work the

paddle stirrer was shown to be better for EB formation, compared to propeller stirrer. Additionally the influence of the different agitation rates (90rpm, 110rpm, 130rpm and 150rpm) on the size and gene expression of EBs was investigated on day 5 of differentiation. The higher the agitation rate, the smaller and more uniform the murine EBs. Size of cESC EBs was not influenced by agitation rate. This is probably because of lower proliferation activity of cESCs as compared to murine ESCs. Thus, cESC EBs are much smaller on day 5 of differentiation (about 80 μm) compared to murine EBs and therefore too small to be size controlled by the shear force. However, ESCs of both species show an increased expression of the pluripotency associated genes Oct4 and Nanog in the bioreactor on day 5 of differentiation indicating an decelerated differentiation in the bioreactor compared to static differentiation. Lower agitation rates (90rpm and 110rpm) decreased the expression of the mesodermal marker gene brachyury on day 5 of murine ESC differentiation in the bioreactor compared to static culture. Because osteoblasts develop from the mesoderm and mesodermal differentiation is negatively influenced by lower agitation rates an agitation rate of 130rpm for the osteogenic differentiation of murine ESCs was preferred. For better comparison to murine ESCs and the fact that ectodermal expression is enhanced with lower agitations rates (90rpm and 110rpm), osteogenic differentiation of cESCs was also carried out at 130rpm. The differentiation potential of EBs generated in the bioreactor at 130rpm was compared to the potential of EBs generated in static culture. In these experiments EBs were formed by the hanging drop method (murine ESCs) or by the cell cluster technique (cESCs) as well as in the bioreactor at 130rpm. On day 5 of differentiation these differently generated EBs were plated to cell culture plates in a similar manner. Osteogenic differentiation was then directed to osteoblasts by the use of ascorbic acid, β -glycerophosphate and the active form of vitamin D₃. On day 30 of differentiation mineralization was compared between the different cultures. Results show no influence of EB formation strategy on the osteogenic differentiation success of either murine ESCs or cESCs. Thus, the suspension bioreactor systems seems to be adequate for the EB formation of murine and cESCs EBs

and the osteogenic differentiation potential of these EBs is similar to EBs generated in static culture. Because of reduced effort compared to static EB formation, the use of the bioreactor system could be advantageous regarding large scale EB formation experiments as needed for transplantation studies. For the complete osteogenic differentiation of murine and cESCs in the bioreactor the medium of generated EBs was supplemented with ascorbic acid, β -glycerophosphate and the active form of vitamin D₃. On day 30 of differentiation the calcium content of bioreactor and static differentiation cultures was compared. Results show a 90% decreased osteogenic differentiation of murine ESCs in the bioreactor compared to the static differentiation. Additional experiments, where murine ESCs were differentiated as intact EBs but not agitated (EBs were not dissociated on day 5 and cultured in suspension in petri dishes until day 30 of differentiation) show that osteogenic differentiation is negatively influenced by the 3-dimensional differentiation. Results show a 70% decreased osteogenic differentiation of intact murine EBs compared to monolayer differentiation. Thus osteogenic differentiation of murine ESCs is less effective in 3D aggregates compared to monolayer differentiation and further decreased by agitation of these 3D aggregates. It is likely that decreased osteogenic differentiation in 3D aggregates occurs because cells in the aggregate start to release cytokines and growth factors which influence the differentiation of other cells within the aggregate. Therefore the aggregate seems to be a closed system, which differentiation is more regulated by the inner environment than the outer environment which is altered by supplementation of the culture medium with cytokines and growth factors. The fact that the agitation of these aggregates further decreases the osteogenic differentiation is still unclear. Here, probably shear force induced signalling pathways play an important role in the regulation of differentiation. Additional experiments on murine ESC differentiation with a rotation shaker used as an alternative shear force inducing system, as performed in the present work, did not clarify this situation. Surprisingly, the differentiation of cESCs in the bioreactors resulted in a 400% increased osteogenic differentiation compared to static differentiation. In fact the reason for this increase is

again unclear, the involvement of nuclear β -catenin activity is assumed. The questions as to why shear force influences the differentiation of murine and cESC differently can not be sufficiently explained in the present work. Additional experiments regarding the regulation of probably shear force influenced signalling pathways are necessary. However the results indicate species differences regarding osteogenic differentiation under shear force. Thus the choice of species seems to be important for toxicity testing of drug compounds. In the present work the successful osteogenic differentiation of feeder cell free expanded cESCs in a fully parameter-controlled and regulated suspension bioreactor was shown. This environmentally independent process allows the industrial application of osteogenic differentiation of ESCs for use in embryotoxicity testing of drugs. Additionally it opens the possibility for large scale differentiation experiments under accurate defined culture conditions in the field of regenerative cell therapy.

7 Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Dr. zur Nieden für die Bereitstellung des Themas und Betreuung der Doktorarbeit am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI) Leipzig bedanken. Mein besonderer Dank gilt der Betreuerin meiner Arbeit seitens der Fakultät, Frau Prof. Dr. Robitzki.

Frau Dr. Faber vom Fraunhofer Institut danke ich für die Korrektur der englischen Zusammenfassung.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Mama und meinem Freund Randy für die unerschöpfliche Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotionszeit.

