Aus dem Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik an der Universität zu Lübeck Direktor: Prof. Dr. rer. nat. G. Fuhr

Charakterisierung klonaler pankreatischer Stammzelllinien der Ratte und Differenzierungsmöglichkeiten humaner pankreatischer Stammzellen in Kardiomyozyten

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck - aus der Medizinischen Fakultät -

> vorgelegt von Jennifer Kajahn aus Köln

Lübeck 2007

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse	
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Otte	
Tag der mündlichen Prüfung:	19.06.2009	
zum Druck genehmigt. Lübeck, den	19.06.2009	
and Warner Solhach		

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach - Dekan der Medizinischen Fakultät -

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inha	ltsverzeichnis	Ι
Abk	ürzungen	IV
1.	Einleitung	
	1.1 Definition und Eigenschaften von Stammzellen	1
	1.1.1 Embryonale und adulte Stammzellen	1
	1.1.2 Differenzierung von Stammzellen	2
	1.2 Adulte Stammzellen aus dem Pankreas	3
	1.2.1 Das Pankreas und der Diabetes mellitus	3
	1.2.2 Das Potential von Stammzellen aus dem Pankreas	4
	1.3 Regenerative Medizin mit Stammzellen beim Myokardinfarkt	6
	1.3.1 Regenerative Medizin	6
	1.3.2 Der Myokardinfarkt	6
	1.3.3 Stammzellen zur Therapie des Myokardinfarktes	7
	1.4 Die Wirkung von 5-Azacytidin auf die Differenzierung von	
	Stammzellen in Kardiomyozyten	12
	1.4.1 Differenzierung von Stammzellen aufgrund verschiedener	
	Mechanismen	12
	1.4.2 DNA-Methylierung	12
	1.4.3 DNA-Methylierung als Differenzierungsstimulation für	
	Stammzellen	13
	1.5 Zielsetzung	14
2.	Material und Methoden	
	2.1 Chemikalien und Geräte	15
	2.1.1 Chemikalien	15
	2.1.2 Geräte	18
	2.2 verwendete Zellen und Gewebe	19
	2.2.1 Zelllinien	19
	2.2.2 Pankreas	19

2.2.3 Myokard	20
2.3 Medien	20
2.3.1 Kultivierungsmedium für Stammzellen	20
2.3.2 Kultivierungsmedium für humane Tumorzellen	20
2.4 Grundlegende Methoden	20
2.4.1 Präparation und Isolation von Acini des exokrinen Pankreas	
des Menschen	20
2.4.2 Kultivierung der Zellen	22
2.4.3 Passagieren von Zellkulturen	22
2.4.4 Kryokonservierung von Zellkulturen	22
2.4.5 Fixierung der Zellen auf Chamber Slides	22
2.4.6 Klonale Analyse der Zelllinie Z29	23
2.5 Methoden zur spontanen Differenzierung	24
2.5.1 Spontane Differenzierung durch "Hängende Tropfen"	24
2.6 Methoden zur Differenzierung in Kardiomyozyten	25
2.6.1 Differenzierung mit Hilfe von Myokardgewebe	25
2.6.2 Differenzierung mit 5-Azacytidin	25
2.7 Analyse-Methoden	26
2.7.1 Immunfluoreszenzfärbung	26
2.7.2 alkalische Phosphatase antialkalische Phosphatase Komplex-	
(APAAP) Färbung	27
2.7.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
a RNA-Präparation	27
b Reverse Transkription	27
c PCR	28
d Agarose-Gelelektrophorese	28
Ergebnisse	

3.1	Stammzellcharakterisierung der primären Zellklonlinie Z29 20B11	
	und den aus ihr generierten organoid bodies im Vergleich	29
	3.1.1 Klonale Analyse der Zellinie Z29	29
	3.1.2 Generierung von organoid bodies aus der Zellklonlinie Z29 20B11	29
	3.1.3 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen	30

3.

3.1.4 Ergebnisse der PCR	34
3.2 Stimulationsversuch pankreatischer Stammzellen der Ziege mit Myokard	36
3.2.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen	36
3.3 Stimulationsversuch humaner pankreatischer Stammzellen mit Myokard	37
3.3.1 Ergebnisse der Immunzytochemie für MF 20 und Troponin I	37
3.3.2 Ergebnisse der PCR	40
3.3.3 Morphologie der stimulierten Zellen	42
3.3.4 Schlagende Areale in den Stammzellkulturen	42
3.4 Stimulationsversuch humaner pankreatischer Stammzellen mit 5-Azacytidir	1 44
3.4.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen	44
3.4.2 Ergebnisse der PCR	45

4. Diskussion

Literaturverzeichnis	60
Zusammenfassung	59
Kardiomyozyten mithilfe von 5-Azacytidin	56
4.3 Differenzierung humaner pankreatischer Stammzellen in	
Kardiomyozyten mithilfe von myokardialen Biopsien	51
4.2 Differenzierung humaner pankreatischer Stammzellen in	
und den aus ihr generierten organoid bodies im Vergleich	47
4.1 Stammzellcharakterisierung der primären Zellklonlinie Z29 20B11	

Danksagung Curriculum Vitae

5.

6.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bFGF	bovine fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovines Serumalbumin
° C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
d	Tag
DAPI	Diamidin-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Diribonucleid acid
dNTP	Desoxyribonukleotide Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
G-CSF	Granulozytenkolonie stimulierenden Faktor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GM-CSF	Granulozyten- und Makrophagenkolonie
	stimulierender Faktor
μ	Mikro
MDM	Modified Dulbecco's Medium
MEM	Modified Eagle Medium
MF 20	sarkomerisches Myosin
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
NF	Neurofilament
OB	organoid body
Oct	Octamer binding transcription factor

PDX	pancreas/duodenum homebox	
PCR	Polymerase chain reaction	
рН	"pondus Hydrogenii", neg. dekadischer Logarithmus	
	der Wasserstoffionenkonzentration	
PSC	pancreatic stellate cell	
PSLC	pancreatic stellate-like cell	
RNA	Ribonucleid acid	
RT	reverse Transkription	
SMA	smooth muscle actin	
SSEA	stage-specific embryonic antigen	
TB	tissue body	
TBST	tris buffered saline triton X	
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan	
U	Unit	

1. Einleitung

1.1 Definition und Eigenschaften von Stammzellen

1.1.1 Embryonale und adulte Stammzellen

Stammzellen sind charakterisiert durch ihre Fähigkeit sich über Teilung selbst zu erhalten (Immortalität) und durch die Möglichkeit spezialisierte Zelltypen zu generieren. Sie selbst bleiben unspezialisiert (National Institutes of Health, 2005). Der Teilungsmechanismus ist sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch möglich (Ulloa-Montoya et al., 2005): Während bei der symmetrischen Division beide Tochterzellen denselben Stammzellcharakter aufweisen, detektiert man bei der asymmetrischen Division eine Stammzelle und eine differenzierte Zelle.

Man unterscheidet zwei verschiedene Stammzellarten:

Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste in den ersten Tagen der embryonalen Entwicklung gewonnen. Dies konnte für humane Zellen erstmals von Thomson et al. 1998 gezeigt werden. Embryonale Stammzellen zeigen *in vitro* eine pluripotente Differenzierung, d.h. sie können Zellen aller drei Keimblätter - Ektoderm, Mesoderm und Entoderm - bilden.

Adulte Stammzellen kommen in fast allen Geweben vor und sind für diese vorwiegend spezifisch. Man unterscheidet sie anhand der Möglichkeiten sich in verschiedene Zell- und Gewebetypen zu differenzieren. Die hämatopoetischen Stammzellen zum Beispiel sind im Knochenmark lokalisiert und können in alle Zellen des Blutsystems differenzieren. Daher wurden sie zunächst als multipotente Stammzellen bezeichnet mit diversen Differenzierungsmöglichkeiten in Zellen des mesodermalen Keimblattes. Jedoch konnte unter anderen von Lagasse et al. 2000 gezeigt werden, dass hämatopoetische Stammzellen auch Zellen anderer Keimblätter generieren können. Sie besitzen zusätzlich die Fähigkeit zur Differenzierung in ektodermale und entodermale Zelltypen (Heike et al., 2004), was als Plastizität (Eisenberg et al., 2003; Quesenberry et al., 2004) bezeichnet wird. Hämatopoetische Stammzellen haben also pluripotente Eigenschaften.

Seither konnten weitere pluripotente Stammzellen im adulten Organismus (Jiang et al., 2002; Young, 2004) gefunden werden. So zeigten Kruse et al. 2004, dass Stammzellen aus den exokrinen Drüsen des Pankreas typische Stammzellgene exprimieren und Zellen aller drei Keimblätter generieren können.

Neben den definierten Kriterien (National Institutes of Health, 2005) können Stammzellen anhand verschiedener Marker charakterisiert werden. In einigen Zusammenfassungen wurde versucht Marker allgemeingültig für alle Stammzellen zu definieren, was bis dato nicht gelungen ist. Zwar wurde in vergleichenden Studien zwischen embryonalen, hämatopoetischen und neuronalen Stammzellen untereinander gleiche Gene gefunden, jedoch beim Vergleich der einzelnen Studien miteinander fehlt der gewünschte Überblick von Genen, die in allen Stammzellen vorkommen (Ivanova et al., 2002; Ramalho-Santos et al., 2002; Fortunel et al., 2003).

Es gibt für einige Stammzellpopulationen Marker, die für sie charakteristisch sind. In embryonalen Stammzellen lassen sich charakteristisch auf RNA- und Proteinebene die Marker Nestin, Oct-4, CD9, alkalische Phosphatase (Hass et al., 1979; Palmieri et al., 1994; Kanatsu-Shinohara et al., 2004; Wiese et al., 2004) und andere nachweisen. Während zum Beispiel bei den Stammzellen aus dem Knochenmark häufig die Oberflächenproteine CD34, CD44, CD115 positiv sind.

Bei der Charakterisierung vieler adulter Stammzelltypen jedoch gestaltet es sich schwierig zelleigene Proteine als stammzelltypisch zu deklarieren. Hier bleibt nur die Möglichkeit auf die Marker der embryonalen Stammzellen zurückzugreifen. Dies erscheint teilweise problematisch, da sich embryonale von den adulten Stammzellen in ihren Eigenschaften sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unterscheiden (siehe auch 1.1.2).

1.1.2 Differenzierung von Stammzellen

In vivo differenzieren Stammzellen zum Erhalt des Gewebes nach Zellverlust. Abhängig vom Zellumsatz sind sie im stetigen (z.B. in der Mukosa des Magen-Darm-Traktes) oder im gelegentlichen Teilungsprozess (z.B. in der Leber). Je nach Potential bilden sie einen (z.B. unipotente Fibroblasten), mehrere (z.B. multipotente Stammzellen der Haut) oder alle (pluripotente Stammzellen) Zelltypen des Organismus. Sie befinden sich laut Theorie inaktiv in Nischen von differenzierten Geweben (Moore et al., 2006).

Im Gegensatz dazu sind Stammzellen *in vitro* keinen Nischen-isolierten Bedingungen ausgesetzt und differenzieren spontan und ungerichtet entsprechend ihres Potentials. Die Forschungen zielen daher darauf ab, Differenzierungen zu beeinflussen. Embryonale Stammzellen werden zum Beispiel auf speziellen Nährböden mit wachstumshemmenden Faktoren kultiviert, auf denen sie undifferenziert bleiben (Amit et al., 2003). Adulte Stammzellen hingegen können bis dato nicht in undifferenzierten Stadien belassen werden. Sie differenzieren *in vitro* spontan in verschiedene Zelltypen.

Eine weitere Möglichkeit Differenzierungen zu beeinflussen besteht darin mithilfe von verschiedenen Stimulationsfaktoren bestimmte Zelltypen zu erhalten. Dies kann durch verschiedene Kultivierungsbedingungen erzielt werden: Kokulturen mit anderen Zellen Geweben Kultivierungsmedien, die diverse Zusätze. wie z.B. und oder Wachstumsfaktoren, enthalten. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass sich Stammzellen mit Retinsäure (Rohwedel et al., 1999) oder 5-Azacytidin (Xu et al., 2004) gezielt in Myozytentypen differenzieren. Auch die Methode der "Hängenden Tropfen", die dreidimensionale Zellaggregate generiert, ist eine etablierte Methode embryonale Stammzellen in ihrer Differenzierung zu beeinflussen und diese zu forcieren (Wobus et al., 1988).

1.2 Adulte Stammzellen aus dem Pankreas

1.2.1 Das Pankreas und der Diabetes mellitus

Das Pankreas ist eine Drüse, die im Bauchraum in die Konkavität des Dünndarms eingebunden ist. Obwohl sie sich von der Größe in Homo sapiens und Rattus norwegicus unterscheidet, lässt sie sich dennoch bei beiden in Caput, Corpus und Cauda abgrenzen. Das Caput -der Kopf- liegt direkt in der Duodenalschleife, während der Corpus -der Körper- mit der Cauda -dem Schwanz- schließlich bis an die Milz reicht. Dorsal im Pankreas befindet sich der Ductus pancreaticus major, der durch die ganze Länge der Drüse zieht und dabei kleinere Zuflüsse einsammelt. Er mündet schließlich in den Darm an dem absteigenden Teil des Dünndarms an der Papilla Vateri.

Das Pankreas besitzt zwei Anteile:

Der überwiegende Anteil ist exokrin. Das Pankreas ist in viele Läppchen unterteilt, durch die lockeres Bindegewebe zieht, in denen versorgende Bahnen verlaufen. Jedes Läppchen besteht aus vielen endständigen Azini, die untereinander durch kleine Gangsysteme verbunden sind. In den Azini befinden sich Zellen, die durch die Nahrungsaufnahme stimuliert, Enzyme sezernieren. So entlassen sie über das komplexe Gangsystem schließlich in den Darm zum Beispiel Lipase für den Fett-, Trypsin für den Protein- und Amylase für den Kohlenhydratabbau.

Der endokrine Anteil der Bauchspeicheldrüse stellt nur knapp 5 % des Organs dar. Er besteht aus den Langerhans-Inseln, die als rundliche Epithelkomplexe in mitten der Drüsenläppchen zu finden sind. Drei verschiedene Zelltypen produzieren hier Insulin, Glukagon und Somatostatin, die alle für den Glucosestoffwechsel im Körper eine große Rolle spielen (Schiebler et al., 2002).

Seit einiger Zeit wird vermutet, dass Stammzellen aus dem adulten Pankreas über eine hohe Plastizität verfügen. So konnte bereits in einigen Tierversuchen gezeigt werden, dass nach einer induzierten Pankreatitits massive Neubildungen von Zellen einsetzen (Zimmermann et al., 2002). Unklar ist bis heute ob es sich dabei um Transdifferenzierungen handelt, ein Umwandlungsprozess von einem Zelltyp des Pankreas in einen anderen, der bereits in verschiedenen Experimenten gezeigt werden konnte (azinäre Zellen in Gangzellen, Zimmermann et al., 2002; Inselzellen in Gangzellen, Yuan et al., 1996), oder ob Stamm- oder Progenitorzellpopulationen, die sich in die benötigten Zelltypen differenzieren, für die Regenerationen verantwortlich sind (Bonner-Weir, 2002; Holland, 2004).

Trotz der Regenerationsfähigkeit der Bauchspeicheldrüse kann sie bei einigen Erkrankungen die notwenige Zellpopulation nicht aufrechterhalten. Diabetes mellitus ist eine zentrale Erkrankung in der regenerativen Medizin. Da der Körper die Homöostase zwischen abgestoßenen insulinproduzierenden β -Zellen und möglichen Regenerationen nicht erhalten kann, sind Patienten auf eine ununterbrochene, exogene Insulingabe angewiesen. Heute sind bereits Transplantationen von Langerhans-Inseln möglich, wobei für eine Unabhängigkeit der exogenen Insulinzufuhr drei Pankreas Spender verfügbar sein müssen (Ryan et al., 2001). Daher ist ein Forschungsziel möglicherweise mit autolog entnommenen Stammzellen effiziente Inselzellpopulationen *in vitro* herzustellen, die dann in denselben Patienten injiziert werden könnten.

1.2.2 Das Potential von Stammzellen des Pankreas

In diesem Zusammenhang wurden bereits unterschiedliche Stammzellpopulationen aus dem Pankreas isoliert, die unterschiedliche Potentiale aufweisen.

Choi et al. isolierten 2004 Inselzellen aus der Maus, die sie bis zu 80 % anreichern konnten. Diese wurden so kultiviert, dass sie Zellaggregate bildeten. Die Zellaggregate sezernierten nach Stimulation mit Laminin -einer Matrix auf der die Zellen wachsen-

Glukagon und Insulin. Bei einer Stimulation mit Fibronektin jedoch konnten Marker für eine stattgefundene Nervenzelldifferenzierung gezeigt werden. Die Autoren postulierten daher einen multipotenten Stammzelltyp, der sich in das ektodermale und das entodermale Keimblatt differenzieren kann. Entsprechende Ergebnisse lieferte im selben Jahr die Arbeitsgruppe um Seaberg et al. (2004). Sie zeigte eine kleine Zellpopulation, sowohl aus den Inseln als auch den Gangsystemen gewonnen, aus der Einzelzelllinien generiert werden konnten, die ebenfalls in die erwähnten Keimblätter differenzierten. Dass bis zu diesem Zeitpunkt, eine Differenzierung in das mesodermale Keimblatt nicht gelungen war, wurde mit einem möglichen gemeinsamen embryonalen Ursprungs des Pankreas (entodermal) mit dem Gehirn (ektodermal) erklärt (Seaberg et al., 2004).