8 Wissenschaftlicher Werdegang

Name	Susanne Trettner
Geboren	09. September 1981 in Leipzig
Staatsangehörigkeit	deutsch
1992 - 2000	Brockhaus Gymnasium Leipzig, Abitur
2000 - 2001	Studium der Biologie an der Universität Regensburg
2001 - 2005	Weiterführung des Studium der Biologie an der Universität Leipzig, Abschluss als Diplombiologin
10/2004 - 09/2005	Diplomarbeit in der AG Zelltechniken und angewandte Stammzell- biologie, BBZ, Universität Leipzig Titel: Untersuchung des Einflusses von hyper-, norm- und hypooxi- schen Kulturbedingungen auf adulte Hepatozyten. unter Anleitung von Herr Prof. Dr. Augustinus Bader
10/2005 - 12/2005	WHK in der Arbeitsgruppe für Zelltechniken und angewandte Stammzellbiologie, BBZ, Universität Leipzig
02/2006 - 04/2006	WHK im Forschungslabor der Chirurgie, Universität Leipzig

Wissenschaftlicher Werdegang _____

05/2006 - 10/2006 WHK im Forschungslabor der Augenklinik, Universität Leipzig

Seit 11/2006 Promotion in der Arbeitsgruppe für angewandte Stammzelltechnologie, Fraunhofer Institut (IZI) Leipzig
unter Anleitung von Frau Dr. Nicole I. zur Nieden

9 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Originalpublikationen im Rahmen der Dissertation

S. Trettner, A. Findeisen, S. Taube, E. Sasaki, N.I. zur Nieden

Osteogenic induction from primate embryonic stem cells cultured in feeder-dependent and feeder-independent conditions.

Cell Death and Differentiation, eingereicht 09/2009, unter Revision; IF: 8.399 (2008).

L. Baumgartner, K.C. Keller, J. Ast, T.S. Satoorian, S. Trettner, N.I. zur Nieden

Predicting developmental osteotoxicity in the EST: differential sensitivity of primate and murine embryonic stem cells.

In Vorbereitung für Toxicology Letters IF: 3.479 (2009.)

A. Seeliger, S. Trettner, S. Horvat, B. Kuske, J. Ast, N.I. zur Nieden

Embryoid body formation in fully automated suspension bioreactors enhances the proportion of neural-crest derived osteoprogenitors.

In Vorbereitung für Stem Cells IF: 7.747 (2009).

S. Trettner, B. Kuske, I.K.C. Martinez, K.C. Keller, N.I. zur Nieden

Embryonic stem cell differentiation into osteoblasts is impaired in 3D.

In Vorbereitung.

Buchartikel im Rahmen der Dissertation

L. Baumgartner, S. Trettner, V. Savkovic, C. Martin, N.I. zur Nieden
Stem cells and their use in skeletal tissue repair.

In: Appasani K (ed), Stem Cells and Regenerative Medicine, Springer, *im Druck*

S. Trettner, A. Seeliger, N.I. zur Nieden

Embryoid body formation in suspension: recent advances in automated bioreactor technology.

In: zur Nieden NI (ed), Embryonic stem cell therapy for osteo-degenerative diseases. Methods Mol Biol, Humana Press, *im Druck*

Poster im Rahmen der Dissertation

S. Trettner, E. Sasaki, N.I. zur Nieden

Development of an automated 3D bioprocess for osteogenic differentiation of primate embryonic stem cells.

Saxon Biotechnology Symposium 2007 (Brand M., Schwille P., Robitzki A.A., Seibel P., Hrsg.), S.132, ISBN 978-3-86780-044-0

S. Trettner, A. Seeliger, N.I. zur Nieden

Controlled formation of embryoid bodies in bioreactors for reproducible differentiation initiation of mouse and primate embryonic stem cells.

Saxon Biotechnology Symposium 2009 (Robitzki A.A., Blessing M., Züchner T., Brand M., Stewart F., Beyer A., Schäffer E., Hrsg.), S.188, ISBN 978-3-00-027884-6

S. Trettner, E. Sasaki, N.I. zur Nieden

Development of an automated 3D bioprocess for osteogenic differentiation of primate embryonic stem cells.

6th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2007 (Thiery J., Beck-Sickinger A., Arendt T., Hrsg.), S.294, ISBN 3-9810760-2-8

S. Trettner, A. Seeliger, N.I. zur Nieden

Scalable production of uniform EBs from embryonic stem cells for high-throughput screens.

7th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2008 (Thiery J., Beck-Sickinger A., Arendt T., Hrsg.), S.279, ISBN 3-9810760-4-4

S. Trettner, G. Fleischmann, P.A. Horn, E. Sasaki, N.I. zur Nieden

Osteogenesis in primate embryonic stem cells.

Regenerative Medicine, September 2007 Vol.2, No.5, S.699, ISSN 1746-0751

S. Trettner, S. Taube, N.I. zur Nieden

Osteogenic differentiation of common marmoset monkey embryonic stem cells cultured in a feeder-free environment.

Regenerative Medicine, November 2009 Vol.4, No.6, (Suppl.2), S.293, ISSN 1746-0751;
Impact factor: 2.8 (2009)

S. Trettner, L.A. Davis, D.E. Rancourt, N.I. zur Nieden

Osteogenesis of embryonic stem cells - a species comparison.

Stem Cells 2007, Punta Cana Dec 2007, Abstract book S.43

S. Trettner, S. Taube, E. Sasaki, N.I. zur Nieden

Feeder-free culture and osteogenic differentiation in marmoset embryonic stem cells.

Stem Cell Network 2007 AGM, Toronto Nov 2007, Abstract book S.49

Andere Veröffentlichungen

M. Hollborn, C. Petto, A. Steffen, S. Trettner, A. Bendig, P. Wiedemann, A. Bringmann, L. Kohen

Effects of thrombin on RPE cells are mediated by transactivation of growth factor receptors.

Investigative Ophthalmology and Visual Science, 50(9), 4452-9, 2009; Impact factor: 3.5 (2008)

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe und dass ich die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken in der Arbeit als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Susanne Trettner

Leipzig, den 27. Februar 2011

Literaturverzeichnis

- [1] Solter D., Knowles B. B. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(12):5099–5102, 1975.
- [2] Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391):1145–7, 1998.
- [3] 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., Gough N. M. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336(6200):684–687, 1988.
- [4] Evans M. J., Kaufman M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819):154–156, 1981.
- [5] Martin G. R. 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(12):7634–7638, 1981.
- [6] Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Becker R. A., Hearn J. P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(17):7844–8, 1995.
- [7] Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Hearn

- J. P. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod*, 55(2):254–259, 1996.
- [8] Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5):643–55, 2003.
- [9] Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S. The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and es cells. *Cell*, 113(5):631–642, 2003.
- [10] Wright W. E., Piatyszek M. A., Rainey W. E., Byrd W., Shay J. W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*, 18(2):173–179, 1996.
- [11] Solter D., Knowles B. B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (ssea-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(11):5565–5569, 1978.
- [12] Kannagi R., Cochran N. A., Ishigami F., Hakomori S., Andrews P. W., Knowles B. B., Solter D. Stage-specific embryonic antigens (ssea-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J*, 2(12):2355–2361, 1983.
- [13] Bradley A., Evans M., Kaufman M. H., Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309(5965):255–256, 1984.
- [14] Laflamme M. A., Gold J., Xu C., Hassanipour M., Rosler E., Police S., Muskheli V., Murry C. E. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol*, 167(3):663–671, 2005.

- [15] Kehat I., Khimovich L., Caspi O., Gepstein A., Shofti R., Arbel G., Huber I., Satin J., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 22(10):1282–1289, 2004.
- [16] Wobus A. M. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med*, 22(3):149–164, 2001.
- [17] Leahy A., Xiong J. W., Kuhnert F., Stuhlmann H. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool*, 284(1):67–81, 1999.
- [18] Wobus A. M., Guan K., Yang H. T., Boheler K. R. Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol*, 185:127–156, 2002.
- [19] Sachinidis A., Fleischmann B. K., Kolossov E., Wartenberg M., Sauer H., Hescheler J. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res*, 58(2):278–291, 2003.
- [20] Wobus A. M., Kaomei G., Shan J., Wellner M. C., Rohwedel J., Guanju J., Fleischmann B., Katus H. A., Hescheler J., Franz W. M. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 29(6):1525–1539, Jun 1997.
- [21] Sauer H., Wartenberg M. Reactive oxygen species as signaling molecules in cardiovascular differentiation of embryonic stem cells and tumor-induced angiogenesis. *Antioxid Redox Signal*, 7(11-12):1423–1434, 2005.
- [22] Garg V., Kathiriya I. S., Barnes R., Schluterman M. K., King I. N., Butler C. A., Rothrock C. R., Eapen R. S., Hirayama-Yamada K., Joo K., Matsuoka R., Cohen

- J. C., Srivastava D. Gata4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with tbx5. *Nature*, 424(6947):443–447, Jul 2003.
- [23] Morin S., Charron F., Robitaille L., Nemer M. Gata-dependent recruitment of mef2 proteins to target promoters. *EMBO J*, 19(9):2046–2055, May 2000.
- [24] Doetschman T. C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 87:27–45, 1985.
- [25] Maltsev V. A., Rohwedel J., Hescheler J., Wobus A. M. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev*, 44(1):41–50, 1993.
- [26] Bain G., Kitchens D., Yao M., Huettner J. E., Gottlieb D. I. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol*, 168(2):342–357, 1995.
- [27] Strübing C., Ahnert-Hilger G., Shan J., Wiedenmann B., Hescheler J., Wobus A. M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev*, 53(2):275–287, 1995.
- [28] Buttery L. D., Bourne S., Xynos J. D., Wood H., Hughes F. J., Hughes S. P., Episkopou V., Polak J. M. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng*, 7(1):89–99, 2001.
- [29] zur Nieden N. I., Kempka G., Ahr H. J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation*, 71(1):18–27, 2003.
- [30] Reubinoff B. E., Pera M. F., Fong C. Y., Trounson A., Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 18(4):399–404, 2000.

- [31] Schuldiner M., Eiges R., Eden A., Yanuka O., Itskovitz-Eldor J., Goldstein R. S., Benvenisty N. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res*, 913(2):201–205, 2001.
- [32] Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E., Binah O., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 108(3):407–414, 2001.
- [33] Hibino H., Tani K., Ikebuchi K., Wu M. S., Sugiyama H., Nakazaki Y., Tanabe T., Takahashi S., Tojo A., Suzuki S., Tanioka Y., Sugimoto Y., Nakahata T., Asano S. The common marmoset as a target preclinical primate model for cytokine and gene therapy studies. *Blood*, 93(9):2839–2848, 1999.
- [34] Hematti P., Obrtlíkova P., Kaufman D. S. Nonhuman primate embryonic stem cells as a preclinical model for hematopoietic and vascular repair. *Exp Hematol*, 33(9):980–986, 2005.
- [35] Byrne J. A., Pedersen D. A., Clepper L. L., Nelson M., Sanger W. G., Gokhale S., Wolf D. P., Mitalipov S. M. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 450(7169):497–502, Nov 2007.
- [36] Sasaki E., Suemizu H., Shimada A., Hanazawa K., Oiwa R., Kamioka M., Tomioka I., Sotomaru Y., Hirakawa R., Eto T., Shiozawa S., Maeda T., Ito M., Ito R., Kito C., Yagihashi C., Kawai K., Miyoshi H., Tanioka Y., Tamaoki N., Habu S., Okano H., Nomura T. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*, 459(7246):523–527, 2009.
- [37] Suemori H., Tada T., Torii R., Hosoi Y., Kobayashi K., Imahie H., Kondo Y., Iritani A., Nakatsuji N. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by ivf or icsi. *Dev Dyn*, 222(2):273–279, 2001.