Schließlich konnte gezeigt werden, dass azinäre Zellen nicht nur Stammzellcharakteristika aufweisen (unbegrenzte Proliferation, Regenerations- und Differenzierungspotential), sondern dass sie auch in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren können (Kruse et al., 2004 und 2006). Somit wurden zum ersten Mal pluripotente Stammzellen aus dem adulten Pankreas beschrieben.

Man nimmt also heute an, dass das Pankreas tatsächlich Stammzellen beherbergt. Es bleibt jedoch unklar, wo diese sich *genau* befinden. Obwohl die genannten Gruppen verschiedene Quellen für ihre Isolationen beschrieben, ist die am weitesten verbreitete Theorie, dass sich Stammzellnischen in den Gangsystemen der Drüse befinden. Zwar erscheinen auch die Azini als mögliche Quelle, da exokrines Gewebe bei einer Präparation nie gänzlich entfernt werden kann, dennoch bleiben die Schnittstellen der genannten Gruppen wahrscheinlich die Gangepithelien.

Bestätigt wird dies durch eine kürzlich veröffentliche Publikation, in der Stammzellisolationen aus den Gangepithelien beschrieben werden (Seeberger et al., 2006). Die isolierten Zellen konnten in zellulären Aggregaten spontan in Zellen des Mesoderm und des Entoderm differenzieren.

1.3 Regenerative Medizin mit Stammzellen beim Myokardinfarkt

1.3.1 Regenerative Medizin

Seit Beginn der Charakterisierung der Stammzellen wird deren mögliche klinischtherapeutische Bedeutung diskutiert. Im Mittelpunkt ihrer Anwendungsmöglichkeiten stehen vor allem degenerative Erkrankungen, wie Parkinson, Diabetes mellitus oder die Muskeldystrophie nach akutem Myokardinfarkt. Die Herzinsuffizienz als mögliche Spätfolge des Myokardinfarkts stellt eine besondere Herausforderung dar, da sie zu einer der führenden Todesursachen der westlichen Welt gehört (American Heart Association, 2005).

Die regenerative Medizin beschäftigt sich vor allem mit der Möglichkeit mit Stammzellen oder ausdifferenzierten Zellen auf Matrices (*tissue engineering*) untergegangenes, defektes Gewebe wiederherzustellen.

1.3.2 Der Myokardinfarkt

Aufgrund der Minderperfusion durch Stenose oder Verschluss einer Koronararterie kommt es zur Nekrose der Kardiomyozyten, die durch eigene Reparaturmechanismen nicht regeneriert werden können. Die Umwandlung des nekrotischen Gewebes in Narbengewebe führt zu Einbußen in der Kontraktionsfähigkeit. Aufgrund des verminderten funktionsfähigen Gewebes kann das Blut nicht mehr adäquat aus dem Herzen gepumpt werden, was zu Muskelschwäche und gesteigerter Ermüdung (Vorwärtsversagen) oder Wassereinlagerungen in verschiedenen Organen (Rückwärtsversagen) führen kann (Herold, 2006). Der Patient ist in seiner Belastungsfähigkeit stark eingeschränkt.

Die Leistung des Herzen wird unter anderem mit der Ejektionsfraktion (EF) beschrieben, die sich auf das bei einem Schlag ausgeworfene Blut im Verhältnis zum Gesamtblutvolumen in der Kammer bezieht und deren Normbereich bei 70 % liegt. Ist die EF unter 30 % gesunken handelt es sich um eine schwere Funktionseinschränkung, bei der Organtransplantationen meist unabdingbar sind. Patienten mit EF über 30 % sind ihr Leben lang auf eine symptomatische Therapie mit Medikamenten, wie z.B. ACE-Hemmer oder Beta-Blocker, angewiesen (Herold, 2006; McMullen and Pasumarthi, 2007). Während der akute Myokardinfarkt operativ in Form eines Bypasses oder einer Stent-Implantation mittels Herzkatheterisierung in seiner Ätiologie behandelt wird, kann die Nekrose von Kardiomyozyten nur teilweise verhindert werden.

1.3.2 Stammzellen zur Therapie des Myokardinfarktes

Seit verschiedene Stammzellen in mehreren Organen identifiziert worden sind, besteht die große Hoffnung darin, sie in degenerative Gewebe zu integrieren, damit sie Gewebe langfristig wieder funktionsfähig machen.

Einige Forschungsergebnisse deuten bereits heute darauf hin, dass eine Stammzelltherapie in Zukunft potentiell vielen betroffenen Patienten Heilung bringen kann.

Wissenschaftler haben bis jetzt einige potentielle Stammzellquellen für die Regeneration von myokardialem Gewebe gefunden. Es konnten in einigen Tierexperimenten Stammzellen im Herzen gefunden werden, die als Sca-1⁺- und c-Kit⁺-Zellen bezeichnet werden (Beltrami et al., 2003; Matsuura et al., 2004). Diese Zellen liegen in Nischen isoliert vom übrigen Gewebe und werden vom Körper in Stresssituationen, zum Beispiel durch parakrin sezernierte Hormone, aktiviert (Lyngbaek et al., 2007). Bei stetigem Verlust von Kardiomyozyten könnten diese Stammzellen eventuell adäquat regenerieren, bei einem akuten Verlust von Gewebe hingegen, kann keine ausreichende Menge an Stammzellen rekrutiert werden. Könnte man durch verschiedene Methoden, wie zum Beispiel einfache Gabe von Stimulantien (z.B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren) diese Rekrutierung verstärken, könnten diese Zellen auch im akuten Fall ausreichend zur Verfügung stehen.

Man konnte bereits nachweisen, dass Stammzellen aus dem Knochenmark (hämatopoetische und/oder mesenchymale), die durch Mobilisierung und Homing zwischen Knochenmark, Blutbahn und Geweben wandern, sich bei myokardialem Stress im Herzgewebe einfinden. Man konnte noch nicht nachweisen, dass diese mobilisierten Stammzellen funktionelle Aufgaben übernehmen, aber sie scheinen sich in das Gewebe zu integrieren und vor allem Blutgefäße zu generieren (Orlic et al., 2001; Dawn and Bolli, 2005). Hier konnte man durch die Gabe von verschieden Faktoren (z.B. G-CSF oder GM-CSF) (Seiler et al., 2001), die zum Beispiel auch bei der Vorbereitung auf eine Knochenmarkspunktion vor einer Chemotherapie routinemäßig durchgeführt wird, das

Mobilisieren der Stammzellen aus dem Knochenmark forcieren. Die Patienten zeigten einen signifikanten Anstieg an koronarem Blutfluss zum Infarktgewebe.

Der Einsatz dieser beiden Möglichkeiten als Standard in der regenerativen Medizin wäre insofern von Vorteil, als das er keinen invasiven Eingriff mit sich bringt.

Da die Isolierung von embryonalen und adulten Stammzellen bereits etabliert ist, kann man Stammzellen aus dem frühen Embryo und verschiedenen adulten Geweben gewinnen und sie unterschiedlich vorbehandelt schließlich in ischämisches Myokardgewebe injizieren (McMullen and Pasumarthi, 2007).

In embryonalen Stammzellexperimenten zeigte sich, dass sich Stammzellen nachdem sie in "Hängenden Tropfen" embryoid bodies geformt haben, in Kardiomyozyten differenzieren (Boheler et al., 2002; Ulloa-Montoya et al., 2005). Dabei zeigten die Herzzellen in vitro ihre Funktionalität durch verschiedenes rhythmisches Pulsieren, das Kontraktionen des Myokardgewebes, unterteilt in atriale, ventrikuläre und Purkinje-Zellen, ähnlich ist (He et al., 2003). Kardiomyozyten können dann zum Beispiel anhand von vorausgehenden Transfektionen der embryonalen Stammzellen mit Fusionsgenen aus einer Zellkultur isoliert werden, sodass eine reine Kardiomyozytenkultur hergestellt werden kann (Klug et al., 1996). Problematisch bei weiteren Forschungen gestaltet sich der Umgang mit ethischen Bedenken bezüglich der Anwendung von embryonalen Stammzellen im humanen Organismus. Zusätzlich besteht die Gefahr der Teratombildung (Geschwüre mit entarteten Zellen), die von undifferenzierten embryonalen Stammzellen auszugehen scheint (McMullen and Pasumarthi, 2007). Bei Differenzierung der Zellen in Kardiomyozyten ist nicht auszuschließen, dass diese Kardiomyozyten nicht transformiert werden, das bedeutet, dass sie wieder in ein undifferenziertes Stadium zurückkehren und damit ebenso zu einer Onkogenese führen könnten. So gesehen gestaltet sich eine Injektion von differenzierten oder undifferenzierten embryonalen Stammzellen in ischämisches Myokardgewebe des Menschen bis heute als nicht vertretbar und wurde bis dato nicht durchgeführt.

In adulten Stammzellforschungen wurden einige Stammzellquellen in adulten Organen des Menschen nachgewiesen. Neben den Stammzellen des Knochenmarks konnten noch zahlreiche in anderen Organen und Geweben detektiert werden (z.B. Skelettmuskulatur, Fettgewebe, Haarfollikel) (Gaustad et al., 2004; Winitsky et al., 2005; Kruse et al., 2006). Bisher konnten Differenzierungen in Kardiomyozyten *in vitro* vor allem von Stammzellen aus dem Knochenmark gezeigt werden. Die Stimulierung wurde aktiviert durch diverse Kulturbedingungen, vor allem mit Wachstumsfaktoren. Obwohl die differenzierten Zellen durch verschiedene Nachweismethoden und auch funktionell in Form von autonomen Kontraktionen als kardiomyogen bezeichnet werden können, konnten bis heute keine sich kontrahierenden Zellen ohne forcierte Differenzierung hergestellt werden.

Bei den *in vivo* Anwendungen werden nicht vordifferenzierte Stammzellen in Herzinfarktgewebe injiziert. Stammzellen aus dem Knochenmark zum Beispiel werden isoliert (Sortierung nach mononukleären Zellen, meist CD34⁺) und in das Gewebe transplantiert (Strauer et al., 2002 und 2005). Problematisch ist die bisher nicht mögliche reine Kultur an z.B. CD34⁺-Zellen, damit kann auch bis heute nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass andere mitinjizierte Zellen den Organismus schädigen oder beeinflussen. Zusätzlich konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, das zwar eine Verbesserung der Herzaktion im Vergleich zur Placebogruppe zu sehen ist (Strauer et al., 2002 und 2005), man letztlich aber noch nicht nachweisen konnte, dass die transplantierten Zellen sich in das Gewebe funktionell einfügen. Des Weiteren hat man auch in anderen Organen transplantierte Zellen wieder finden können.

Die Methode der Injektion der Stammzellen ist bereits etabliert. Man unterscheidet drei verschiedene Arten: Die intrakoronare Infusion und die direkte intramyokardiale Injektion werden beide invasiv in einer offenen Herzoperation vorgenommen. Dahingegen bietet die Katheterinjektion die Möglichkeit eines nicht invasiven, nicht narkotischen, für den Patienten also wesentlich angenehmeren Eingriffes. Die Stammzellen werden hierbei über den Ballonkatheter injiziert, der einen Rückfluss der Zellen entgegen der Injektionsrichtung verhindert (Zur Veranschaulichung siehe Abb. 4.2.a). Eine weitere Möglichkeit der Applikation von Stammzellen wurde kürzlich von Miyahara et al. (2006) vorgeschlagen. Hier wurden mesenchymale Stammzellen auf eine aus Isopropylacrylamid bestehende Trägersubstanz ausgesät und als *cell sheet* auf das ischämische Herzgewebe aufgetragen.

Man kann also zusammenfassen, dass sich verschiedene Ziele für die regenerative Medizin beim Myokardinfarkt formulieren lassen, bei denen embryonale oder adulte Stammzellen eingesetzt werden könnten. Dafür müssen folgende Fragen geklärt werden: Wie kann man bei der Anwendung von embryonalen Stammzellen die Teratombildung ausschließen? Woher kann man die embryonalen Stammzellen gewinnen, wenn weiterhin ethische Restriktionen bestehen?

Wie kann man bei der Anwendung von adulten Stammzellen eine ausreichende, reine Stammzellkultur präparieren? Sollten die Stammzellen *in vitro* vordifferenziert in defektes Myokardgewebe injiziert werden? Wie könnte man körpereigene Stammzellen mobilisieren?



Abb. 4.2.a Veranschaulichung der regenerativen Möglichkeiten bei ischämischnekrotischem Myokardgewebe. (A) zeigt verschiedene Zellen die injiziert werden könnten.
(B) stellt dar, welche Vorversuche gemacht werden können, bevor die Stammzellen auf drei verschiedene Arten transplantiert werden.

[Die Abbildung wurde entnommen aus einer Veröffentlichung von Dimmeler et al., 2005]

1.4 Die Wirkung von 5-Azacytidin auf die Differenzierung von Stammzellen in Kardiomyozyten

1.4.1 Differenzierung von Stammzellen aufgrund verschiedener Mechanismen

Zur gezielten Differenzierung von Stammzellpopulationen werden verschiedene Substanzen und Substanzmischungen eingesetzt. Die einfache Zugabe von Wachstumsfaktoren, wie z.B. dem *fibroblast growth factor* (FGF), in Kultivierungsmedien bewirken Differenzierungen in Zelltypen, z.B. Fettzellen (Kakudo et al., 2007). Auch Retinsäure oder 5-Azacytidin hat in diversen Experimenten eine Ausdifferenzierung von Stammzellen bewirkt (Rohwedel et al., 1999; Xu et al., 2004).

Diese Substanzen wirken mit unterschiedlichen Mechanismen auf die DNA der Stammzellen, so dass Gene an- oder abgeschaltet werden.

1.4.2 DNA-Methylierung

DNA-Methylierung ist ein epigenetisches Phänomen, das Transkriptionsfähigkeiten von Genen beeinflusst ohne Basensequenzen zu verändern. Dabei werden Cytosine, die in der DNA an Guanosine gebunden sind, durch die DNA-Methyltransferase in 5-Methylcytosin umgewandelt. Tritt diese methylierte Base vermehrt zum Beispiel in Promotorbereichen auf, kann es zu Funktionsverlusten von Genen kommen. So konnte in einigen Neoplasien gezeigt werden, dass eine ständige Methylierung von tumorassoziierten Genen, wie zum Beispiel den Tumorsuppressorgenen, zu deren Inaktivierung führt. Tumorsuppressorgene, die einem Entarten von Zellen entgegen wirken, können dann nicht mehr synthetisiert werden und es kommt zum Verlust der Zellzykluskontrolle der betroffenen Zelle und sie entartet selbst (Jones et al., 1999).

Umgekehrt kann es bei einer Hypomethylierung in Promotorbereichen zu einer vermehrten Expression von Genen kommen. Hier können zum Beispiel Onkogene vermehrt exprimiert werden, die ein Tumorwachstum fördern.

Die Auswirkungen von DNA-Methylierungen sind also vielfältig. Seitdem 5-Methylcytosin 1948 zum ersten Mal entdeckt wurde (Hotchkiss, 1948), wird die regulatorische Funktion der DNA-Methylierung auch in der embryonalen Entwicklung und Zelldifferenzierung diskutiert. Auch wenn davon ausgegangen wird, dass der Methylierungsstatus einer genomischen Region über Zellgenerationen erhalten bleiben kann, konnte man feststellen, dass ständige (De-)Methylierungen stattfinden (Singal et al., 1999). Vor allem während der Embryogenese ändern sich Methylierungsmuster kontinuierlich und eine signifikante genomweite Demethylierung tritt auf (Monk et al., 1987). Es kann davon ausgegangen werden, dass spezifische Demethylierungen in embryonalen Stammzellen zu erforderlichen Veränderungen der Genexpression führen, die damit bestimmte Zelltypen generieren (Reik et al., 2001).

1.4.3 DNA-Methylierung als Differenzierungsstimulation für Stammzellen

Das Cytosin-Analogon 5-Azacytidin ist ein Methylierungsinhibitor, der als Pharmakon bei Neoplasien des blutbildenden Systems eingesetzt wird. Er verhindert die DNA-Methylierung an spezifischen Onkogenen und gleichzeitig fördert er die Expression von Tumorsuppressorgenen. Durch seinen möglichen Wirkmechanismus in der Embryogenese ist 5-Azacytidin auch in der Stammzellforschung bereits zum Einsatz gekommen. So konnten Makino et al. 1999 nachweisen, dass sich murine Stammzellen aus dem Knochenmark mit Hilfe des Methylierungsinhibitors vermehrt in Kardiomyozyten differenzierten (Makino et al., 1999). Dabei vollzogen sie die Differenzierungsstimulation mit klonalen Zelllinien, die sie 24 Stunden mit 5-Azacytidin (3 μ mol/l) inkubierten. Differenzierte Kardiomyozyten konnten danach mit analytischen Methoden detektiert werden. Es wurden auch schlagende Areale in den differenzierten Zellkulturen beobachtet. Andere Arbeitsgruppen konnten ähnliche Ergebnisse mit animalen Stammzellen erzielen (Hakuno et al., 2002; Rangappa et al., 2003).

Xu et al. konnten nachweisen, dass auch humane Stammzellen aus dem Knochenmark sich mit Hilfe des Methylierungsinhibitors vermehrt in Kardiomyozyten differenzieren (Xu et al, 2004). Dabei inkubierten sie mesenchymale Stammzellen für 24 Stunden mit 5-Azacytidin (10 μ mol/l), bFGF (10 μ g/l) und Antibiotika-Zusätzen. Während hier keine schlagenden Zellen gefunden wurden, konnten spontane, rhythmische Kalziumströme nach Stimulation mit Kaliumchlorid gemessen werden.