- [38] Sasaki E., Hanazawa K., Kurita R., Akatsuka A., Yoshizaki T., Ishii H., Tanioka Y., Ohnishi Y., Suemizu H., Sugawara A., Tamaoki N., Izawa K., Nakazaki Y., Hamada H., Suemori H., Asano S., Nakatsuji N., Okano H., Tani K. Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*callithrix jacchus*). *Stem Cells*, 23(9):1304–1313, 2005.
- [39] Calhoun J. D., Lambert N. A., Mitalipova M. M., Noggle S. A., Lyons I., Condie B. G., Stice S. L. Differentiation of rhesus embryonic stem cells to neural progenitors and neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 306(1):191–197, 2003.
- [40] Kaufman D. S., Lewis R. L., Hanson E. T., Auerbach R., Plendl J., Thomson J. A. Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic stem cells. *Blood*, 103(4):1325–1332, Feb 2004.
- [41] Hosseinkhani M., Hosseinkhani H., Khademhosseini A., Bolland F., Kobayashi H., Gonzalez S. P. Bone morphogenetic protein-4 enhances cardiomyocyte differentiation of cynomolgus monkey escs in knockout serum replacement medium. *Stem Cells*, 25(3):571–580, 2007.
- [42] Haruta M., Sasai Y., Kawasaki H., Amemiya K., Ooto S., Kitada M., Suemori H., Nakatsuji N., Ide C., Honda Y., Takahashi M. In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(3):1020–1025, 2004.
- [43] Chen H., Hattori F., Murata M., Li W., S.Yuasa , Onizuka T., Shimoji K., Ohno Y., Sasaki E., Kimura K., Hakuno D., Sano M., Makino S., Ogawa S., Fukuda K. Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 369(3):801–806, 2008.
- [44] Kurita R., Sasaki E., Yokoo T., Hiroyama T., Takasugi K., Imoto H., Izawa K., Dong Y., Hashiguchi T., Soda Y., Maeda T., Suehiro Y., Tanioka Y., Nakazaki

- Y., Tani K. Tal1/scl gene transduction using a lentiviral vector stimulates highly efficient hematopoietic cell differentiation from common marmoset (*Callithrix jacchus*) embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24(9):2014–2022, 2006.
- [45] Rohwedel J., Guan K., Wobus A. M. Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs*, 165(3-4):190–202, 1999.
- [46] Ng E. S., Davis R. P., Azzola L., Stanley E. G., Elefanty A. G. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood*, 106(5):1601–1603, Sep 2005.
- [47] Ungrin M. D., Joshi C., Nica A., Bauwens C., Zandstra P. W. Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS One*, 3(2):e1565, 2008.
- [48] Moeller H.-C., Mian M. K., Shrivastava S., Chung B. G., Khademhosseini A. A microwell array system for stem cell culture. *Biomaterials*, 29(6):752–763, Feb 2008.
- [49] Mohr J. C., de Pablo J. J., Palecek S. P. 3-d microwell culture of human embryonic stem cells. *Biomaterials*, 27(36):6032–6042, Dec 2006.
- [50] Dang S. M., Gerecht-Nir S., Chen J., Itskovitz-Eldor J., Zandstra P. W. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells*, 22(3):275–282, 2004.
- [51] Cameron C. M., Hu W.-S., Kaufman D. S. Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation. *Biotechnol Bioeng*, 94(5):938–948, 2006.
- [52] Carpenedo R. L., Sargent C. Y., McDevitt T. C. Rotary suspension culture enhan-

- ces the efficiency, yield, and homogeneity of embryoid body differentiation. *Stem Cells*, 25(9):2224–2234, 2007.
- [53] Fok E. Y. L., Zandstra P. W. Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. *Stem Cells*, 23(9):1333–1342, 2005.
- [54] Gerecht-Nir S., Cohen S., Itskovitz-Eldor J. Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (heb) formation and differentiation. *Biotechnol Bioeng*, 86(5):493–502, 2004.
- [55] Zweigerdt R., Burg M., Willbold E., Abts H., Ruediger M. Generation of confluent cardiomyocyte monolayers derived from embryonic stem cells in suspension: a cell source for new therapies and screening strategies. *Cytotherapy*, 5(5):399–413, 2003.
- [56] Schroeder M., Niebruegge S., Werner A., Willbold E., Burg M., Ruediger M., Field L. J., Lehmann J., Zweigerdt R. Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. *Biotechnol Bioeng*, 92(7):920–933, 2005.
- [57] Bratt-Leal A. M., Carpenedo R. L., McDevitt T. C. Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnol Prog*, 25(1):43–51, 2009.
- [58] Baharvand H., Hashemi S. M., Ashtiani S. K., Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2d and 3d culture systems in vitro. *Int J Dev Biol*, 50(7):645–652, 2006.
- [59] Hwang N. S., Kim M. S., Sampattavanich S., Baek J. H., Zhang Z., Elisseeff J. Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic

- differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24(2):284–291, Feb 2006.
- [60] Tian X.-F., Heng B.-C., Ge Z., Lu K., Rufaihah A. J., Fan V. T.-W., Yeo J.-F., Cao T. Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2d and 3d culture systems. *Scand J Clin Lab Invest*, 68(1):58–67, 2008.
- [61] Kamioka H., Miki Y., Sumitani K., Tagami K., Terai K., Hosoi K., Kawata T. Extracellular calcium causes the release of calcium from intracellular stores in chick osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 212(2):692–696, Jul 1995.
- [62] Mikuni-Takagaki Y., Kakai Y., Satoyoshi M., Kawano E., Suzuki Y., Kawase T., Saito S. Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. *J Bone Miner Res*, 10(2):231–242, Feb 1995.
- [63] Ajubi N. E., Klein-Nulend J., Nijweide P. J., Vrijheid-Lammers T., Alblas M. J., Burger E. H. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes—a cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun*, 225(1):62–68, 1996.
- [64] Phillips B. W., Belmonte N., Vernochet C., Ailhaud G., Dani C. Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284(2):478–484, 2001.
- [65] Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A. L., Karsenty G. *Osf2/cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89(5):747–754, 1997.
- [66] Ziros P. G., Basdra E. K., Papavassiliou A. G. *Runx2*: of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007.
- [67] zur Nieden N. I., Cormier J. T., Rancourt D. E., Kallos M. S. Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors. *J Biotechnol*, 129(3):421–432, 2007.

- [68] Bodine P. V. N., Komm B. S. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*, 7(1-2):33–39, 2006.
- [69] Davis L. A., Nieden N. I. Z. Mesodermal fate decisions of a stem cell: the wnt switch. *Cell Mol Life Sci*, 65(17):2658–2674, 2008.
- [70] Gottardi C. J., Gumbiner B. M. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol*, 11(19):R792–R794, 2001.
- [71] Liu C., Li Y., Semenov M., Han C., Baeg G. H., Tan Y., Zhang Z., Lin X., He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 108(6):837–847, 2002.
- [72] Anton R., Kestler H. A., Kühl M. Beta-catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells. *FEBS Lett*, 581(27):5247–5254, 2007.
- [73] Sottile V., Thomson A., McWhir J. In vitro osteogenic differentiation of human es cells. *Cloning Stem Cells*, 5(2):149–155, 2003.
- [74] Yamashita A., Takada T., Narita J., Yamamoto G., Torii R. Osteoblastic differentiation of monkey embryonic stem cells in vitro. *Cloning Stem Cells*, 7(4):232–237, 2005.
- [75] van der Wiel H. E., Lips P., Nauta J., Netelenbos J. C., Hazenberg G. J. Biochemical parameters of bone turnover during ten days of bed rest and subsequent mobilization. *Bone Miner*, 13(2):123–129, May 1991.
- [76] Goodship A. E., Lanyon L. E., McFie H. Functional adaptation of bone to increased stress. an experimental study. *J Bone Joint Surg Am*, 61(4):539–546, Jun 1979.
- [77] Cowin S. C., Weinbaum S., Zeng Y. A case for bone canaliculi as the anatomical site of strain generated potentials. *J Biomech*, 28(11):1281–1297, 1995.

- [78] Burger E. H., Klein-Nulen J. Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res*, 13:93–98, 1999.
- [79] Bancroft G. N., Sikavitsas V. I., van den Dolder J., Sheffield T. L., Ambrose C. G., Jansen J. A., Mikos A. G. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3d perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20):12600–12605, 2002.
- [80] Klein-Nulend J., van der Plas A., Semeins C. M., Ajubi N. E., Frangos J. A., Nijweide P. J., Burger E. H. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J*, 9(5):441–445, 1995.
- [81] Smalt R., Mitchell F. T., Howard R. L., Chambers T. J. Induction of no and prostaglandin e2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. *Am J Physiol*, 273(4 Pt 1):E751–E758, 1997.
- [82] Hung C. T., Allen F. D., Pollack S. R., Brighton C. T. Intracellular ca²⁺ stores and extracellular ca²⁺ are required in the real-time ca²⁺ response of bone cells experiencing fluid flow. *J Biomech*, 29(11):1411–1417, 1996.
- [83] Donahue S. W., Donahue H. J., Jacobs C. R. Osteoblastic cells have refractory periods for fluid-flow-induced intracellular calcium oscillations for short bouts of flow and display multiple low-magnitude oscillations during long-term flow. *J Biomech*, 36(1):35–43, 2003.
- [84] Bakker A. D., Soejima K., Klein-Nulend J., Burger E. H. The production of nitric oxide and prostaglandin e(2) by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech*, 34(5):671–677, 2001.
- [85] Johnson D. L., McAllister T. N., Frangos J. A. Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts. *Am J Physiol*, 271(1 Pt 1):E205–E208, 1996.

- [86] Kapur S., Baylink D. J., Lau K.-H. W. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone*, 32(3):241–251, 2003.
- [87] Goldstein A. S., Juarez T. M., Helmke C. D., Gustin M. C., Mikos A. G. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 22(11):1279–1288, 2001.
- [88] van den Dolder J., Bancroft G. N., Sikavitsas V. I., Spauwen P. H. M., Jansen J. A., Mikos A. G. Flow perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in titanium fiber mesh. *J Biomed Mater Res A*, 64(2):235–241, 2003.
- [89] Sikavitsas V. I., Bancroft G. N., Holtorf H. L., Jansen J. A., Mikos A. G. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3d perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(25):14683–14688, 2003.
- [90] Klein-Nulend J., Semeins C. M., Ajubi N. E., Nijweide P. J., Burger E. H. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (no) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts—correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 217(2):640–648, 1995.
- [91] Westbroek I., Ajubi N. E., Alblas M. J., Semeins C. M., Klein-Nulend J., Burger E. H., Nijweide P. J. Differential stimulation of prostaglandin g/h synthase-2 in osteocytes and other osteogenic cells by pulsating fluid flow. *Biochem Biophys Res Commun*, 268(2):414–419, 2000.
- [92] Pitsillides A. A., Rawlinson S. C., Suswillo R. F., Bourrin S., Zaman G., Lanyon L. E. Mechanical strain-induced no production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *FASEB J*, 9(15):1614–1622, 1995.
- [93] Taiani J., Krawetz R. J., Nieten N. Z., Wu Y. E., Kallos M. S., Matyas J. R.,