1.5 Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Analyse einer klonalen Zelllinie pankreatischer Stammzellen. Dafür wurde die bereits isolierte primäre Rattenzelllinie Z29 verwendet. Der Nachweis diverser Marker erfolgte mittels Immunzytochemie und PCR, wobei Stammzellproteine und solche aller drei Keimblätter gezeigt wurden. Besonderer Fokus lag auf Markern des mesodermalen Keimblattes und genauer auf denen der Muskulatur, da ein weiteres Ziel die Differenzierung in Kardiomyozyten war. Schließlich sollte eine spontane Differenzierung dieser Zellklone in *organoid bodies* erfolgen, die mit der Methode der "Hängenden Tropfen" stimuliert wurde. Es wurden die gleichen Stammzellmarker getestet und anschließend Vergleiche zu den Ergebnissen der Zellklone durchgeführt.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Zellklone sollten gezielte, verstärkte Differenzierungen in kardiomyogene Zelltypen erfolgen. Dafür war die Etablierung eines Kokultursystems mit myokardialen Biopsien ein weiteres Ziel. Ein Protokoll wurde erstellt und anschließend seine Funktionalität zunächst mit pankreatischen Stammzellen der Ziege und allogenem Herzgewebe getestet. Hierfür wurde die Immunzytochemie zur Auswertung hinzugezogen.

Anschließend sollte das Protokoll zur gezielten Differenzierung auf humane Stammzellen übertragen werden. Dafür wurden zunächst humane adulte Stammzellen aus dem Pankreas isoliert und kultiviert. Die Kokultivierung erfolgte mit humanem Myokardgewebe. Für die folgenden Analysen wurden Immunzytochemie und PCR angewendet.

Es sollte eine weitere Möglichkeit der forcierten Differenzierung von pankreatischen Stammzellen in Kardiomyozyten getestet werden. Daher wurde in Anlehnung an kardiomyogene Differenzierungen mithilfe des Methylierungshemmers 5-Azacytidin in mesenchymalen Stammzellen (Makino et al. 1999; Xu et. al. 2004) versucht, diese Methode auf pankreatische Stammzellen anzuwenden. Für die Auswertung wurde ebenfalls Immunzytochemie und PCR zur Hilfe genommen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

2.1.1 Chemikalien und Hersteller

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Aminosäuren, nicht essentiell	GIBCO, Karlsruhe
Amphotericin	Biochrom, Berlin
5-Azacytidin	SIGMA, Steinheim
Antikörper (siehe Tab. 2.1.a)	Chemicon, Hampshire, UK
APAAP-Komplex	Dako, Hamburg
Borsäure	Merck, Darmstadt
bFGF	SIGMA, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	SIGMA, Steinheim
Bromphenol Blau	Serva, Heidelberg
Cy 3-Zweitantikörper (Ziege, Anti-Maus IgG)	Jackson, ImmunoResearch,
	Cambridgeshire, UK
DAPI	Roche, Mannheim
Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO BRL, Karlsruhe
DMSO	Sigma, Steinheim
dNTP (10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
DTT (0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe
First strand buffer	Invitrogen, Karlsruhe
FKS	PAA, Pasching, A
Fluorescein (FITC; Ziege, Anti-Kann. IgG)	Jackson, ImmunoResearch,
	Cambridgeshire, UK
Gelatine 0,1 %	Fluka, Neu-Ulm
Glutamin	PAA, Pasching, A
Glycerin	Merck, Darmstadt

Dako, Hamburg

HEPES Iscove MDM Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Kollagenase Magnesiumchlorid **MEM-Earle** β-Mercaptoethanol Methanol Molekularbiol. Wasser; AccuGENE Natriumchlorid Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat Normalserum (Ziege) NucleoSpin RNA II Oligo-dT PCR-Marker, 100 bp DNA Leiter Penicillin/Streptomycin Primer (siehe Tab. 2.1.b) **Ringer-Lösung** RNA (human, Herz) Superscript RT II-RNase H Taq-Polymerase Trasylol Tris Triton X 100 Trypsin Tyrode Salzlösung Vectashield-Einbettmedium

Xylencyanol (Türkis)

Roth, Karlsruhe Biochrom, Berlin Merck, Darmstadt Roth. Karlsruhe Serva, Heidelberg Fermentas, St. Leon-Rot Biochrom, Berlin SIGMA, Steinheim Roth, Karlsruhe Cambrex, Verviers, B Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Vector, Burlingame, USA Machery & Nagel, Düren Invitrogen, Karlsruhe New England BioLabs, PAA, Pasching, A Eurogentec, San Diego, USA DeltaSelect, Pfullingen Ambion, Cambridgeshire, UK Invitrogen, Karlsruhe Fermentas, St. Leon-Rot Bayer, Leverkusen **BIOMOL**, Hamburg Fluka, Neu-Ulm PAA, Pasching, A SIGMA, Steinheim Vector Laboratories, Burlingame, CA SIGMA, Steinheim

Antikörper	bezogen von	Marker für	Keimblatt
Anti-alkalische	R&D Systems,	Zellmembran von	
Phosphatase	Wiesbaden	Stammzellen	
Anti-Amylase	Calbiochem,	Amylase produzierende	Entoderm
	Schwalbach	Zellen	
Anti-GFAP	Dako, Hamburg	Gliale Zellen	Ektoderm
Anti-Insulin	SIGMA, Steinheim	Insulin produzierende	Entoderm
		Zellen	
Anti-Nanog	Chemikon, Hamshire,	Stammzellen	
	UK		
Anti-Nestin	Chemikon, Hampshire,	(neuronale)	
	UK	Stammzellen	
Anti-NF	Serotec, Düsseldorf	Neurone	Ektoderm
Anti-Kollagen II	DSHB, USA	Knorpelzellen	Mesoderm
Anti-Oct-4	Chemikon, Hampshire,	Stammzellen	
	UK		
Anti-PDX 1	Chemikon, Hampshire,	Pankreaszellen	Entoderm
	UK		
Anti-sarkomerisches	DSHB, USA	Muskelzellen	Mesoderm
Myosin (MF 20)			
Anti-SMA	Dako, Hamburg	Muskelzellen	Mesoderm
Anti-SSEA-1	Chemion, Hampshire,	Stammzellen	
	UK		
Anti-Troponin I	Dako, Hamburg	Herzmuskelzellen	Mesoderm

Tab. 2.1.a Auflistung der verwendeten Antikörper

Tab. 2.1.b Auflistung der verwendeten Primer

Target-/Kontrollgen	Primersequenz (5'-3')	Temperatur	Produktgröße (bp)
(Homo sapiens)			
Troponin I	links:	61,3° C	311
	aggcaaaagtcaccaagaaca		
	rechts:		
	aggggcagtaggcaggaag		
Troponin T2 Isoform 1	1.: gattctggctgagaggagga	62,6° C	197
	r.: tggagactttctggttatcgttg		
Beta Myosin, schweres	1.: gccccacatcttctccatct	61,3° C	179
Polypeptid 7	r.: ggctctggtccttcttgct		
Alpha Aktin	1.: gtgtgacgacgaggagacca	62,6° C	154
	r.: cttctgacccatacccacca		
Desmin	1.: ctgtccctcccacctctgt	62,6° C	250
	r.: agcccctgctttctaagtcc		
GAPDH	1.: gagtcaacggatttggtcgt	58,8° C	213
	r.: ggaagatggtgatgggattt		

Target-/Kontrollgen	Primersequenz (5'-3')	Temperatur	Produktgröße (bp)
(Ratte)			
Amylase	1.: ggtctctccacccaatgaaa	59,3° C	173
	r.: tgacagcatccacataaatcc		
BMP-2	1.: tgacgcttttctcgtttgtg	59° C	178
	r.: atgggtttgtggtggaagtg		
CD-9	1.: ggtttcctgggctgctgt	59,1° C	220
	r.: ggatggctttgagtgtttcc		
GAPDH	1.: tgatgctggtgctgagtatg	60° C	477
	r.: ggggtaggaacacggaagg		
GFAP	1.: agaaaaccgcatcaccattc	58,5° C	188
	r.: gcacacctcacatcacatcc		
Glukagon	1.: atcgtggctggattgtttgt	58,5° C	161
-	r.: gtgaatgtgccctgtgaatg		
Nestin	1.: agaccactgacacccacaga	62,7° C	150
	r.: ggaggagggagaggaagaag		
NF	1.: agtggttcaaatgccgctac	58,5° C	228
	r.: gctgctggatggtgtcct		
Oct-4	1.: tggagaagtgggtggaggaa	62° C	396
	r.:ccgagtagagtgtggtgaaatgg		

2.1.2 Geräte und Hersteller

Brutschrank	BINDER, Tuttlingen	
Elektrophorese-System	Bio-Rad, München	
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Hamburg	
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen	
Inkubationsschrank	Heraeus, Hannover	
Lichtmikroskop Axiovert	Zeiss, Hamburg	
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg	
PC-Programm Axio Vision 3.0	Carl Zeiss Vision GmbH,	
	Hallbergmoos	
PC-Programm PCBAS	Raytest, Langenzersdorf, A	
Photometer, Ultrospec 3100	GE Healthcare Europe, München	
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen	
Schüttelinkubator GFL, Großburgwedel		
ortex IKA, Staufen		
Waage	Kern, Balingen	
Wasserbad	Memmert, Schwabach	
Zentrifugen		
- Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg	
- Minifuge	Kisker, Steinfurt	
- Zellkultur-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg	

2.2 Zellen und Gewebe

Zelllinie	Zell-/ Gewebeart	Kultivierungsmedium	Referenz
Z29 P8	Stammzellen aus	DMEM mit 10 % FKS und	Kruse et al., 2004
	dem exokrinen	1 % Penicillin/Streptomycin	
	Pankreas der Ratte		
ZIpan 1b	Stammzellen aus	DMEM mit 10 % FKS und	Kruse et al., 2004
	dem exokrinen	1 % Penicillin/Streptomycin	
	Pankreas der Ziege		
CEpan 3b	Stammzellen aus	DMEM mit 10 % FKS und	Kruse et al., 2004
	dem humanen	1 % Penicillin/Streptomycin	
	exokrinen Pankreas		
CEpan 6b	Stammzellen aus	DMEM mit 10 % FKS und	Kruse et al., 2004
	dem humanen	1 % Penicillin/Streptomycin	
	exokrinen Pankreas		
HeP 2	Tumorzellen aus	Iscove MDM mit	Moore et al., 1955
	einem humanen	10 % FKS und 1 %	
	Larnyxkarzinom	Penicillin/Streptomycin	

2.2.1 Zelllinien

Die Zelllinien Z29, ZIpan 1b und HeP 2 wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse zur Verfügung gestellt. Die humanen Zelllinien wurden selbst präpariert (siehe 2.4.1).

2.2.2 Pankreas

Das humane Pankreasgewebe wurde dankenswerterweise von der chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck zur Verfügung gestellt. Bei Patienten mit Pankreatitis wurden die entzündeten Bereiche des Pankreas mit einem Sicherheitssaum entfernt. Es wurde nur nicht entzündetes Gewebe aus dem Sicherheitssaum für die Präparation verwendet.

(Ethische Beglaubigung durch das ethische Komitee des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck; AZ: 03-065)

2.2.3 Myokard

Das verwendete humane myokardiale Gewebe verdanke ich der Herzchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck. Einerseits wurde abgeschnürtes Gewebe verwendet, das durch Einsatz der Herz-Lungen Maschine am rechten Vorhof entsteht. Das Gewebe kann entfernt werden, da es sonst nekrotisiert und für die weitere Herzleistung des Patienten irrelevant ist.

Andererseits wurde Papillarmuskulatur verwendet, die bei Herzklappen-Operationen anfiel.

(Ethische Beglaubigung durch das ethische Komitee des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck; AZ: 05-206)

2.3 Medien

2.3.1 Kultivierungsmedium für Stammzellen

450 ml DMEM-Medium wurde mit 45 ml FKS und 5 ml Penicillin/Streptomycin versetzt. Die Gesamtkonzentration von Penicillin/Streptomycin entspricht einem Volumenprozent.

2.3.2 Kultivierungsmedium für humane Tumorzellen

450 ml Iscove-Medium wurde mit 45 ml FKS und 5 ml Penicillin/Streptomycin versetzt.

2.4 Grundlegende Methoden

2.4.1 Präparation und Isolation von Acini des exokrinen Pankreas des Menschen

Die Isolierung der Acini und damit die Gewinnung von glandulären Stammzellen wurde in Anlehnung an die Methode von Grosfils et al., 2003, durchgeführt. Dabei kamen folgende Puffer und Medien zum Einsatz:

HEPES-Stammlösung:	2,383 g HEPES auf 100 ml Aqua bidest, pH 7,6
HEPES-Eagle-Medium:	90 ml MEM
	10 ml HEPES-Stammlösung

Isolationsmedium:

32 ml HEPES-Eagle-Medium, pH 7,4 8 ml 5 % BSA 200 μl 0,1 M CaCl2 100 μl Trasylol

Digestionsmedium:

20 ml Isolationsmedium, pH 7,44 mg Kollagenase

Isolations- und Digestionsmedium wurden unmittelbar vor der Verwendung mit Carbogen begast und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Die Präparation des humanen Pankreasgewebes wurde von Chirurgen der medizinischen Universität zu Lübeck durchgeführt; die Übergabe des Gewebes erfolgte in steriler Ringer-Lösung.

Für die Isolation wurden zunächst härtere Bereiche mit einem Skalpell abgetrennt und verworfen, davon ausgehend, dass es sich um nicht gewolltes Bindegewebe handelt. Die weichen Anteile wurden in Digestionsmedium aufgenommen, mit einer sterilen Schere fein zerkleinert und anschließend mit Carbogen begast. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37° C in einem Schüttler mit zweihundert Zyklen pro Minute. Das Digestionsmedium wurde abgesaugt und das Gewebe zweimal mit Isolationsmedium gewaschen. Das Gewebe wurde erneut in Digestionsmedium aufgenommen, weiter zerkleinert und wieder begast. Anschließend fand eine erneute Inkubation auf dem Schüttler für fünfzehn Minuten statt.

Im Anschluss daran wurde das Gewebe durch mehrfaches Aufziehen in Glaspipetten mit absteigendem Innendurchmesser (10 ml, 5 ml, 2 ml) weiter mechanisch zerkleinert. Die Zellsuspension wurde dann durch einen Gazefilter in ein 15 ml Röhrchen gesiebt und bei 800 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, um das Pellet dann in 10 ml DMEM aufzunehmen und erneut zu zentrifugieren. Dieser Vorgang wurde entsprechend der Pelletgröße zweimal wiederholt. Das Zellpellet wurde nach der letzten Zentrifugation wieder in DMEM aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche gegeben. Die Inkubation der Acini-Zellen erfolgte bei 37° C und 5 % CO₂ zunächst für zwei Tage, bis ein deutliches Zellwachstum aus den Acini zu erkennen war. Dann wurde der erste Mediumwechsel vorgenommen um letzte unerwünschte Zelltrümmer zu entfernen. Die Zellen wurden CEpan 3b und 6b benannt und entsprechend der folgenden Erläuterungen kultiviert, passagiert und kryokonserviert.

2.4.2 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit in entsprechenden Zellflaschen mit dem Kultivierungsmedium (siehe 2.3), wobei in der Regel alle drei Tage ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Die Zellflaschen wurden im Brutschrank bei 37° C mit einer CO₂-Konzentration von 5 % gehalten.

2.4.3 Passagieren von Zellkulturen

Die Zellen hafteten adhärent und überlagernd auf den unbeschichteten Plastikböden der Zellflaschen. Nach Begutachtung der Gefäße unter dem Mikroskop wurden die Zellen dann passagiert, wenn der Eindruck entstand, dass diese sich nicht mehr ausreichend entfalten konnten und zu dicht beieinander lagen. Das Medium wurde dann von den Zellen entfernt; die Zellflasche mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin 4 Minuten inkubiert, so dass sich die Zellen vom Boden ablösten. Das Trypsin wurde mit einer doppelten Menge an Medium neutralisiert und die Suspension anschließend bei 1000 U für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet konnte nach eigenem Ermessen auf zwei oder mehr Kulturflaschen aufgeteilt und mit der entsprechenden Menge an Kultivierungsmedium befüllt werden.

2.4.4 Kryokonservierung von Zellkulturen

Die Zellen wurden zunächst entsprechend Punkt 2.4.3 mit Trypsin abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit gekühltem Einfriermedium (90 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert und sofort bei -20° C gelagert. Nach kurzzeitiger Lagerung im -80° C Gefrierschrank wurden die Zellen in Stickstoff (-196° C) überführt.

2.4.5 Fixierung der Zellen auf Chamber Slides

Für die Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von Proteinen wurden trypsinierte Zellen mit einer Dichte von ca. 50 Zellen/µl auf *Chamber Slides* mit jeweils zwei Kammern ausgesät. Dies geschah mit 1000 µl Kultivierungsmedium. Die Inkubation erfolgte wie gewohnt bis die Zellen auf dem Objektträger adhärierten. Zur Fixierung wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen, nachdem das Medium mit einer Automatik-Pipette abgesaugt wurde. Ein Methanol/Aceton-Gemisch in einem Konzentrationsverhältnis von 7:3 wurde mit DAPI (1:1000) auf die *Chamber Slides* gegeben. Bei Raumtemperatur wurden die Zellen 5 Minuten fixiert. Anschließend wurde die Suspension abgesaugt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4° C aufbewahrt.

2.4.6 Klonale Analyse der Zelllinie Z 29

Für die klonale Analyse, d.h. die Generierung einer Zelllinie entstanden aus einer Einzelzelle, wurde Passage 8 der pankreatischen Stammzellen der Ratte verwendet.

Es wurde für die Kultivierung der Einzelzelle und ihrer Tochterzellen folgendes Nährmedium verwendet:

395 ml DMEM100 ml FKS5 ml Penicillin/Streptomycin

Die Zellen wurden durch Trypsinierung vom Boden der Zellflasche abgelöst und anschließend mit Kultivierungsmedium in Suspension gehalten. Es wurde die Zellzahl der Suspension pro 200 μ l bestimmt. Aufgrund der Zellzahl konnte errechnet werden, wie weit die Suspension mit Medium verdünnt werden musste, so dass galt: eine Zelle/200 μ l.