- Rancourt D. E. Reduced differentiation efficiency of murine embryonic stem cells in stirred suspension bioreactors. *Stem Cells Dev*, Sep 2009.
- [94] Vallier L., Alexander M., Pedersen R. A. Activin/nodal and fgf pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 118(Pt 19):4495–509, 2005.
- [95] Heuer J., Bremer S., Pohl I., Spielmann H. Development of an in vitro embryotoxicity test using murine embryonic stem cell cultures. *Toxic In Vitro*, Vol. 7, No. 4:pp. 551–556, 1993.
- [96] Rothermel A., Biedermann T., Weigel W., Kurz R., Ruffer M., Layer P. G., Robitzki A. A. Artificial design of three-dimensional retina-like tissue from dissociated cells of the mammalian retina by rotation-mediated cell aggregation. *Tissue Eng*, 11(11-12):1749–1756, 2005.
- [97] Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4(5):267–274, 1976.
- [98] Smith A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:435–462, 2001.
- [99] Conner D. A. Mouse embryo fibroblast (mef) feeder cell preparation. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 23:Unit 23.2, May 2001.
- [100] Fleischmann G., Müller T., Blasczyk R., Sasaki E., Horn P. A. Growth characteristics of the nonhuman primate embryonic stem cell line cjes001 depending on feeder cell treatment. *Cloning Stem Cells*, 11(2):225–233, 2009.
- [101] Ellerström C., Strehl R., Noaksson K., Hyllner J., Semb H. Facilitated expansion of human embryonic stem cells by single-cell enzymatic dissociation. *Stem Cells*, 25(7):1690–1696, Jul 2007.

- [102] Gong G., Roach M. L., Jiang L., Yang X., Tian X. C. Culture conditions and enzymatic passaging of bovine esc-like cells. *Cloning Stem Cells*, Jan 2010.
- [103] Wege H., Chui M. S., Le H. T., Tran J. M., Zern M. A. Sybr green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucleic Acids Res*, 31(2):E3–E3, 2003.
- [104] Schneider A., Spitkovsky D., Riess P., Molcanyi M., Kamiseti N., Maegle M., Hescheler J., Schaefer U. tthe good into the pot, the bad into the crop!-a new technology to free stem cells from feeder cells. *PLoS ONE*, 3(11):e3788, 2008.
- [105] Moore H. The medium is the message. *Nat Biotechnol*, 24(2):160–161, Feb 2006.
- [106] Zhang X., Wang S., Yang S., Li T., Ji S., Chen H., Li B., Jin L., Xie Y., Hu Z., Chi J. Feeder layer- and serum-free culture of rhesus monkey embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online*, 13(3):412–420, 2006.
- [107] Xu C., Inokuma M. S., Denham J., Golds K., Kundu P., Gold J. D., Carpenter M. K. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 19(10):971–974, 2001.
- [108] Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 70(3):837–845, 2004.
- [109] Johansson B. M., Wiles M. V. Evidence for involvement of activin a and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol*, 15(1):141–151, 1995.
- [110] Li Y., Powell S., Brunette E., Lebkowski J., Mandalam R. Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnol Bioeng*, 91(6):688–698, 2005.
- [111] Müller T., Fleischmann G., Eildermann K., Mätz-Rensing K., Horn P. A., Sasaki E., Behr R. A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset

- monkey (*callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. *Hum Reprod*, 24(6):1359–1372, 2009.
- [112] Draper J. S., Smith K., Gokhale P., Moore H. D., Maltby E., Johnson J., Meisner L., Zwaka T. P., Thomson J. A., Andrews P. W. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 22(1):53–4, 2004.
- [113] ya Yasuda S., Tsuneyoshi N., Sumi T., Hasegawa K., Tada T., Nakatsuji N., Suemori H. Nanog maintains self-renewal of primate es cells in the absence of a feeder layer. *Genes Cells*, 11(9):1115–1123, 2006.
- [114] Mitalipov S. M., Kuo H.-C., Hennebold J. D., Wolf D. P. Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey. *Biol Reprod*, 69(6):1785–1792, 2003.
- [115] Byrne J. A., Mitalipov S. M., Clepper L., Wolf D. P. Transcriptional profiling of rhesus monkey embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 75(6):908–915, Dec 2006.
- [116] Hatano S.-Y., Tada M., Kimura H., Yamaguchi S., Kono T., Nakano T., Suemori H., Nakatsuji N., Tada T. Pluripotential competence of cells associated with nanog activity. *Mech Dev*, 122(1):67–79, 2005.
- [117] Hyslop L., Stojkovic M., Armstrong L., Walter T., Stojkovic P., Przyborski S., Herbert M., Murdoch A., Strachan T., Lako M. Downregulation of nanog induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells*, 23(8):1035–1043, 2005.
- [118] Andrews P. W., Banting G., Damjanov I., Arnaud D., Avner P. Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma*, 3(4):347–361, 1984.

- [119] Andrews P. W. Human teratocarcinomas. *Biochim Biophys Acta*, 948(1):17–36, Aug 1988.
- [120] Bhanot P., Brink M., Samos C. H., Hsieh J. C., Wang Y., Macke J. P., Andrew D., Nathans J., Nusse R. A new member of the frizzled family from drosophila functions as a wingless receptor. *Nature*, 382(6588):225–30, 1996. kein Paper zu kriegen, nur Abstract!!!
- [121] Cadigan K. M., Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, 11(24):3286–305, 1997.
- [122] Ikeda S., Kishida S., Yamamoto H., Murai H., Koyama S., Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, forms a complex with gsk-3beta and beta-catenin and promotes gsk-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J*, 17(5):1371–1384, 1998.
- [123] Kimelman D., Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 25(57):7482–91, 2006.
- [124] Behrens J., von Kries J. P., Kuhl M., Bruhn L., Wedlich D., Grosschedl R., Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor lef-1. *Nature*, 382(6592):638–42, 1996. kein Paper zu kriegen nur Abstract!!!
- [125] Eastman Q., Grosschedl R. Regulation of lef-1/tcf transcription factors by wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol*, 11(2):233–240, 1999.
- [126] Huber O., Korn R., McLaughlin J., Ohsugi M., Herrmann B. G., Kemler R. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor lef-1. *Mech Dev*, 59(1):3–10, 1996.
- [127] Yang Y. Wnts and wing: Wnt signaling in vertebrate limb development and musculoskeletal morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 69(4):305–317, 2003.

- [128] Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11(4):273–282, 2000.
- [129] Aberle H., Schwartz H., Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem*, 61(4):514–23, 1996.
- [130] Hill T. P., Später D., Taketo M. M., Birchmeier W., Hartmann C. Canonical wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*, 8(5):727–738, 2005.
- [131] Day T. F., Guo X., Garrett-Beal L., Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*, 8(5):739–750, 2005.
- [132] Lian J. B., Stein G. S. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J*, 15:118–140, 1995.
- [133] Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med*, 6(2):88–95, 2000.
- [134] Gaur T., Lengner C. J., Hovhannisyan H., Bhat R. A., Bodine P. V., Komm B. S., Javed A., van Wijnen A. J., Stein J. L., Stein G. S., Lian J. B. Canonical wnt signaling promotes osteogenesis by directly stimulating runx2 gene expression. *J Biol Chem*, 280(39):33132–40, 2005.
- [135] Karp J. M., Ferreira L. S., Khademhosseini A., Kwon A. H., Yeh J., Langer R. S. Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro. *Stem Cells*, 24(4):835–843, 2006.

- [136] Xu C., Police S., Rao N., Carpenter M. K. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res*, 91(6):501–508, Sep 2002.
- [137] Keller G. M. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 7(6):862–869, Dec 1995.
- [138] Coucouvanis E., Martin G. R. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell*, 83(2):279–287, Oct 1995.
- [139] Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol*, 273(4 Pt 1):C1109–C1123, 1997.
- [140] Sen A., Kallos M., Behie L. Effects of hydrodynamics on cultures of mammalian neural stem cell aggregates in suspension bioreactors. *Ind Eng Chem Res*, 40:5350–5357, 2001.
- [141] King J. A., Miller W. M. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. *Curr Opin Chem Biol*, 11(4):394–398, 2007.
- [142] Kallos M. S., Behie L. A. Inoculation and growth conditions for high-cell-density expansion of mammalian neural stem cells in suspension bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 63(4):473–483, 1999.
- [143] Cormier J. T., Nieden N. I., Rancourt D. E., Kallos M. S. Expansion of undifferentiated murine embryonic stem cells as aggregates in suspension culture bioreactors. *Tissue Eng*, 1:1, 2006. Using Smart Source Parsing Oct.
- [144] Wang X., Wei G., Yu W., Zhao Y., Yu X., Ma X. Scalable producing embryoid bodies by rotary cell culture system and constructing engineered cardiac tissue with es-derived cardiomyocytes in vitro. *Biotechnol Prog*, 22(3):811–818, 2006.

- [145] Yirme G., Amit M., Laevsky I., Osenberg S., Itskovitz-Eldor J. Establishing a dynamic process for the formation, propagation, and differentiation of human embryoid bodies. *Stem Cells Dev*, 17(6):1227–1241, 2008.
- [146] Niebruegge S., Bauwens C. L., Peerani R., Thavandiran N., Masse S., Sevaptisidis E., Nanthakumar K., Woodhouse K., Husain M., Kumacheva E., Zandstra P. W. Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 102(2):493–507, 2009.
- [147] Genschow E., Scholz G., Brown N., Piersma A., Brady M., Clemann N., Huuskonen H., Paillard F., Bremer S., Becker K., Spielmann H. Development of prediction models for three in vitro embryotoxicity tests in an ecvam validation study. *In Vitro Mol Toxicol*, 13(1):51–66, 2000.
- [148] Yu X., Botchwey E. A., Levine E. M., Pollack S. R., Laurencin C. T. Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31):11203–11208, 2004.
- [149] Klein-Nulend J., Bacabac R. G., Mullender M. G. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris)*, 53(10):576–580, 2005.
- [150] Hwang Y.-S., Cho J., Tay F., Heng J. Y. Y., Ho R., Kazarian S. G., Williams D. R., Boccaccini A. R., Polak J. M., Mantalaris A. The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering. *Biomaterials*, 30(4):499–507, Feb 2009.
- [151] Chen S. S., Revoltella R. P., Papini S., Michelini M., Fitzgerald W., Zimmerberg J., Margolis L. Multilineage differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in three-dimensional culture systems. *Stem Cells*, 21(3):281–295, 2003.

- [152] Carpenedo R. L., Bratt-Leal A. M., Marklein R. A., Seaman S. A., Bowen N. J., McDonald J. F., McDevitt T. C. Homogeneous and organized differentiation within embryoid bodies induced by microsphere-mediated delivery of small molecules. *Biomaterials*, 30(13):2507–2515, 2009.
- [153] Owan I., Burr D. B., Turner C. H., Qiu J., Tu Y., Onyia J. E., Duncan R. L. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol*, 273(3 Pt 1):C810–C815, Sep 1997.
- [154] Fagotto F., Funayama N., Gluck U., Gumbiner B. M. Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in xenopus. *J Cell Biol*, 132(6):1105–1114, Mar 1996.
- [155] Arnsdorf E. J., Tummala P., Jacobs C. R. Non-canonical wnt signaling and n-cadherin related beta-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate. *PLoS One*, 4(4):e5388, 2009.
- [156] Norvell S. M., Alvarez M., Bidwell J. P., Pavalko F. M. Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 75(5):396–404, 2004.
- [157] Orsulic S., Huber O., Aberle H., Arnold S., Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/lef-1-mediated transactivation. *J Cell Sci*, 112 (Pt 8):1237–1245, Apr 1999.