Für das Ausplattieren wurden 96-Kammer-Platten verwendet. Bereits einen Tag nach dem Start wurde mit Hilfe des Lichtmikroskops jede Kammer auf eine Einzelzelle überprüft. Bei den Kammern, die eine Einzelzelle enthielten, wurden täglich Medienwechsel vollzogen und die Teilungsrate notiert. Somit konnte zusätzliche Gewissheit erlangt werden, dass die wachsende Population tatsächlich aus einer Einzelzelle entstanden ist (1=2=4=8 etc.).

16 Tage nach Versuchsstart waren einige Kammern bereits konfluent mit adhärierenden Zellen bewachsen, so dass ein erstes Trypsinieren und Überführen in 12-Kammer-Platten durchgeführt wurde.

Weitere 6 Tage später konnten erste Zellklone in kleine Kulturflaschen überführt werden. Von nun an wurde für die weitere Kultivierung DMEM-Medium mit 10 % FKS (siehe 2.3.1) verwendet.

2.5 Methoden zur spontanen Differenzierung

2.5.1 Spontane Differenzierung durch "Hängende Tropfen"

Mit Hilfe der "Hängenden Tropfen" bilden Zellen Zellaggregate, so genannte *organoid bodies*, in denen vermehrt spontane Differenzierungen ablaufen. In diesem Versuch wurden besonders gut wachsende Zellklone (20B11) der Zelllinie Z 29 verwendet.

Für die Differenzierung wurde folgendes Medium angesetzt:

380 ml DMEM

100 ml FKS (vorher für 30 min bei 54° C inaktiviert) je 5 ml Additive:

- L-Glutamin
- 3,5 μl β-Mercaptoethanol auf 5 ml PBS
- nicht essentielle Aminosäuren
- Penicillin/Streptomycin

Für die Kultivierung wurden Gelatine-beschichtete Kulturschalen benötigt, die einen Tag zuvor angesetzt werden mussten. Dafür wurden die Schalen mit 0,1 % Gelatine bei 4° C beschichtet. Die noch flüssige Gelatine wurde anschließend abgesaugt.

Zuerst wurden bakteriologische Petrischalen mit jeweils 15 ml PBS befüllt. Die abtrypsinierten Zellen wurden mit Differenzierungsmedium resuspendiert und so verdünnt, dass galt: 2000 Zellen pro 20 μ l. Mit einer Glaspipette wurden anschließend 20 μ l Tropfen auf die Deckel der Petrischalen gegeben, die dann vorsichtig auf die mit PBS gefüllten Schalen gestülpt wurden.

Nach zwei Tagen hatten sich bereits sichtbar *organoid bodies* geformt, die dann mit Nährmedium (20 % FKS) von den Deckeln gespült wurden und daraufhin für weitere vier Tage inkubierten.

Die *organoid bodies* wurden zur Weiterzucht einzeln in Gelatine-beschichtete Kulturschalen überführt, wobei sie erneut mit Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Nach einigen Tagen konnten die *organoid bodies* weiter in herkömmlichen Zellflaschen

und mit dem Kultivierungsmedium (2.3.1) wachsen. Die spontane Differenzierung fand weiter statt und die Zellaggregate ließen sich wie Primärzellen behandeln.

2.6 Methoden zu Differenzierung in Kardiomyozyten

2.6.1 Differenzierung mit Hilfe von Myokardgewebe

Das bei der Operation gewonnene Gewebestück wurde in Ringer-Lösung aufgenommen und unter sterilen Bedingungen in kleinere Stücke (4x4x4 mm) geschnitten. Diese wurden in eine unbeschichtete mittlere Zellflasche gegeben und 3-5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Als das Myokardgewebe fest am Boden anhaftete, wurden trypsinierte und in Kultivierungsmedium resuspendierte Zellen in die Flasche gegeben. Zwei Tage nach Inkubation wurden die Gewebestücke entfernt und die Zellen aliquotiert um sie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kokultivierung zu analysieren. Die Zellen CEpan 3b befanden sich in Passage 14 und die Zellen CEpan 6b in Passage 4, als sie mit dem Myokardgewebe inkubiert wurden.

Für die Stimulierungsversuche glandulärer Stammzellen der Ziege wurden speziesspezifische Myokardgewebestücke verwendet.

2.6.2 Differenzierung mit 5-Azacytidin

Für die gezielte Differenzierung der pankreatischen Stammzellen in Kardiomyozyten wurde folgendes Differenzierungsmedium verwendet:

500 ml DMEM-Medium 5 μmol 5-Azacytidin 5 μg bFGF 0,125 mg Amphotericin

Nach Trypsin-Behandlung wurden die Zellen resuspendiert und einmal mit der Tyroden Salzlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Kultivierungsmedium aufgenommen und mit einer Dichte von 1 x 10³ in kleine Petrischalen (Durchmesser 5 cm) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt, das jetzt statt Penicillin/Streptomycin Amphotericin, bFGF und 5-Azacytidin (10 μ mol/l) enthielt. Dieses Medium wurde 24 Stunden auf den Zellen belassen, dann abgesaugt. Die Zellen wurden erneut einmal mit der Tyroden Salzlösung gewaschen und folgend weiter in Kultivierungsmedium inkubiert. Die weitere Kultivierung erfolgte nach obigen Angaben (siehe 2.4.2). Jeweils 2 und 4 Wochen nach 5-Azacytidin-Behandlung wurden die Zellen auf *Chamber Slides* für Immunfluoreszenzfärbungen und Petrischalen für den PCR-Nachweis aliquotiert.

2.7 Analyse-Methoden

2.7.1 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Detektion und Markierung bestimmter Proteine über Immunzytochemie wurden die fixierten Zellen auf den *Chamber Slides* verwendet. Zunächst wurde das PBS abgesaugt, um dann 20 Minuten mit Normalserum der Ziege unspezifische Bindungen abzusättigen. Damit werden Proteine, die möglicherweise auch durch die Antikörper gebunden werden könnten, zuvor mit unspezifischen Antikörpern der Ziege blockiert, die später nicht angefärbt werden.

Die Erstantikörper, die von der Maus oder dem Kaninchen stammen, wurden in der angegebenen Konzentration des Herstellers in TBST+0,1 % BSA verdünnt, auf die Zellen gegeben und eine Stunde bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Dabei war einem Austrocknen der Zellen durch eventuelles Verdunsten entgegen zu wirken, weshalb die *Chamber Slides* in eine feuchte Kammer gelegt wurden.

Anschließend wurden die *Chamber Slides* mit PBS dreimal gewaschen und daraufhin ein fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper auf diese gegeben. Der Zweitantikörper Cy 3 (Anti-Maus) wurde 1:400, der Zweitantikörper FITC (Anti-Kaninchen) 1:200 in PBS verdünnt. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei 37° C und dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen zuletzt mit Aqua dest. gewässert. Für die weitere Aufbewahrung wurden die Objektträger von den Kammern befreit und mit Vectashield-Einbettmedium eingedeckt.

2.7.2 Alkalische Phosphatase-

antialkalische Phosphatase-Komplex (APAAP)-Färbung

Die APAAP-Färbung wurde zum Nachweis des Proteins Troponin I verwendet. Dafür wurde auf die fixierten Zellen zunächst wie unter Punkt 2.7.1 Normalserum und Primärantikörper gegeben, um sie dann mit dem entsprechenden Zweitantikörper eine Stunde zu inkubieren. Anschließend wurde der APAAP-Komplex aufgetragen in geeigneter Verdünnung entsprechend der Anweisungen des Herstellers und dreißig Minuten inkubiert. Nach mehreren Waschschritten und wiederholtem Auftragen des APAAP-Komplexes wurden die Zellen schließlich mit einer chromogenen Substratlösung für alkalische Phosphatase (Naphtol/Neofuchsin) solange inkubiert, bis die gewünschte Farbintensität mit dem Kontrastfarbstoff Hämalaun erreicht war. Für die weitere Aufbewahrung wurden die Objektträger ebenfalls mit Vectashield-Einbettmedium eingedeckt.

2.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.7.3.a RNA-Präparation

Für die RNA-Präparation wurde eine kleine voll gewachsene Petrischale benötigt. Die adhärenten Zellen wurden vom Medium befreit und mit PBS feucht gehalten. Mit einem Zellschaber konnten die Zellen dann vom Boden abgekratzt werden. Anschließend wurde die Suspension fünf Minuten in einem Röhrchen bei 1000U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in ein kleines Eppendorf-Röhrchen überführt und in der Mikrozentrifuge bei 10000 U/min für zwei Minuten erneut zentrifugiert. Die Präparation wurde mit dem NucleoSpin-Kit von Machery & Nagel und gemäß deren Anleitung durchgeführt.

2.7.3.b Reverse Transkription

Vor Beginn wurde eine photometrische Bestimmung durchgeführt, bei der die Konzentration der präparierten RNA gemessen wurde. Dies ist wichtig da für den Versuch der Reversen Transkription 500 ng RNA eingesetzt werden. Die Reverse Transkription bewirkt eine Umschreibung der präparierten RNA in cDNA. Während der RT-Reaktion lief eine Negativkontrolle mit, um später eine mögliche Verunreinigung durch Überreste von DNA identifizieren zu können. Die Negativkontrolle wurde nicht in cDNA umgeschrieben. Die RT der Proben erfolgte anschließend unter Einsatz der Superscript Reverse Transkriptase und Oligo dT Primern gemäß der Anleitung des Herstellers. Abschließend konnten die Proben bei -20° C für die Polymerase-Kettenreaktion gelagert werden.

2.7.3.c PCR

Ein Zwanzigstel des RT-Reaktionsproduktes wurde unter Verwendung der Polymerase und spezifischer Primer bei zuvor ausgetesteten Temperaturen amplifiziert (siehe Tab. 2.1.b). Der verwendete Zyklus wurde wie folgt programmiert: 95° C für 40 sec – ausgetestete Temperatur für 40 sec – 72° C für 40 sec. Die Zyklenzahl variierte zwischen 38 und 42, abhängig von der bestmöglich erreichbaren Intensität der amplifizierten Proteine in den Agarose-Gelen der Kontrollbanden.

2.7.3.d Agarose-Gelelektrophorese

Ein 2 %iges Agarose-Gel diente schließlich der Analyse der Ergebnisse der PCR.
3. Ergebnisse

3.1 Stammzellcharakterisierung der primären Zellklonlinie Z29 20B11 und den aus ihr generierten *organoid bodies*

3.1.1 Klonale Analyse der Zelllinie Z29

Für die Generierung von Zellklonen aus einer Primärkultur der Rattenzelllinie Z29 wurden 20 Platten mit je 96 Kammern ausplattiert. Die Konzentration wurde so gewählt, dass sich bei visueller Auswertung im Mittel eine Zelle in jeder Kammer befand (1 Zelle/200 μl). Nach 16 Tagen waren in 23 Kammern (1 %) konfluent wachsende Zellklone entstanden, die nach den bekannten Kultivierungsbedingungen behandelt wurden (siehe 2.4). Nach weiteren zwei Wochen zeigten schließlich nur noch 9 Zellklonlinien (0,5 %) unlimitiertes Wachstum, das sie auch beim weiteren Passagieren beibehielten. Für die Stammzellcharakterisierung wurde die Primärzellklonlinie Z29 20B11 verwendet.

3.1.2 Generierung von organoid bodies aus der Zellklonlinie Z29 20B11

Da durch die "Hängenden Tropfen" die spontane Differenzierung forciert wird, wurden für die Stammzellcharakterisierungen *organoid bodies (OBs)* generiert. Dafür wurde die Primärzellklonlinie Z29 20B11 verwendet. Zur Charakterisierung ihrer Eigenschaften wurden Ergebnisse beider Kulturen (Primär- und *OB*-Kultur) in Immunfluoreszenzfärbungen und RT-PCR herangezogen.



Abb. 3.1.a Generierte *organoid bodies* in einer bakteriologischen Schale nach dem Herunterspülen aus den "Hängenden Tropfen" (**a**, **b**). Nachdem diese auf Gelatinebeschichtete Zellschalen überführt wurden, wuchsen innerhalb weniger Tage Zellen aus den Aggregaten heraus.

3.1.3 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen

Die Stammzellmarker SSEA-1 und Nestin konnten in einigen Primärzellklonen nachgewiesen werden. Jedoch wurden in den zur spontanen Differenzierung gebrachten *OB*-Kulturen diese Proteine vermehrt angefärbt. SSEA-1 ist auf der Oberfläche von Stammzellen zu finden und daher punktuell anfärbbar (Abb. 3.1.b/c, Bild (**a**)). Nestin hingegen ist ein Intermediärfilament und stellt sich daher im Zytoplasma dar (Abb. 3.1.b/c, Bild (**b**)). Der Stammzellmarker Nanog konnte nur in den Primärzellklonen gefunden werden (Abb. 3.1.b, Bild (**c**)). Nanog ist ein Transkriptionsfaktor, der kernlokalisiert ist. Das Protein findet sich in dieser Aufnahme jedoch zytoplasmatisch und filamentär, weshalb dieses Ergebnis noch zu diskutieren bleibt. Es fanden sich in den *OB*-Kulturen Zellen positiv für die Stammzellmarker alkalische Phosphatase und Oct-4, die in den Primärzellklonen nicht detektierbar waren. Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, welches punktuell dargestellt, mit der Zellmembran verankert ist (Abb. 3.1.c, Bild (**c**)). Oct-4 als Transkriptionsfaktor findet sich in embryonalen Stammzellen im Zellkern, wurde in diesem Zusammenhang jedoch im Zytoplasma der Zellen angefärbt (Abb. 3.1.c, Bild (**d**)).

Tab. 3.1.a *Quantitative Einschätzung der getesteten Marker auf Zellen der primären Zellklonkultur und der* OB-*Kultur.*

	1			
Getesteter Marker	Anzahl positiv markierter	Anzahl positiv markierter		
	Zellen in der primären	Zellen in der OB-Kultur		
	Zellklonkultur Z29 20B11	generiert aus Z29 20 B11		
Alkalische Phosphatase	0/-	0		
Amylase	0	++		
GFAP	-	0		
Kollagen II	0	0		
Nanog	0/-	-		
Nestin	o/+	+		
NF	-	++		
Oct-4	-	0		
PDX-1	+	++		
SMA	++	++		
SSEA-1	0/-	0		

(++) = sehr viele positive Zellen

- (+) = viele positive Zellen
- (**o**) = vereinzelt positive Zellen
- (-) = keine positiven Zellen

Ein Nachweis für die spontane Differenzierung von Stammzellen ist möglich mit verschiedenen Markern, die jeweils für Zellen der drei Keimblätter spezifisch sind. Die getesteten ektodermalen Marker GFAP und NF, die in differenzierten Nervenzellen wichtige Strukturproteine darstellen, konnten in den primären Zellklonen nicht detektiert werden, wohl aber in den aus ihnen generierten *OB*-Kulturen. Diese Proteine stellten sich vor allem filamentär dar (Abb. 3.1. c, Bilder (**b**) und (**g**)). Während GFAP nur vereinzelt in einigen Zellen zu finden war, zeigte sich NF in vielen Zellen der *OB*-Kultur positiv.

Auf Zellen des mesodermalen Keimblattes wurden die Kulturen mit den Antikörpern für SMA und Kollagen II getestet, die in beiden Kulturen stark nachweisbar waren. SMA färbt das Aktin-Zytoskelett im Zytoplasma von Muskelzellen an (Abb. 3.1.b, Bild (e); Abb. 3.1.c, Bild (**f**,**g**)). Der Antikörper Kollagen II markiert ein Strukturprotein, das als Sekret in Knorpelzellen produziert wird und sich im Zytoplasma der Zellen befindet.

Entodermale Marker, wie Amylase und PDX-1, konnten ebenso in Zellen beider Kulturen gezeigt werden, wobei in den OB-Kulturen größere Areale auffindbar waren. Amylase spaltet als Enzym Kohlenhydrate und ist daher als Sekret in Zellen nachweisbar (Abb. 3.1.b, Bild (f), Abb. 3.1.c, Bild (h)). Es wird in den exokrinen Anteilen des Pankreas hingegen endokrinen produziert. PDX-1 findet sich in den Anteilen der Bauchspeicheldrüse und ist ein Transkriptionsfaktor für die Hormone Insulin und Glukagon. PDX-1 ist nukleär auffindbar (Abb. 3.1.b, Bild (g); Abb. 3.1.c, Bild (i)).



Abb. 3.1.b Immunfluoreszenzfärbungen der primären Zellklone Z29 20B11. Die Stammzellmarker SSEA-1 (a), Nestin (b) und Nanog (c) ließen sich in einzelnen Zellen nachweisen. Die mesodermalen Marker Kollagen II (d) und SMA (e) waren deutlich vermehrt detektierbar. Amylase (f) und PDX-1 (g) -Marker des entodermalen Keimblattesstellten sich ebenso in einigen Zellen positiv dar. Die ektodermalen Marker (NF und GFAP) konnten in den Färbungen nicht gefunden werden und sind daher nicht dargestellt. Die Zellkerne wurden in jeder Abbildung mit DAPI (blau) angefärbt.



Abb. 3.1.c Immunfluoreszenzfärbungen der OB-Kultur, generiert aus den primären Zellklonen Z29 20B11.

Abb. 3.1.c Immunfluoreszenzfärbungen der OB-Kultur, generiert aus den primären Zellklonen Z29 20B11. Die Stammzellmarker SSEA-1 (a), Nestin (b, rot), alkalische Phosphatase (c) und Oct-4 (d) konnten sich sowohl in Einzelzellen als auch in Zellaggregaten darstellen lassen. Die mesodermalen Marker Kollagen II (e) und SMA (f, g, rot) wurden ebenso detektiert. Amylase (h) und PDX-1 (i) -Marker des entodermalen Keimblattes- stellten sich in einigen Zellen und Zellaggregaten positiv dar. In der *OB*-Kultur konnten die entodermalen Marker GFAP (b, grün) und NF (g, grün) nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden in jeder Abbildung mit DAPI (blau) angefärbt.

3.1.4 Ergebnisse der PCR

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen sind nur zum Teil übereinstimmend mit den Ergebnissen der PCR für die cDNAs der primären Zellklonlinie 20B11 und den aus ihr generierten *organoid bodies*.

Die Funktionalität der Primer und die bestmögliche Temperatur und Zyklenzahl wurde anhand der embryonalen cDNA getestet (siehe Tab. 2.1.b). Diese wird daher außerdem als Positivkontrolle gewertet. Als Kontaminationskontrolle wurden die RT-PCR-Ansätze ohne Superscript in der PCR ebenfalls getestet. Sie produzierten in den meisten Fällen keine Banden und sind deshalb nicht dargestellt. Obwohl für die Reverse Transkription die gleiche Menge an RNA eingesetzt wird, wurden die Proben auf das Haushaltsgen GAPDH untersucht. Dies gab zusätzliche Evidenz für eine quantitativ gleiche Basis beider Proben, weshalb die weiteren Ergebnisse auch quantitativ vergleichbar waren (Abb. 3.1.d).

Für die Stammzellmarker Oct-4, CD9 und Nestin konnte eine mRNA-Expression mittels RT-PCR in beiden untersuchten Ansätzen nachgewiesen werden. Es zeigten sich quantitativ nur für den Stammzellmarker Oct-4 Unterschiede: Die zur spontanen Differenzierung gebrachte *OB*-Kultur zeigte eine etwas verminderte Expression.

Für das mesodermale Keimblatt wurde der Marker BMP-2 getestet. Dieses Protein stellt die frühe Entwicklung von embryonalen Zellen in Osteozyten dar und ist in den untersuchten Zellen deutlich detektierbar.

Als ektodermale Marker wurden Neurofilamente (NF) und GFAP amplifiziert, aber es konnte nur GFAP gezeigt werden. GFAP ist ein Marker für Vorläufer von glialen Zellen, NF von neuronalen Zellen. Quantitative Unterschiede in diesen Expressionen waren nicht auszumachen. Für das entodermale Keimblatt konnte die Expression von Amylase dargestellt werden, jedoch nur deutlich in den *organoid bodies*. Die Expression von Glukagon konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.1.d).





3.2 Stimulationsversuch pankreatischer Stammzellen der Ziege mit Myokard

3.2.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Versuche an humanen Stammzelllinien ging eine erste Immunfärbung mit denen der Ziege voraus. Damit sollte prinzipiell die Funktionalität des Protokolls (siehe 2.6.1) bestätigt werden. Die pankreatischen Stammzellen der Ziege wurden für zwei Tage mit einem Myokardstück der gleichen Spezies auf *Chamber Slides* inkubiert. Direkt danach wurden die Zellen fixiert und die Färbungen durchgeführt. Die kokultivierten Zellen waren deutlich positiv für das Protein sarkomerisches Myosin (MF 20), wobei auch die Kontrolle, die ohne Myokardstück inkubiert worden war, einige positive Zellen zeigte (Abb. 3.2.a). Der Antikörper stellt filamentäre Strukturen dar, in denen teilweise eine sarkomere Querstreifung auszumachen ist (Abb. 3.2.a). Quantitativ wurde geschätzt, dass der Kokultur-Versuch 80 %, während die Kontrolle 30-40 % positive Zellen aufwies.



Abb. 3.2.a Immunfluoreszenzfärbungen pankreatischer Stammzellen der Ziege nach 48-stündiger Inkubation mit Myokardgewebe (a, b) und Kontrollinkubation (c, d). Quantitativ sind in der Kokultur deutlich mehr Zellen für das Protein MF 20 positiv als in der Kontrolle. [DAPI: blau; MF 20: rot]

3.3 Stimulationsversuch humaner pankreatischer Stammzellen mit Myokard

3.3.1 Ergebnisse der Immunzytochemie für MF 20 und Troponin I

Für die Darstellung des muskelspezifischen Proteins MF 20 wurden humane pankreatische Stammzellen zunächst direkt nach 48-stündiger Inkubation mit humanem Myokardgewebe fixiert und gefärbt.



Abb. 3.3.a Immunfluoreszenzfärbungen des Proteins MF 20. (a) zeigt lichtmikroskopisch Myokardgewebe, das mit humanen pankreatischen Stammzellen für 48 Stunden kokultivierte. In (b) erkennt man einen Gradienten an detektierbaren MF 20, der von dem Ort des ursprünglich gelegenen Myokardgewebes (M) ausgeht. (c, d) zeigen MF 20 (rot) in den kokultivierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (e, f). [DAPI: blau]

Es zeigten sich im Vergleich zu nicht kokultivierten Zellen deutlich angefärbte Bereiche, die in einem Gradienten von dem haftenden Myokardstück ausgingen (Abb. 3.3.a). Die Gesamtheit der kokultivierten Zellen mit dem angefärbten Protein MF 20 konnte auf circa 65 % beziffert werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich deutlich weniger positive Zellen in der Kontrolle (~10 %).

Zur Kontrolle wurde ein kryogeschnittenes Myokardstück ebenfalls mit Antikörper für MF 20 gefärbt und es zeigte sich deutlich positiv (Abb. 3.3.b). Die beiden Kontrollversuche, bei denen Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen mit Myokardgewebe inkubiert wurde, stellten sich hingegen negativ dar (Abb. 3.3.b).



Abb. 3.3.b Kontrollversuche für das Protein MF 20. Als Positivkontrolle galt ein Myokardgewebeschnitt, der mit dem MF 20-Antikörper gefärbt wurde (\mathbf{a}). Für den Nachweis, dass Sarkomere nicht aus Myokardgewebe auf kokultivierte Zellen übertragen wurden, wurden Kokulturen mit Fibroblasten (\mathbf{b}) und mesenchymalen Stammzellen (\mathbf{c}) angefertigt, die negativ waren. [MF 20: rot; DAPI: blau]

Um nachweisen zu können, für wie lange die Differenzierung anhält und detektierbar ist, wurden immunzytochemische Färbungen fünf Wochen nach Start der Kokulturen angefertigt. Die Zellen wurden bis zur Analyse in Kultur gehalten und passagiert. Nach fünf Wochen bestanden keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den kokultivierten Zellen und ihrer Kontrollen (Abb. 3.3.c). In den behandelten Zellen konnten nur noch wenige positive Zellen detektiert werden (~15 %). Die Kontrolle zeigte im Verlauf der fünf Wochen ebenso einen Abfall der MF 20-positive Zellen (~3-5 %).



Abb. 3.3.c *Immunfluoreszenzfärbung des Proteins MF 20 nach fünf Wochen.* Die kokultivierten Zellen zeigten nach einigen Passagen weniger detektierbares MF 20 (**a**, **b**) im Vergleich zur Analyse direkt nach Inkubation mit Myokardgewebe. Die Kontrollgruppe zeigte vereinzelt Zellen mit angefärbtem MF 20 (**c**, **d**). [MF 20: rot; DAPI: blau;]

Für den Nachweis des Proteins Troponin I mittels der APAAP-Färbung wurden kokultivierte Zellen und ihre Kontrollen direkt nach Inkubation mit Myokardgewebe fixiert und analysiert. Hier konnten große Bereiche gefunden werden, in denen sich Troponin I anfärben ließ. Die Kontrollzellen zeigten annähernd kein detektierbares Troponin I (Abb. 3.3.d).



Abb. 3.3.d *APAAP- Färbung des Proteins Troponin I.* In den unbehandelten Zellen (**a**) ließ sich das Muskelprotein nicht nachweisen. In den kokultivierten Zellen (**b**) erschienen mehrere Zentren in denen Troponin I nachweisbar war. [Troponin I: rot; Hämatoxylin: blau]

3.3.2 Ergebnisse der PCR

Für die mRNA-Expressionsanalysen der Gene α -Aktin, Desmin, Myosin, Troponin I und Troponin T2 wurden vier unterschiedliche Versuche durchgeführt. Humane Herzmuskulatur wurde für 48 Stunden mit humanen pankreatischen Stammzellen inkubiert, bevor die Zellen weitere zwei Wochen kultiviert und daraufhin analysiert wurden. Die pankreatischen Stammzellen unterschieden sich in Ursprung und Passagenzahl (Abb. 3.3.e).

Die angefertigten cDNAs wurden zunächst auf das Haushaltsgen Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) getestet um, für den späteren Vergleich zwischen kokultivierten Zellen und deren Kontrollen, von gleichen Mengen ausgehen zu können. Die Banden, die sich für GAPDH detektieren ließen, erfüllten diese Vorraussetzung (Abb. 3.3.e). Proben, bei denen keine Reverse Transkription durchgeführt wurde, zeigten nach Auftragen auf das Agarose-Gel annähernd keine Banden, weshalb man von fast reinen präparierten RNA-Proben ausgehen durfte (Daten nicht gezeigt).

Die Targetgene Troponin I und Myosin konnten in allen Versuchen in ihrer Expression nicht eindeutig detektiert werden, da sie diffuse und zusätzliche unspezifische Banden erzeugten (Daten nicht gezeigt). Für den Verlauf der weiteren PCR-Analysen konnten diese Primer daher nicht verwendet werden.



Abb. 3.3.e *PCR-* Ergebnisse für die Targetgene Desmin, Troponin T2, α-Aktin und GAPDH. In vier verschiedenen Ansätzen wurden jeweils kokultivierte mit unbehandelten Zellen auf diese Proteine untersucht und verglichen.

Während die Genexpression von α -Aktin in nur der Hälfte der Versuche ausgemacht werden konnte, ließen sich Desmin und Troponin T hingegen in allen RT-PCR-Experimenten nachweisen (Abb. 3.3.e).

In einem Versuch (M3) konnte α -Aktin in den unter gleichen Bedingungen kultivierten Kontrollzellen deutlich stärker gezeigt werden als in den kokultivierten Zellen. Berechnet man die optische Dichte der Banden im Gel für α -Aktin und eicht die Bande der Kontrollzellen auf einen Nullwert, so handelt es sich in den kokultivierten Zellen um eine prozentualen Abnahme der (od-BkG)/mm (optischen Dichte minus Hintergrund/ mm) von 81 % (Abb. 3.3.f). In einem anderen Versuch (M1) konnte ein entgegen gesetzter Effekt ausgemacht werden; hier zeigte sich das Targetgen α -Aktin in den behandelten Zellen um 38 % stärker exprimiert. In den Versuchen M2 und M4 konnte auch nach wiederholten Tests α -Aktin in den präparierten RNAs nicht gefunden werden.

Für die Analysen der Targetgene Desmin und Troponin T2 konnte jeweils in drei kokultivierten Proben eine deutlich stärkere Expression festgestellt werden. Die Spanne der Verbesserung reicht von 3 % bis 100 % bei Desmin und 47 % bis 70 % bei Troponin T2 (Abb. 3.3.f). In jeweils einer Probe jedoch zeigten sich diese exprimierten Gene in den Banden der Kontrollzellen deutlicher, weshalb eine statistische Auswertung wenig sinnvoll erschien. Standardabweichungen wären größer als der eigentliche Mittelwert.



Abb. 3.3.f Darstellung der prozentualen Unterschiede von detektierten Proteinen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Die Banden der Kontrollzellen für die Primer Desmin (1), Troponin T2 (2) und α -Aktin (3) wurden densitometrisch ausgewertet und auf einen Nullwert geeicht. Anschließend konnten anhand der densitometrischen Auswertung der kokultivierten Zellen prozentuale Unterschiede erhoben werden.

Tab. 3.3.a Auswertung der optischen Dichte der Gelbanden im relativen und prozentualen Vergleich. Die Targetgene Desmin, Troponin T2 und α -Aktin wurden anhand ihrer optischen Dichte in den Gelbanden zwischen M1-M4 verglichen. Die jeweiligen Kontrollzellen wurden auf einen Nullwert geeicht und die prozentualen Unterschiede der behandelten Zellen prozentual angegeben.

(od- Bkg)/ mm der Targetgene								
	Desmin		Troponin T2		α-Aktin			
CEpan 3b P14	9351.96	+3 %	7049.62	+70 %	4179.65	+38 %		
+ Myokard P1 M1								
CEpan 3b P15	9099.06	0 %	2160.33	0 %	2578.06	0 %		
CEpan 3b P2	1758.47	+100 %	3971.62	-25 %	0.00	0 %		
+ Myokard P2 M2								
CEpan 6b P4	0.00	0 %	5264.26	0 %	0.00	0 %		
CEpan 6b P4	3748.03	+72 %	10106.46	+66 %	1912.34	-81 %		
+ Myokard P1 M3								
CEpan 6b P5	1061.44	0 %	3410.81	0 %	10178.40	0 %		
CEpan 6b P5	1422.93	-68 %	7106.54	+47 %	0.00	0 %		
+ Myokard P2 M4								
CEpan 6b P7	4416.74	0 %	3756.18	0 %	0.00	0 %		

3.3.3 Morphologie der stimulierten Zellen

Beim Beobachten der Zellen nach Stimulierung durch das Myokardgewebe konnte man zeitlich unkoordiniert die Entstehung von netzartigen Komplexen finden (Abb. 3.3.g). Diese entstanden erst, wenn die Zellen adhärent waren und sich flächendeckend auf der Zellflasche ausgebreitet hatten. Lichtmikroskopisch erkannte man myofibrillär-ähnliche Strukturen, die sich ineinander zu verweben schienen. Die netzartigen Komplexe verschwanden ohne Eingreifen oder nach Trypsinierung und Neu-Aussaat und erschienen nur teilweise wieder. Sie zeigten keinerlei Bewegung und ließen sich auch durch eine verdünnte Kaliumchlorid-Lösung (1:5) nicht zur Kontraktion induzieren. In den jeweiligen Kontrollen konnten mitunter ähnliche Komplexe gefunden werden, jedoch im Verhältnis deutlich weniger.

3.3.4 Schlagende Areale in den Stammzellkulturen

Durch mechanisches Abschaben der Zellen, eine Möglichkeit - neben dem Trypsinieren -Zellen vom Boden der Zellflasche zu lösen, konnte gezeigt werden, dass sich die netzartigen Komplexe zusammenziehen. Nach Absaugen der abgeschabten Komplexe wurden die Bereiche aufgezeichnet, die im verbliebenen PBS-Flüssigkeitsfilm noch erhalten waren. Man konnte sehen, dass die Bereiche, teils abgelöst, teils fest haftend, sich mit einer Frequenz von ~ 0,3 Hz kontrahierten. Es konnten sowohl rhythmische, als auch arrhythmische Komplexe detektiert werden. Die Bewegung konnte für wenige Minuten (5-7 min) beobachtet werden und erschöpfte sich dann. Eine Wiederaufnahme der Komplexe in Medium führte zu keinem Anwachsen der auch morphologisch veränderten Zellen. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Zellen unter gleichen Bedingungen abgeschabt. Auch hier zeigten sich Areale, die sich autonom mit der gleichen Frequenz kontrahierten. Jedoch waren es weniger und kleinere Areale.



Abb. 3.3.g Fotografien aus den Aufnahmen der sich kontrahierenden Kardiomyozyten.

Abb. 3.3.g Fotografien aus den Aufnahmen der sich kontrahierenden Kardiomyozyten.

Schematisch an einem Raster dargestellt sind die Ortsveränderungen der sich kontrahierenden Zellareale. (a) und (b) zeigen die Verschiebungen einzelner Zellen innerhalb von drei Sekunden. Insgesamt konnte eine Frequenz von 20 Schlägen pro Minute festgestellt werden. (c) zeigt die beiden Bilder übereinander gelagert, in dem unscharfen Bereiche eine Bewegung ausdrücken. Vor der Stimulation der Kontraktion wurden in den Zellkulturen Netzstrukturen gefunden (d).

3.4 Stimulationsversuch humaner pankreatischer Stammzellen mit 5-Azacytidin

3.4.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen

Für den Nachweis des Proteins MF 20 in der Immunfluoreszenz wurden die behandelten Zellen und ihre Kontrollen am 21. Tag nach Versuchsbeginn fixiert. Hier zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede. Es konnten nur die Zellkerne angefärbt werden (Abb. 3.4.a). Zwei Wochen darauf (am 35. Tag) wurde von den weiter in Kultur gehaltenen Zellen erneut eine Färbung gemacht, die das Protein MF 20 ebenfalls nicht darstellte (Daten nicht gezeigt).



Abb. 3.4.a *Immunfluoreszenfärbung der pankreatischen Stammzellen CEpan 3b P14 mit 5-Azazytidin behandelt und deren Kontrollen.* Es zeigten sich keine Unterschiede in der Fluoreszenz zwischen den behandelten Zellen (**a**, **b**) und der Kontrolle (**c**, **d**). [MF 20: rot; DAPI: blau]

3.4.2 Ergebnisse der PCR

Die Zellen CEpan 3b in Passage 14 mit 24-stündiger 5-Azacytidin-Behandlung wurden nach siebzehn Tagen Kultivierung mittels PCR analysiert.

Durch den Nachweis des Haushaltsgens GAPDH (Abb. 3.4.b.) konnte gezeigt werden, dass umgeschriebene cDNA in gleichen und damit zu vergleichenden Mengen vorlag.

Die Expression der Targetgene α-Aktin, Desmin und Troponin T2 konnten in den Kontrollzellen nachgewiesen werden, wohingegen in den stimulierten Zellen nur Desmin und Troponin T2 gezeigt werden konnte. Während die Bande für das Gen Desmin bei den stimulierten Zellen stärker erscheint, zeigen die beiden anderen Banden schwächere Ergebnisse. Eine densitometrische Auswertung zeigte, dass nur das Gen Desmin in den stimulierten Zellen zu 29 % stärker detektierbar ist als in der Kontrolle (Tab. 3.4.a). Die anderen Targetgene stellten sich auch im Vergleich der optischen Dichten der Gelbanden in den stimulierten Zellen vermindert exprimiert dar.



Abb. 3.4.b *PCR- Ergebnisse der stimulierten humane pankreatischen Stammzellen mit 5-Azacytidin.* Es zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den stimulierten und unbehandelten Zellen. Während das Gen Desmin in den stimulierten wenig stärker exprimiert zu sein scheint, zeigten sich beim Gen α -Aktin entgegengesetzte Phänomene. Troponin T2 war in beiden Banden ähnlich stark detektierbar.

Tab. 3.4.a Densitometrische Auswertung der mit 5-Azacytidin-stimulierten und unbehandelten Stammzellen. Es zeigten sich keine eindeutigen Tendenzen bezüglich der Unterschiede zwischen den stimulierten Zellen und ihrer Kontrollen.

(od-Bkg)/mm									
	α-Aktin		Troponin T2		Desmin				
CEpan 3b P14	615.08	-54 %	4879.66	-7 %	2654.33	+29 %			
+ 5-Azacytidin									
CEpan 3b P15	1339.26		5263.12		1872.50				

4. Diskussion

4.1 Stammzellcharakterisierung der primären Zellklonlinie Z29 20B11 und den aus ihr generierten *organoid bodies*

Adulte pankreatische Stammzellen besitzen die Fähigkeit sich spontan in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Kruse et al., 2004; Choi et. al., 2004; Seeberger et al., 2006). Der Ursprung dieser potenten Zellen ist bislang ungeklärt. Während Zellen aus dem endokrinen Anteil des Pankreas Zellen des entodermalen und ektodermalen Keimblattes generieren können (Choi et al., 2004; Seaberg et al., 2004), konnte gezeigt werden, dass solche isoliert aus den Gangsystemen auch Zellen des mesodermalen Ursprungs bilden können (Seeberger et al., 2006). Die hier verwendete Methode zur Isolierung pankreatischer Stammzellen ist eine etablierte und effiziente Methode (Kruse et al., 2004), die überwiegend exokrine Anteile in die Präparation mit einbezieht. Nichtsdestotrotz wurden in frischpräparierten Zellen nur 80-90 % Amylase-positive Zellen gefunden. Es wird angenommen, dass sich auch Zellen aus Gangsystemen und periazinären Bereichen in den Präparationen befanden. Da es sich daher also immer um ein Gemisch von Präparationsgewebe handelt, kann der genaue Ursprung dieser Zellen noch nicht geklärt werden.

Neben den spontanen Differenzierungen zeigen adulte pankreatische Stammzellen des azinären Drüsengewebes auch eine lange Lebensfähigkeit und ein hohes Wachstumspotential. Sie lassen sich in Zellkulturen der Ratte bis zu über 140 Passagen in vitro kultivieren ohne an Vitalität zu verlieren. Es ist ihnen möglich auch in hohen Passagen noch dreidimensionale Zellaggregate, organoid bodies, zu bilden. OBs zeigen erstaunliche Eigenschaften: Einerseits finden im Inneren dieser Körperchen vermehrte Differenzierungen statt, andererseits können sie zu sogenannten tissue bodies aggregieren (Kruse et al, 2006). In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte gezeigt werden, dass einige dieser tissue bodies (TBs) Oozyten-ähnliche Zellen an ihre Oberfläche entlassen können (Danner et al., 2006). Nur wenige andere adulte Stammzellen zeigen die Eigenschaft Keimzellen zu generieren (Dyce et al., 2006).

Zusätzlich zu diesen erstaunlichen Fähigkeiten zeigen adulte pankreatische Stammzellen sowohl in Primär- als auch in *OB*-Kulturen diverse Proteine, die in embryonalen Stammzellen gefunden werden (Kruse et al., 2004 und 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass adulte pankreatische Stammzellen der Ratte auch klonierbar sind. Nach den definieren Stammzellkriterien (National Institutes of Health, 2005) ist es einer Stammzelle möglich als Einzelzelle eine Kultur zu generieren. Die hier durchgeführte klonale Analyse zeigte, dass 0,5 % der ausplattierten Einzelzellen eine eigene Kultur bilden konnten. Dass also nur wenige Stammzellen in einer Zellkultur zu sein scheinen, ist stimmig mit immunzytochemischen Daten von Primärzellen, in denen der überwiegende Anteil der Zellkultur bereits in ein differenziertes Stadium übergegangen war (Kruse et al., 2004). Differenzierte Zellen können sich in der Regel nicht mehr teilen und gehen oftmals nach erstem Trypsinieren zugrunde.

Die verwendete Zellklonlinie Z29 20B11 konnte bis über 25 Passagen kultiviert werden und zeigte auf Protein- und RNA-Ebene äquivalente Eigenschaften zu den beschriebenen Primär- und *OB*-Kulturen (Kruse et al., 2004). In dieser Arbeit sollte zur weiteren Charakterisierung der pankreatischen Stammzellen aus der Zellklonkultur dreidimensionale Zellaggregate gebildet werden, die mit den primären Zellklonen auf diverse Stammzellmarker und Marker für ausdifferenzierte Zellen getestet werden sollten. Die dafür angewendete Methode der "Hängenden Tropfen" ist eine für embryonale Stammzellen etablierte (Wobus et al., 1988) und konnte problemlos auf die pankreatischen Zellklone übertragen werden.

Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen und PCR-Analysen wurden die beiden Zellpopulationen dann analysiert. Prinzipiell zeigten sich im Vergleich keine Unterschiede bezüglich des Vorhandenseins der getesteten Marker, jedoch bezüglich der Expressionsstärke. Auf eine Auszählung der Zellen wurde in dieser Untersuchung verzichtet, dennoch zeichneten sich einige deutliche Unterschiede ab, auf die im Weiteren eingegangen werden soll.

Die embryonalen Stammzellmarker SSEA-1 und alkalische Phosphatase konnten mittels Immunfluoreszenzfärbungen in Zellen nachgewiesen werden. Während Oct-4 nur in einzelnen Zellen der Färbungen positiv war, zeigte die PCR eine deutliche Genexpression. Der Antikörper Oct-4 soll nach Beschreibung des Herstellers zwar nukleär in Stammzellen zu finden sein, jedoch scheint der Transkriptionsfaktor je nach Expressionszeitpunkt auch im Zytoplasma darstellbar zu sein, wie bereits einige Arbeitsgruppen auch in embryonalen Stammzellen zeigten (Cauffman et al., 2005). Dass hier dargestellte Ergebnis, nämlich Oct-4 im Zytoplasma, ist reproduzierbar. Die dargestellten Ergebnisse für das Protein Nanog, ebenso ein Transkriptionsfaktor, sind dahingegen nicht reproduzierbar und können daher nicht weiter verwendet werden. Es gibt keine Studien darüber, dass das Protein auch zytoplasmatisch vorkommen kann.

Nestin, ein Stammzell- und Progenitormarker, konnte in beiden Analyseverfahren in den Zellen detektiert werden. Zusätzlich wurde alleine mit der PCR der Marker CD9 getestet, der mit den anderen Ergebnissen zusammen eine Evidenz für das Vorhandensein von Stammzellen in den untersuchten Kulturen gab.

Bei diesen untersuchten Markern zeigten sich wenige Unterschiede zwischen den Zellklonen und den *organoid bodies*. Da die Bildung der *OBs* die spontane Differenzierung und die Proliferation anregen soll war dies nicht anders zu erwarten. Die Stammzellen erhalten sich trotz Teilung und Spezialisierung selbst (National Institutes of Health, 2005).

Im weiteren Verlauf sollte untersucht werden, wie sich die Zellen im Bezug auf Marker der drei Keimblätter verhalten. Hierfür wurden die Zellen zunächst auf die entodermalen Marker getestet. Das, aus dem exokrinen Pankreas stammende, für die Verdauung wichtige Enzym Amylase konnte sowohl auf Protein-, als auch auf RNA-Ebene nur in den organoid bodies gefunden werden. Dies bedeutet, dass die Aggregation in den dreidimensionalen Körpern den Zellen einen unbekannten Stimulus gegeben haben muss, ähnlich wie im Organismus, in dem die Amylase-Produktion durch kohlenhydratreiches Essen stimuliert wird (Herold, 2006). Der Transkriptionsfaktor PDX-1, der die Expression der endokrinen Hormone Insulin und Glukagon des Pankreas steuert, konnte immunzytochemisch in beiden untersuchten Zellpopulationen nachgewiesen werden, jedoch konnte dieses Ergebnis anhand der PCR-Analysen nicht bestätigt werden. Da die PCR für das Hormon Glukagon anhand der embryonalen starken Bande im Elektrophorese-Gel funktionierte, muss davon ausgegangen werden, dass zu dem Zeitpunkt der Analyse tatsächlich kein Glukagon exprimiert worden war. Dies könnte zum Beispiel bedeuten, dass zwar der Transkriptionsmechanismus der Hormone zu dem Untersuchungszeitpunkt angeschaltet war, nicht aber der Translationsmechanismus. Durch eine posttranskriptionale Regulation ist es möglich, dass die Zellen nicht stimuliert waren, die Hormone zu produzieren.

Die mesodermalen Markerproteine SMA, in der glatten Muskulatur vorkommend, und Kollagen II, ein Marker für Knorpelzellen, konnten in den immunzytochemischen Daten überzeugend dargestellt werden. In der PCR wurde das Gen BMP-2 getestet und die Ergebnisse zeigten seine Expression in beiden Zellpopulationen. Somit konnte die Existenz von Zellen des mesodermalen Keimblattes nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllinien konnten nicht ausgemacht werden.

Für das ektodermale Keimblatt wurden nervenspezifische Proteine getestet. Während die immunzytochemischen Daten nur in den *organoid bodies* ein Vorhandensein des Nervenmarker NF zeigten, wurde in beiden Zellen der Gliazellmarker GFAP nicht oder nur sehr wenig gefunden. Die Gen-Nachweise jedoch zeigten eine Transkription des GFAP-Gens und erstaunlicherweise keine Expression des NF-Gens. Da mittels PCR die mittlere Kette des NF-Gens amplifiziert und in den Färbungen ein Pan-Neurofilament Antikörper verwendet wurde, lässt dies darauf schließen, dass es sich um eine unterschiedliche Genexpression der drei möglichen Ketten des NFs handeln muss (Kruse et al., 2006). Desweiteren ist bislang völlig unklar, wie die unterschiedlichen Bedingungen im Verlauf der Analysen auf die Zellen wirken. Nicht bekannt ist zum Beispiel welche Einflüsse das Aussäen der Zellen auf *Chamber Slides* besitzt und welche Rolle unterschiedliche Passagen spielen. Tatsächlich scheint es eine Evidenz dafür zu geben, dass in unterschiedlichen Passagen verschiedene Proteine transkribiert werden oder nicht.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass aus einer pluripotenten pankreatischen Stammzelllinie der Ratte Zellklone generiert werden konnten, die ebensolche Eigenschaften besitzen, wie bereits in primären pankreatischen Stammzellen dargestellt (Kruse et al., 2004 und 2006). Die aus der Zellklonlinie mittels der Methode der "Hängenden Tropfen" kultivierten *organoid bodies* zeigten gleiche Eigenschaften. Zwar gab es einige Unterschiede in Bezug auf die Expression von Proteinen, dennoch sind auch hier Proteine aller drei Keimblätter und Stammzellmarker nachweisbar. Durch die Zellaggregation konnten einige Proteine verstärkt gefunden werden, was die Methode als solche bestätigt, da mit ihr eine forcierte Differenzierung erzielt werden soll.

Für den Verlauf der weiteren Arbeit war besonders die Beobachtung wichtig, dass sich die untersuchten Zellen auch spontan in Muskelzellen differenzieren. Dies gab Anlass zu der

Arbeitshypothese, dass auch Herzmuskelzellen spontan differenzieren und dass diese Differenzierung durch verschiedene Mechanismen forciert werden könnte.

4.2 Differenzierung humaner pankreatischer Stammzellen in Kardiomyozyten mithilfe von myokardialen Biopsien

Adulte Stammzellen haben ein erhebliches Differenzierungspotential einschließlich der *in vitro* Differenzierung in Kardiomyozyten. Während bei den embryonalen Stammzellen die Differenzierung in dreidimensionalen Zellaggregaten spontan abläuft (Boheler et al., 2002), benötigen adulte Stammzellen in der Regel diverse Stimulationsmechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass humane adulte Stammzellen aus dem Fettgewebe nach Kultur mit Extrakten aus Rattenherzen einen kardiomyogenen Phänotypen bilden können (Gaustad et al., 2004). Die differenzierten Zellen zeigen neben diversen kardiomyogenen Proteinexpressionen auch spontane Kontraktionen von Einzelzellen. Humane endotheliale Progenitorzellen hingegen, isoliert aus peripherem Blut, differenzieren in Kardiomyozyten nach Kokultur mit neonatalen Ventrikelzellen aus der Ratte (Badorff et al., 2003). Während auch andere Stimulanzien wie zum Beispiel 5-Azacytidin (Xu et al., 2004) einen kardiomyogenen Phänotypen generieren können, deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass Herzzellen wichtige Stoffe für ihre eigene Differenzierung und Erhaltung sezernieren (Ancey et al., 2002).

Die Ergebnisse zu den Eigenschaften von pankreatischer Stammzellen aus der Ratte halfen bei der Planung für folgende Untersuchungen, jedoch wurde aus diversen Gründen weiter mit pankreatischen Stammzellen der Ziege b. z. w. des Menschen gearbeitet. Zurzeit gibt es kein funktioniertes Rattenmodell an der Universität, so dass spätere *in vivo*-Versuche schwierig zu verwirklichen wären. Stattdessen gäbe es die Möglichkeit in Kooperation mit der Herzchirurgie des UKSH Campus Lübeck an Ziegen *in vivo*-Versuche zu realisieren. Die Arbeit mit humanen pankreatischen Stammzellen wurde vor allem wegen eines möglichen späteren therapeutischen Einsatzes forciert.

Nachdem humane pankreatische Stammzellen auf ihre Stammzelleigenschaften untersucht wurden (Kruse et al., 2004), zeigten sie ähnliche Eigenschaften in der *in vitro* Kultur, wie

die Stammzellen der Ratte (4.1). Eine spontane Differenzierung in Zelltypen des mesodermalen Keimblattes ist ebenso möglich. Die Differenzierung in Zellen mit kardiomyogenem Phänotyp konnte hier erstmals dargestellt werden (Guldner et al., 2006). Die Tatsache, dass die Generierung von wenigen Herzzellen spontan abläuft, ist eine interessante Beobachtung beim Vergleich mit anderen adulten Stammzellen, bei denen spezifische Induktionen notwendig sind.

Im Hinblick auf die mögliche klinische Anwendung sollten Methoden entwickelt werden, die Differenzierung in Kardiomyozyten zu forcieren. Um den physiologischen Bedingungen *in vivo* gerecht zu werden, wurde die Idee der Kokultur mit Biopsien aus dem Myokard entwickelt. Im Gegensatz zu anderen Kokultur-Versuchen, in denen semipermeable Membranen verwendet wurden (Li et al., 2006), um nur einen Austausch von Molekülen zu ermöglichen, wurden hier Myokard und Stammzellen im direkten Kontakt miteinander kultiviert. Mit dieser Methode muss man sich der Diskussion stellen, ob tatsächlich Differenzierungen stattfinden oder ob es sich bei später zu detektierenden Kardiomyozyten um fusionierte Zellen handelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *in vivo* nach intramyokardialen Injektionen von Stammzellen beide Phänomene auftreten (Zhang et al., 2004). Da fusionierte Zellen den differenzierten Zellen in ihrer Funktionalität keinen Abbruch tun, war es viel wichtiger eine *in vivo* Umgebung, die der im Herzen ähnelt, zu imitieren. Zusätzlich wurde mit einer einfachen Methode eine Zellfusion fast vollständig ausgeschlossen (siehe unten).

Erste Versuche wurden mit pankreatischen Stammzellen der Ziege durchgeführt. Die Isolierung und Kultivierung konnte nach den etablierten Bedingungen für humane pankreatische Stammzellen erfolgen. Nachdem zerkleinerte Myokardstücke auf dem Boden der Zellflasche anhafteten, wurden die Stammzellen darauf gegeben und für 48 Stunden kokultiviert. Nach dem Entfernen des Gewebes wurde Immunzytochemie durchgeführt und die Zellen auf das muskelspezifische Protein sarkomerisches Myosin (MF 20) getestet. Die gleichzeitig angefertigten Kontrollfärbungen zeigten im Vergleich, dass durch den Kontakt mit dem Myokard ein positiver Stimulus auf die Differenzierung in Myozyten erfolgt war. Da das Protein Myosin im kontraktilen Apparat mit Aktin zusammen in allen Muskelzellen vorkommt (Lodish et al., 2001) kann mit diesem Ergebnis keine Aussage über die Differenzierung in Kardiomyozyten getätigt werden.

Darauf aufbauend wurden humane pankreatische Stammzellen mit humanem Myokard für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden direkt danach fixiert und immunzytochemisch analysiert. Auch hier waren deutlich mehr Stammzellen in myogene Zellen differenziert als in der Kontrolle. Zusätzlich konnte ein Gradient an differenzierten, Myosin-positiven Zellen ausgehend von der ursprünglichen Stelle des Myokards beobachtet werden. Dieser Gradient kann bedingt sein durch:

Einerseits das Auswachsen von sich schnell regenerierenden Zellen aus dem Myokard mit anschließender Zellfusion. Diese Theorie konnte jedoch ausgeschlossen werden. Dafür wurde Myokard für 48 Stunden unter denselben Bedingungen einer Kokultur aber ohne pankreatische Stammzellen inkubiert. Nach 48 Stunden waren keine herauswachsenden Zellen detektierbar.

Andererseits durch das Ausschwemmen von Sarkomeren aus dem Myokard, die sich auf den Stammzellen ablagern und falsch positive Ergebnisse erzeugen. Dafür wurden Kokulturen mit Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen unter gleichen Bedingungen angesetzt. Sie zeigten beide nach der immunzytochemischen Färbung keine positiven Zellen für das Muskelprotein.

Der Gradient könnte also ein Produkt sein von freigesetzten Faktoren, die das Myokard an die umliegenden Zellen an der Kontaktstelle abgibt (parakrine Sekretion).

Da das Protein MF 20 generell in allen Muskelzellen vorhanden ist, wurden immunzytochemische Färbungen für das kardial spezifische Protein Troponin I durchgeführt. In den Kokulturen zeigte eine deutlich gesteigerte Anzahl an Zellen eine Proteinexpression von Troponin I. Troponin I wird quantitativ im Blut bei Verdacht auf einen Myokardinfarkt bestimmt und wird von geschädigten Herzmuskelzellen freigesetzt. Nicht auszuschließen ist, dass auch hier Troponine aus der Myokardbiopsie freigesetzt werden, da Kardiomyozyten durch die Präparation beschädigt werden. Daher wurde für weitere Evidenz, dass sich Kardiomyozyten differenziert hatten, zusätzlich PCR-Analysen für Gene des kontraktilen Apparates durchgeführt, die die These einer vermehrten Differenzierung durch Kokultivierung verstärkten.

Es zeigte sich in den meisten Versuchen, dass die Targetgene Desmin und Troponin T in den kokultivierten Zellen stärker exprimiert wurden. Die densitometrische Auswertung zeigte jedoch, dass sich die verschiedenen Versuche in den prozentualen Ergebnissen sehr voneinander unterschieden. Damit war vor allem eine statistische Auswertung nicht sinnvoll, da die Standardabweichungen über den Mittelwerten gelegen hätten. Die großen Varianzen liegen wahrscheinlich darin begründet, dass für jeden Versuch unterschiedliche Zelllinien und Passagenzahlen verwendet wurden. Für eine statistische Auswertung dieser Versuche sollte man also Zelllinie und Passagenzahl beachten, die Anzahl an Versuchen erhöhen und eventuell auf eine quantitative rt-PCR zurückgreifen.

Die Expression des Gens α -Aktin konnte nur in zwei Versuchen detektiert werden. Die Expressionsstärken widersprachen sich, so dass keine Tendenz auszumachen ist. Es bleibt weiter zu testen, ob in den beiden anderen Versuchen kein α -Aktin-Gen aktiviert ist, oder ob das Gen unter diesen Bedingungen nicht detektierbar ist. Die Primer für die Gene Myosin und Troponin I konnten für die Analyse der differenzierten Zellen nicht weiter verwendet werden. Die Auswertung der PCR mittels Gel-Elektrophorese zeigte diffuse und unspezifische Banden auch nach mehrmaligem Testen und veränderten Arbeitsbedingungen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl das muskelspezifische Desmin als auch das herzmuskelspezifische Troponin T in kokultivierten Zellen tendenziell verstärkt exprimiert wird. Damit ist eine forcierte Differenzierung in Kardiomyozyten mit Hilfe der Kokultur nachgewiesen worden.

Die PCR-Analysen wurden im Durchschnitt zwei Wochen nach Kokultivierung durchgeführt, um eine ausreichende Menge an zu präparierender RNA zu erhalten. Der weniger deutliche Unterschied zwischen kokultivierten und unbehandelten Zellen könnte darin begründet sein, dass die Differenzierung in Kardiomyozyten mit der Zeit rückläufig ist. Dass differenzierte Zellen sich auch wieder *re*differenzieren können, das bedeutet in ihren ursprünglichen Zustand zurückzukehren, wurde bereits postuliert (Gardiner und Bryant, 1996). Dies würde auch erklären, warum in immunzytochemischen Färbungen fünf Wochen nach Kokultur das Protein MF 20 in den meisten kokultivierten Zellen nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Außer einer hypothetischen *Re*differenzierung ist auch möglich, dass differenzierte Zellen apoptotisch werden. Es ist bekannt, dass sich differenzierte Zellen schlecht in der Zellkultur halten und dass sie zum Beispiel durch das Passagieren mit Trypsin so stark beschädigt werden, dass sie absterben können.

Einen funktionellen Nachweis erbrachten die differenzierten Kardiomyozyten, als sie nach Änderung der Kulturbedingungen und mechanischer Stimulation spontan kontrahierten. Zwar zeigten sich in den Kontraktionen (20 Schläge/min) zwischen kokultivierten und unbehandelten Zellen im Wesentlichen keine Unterschiede, jedoch konnte beobachtet werden, dass sich in den Kokulturen deutlich größere Zellareale autonom kontrahierten. Dass auch die unbehandelten Zellen kontrahierten, ist erklärbar damit, dass pankreatische Stammzellen auch spontan in Kardiomyozyten differenzieren. Bislang konnten Kontraktionen von differenzierten Kardiomyozyten nur in Tierexperimenten gezeigt werden (Winitsky et al., 2005). Lediglich bei humanen adulten Stammzellen aus dem Fettgewebe konnte gezeigt werden, dass nach Induktion der kardiomyogenen Differenzierung wenige Kontraktionen auslösbar waren (Gaustad et al., 2003).

Die lichtmikroskopisch erkennbaren netzartigen Zellaggregate, die an myofibrillär ineinander verwebte Fasern erinnerten, schienen einen positiven Effekt auf die Kontraktionen zu besitzen, wenn diese nicht sogar von ihnen ausgingen. Die Tatsache, dass Kontraktionen in embryonalen Stammzellen vor allem in dreidimensional organisierten Zellaggregaten stattfinden (Boheler et al., 2002), unterstützt diese These.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass humane pankreatische Stammzellen das Potential besitzen, sich spontan in Kardiomyozyten zu differenzieren. Durch die Etablierung eines Kokultur-Systems mit humanem Myokardgewebe konnte man die Anzahl der sich differenzierenden Kardiomyozyten verstärken.

Die Anzahl der differenzierten Zellen nahm jedoch innerhalb von einigen Wochen ab. Um eine *Re*differenzierung im Laufe der Zeit zu verhindern, sollten die humanen pankreatischen Stammzellen *in vivo* nach Applikation einer permanenten Stimulation durch umliegendes Myokard ausgesetzt werden. Dadurch könnten pankreatische Stammzellen dauerhaft differenziert bleiben und sich funktionell in das defekte Myokardgewebe integrieren.

Da bereits intramyokardial adulte Stammzellen in defektes Myokardgewebe injiziert werden (Strauer et al., 2002 und 2005), könnte man bei gleichem Vorgang bewirken, dass sich die differenzierten humanen pankreatischen Stammzellen durch ihre Kontraktionsfähigkeit tatsächlich an der Herzarbeit beteiligen.

Für die Isolierung der pankreatischen Stammzellen wären in Zukunft bereits routinemäßig durchgeführte minimale invasive retroperitoneale Operationen von Nöten. Dieser Eingriff ist risikoträchtiger als zum Beispiel die einfache Blutabnahme für die Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen.

Würde sich aber die Theorie der versteckten Immuntoleranz von Stammzellen bestätigen, könnte man hingegen sogar universale Donorzellen einsetzen, die zum Beispiel von jungen, gesunden Menschen gewonnen werden könnten (Chiu, 2005). Eine vielversprechende Theorie, die ethisch jedoch zu diskutieren wäre.

Zu Diskutieren bleibt auch, ob die Kokultivierung erst *in vitro* durchgeführt werden sollte, bevor die differenzierten Zellen in defektes Myokard injiziert werden. Dabei muss auch bedacht werden, ob differenzierte Zellen isoliert oder in einem Zellgemisch transplantiert werden sollten. Bei einer direkten Injektion von pankreatischen Stammzellen ohne Vordifferenzierung könnte die Differenzierung eigenständig *in vivo* ablaufen.

4.2 Differenzierung humaner pankreatischer Stammzellen in Kardiomyozyten mithilfe von 5-Azacytidin

Zur Forcierung der kardiomyogenen Differenzierung pankreatischer Stammzellen wurde neben der Kokultur myokardialer Biopsien eine weitere Methode getestet werden. Die Zugabe von diversen Chemikalien kann einen positiven Stimulus auf eine bestimmte Differenzierung haben. Der Methylierungshemmer 5-Azacytidin ist sowohl in Versuchen mit embryonalen als auch mit mesenchymalen Stammzellen bereits erfolgreich eingesetzt worden. Während die embryonalen Stammzellen in dreidimensionalen Zellaggregaten mit der Chemikalie behandelt wurden (Yoon et al., 2006), zeigten mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark sowohl aus dem Menschen als auch aus der Maus eine kardiomyogene Differenzierung in Primärkulturen (Xu et al., 2004; Makino et al., 1999).

Als problematisch gestalten sich die eingesetzten Konzentrationen von 5-Azacytidin, die für die einzelnen Stammzellpopulationen unterschiedlich zu sein scheinen. Für diese Arbeit wurde eine Konzentration von 10 μ M gewählt in Anlehnung an das Protokoll für humane Zellen von Xu et al. (2004). Ferner wurden auch Behandlungsdauer und Kulturbedingungen übernommen.

Die behandelten Stammzellen zeigten in der immunzytochemischen Färbung des Muskelproteins MF 20 fast keine positiven Zellen. Unterschiede zwischen den behandelten Zellen und ihren Kontrollen konnten nicht ausgemacht werden. Die Tatsache, dass auch in den Kontrollzellen das Protein nicht detektierbar war, zeigt wie sehr verschiedene Passagen und Kultivierungsdauer die Differenzierung beeinflussen. Die unbehandelten pankreatischen Stammzellen zeigen in der Regel eine Expression des muskelspezifischen Proteins (4.2).

PCR-Analysen bestätigten die Ergebnisse der Immunzytochemie. Hier wurde noch einmal deutlich, dass pankreatische Stammzellen das Potential besitzen sich spontan in kardiomyogene/myogene Zelltypen zu differenzieren (Guldner et al., 2006). Die Expressionsstärke der mit 5-Azacytidin stimulierten Stammzellen jedoch war vermindert. Während das herzspezifische Troponin T2 in den behandelten Zellen nur gering weniger detektierbar war als in der Kontrolle, zeigte sich für das Targetgen α -Actin ein starker Abfall der Expression. Bei dem Targetgen Desmin konnte gezeigt werden, dass die Expression in den behandelten Zellen zugenommen hatte.

In der Summation muss festgestellt werden, dass die Inkubation humaner pankreatischer Stammzellen mit 5-Azacytidin keine verstärkte Differenzierung in Kardiomyozyten bewirkt. Der Einsatz der Konzentration von 10 μ M 5-Azacytidin scheint gegenteilige Effekte auf die Differenzierung zu haben. Liu et al. (2003) bestätigen diese Ergebnisse. Sie kultivierten mesenchymale Stammzellen der Ratte mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Azacytidin (3, 5 und 10 μ M), in unterschiedlichen Passagen und variierten die Inkubationslängen. Sie zeigten in allen Versuchen, dass morphologisch und funktionell keine Herzzellen entstanden waren. Sie konnten ebenfalls keine herzspezifischen Genexpressionen mittels Immunzytochemie und Western Blot Analysen detektieren (Liu et al., 2003). Es muss kritisch festgehalten werden, dass in dieser Arbeit nur mit der Konzentration von 10 μ M gearbeitet wurde. Dies war zwar in Anlehnung an die Versuche mit humanen Stammzellen gemacht worden (Xu et al., 2004), dennoch sind die Einflüsse von verschiedenen Faktoren an Stammzellen noch wenig erforscht. Weitere Versuche mit veränderten Konzentrationen und Kulturbedingungen könnten also durchaus den erwünschten Erfolg erbringen. Bei der eingesetzten Konzentration erscheint der Methylierungshemmer 5-Azacytidin eher einen toxischen denn einen stimulierenden Effekt auf humane pankreatische Stammzellen zu haben. Die toxische Eigenschaft von 5-Azacytidin konnte von Choi et al. gezeigt werden, die embryonale Karzinomzellen auf ihre Differenzierung in Kardiomyozyten überprüften und dabei unterschiedliche Konzentrationen einsetzten (Choi et al., 2004). Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass ab einer eingesetzten Konzentration von 5 μ M die Zellen nekrotisch werden. Trotz der Verwendung von humanen adulten Stammzellen und einer 5-Azacytidin-Konzentration von 10 μ M, könnte dies eine Begründung dafür sein, dass sogar weniger Zellen als in der Kontrolle in den Analysen zu finden waren. Theoretisch könnte also das 5-Azacytidin zu einer zu starken Hypomethylierung der DNA geführt haben, die dann eine Differenzierung in Kardiomyozyten unterbunden hat. Es bleibt festzuhalten, dass weitere Versuchsansätze notwendig sind um klar formulieren zu können, ob 5-Azacytidin einen stimulierenden Effekt auf die kardiomyogene Differenzierung von humanen pankreatischen Stammzellen besitzt.

6. Literaturverzeichnis

A American Heart Association, Heart Disease and Stroke Statistics-2005 Update, Dallas, Texas, American Heart Association 2005

Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, Itskovitz-Eldor J.: *Human feeder layers for human embryonic stem cells*. Biol Reprod 68(6):2150-6 (2003)

Ancey C, Corbi P, Froger J, Delwail A, Wijdenes J, Gascan H, Potreau D, Lecron JC: *Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture*. Cytokine 18(4):199-205 (2002)

Apte M V, Haber P S, Applegate T L, Norton I D, McCaughan G W, Korsten M A, Pirola R C, Wilson J S: *Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture.* Gut 43(1):128-33 (1998)

B Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R,
Zeiher AM, Dimmeler S: *Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes*. Circulation 107(7):1024-32 (2003)

Becker M: *Die Selbstzerstörung des Klon-Helden, Skandal um Hwang.* SPIEGEL ONLINE,23. Dezember 2005, 18:33 http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518,392166,00.html

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P.: *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell 114(6):763-76 (2003)

Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM.: Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. Circ Res 91(3):189-201 (2002) Bonner-Weir S, Sharma A.: Pancreatic stem cells. J Pathol 197(4):519-26 (2002)

C Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A: Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development.
Mol. Hum. Repr 11(3): 173-181 (2005)

Chiu, R: "Stealth Immune Tolerance" in Stem Cell Transplantation: Potential for "Universal Donors" in Myocardial Regenerative Therapy. J Heart Lung Transplant 24:511-516 (2005)

Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N. : *Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny*. Stem Cells 22(6):1070-84 (2004)

Choi SC, Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim DS: 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. Exp Mol Med 36(6):515-23 (2004)

D Danner S, Kajahn J, Geismann C, Klink E, Kruse C: *Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line*. Mol Hum Reprod 13(1):11-20 (2007)

Dawn B, Bolli R: Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. Basic Res Cardiol 100(6):494-503 (2005)

Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD: Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. J Clin Invest 115(3):572-83 (2005)

Dyce PW, Wen L, Li J: *In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin.* Nat Cell Biol 8(4): 384-90 (2006)

E Eisenberg LM, Eisenberg CA: *Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation.* Birth Defects Res C Embryo Today 69(3):209-18 (2003)

- F Fortunel NO, Otu HH, NG HH, Chen J, Mu X, Chevassut T, Li X, Joseph M, Bailey C, Hatzfeld JA, Hatzfeld A, Usta F, Vega VB, long PM, Libermann TA, Lim B: Comment on "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". Science 302(5644):393 (2003)
- **G** Gardiner DM, Bryant SV: *Molecular mechanisms in the control of limb regeneration: the role of homeobox genes.* Int J Dev Biol 40(4):797-805 (1996)

Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P: *Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes*. Biochem Biophys Res Commun 314(2):420-7 (2004)

Grosfils K, Mètioui M, Tiouli M, Dehaye JP: *Isolation of rat pancreatic acini with crude collagenase and permeabilization of these acini with streptolysin O*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 79(1), 99-115 (1993)

Guldner NW, Kajahn J, Klinger M, Sievers HH, Kruse C: Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation from Human Pancreatic Stem Cells Enhanced in Cocultures with Human Myocardial Biopsies. Int J Artif Organs 29(12):1158-66 (2006)

H Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S: Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. Circulation 105(3):380-6 (2002)

Hass PE, Wada HG, Herman MM, Sussman HH.: Alkaline phosphatase of mouse teratoma stem cells: immunochemical and structural evidence for its identity as a somatic gene product. Proc Natl Acad Sci U S A 76(3):1164-8 (1979)

He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ.: *Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization.* Circ Res 93(1):32-9 (2003)

Heike T, Nakahata T: *Stem cell plasticity in the hematopoietic system*. Int J Hematol 79(1):7-14 (2004)

Herold, G und Mitarbeiter: Innere Medizin, eine vorlesungsorientierte Darstellung, 2006. 175- 224, Gerd Herold, Köln, 2006

Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, Bock M, Balana B, Zahanich I, Christ T, Boxberger S, Wettwer E, Ravens U: *Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells*. J Physiol 554(Pt 3):659-72 (2004)

Holland AM, Gonez LJ, Harrison LC.: *Progenitor cells in the adult pancreas*. Diabetes Metab Res Rev 20(1):13-27 (2004)

Hotchkiss RD: the quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. J. Biol. Chem. 175:315-32 (1948)

Hwang WS, Roh SI, Lee BC, Kang SK, Kwon DK, Kim S, Kim SJ, Park SW, Kwon HS, Lee CK, Lee JB, Kim JM, Ahn C, Paek SH, Chang SS, Koo JJ, Yoon HS, Hwang JH, Hwang YY, Park YS, Oh SK, Kim HS, Park JH, Moon SY, Schatten G.: *Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts*. Science 308(5729):1777-83 (2005)

- I Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore JA, Lemischka IR: *A stem cell molecular signature*. Science 298(5593):601-4 (2002)
- J Jaster R, Sparmann, Emmrich J, Liebe S: *Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells*. Gut 51(4):579-84 (2002)

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature 418(6893):41-9 (2002)

Jones PA, Laird PW: Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet 21(2):163-7 (1999)

K Kakudo N, Shimotsuma A, Kusumoto K: *Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells.* Biochem Biophys Res Commun 359(2):239-44 (2007)

Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T.: *CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells.* Biol Reprod 70(1):70-5 (2004)

Klug M G, Soonpaa M, Koh G Y, Field L: *Genetically Selected Cardiomyocytes* from Differentiating Embryonic Stem Cells Form Stable Intracardiac Grafts. J. Clin. Invest. 98(1): 216-224 (1996)

Kruse C., Birth M., Rohwedel J., Assmuth K., Goepel A., Wedel T.: *Pluripotency* of Adult Stem Cells Derived from Human and Rat Pancreas. Appl Phys A 79:1617 -1624 (2004)

Kruse C, Bodo E, Petschnik AE, Danner S, Tiede S, Paus R: *Towards the development of a pragmatic technique for isolating and differentiating nestin- positive cells from human scalp skin into neuronal and glial cell populations: generating neurons from human skin?* Exp Dermatol 15(10):794-800 (2006)

Kruse C, Kajahn J, Petschnik A, Maaß A, Klink E, Rapoport D, Wedel T: Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. Annals of Anatomy 188(6):503-517 (2006)

L Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman I, Grompe M: *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes* in vivo. Nature Medicine 6:1229-1234 (2000)

Li X, Yu X, Lin Q, Deng C, Shan Z, Yang M, Lin S: *Bone marrow mesenchymal* stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. J Mol Cell Cardiol 42(2):295-303 (2006)

Liu Y, Song J, Liu W, Wan Y, Chen X, Hu C: Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? Cardiovasc Res 58(2):460-8 (2003)

Lodish H, Berk A, Zipursky S.L., Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J.E.: *Molekulare Zellbiologie*. 832-847, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 2001

Lyngbaek S, Schneider M, Hansen JL, Sheikh SP: *Cardiac regeneration by resident stem and progenitor cells in the adult heart*. Basic Res Cardiol 102(2):101-14 (2007)

M Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S.: *Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro*. J Clin Invest 103(5):697-705 (1999)

Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H, Komuro I: *Adult cardiac Sca-1positive cells differentiate into beating cardiomyocytes*. J Biol Chem 279(12):11384-91 (2004)

McMullen NM, Pasumarthi KB: Donor cell transplantation for myocardial disease: does it complement current pharmacological therapies? Can J Physiol Pharmacol 85(1):1-15 (2007)
Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H: *Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction*. Nat Med 12(4):459-65 (2006)

Monk M, Boubelik M, Lehnert S: *Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development*. Development 99(3):371-82 (1987)

Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW: Culture Characteristics of four permanent lines of human cancer cells. Cancer Res 15, 598-602 (1955)

Moore KA, Lemischka IR: *Stem cells and their niches*. Science 311(5769):1880-5 (2006)

- N National Institute of Health, Stem Cell Information. http://stemcells.nih.gov/info/basics, Zugriff im Aug 2005
- **O** Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P.: *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.* Proc Natl Acad Sci U S A 98(18):10344-9 (2001)
- P Palmieri SL, Peter W, Hess H, Scholer HR.: Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. Dev Biol 166(1):259-67 (1994)
- Q Quesenberry PJ, Abedi M, Aliotta J, Colvin G, Demers D, Dooner M, Greer D, Hebert H, Menon MK, Pimentel J, Paggioli D: *Stem cell plasticity: an overview*. Blood Cells Mol Dis 32(1):1-4 (2004)

R Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA: "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science 298(5593):597-600 (2002)

Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK: *Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes*. Ann Thorac Surg 75(3):775-9 (2003)

Reik W, Dean W, Walter J.: *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. Science 293(5532):1089-93 (2001)

Rohwedel J, Guan K, Wobus AM.: *Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro*. Cells Tissues Organs 165:190-202 (1999)

Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbutt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM.: *Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol.* Diabetes 50(4):710-9 (2001)

S Schiebler TH, Schmidt W: Anatomie. 8. Auflage. 576-580, Springer-Verlag, Berlin, 2002

Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbutt G, van der Kooy D.: *Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages*. Nat Biotechnol 22(9):1115-24 (2004)

Seeberger KL, Dufour JM, Shapiro AM, Lakey JR, Rajotte RV, Korbutt GS.: *Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium*. Lab Invest 86(2):141-53 (2006)

Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B.: *Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-* stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, doubleblind, placebo-controlled study. Circulation 104(17):2012-7 (2001)

Singal R, Ginder GD: DNA methylation. Blood 93(12):4059-70 (1999)

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kogler G, Wernet P, Muller HW, Kostering M.: *Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study.* J Am Coll Cardiol 46(9):1651-8 (2005)

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P.: *Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans*. Circulation 106(15):1913-8 (2002)

- T Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.: *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science 282(5391):1145-7 (1998)
- U Ulloa-Montoya F, Verfaillie C, Hu W : *Culture Systems for Pluripotent Stem Cells*.J Biosci Bioeng 100(1):12-27 (2005)
- W Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM.: Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? Cell Mol Life Sci 61(19-20):2510-22 (2004)

Winitsky SO, Gopal TV, Hassanzadeh S, Takahashi H, Gryder D, Rogawski MA, Takeda K, Yu ZX, Xu YH, Epstein ND: *Adult murine skeletal muscle contains cells that can differentiate into beating cardiomyocytes in vitro*. PLoS Biol 3(4):e87 (2005)

Wobus AM, Grosse R, Schoneich J: Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells in vitro. Biomed Biochim Acta 47(12):965-73 (1988).

- X Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y.: *Mesenchymal* stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp Biol Med (Maywood) 229(7):623-31 (2004)
- Y Yoon BS, Yoo SJ, Lee JE, You S, Lee HT, Yoon HS: Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. Differentiation 74(4):149-59 (2006)

Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW: *Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction.* J Clin Invest 115(2):326-38 (2005)

Young HE: Existence of reserve quiescent stem cells in adults, from amphibians to humans. Curr Top Microbiol Immunol 280:71-109 (2004)

Yuan S, Rosenberg L, Paraskevas S, Agapitos D, Duguid WP.: *Transdifferentiation of human islets to pancreatic ductal cells in collagen matrix culture*. Differentiation 61(1):67-75 (1996)

Z Zhang S, Wang D, Estrov Z, Raj S, Willerson JT, Yeh ET: *Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo.* Circulation 110(25):3803-7 (2004)

Zimmermann A, Gloor B, Kappeler A, Uhl W, Friess H, Buchler MW.: *Pancreatic* stellate cells contribute to regeneration early after acute necrotising pancreatitis in humans. Gut 51(4):574-8 (2002)

Danksagung

Als ich im April 2004 in den Medien von der adulten Stammzellforschung an der Universität zu Lübeck hörte, war ich sofort fasziniert von der Idee in diesem Bereich meine Dissertation zu schreiben. Damals noch im 4. Semester stellte ich mich dem Meeresbiologen Prof. Dr. Charli Kruse vor und erzählte ihm von meinen Wünschen. Er erbat sich für eine Doktorarbeit ein beurlaubtes Semester und ich wollte dies erst im klinischen Abschnitt meines Studiums. Eineinhalb Jahre später durfte ich dann für 8 Monate in seiner Arbeitsgruppe mitarbeiten und meine Dissertation schreiben.

Ich möchte mich bei meinem Doktorpapa bedanken für das Warten, sein Angebot, sein Verständnis und seine Geduld. Ferner dafür, dass er mir wissenschaftliche Freiräume gewährt hat, dass er mir die Möglichkeiten der Weiterbildung und der Präsentation meiner Ergebnisse gegeben hat und dass er immer sowohl beruflich als auch privat für mich da ist.

Ich danke Professor Dr. Günther Fuhr vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik für die Bereitstellung seiner Arbeitsräume, der Laborgeräte und Materialien im Multifunktionszentrum des Innovationscampus an der Universität zu Lübeck.

Ich danke Professor Dr. Norbert Guldner von der Herzchirurgie der Universität zu Lübeck für die Zusammenarbeit im Herzzellprojekt, für seinen Enthusiasmus und die Motivation, die er mir dadurch gegeben hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Britta Keeding und Elisabeth Theißing, die mir bei der Beschaffung des Myokardgewebes und der Immunzytochemie von Troponin I halfen.

Emel Klink verdient einen besonderen Dank für die Hilfe beim Kultivieren und Analysieren der Zellen und für die vielen fachlichen Anregungen und Lösungen bei aufgetretenen Problemen. Außerdem danke ich ihr für die zahlreichen persönlichen Gespräche zu jeder Zeit und für die wundervolle Freundschaft, die daraus entstanden ist.

Ich danke Dr. Sandra Danner für das Durchsehen und Korrigieren dieser Dissertation, für das Begleiten bei "beruflichen" und privaten Reisen und für den Gedankenaustausch fachlicher und persönlicher, freundschaftlicher Natur.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Daniel Rappoport, der sich erst spät aber intensiv mit meiner Arbeit und meinen elektronischen Geräten auseinander gesetzt hat.

Danken möchte ich allen anderen, die mich in der Zeit meiner Laborarbeit in der Arbeitsgruppe "Zelldifferenzierung und Zelltechnologie" des Fraunhofer IBMT in Lübeck begleitet haben: Sabine Folchert, Claudia Geismann, Anna Petschnik und Philipp Ciba.

Ich möchte mich bei meinen Großeltern, Maria und Willy Schermuly, für ihre Unterstützung bedanken.

Ich danke meinem Bruder Daniel Kajahn für die konstruktive Kritik an dieser Dissertation, für die regelmäßigen medizinischen Gespräche und die geschwisterliche Liebe.

Ich danke meinen Eltern, Beate und Bruno Kajahn, für ...ALLES!

Curriculum Vitae

Persönliche Daten			
Vor- und Zuname		Jennifer Kajahn	
Anschrift		An der Mauer 120	
		23552 Lübeck	
Telefon		0451-5823245	
Geburtsdatum		05. 01. 1983	
Geburtsort		Köln	
Familienstand		ledig	
Familie	Vater	Bruno Kajahn	
		Praktischer Arzt	
	Mutter	Beate Kajahn	
		Medizinisch-Technische Assistentin	
	Bruder	Daniel Kajahn	
		Medizinstudent an der Universität Wien	
<u>Schulausbildung</u>			
06.1989- 06.1993	Grundschule Marienberghausen, NRW		
06.1993- 06.1999	Gymnasium Nümbrecht , NRW		
07.1999- 01.2000	Richfield I	Richfield Highschool, Minneapolis, MN, USA	
01.2000- 06.2002	Gymnasium Nümbrecht, NRW		
	abgeschlossen mit der Allgemeinen Deutschen		
	Hochschulreife		
Hochschulstudium			
10.2002-08.2004	vorkliniscl	her Abschnitt des Studiums der	
	Humanme	dizin an der Universität zu Lübeck. SH	
08 2004	1 Abschnitt der ärztlichen Staatsprüfung		
10 2004- 05 2009	klinischer Abschnitt des Studiums der		
10.2004- 03.2007	Humanmedizin an der Universität zu Lübeck SU		
05 2000	2 Abash	sitt der ärztlichen Staatonröfung	
05.2009	2. Adscrinte der arztinchen Staatsprutung		
	- Approbation als Arztin -		

Berufliche Weiterbildung		
02.2005- 03.2005	Famulatur an der Universität zu Lübeck	
	im Bereich Herzchirurgie	
04.2006-12.2007	Studentische Hilfskraft am Fraunhofer	
	Institut für Biomedizinische Technik in der	
	Arbeitsgruppe "Zelldifferenzierung und Zell-	
	Technologie", Lübeck	
09.2006	Famulatur in der Azienda Sanitaria di Merano, I	
	im Bereich Dermatologie	
03.2007	Famulatur am Allgemeinen Krankenhaus (AKH)	
	in Wien, A	
	im Bereich Infektiologie und Tropenmedizin	
10.2007	Famulatur im Krankenhaus Lainz in Wien, A	
	im Bereich Herzchirurgie	
01.2008- 04.2008	Studentische Hilfskraft an der Fraunhofer	
	Einrichtung für Marine Biotechnologie, AG	
	Zelltechnologie, Lübeck	
02.2008- 06.2008	1. Tertial des Praktischen Jahres in der	
	Herzchirurgie am UKSH Campus Lübeck	
06.2008- 10.2008	2. Tertial des PJ in der orthopädischen Chirurgie	
	am Inselspital Bern, Schweiz	
10.2008- 01.2009	3. Tertial des PJ in der Medizinischen Klinik des	
	Leibniz Forschungszentrum Borstel, SH	
06.2009	mündliche Verteidigung der Doktorarbeit und	
	Anerkennung zum "Dr. med.	

wissenschaftliche Präsentationen

09.2005-03.2006

Beginn und experimentelle Untersuchungen der vorliegenden Dissertation am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in der Arbeitsgruppe "Zelldifferenzierung und Zelltechnologie", Lübeck

03.2006	Teilnahme am CellPROM- Meeting in Paris, Frankreich, mit dem Vortrag "Targeted differentiation of pancreatic stem cells into
05.2006	<i>cardiomyocytes"</i> Teilnahme an der internationalen Konferenz "Strategies in Tissue Engineering" in Würzburg mit den Postern <i>"Human cardiomyogenic cells</i>
	generated from adult human pancreatic stem cells" und "Pancreatic stem cells formed multi- cellular taratoma like structures in vitro"
10.2006	Teilnahme am Fraunhofer Life Science Symposium 2006 in Leipzig mit dem Poster
	"Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line"
11.2006	Teilnahme am 1. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung in Köln mit der Vorstellung der Arbeit <i>"Isolated cells from</i>
	human skin show features of stem/progenitor cells"
09.2007	Teilnahme an der Spetses Summer School in Griechenland mit der Vorstellung eines Posters mit dem Titel <i>"Human pancreatic stem cells</i> <i>cultured on biodegradable meshes may serve as a</i>
	myocardial patch for regeneration of infarcted tissue"
09.2007	Teilnahme am CellPROM- Meeting in Lübeck mit dem Vortrag " <i>Pancreatic stem cell</i> <i>differentiation- state of the art</i> "
10.2007	Teilnahme am Fraunhofer Life Science Symposium 2007 in Leipzig mit dem Poster "Human pancreatic stem cells cultured on biodegradable meshes may serve as a myocardial patch for regeneration of infarcted tissue"

Veröffentlichte Kurzdarstellungen

Kajahn J, Ciba P, Klinger M, Kruse C, Guldner NW: *Human cardiomyogenic cells generated from adult human pancreatic stem cells*. Cytotherapy8(2006), 50-51, Taylor and Francis

Kruse C, Klink E, Kajahn J, Wedel T, Danner S: *Pancreatic stem cells form multicellular teratoma-like structures in vitro*. Cytotherapy 8(2006), 50, Taylor and Francis

Guldner NW, Kajahn J, Klinger M, Sievers HH, Kruse C: Autonomously contracting human cardiomyocytes generated from adult human pancreatic stem cells. Int J Artif Organs 20(2006)5,508

Tiede S, Kajahn J, Danner S, Kruse C, Paus R, Zechel C: *Human dermis-derived cells show features of pluripotent adult stem cells.* J Invest Dermatol 127 (2007)388

Publikationen

Kruse C, Kajahn J, Petschnik A, Maaß A, Klink E, Rapoport D, Wedel T: *Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures*. Annals of Anatomy 188 (6):503-517 (2006)

Guldner NW, Kajahn J, Klinger M, Sievers HH, Kruse C: Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation from Human Pancreatic Stem Cells Enhanced in Cocultures with Human Myocardial Biopsies. Int J Artif Organs 29(12):1158-66 (2006)

Danner S, Kajahn J, Geismann C, Klink E, Kruse C: *Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line*. Mol Hum Reprod 13(1):11-20 (2007)

Danner S, Kajahn J, Kruse C: *Glanduläre Stammzellen- eine neue Quelle für Zellersatz-Therapien?* Z Reg Med1(2007), 28-31, Thieme

Kajahn J, Gorjup E, Tiede S, Briesen H, Paus R, Kruse C, Danner S: *Skin-derived human* adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. Eur J Cell Biol 87(1):39-46 (2008)

Guldner NW, Klapproth P, Schwarz PO, hardel T, Rumpf PM, Kajahn J, Margaritoff P, Sievers HH, Grossherr M: Bio-technologies for a glandular stem cell cardiomyopexy. Ann Anat 191(1):45-50 (2009)

Maass A*, Kajahn J*, Guerleyik E, Guldner NW, Rapoport D, Kruse C: Towards a pragmatic strategy for regenerating infracted myocardium with glandular stem cells. Ann Anat 191(1):51-61 (2009) *Erstautoren

Patent

Mitanmeldung eines Patentes mit dem Titel: "Verfahren zur Herstellung autonom kontrahierender Herzmuskelzellen aus adulten Stammzellen, insbesondere humanen adulten Stammzellen" (Deutsche Patentanmeldung: 10 2006 003 996.3)

Hiermit versichere ich die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt zu haben.

23. Juli 2007

Jennifer Kajahn