Abbildungsverzeichnis

3.1	Aufbau der 8 parallelen Mini-Suspensionsbioreaktor Einheiten	31
4.1	cES-Zellen kultiviert auf Feederzellen und Feeder-frei	51
4.2	Übergang von Feeder-haltiger zu Feeder-freier cES-Zellkultur	53
4.3	Immunozytochemische Charakterisierung der cES-Zellen kultiviert auf Feederzellen	54
4.4	Immunozytochemische Charakterisierung von cES-Zellen nach 30 Passagen Feederzell-freier Kultur	55
4.5	Gegenüberstellung der Genexpression von cES-Zellen auf Feederzellen und Feeder-freien cES-Zellen	57
4.6	Analyse der Telomeraseaktivität von cES-Zellen auf Feederzellen und Feeder-freien cES-Zellen	58
4.7	Karyotypanalyse von cES-Zellen nach 40 Passagen Feederzell-freier Kultivierung	59
4.8	Expressionsanalyse der Pluripotenzgene Oct4 und Nanog in cES-Zellen nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren	60
4.9	Immunozytochemische Färbung charakteristischer cES-Zellmarkerproteine nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren	61
4.10	Durchflusszytometrische Analyse der SSEA-4 positiven cES-Zellen nach Entzug der Pluripotenz-erhaltenden Faktoren	62

4.11	Initiierung der Differenzierung von cES-Zellen mit dem Protokoll der hängenden Tropfen und mittels Zellkluster-Methode	63
4.12	Osteogene Differenzierung von cES-Zellen ohne EB-Bildung	66
4.13	Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter cES-Zellen ohne EB-Bildung	67
4.14	Osteogene Differenzierung von cES-Zellen mit EB-Bildungsschritt	68
4.15	Alizarin Färbung kalzifizierter Bereiche osteogen differenzierter cES-Zellen am Tag 30 der Differenzierung	69
4.16	Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter cES-Zellen mit EB-Bildung	70
4.17	Analyse der Expression Osteoblasten-spezifischer Markergene während der Differenzierung von cES-Zellen aus Feederzell-freier Kultur	71
4.18	Osteogene Differenzierung von cES-Zellen unter dem Einfluss von Retinolsäure und LiCl	72
4.19	Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter cES-Zellen unter dem Einfluss von Retinolsäure und LiCl	74
4.20	Strömungsbilder von Propeller- und Blattrührer	76
4.21	EB-Generierung muriner ES-Zellen im Suspensionsbioreaktor mit Propeller- und Blattrührer	77
4.22	Murine EBs am Tag 5 der Differenzierung in statischer Kultur und im Bioreaktor unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten	77
4.23	Größe muriner EBs an Tag 5 der Differenzierung unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten	78
4.24	Boxplot-Darstellung der EB-Größen muriner ES-Zellen am Tag 5 der Differenzierung	79
4.25	Semiquantitative Analyse der Genexpression muriner EBs an Tag 5 der Differenzierung	81
4.26	Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen im Suspensionsbioreaktor	82

4.27 Größendarstellung der differenzierenden Aggregate muriner ES-Zellen im Bioreaktor	83
4.28 Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer Kultur	84
4.29 Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter muriner ES-Zellen im Bioreaktor im Vergleich zur statischen Differenzierung	85
4.30 Alizarin Färbung kalzifizierter Bereiche osteogen differenzierter muriner ES-Zellen in statischer Kultur und im Bioreaktor	86
4.31 Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultur	88
4.32 Größendarstellung der differenzierenden Aggregate muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultur	89
4.33 Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter muriner ES-Zellen in statischer 3D-Kultivierung im Vergleich zur Kultivierung im Bioreaktor	90
4.34 Osteogene Differenzierung muriner ES-Zellen auf einem Rotationsschüttler	91
4.35 Größendarstellung der differenzierenden Aggregate muriner ES-Zellen auf einem Rotationsschüttler	92
4.36 Quantitative Analyse des Kalziums osteogen differenzierter muriner ES-Zellen auf einem Rotationsschüttler im Vergleich zur Kultivierung im Bioreaktor	93
4.37 EB-Generierung durch das Protokoll der hängenden Tropfen, im Bioreaktor und auf dem Rotationsschüttler im Vergleich	95
4.38 Analyse der Genexpression muriner EBs aus hängender Tropfen Kultur, aus dem Bioreaktor und vom Rotationsschüttler am Tag 5	96
4.39 Osteogene Differenzierung muriner EBs generiert durch das hängende Tropfen Protokoll, im Bioreaktor und auf einem Rotationsschüttler	97
4.40 Quantitative Analyse des Kalziums an Tag 30 der osteogenen Differenzierung nach EB-Generierung durch hängende Tropfen, im Bioreaktor und auf dem Rotationsschüttler	98

4.41	<i>Callithrix jacchus</i> EB-Entwicklung im Bioreaktor bei 130rpm, nach Inokulation von Einzelzellen und Zellklustern	99
4.42	<i>Callithrix jacchus</i> EBs am Tag 5 der Differenzierung in statischer Kultur und im Bioreaktor unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten	100
4.43	Größe von <i>Callithrix jacchus</i> EBs an Tag 5 der Differenzierung unter verschiedenen Rührgeschwindigkeiten	101
4.44	Semiquantitative Analyse der Genexpression der EBs von <i>Callithrix jacchus</i> an Tag 5 der Differenzierung	102
4.45	Osteogene Differenzierung von cES-Zellen im Suspensionsbioreaktor . . .	103
4.46	Quantitative Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums im Bioreaktor differenzierter cES-Zellen	104
4.47	Quantitative Analyse des in die Matrix eingelagerten Kalziums statisch differenzierter cES-Zellen, nach EB-Generierung in statischer Kultur und im Bioreaktor	106
4.48	Statische Differenzierung von cES-Zellen nach EB-Generierung im Bioreaktor und in statischer Kultur	107

Abkürzungsverzeichnis

cDNA	Komplementär-DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrokarbonat (engl. <i>Diethylpyrocarbonate</i>)
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EB	Embryonalkörperchen (engl. <i>embryoid body</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FKS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase-3 β
LIF	engl. <i>Leukemia inhibitory factor</i>
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
PBS	Phosphatpuffer (engl. <i>phosphat buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecylsulfate</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA