

Bronchoalveoläre Spezifizierung von pluripotenten Stammzellen: Der Effekt von Dexamethason, cAMP- erhöhenden Substanzen und Keratinozytenwachstumsfaktor

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr.rer.nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Katherina-Elpida Katsirntaki
geboren am 22.10.1982 in Hannover

2013

Referent: Prof. Dr. Ulrich Martin

Korreferent: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo

Tag der Promotion: 14.05.2013

*„Es hat alles einen Sinn im Leben,
nichts ist umsonst!“*

Zusammenfassung

Erkrankungen des respiratorischen Systems zählen zu den führenden Todesursachen weltweit. Das Lungenepithel ist in der gesunden Lunge in der Lage geschädigtes Epithel über die eigene Zellregeneration, die über Vorläuferzellen und Stammzellen stattfinden, eigenständig zu reparieren. Ist die Eigenregenerierung des Lungenepithels insuffizient oder gestört, führt das zu einem erkrankten Gewebe, das oft mit dem Verlust von Zellgewebe einhergeht. Solche Erkrankungen können genetisch oder degenerativ bedingt sein. Im schlimmsten Fall kann der Verlust von Zellgewebe zu einem Organversagen führen. Ist dieser eingetreten, kann nur über eine Transplantation eines Spenderorgans Leben gerettet werden. Allerdings stellt der limitierende Faktor an Spenderorganen ein großes Problem dar. Desweiteren bringen Transplantationen immunologisch nicht kompatibler allogener Organe viele Komplikationen mit sich.

Mit Hilfe einer Zellersatztherapie besteht die Möglichkeit zugrundegegangenes und geschädigtes Gewebe zu ersetzen. Die Fähigkeit zur Generierung von Vorläuferzellen oder Zellen des respiratorischen Epithels *in vitro* ermöglichen der regenerativen Medizin neue therapeutische Behandlungsmethoden für Lungenerkrankungen, die beispielsweise mit einer cystischen Fibrose (Mukoviszidose, CF) einhergehen.

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) bieten sich als mögliche Zellquelle für die regenerative Medizin und zur Untersuchung bestimmter Wirkstoffe an, da sie eine unbegrenzte Kapazität zur Selbsterneuerung und ein hohes Differenzierungspotenzial in allen drei Keimblättern besitzen. Die Verwendung von humanen (h)ES-Zellen in der Forschung und Medizin wird allerdings als ethisch kontrovers angesehen. Zudem ist die Herstellung autologer hES-Zellen nicht möglich, so dass für die klinische Anwendung ähnliche Probleme wie bei der Transplantation allogener Organen auftreten. Mit der Generierung und dem Einsatz patienteneigener induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen) kann das Problem der immunologisch inkompatiblen Zellquellen umgangen werden. Zudem besteht die Möglichkeit als Disease Modeling degenerative Erkrankungen zu untersuchen und zu verstehen. Wegen ihres ähnlichen Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotentials zu ES-Zellen bieten sich iPS-Zellen als mögliche Alternative an.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Bildung von definitiven Endoderm (DE) in Differenzierungen muriner (m)ES-Zellen optimiert und auf miPS-Zellen übertragen, die eine Clara-Zell-spezifische tetrazyklinregulierende LacZ/GFP Repotergenexpression trugen. Für die Optimierung des DE wurde eine doppeltransgene mES-Zelllinie verwendet, die unter dem Brachyury-Promotor eGFP und unter dem Foxa2-Promotor eine verkürzte Version des humanen Oberflächenmarkers CD4 exprimiert. Über Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenzfärbung und quantitativer Real Time (qRT)-PCR konnten die Endoderm spezifischen Marker Foxa2 und Sox17 detektiert werden. Desweiteren wurden spezifische Schlüsselfaktoren für die Differenzierung von mES- und miPS-Zellen in Atemwegsepithelzellen (insbesondere Clara-Zellen) identifiziert. TEM Untersuchungen der miPS-Klone konnten einen Clara-Zell-spezifischen Phänotyp in miPS-abgeleiteten LacZ-exprimierenden Zellen nachweisen.

murine ES-Zellen und iPS-Zellen; Differenzierung; Clara-Zellen

Abstract

Respiratory diseases are one of the leading causes of human death. Lung epithelium of the healthy organ possesses an ability to repair damaged tissue through the own cell regeneration due to progenitor and stem cells, independently. Insufficient or disrupted regeneration of the lung lining leads to a diseased tissue that is often associated with a loss of tissue or even leading to organ failure. A lung substitute is needed to overcome changes incurred as a result of this failure, independent if congenital or acquired. However, the insufficient number of available donor organs, represent a major problem. Furthermore, transplantation of immunologically incompatible allogenic organs leads to lot of complications.

With help of a cell replacement therapy, it could be possible to replace already damaged tissues. Using the skills of regenerative medicine it is possible to generate progenitor cells or even cells of the respiratory epithelium *in vitro*. This presents a new therapeutic option of treating lung diseases as for example cystic fibrosis (CF).

Embryonic stem cells (ESCs) present a potential source of cells for regenerative medicine and for analyzing of several argents. They have an unlimited capacity for self-renewal but also a high potential for differentiation into cells of all three germ layers. However, the use of human (h)ESCs in research and medicine is considered as ethically controversial. Moreover, the production of autologous ESCs is impossible leading to the same problem of their clinical appliance as using an allogenic transplant. With the generation and use of patient's own induced pluripotent stem cells (iPSCs), problems associated with utilization of immunologically incompatible cell sources can be avoided. Furthermore, iPSCs have opened new avenues for understanding and treating degenerative diseases as disease modeling. Because of their similar self-renewal and differentiation potential to ESCs, iPSCs offer a new therapeutic option.

In this study generation of definitive endoderm (DE) differentiation in murine (m) ESCs has been optimized and transferred for miPSCs, which carried a Clara cell-specific tetracyclin depended LacZ / GFP reporter expression. For the optimization of the DE differentiation a double transgenic mES cell line was used. This cell line expresses under the Brachyury promoter eGFP and under the Foxa2 promoter an truncated version of the human CD4 surface marker . Using flow cytometry, immunofluorescence staining and quantitative real time (qRT)-PCR, endoderm specific markers Foxa2 and Sox17 were detected. Furthermore, specific key factors for the differentiation of mESCs and miPSCs into airway epithelial cells (especially Clara cells) were identified. TEM investigations of the miPSC clones could prove a Clara cell-specific phenotype in miPS-derived LacZ-expressing cells.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Atmungssystem des Menschen	1
1.2.	Entwicklung des Atmungssystems	3
1.2.1.	Die Entwicklung des definitiven Endoderms und dessen Spezifizierung zum primitiven Vorderdarm und der Lunge	3
1.2.2.	Entwicklung der menschlichen Lunge	6
1.2.2.1.	Wichtige Schlüsselfaktoren für die Lungenentwicklung/ Lungenregeneration	7
1.2.2.1.1.	Keratinozytenwachstumsfaktor	7
1.2.2.1.2.	Glukokortikoide	8
1.2.2.1.3.	cAMP-erhöhende Substanzen	9
1.3.	Erkrankungen des Atmungssystems	10
1.4.	Die regenerative Medizin	11
1.5.	Stammzellen: eine mögliche Zellquelle für die regenerative Medizin	12
1.5.1.	Adulte Stammzellen	12
1.5.2.	Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)	13
1.5.3.	Induzierte pluripotente Stammzellen	14
1.6.	Differenzierung von pluripotenten Stammzellen (PS-Zellen) in respiratorische Zellen	16
1.6.1.	Die Differenzierung von PS-Zellen in definitives Endoderm	17
1.6.2.	Die Differenzierung von PS-Zellen in anteriores Vorderdarmendoderm	18
1.6.3.	Die respiratorische Differenzierung von PS-Zellen	18
1.6.4.	Allgemeine Schwierigkeiten bei der Differenzierung von PS-Zellen, insbesondere in respiratorische Zellen	22
1.7.	Zielsetzung	23
2.	Material und Methoden	25
2.1.	Material	25
2.1.1.	Geräte	25
2.1.2.	Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3.	Chemikalien und Reagenzien	27
2.1.4.	Lösungen und Puffer	29
2.1.5.	Gebrauchsfertige Kits	30
2.1.6.	Molekulargewichtsmarker	30
2.1.7.	Oligonukleotide	30

2.1.8. Antikörper _____	31
2.1.8.1. Primärantikörper für Immunfluoreszenzens _____	31
2.1.8.2. Isotypkontrollen für Immunfluoreszenzens _____	32
2.1.8.3. Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzens _____	32
2.1.8.4. Primärantikörper für Durchflusszytometrie (FACS) _____	32
2.1.8.5. Isotypkontrollen für FACS _____	32
2.1.9. Medien _____	33
2.1.9.1. Basalmedien _____	33
2.1.9.2. Kulturmedium für murine embryonale Fibroblasten (Fibroblastenmedium) _____	33
2.1.9.3. Kulturmedium für murine embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen _____	33
2.1.9.4. Einfriemedium für murine embryonale Fibroblasten _____	33
2.1.9.5. Einfriemedium für murine embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen _____	34
2.1.9.6. Serumhaltiges Differenzierungsmedium (IMDM) für Embryoid Bodies (EBs) _____	34
2.1.9.7. Serumfreies Differenzierungsmedium (RPMI) für Monolayer (ML) _____	34
2.2. Methoden _____	35
2.2.1. Methoden zu Zellkultivierung _____	35
2.2.1.1. Zellzahlbestimmung _____	35
2.2.1.2. Beschichtung von Zellkulturgefäßen _____	36
2.2.1.3. Isolierung muriner embryonaler Fibroblasten _____	37
2.2.1.4. Auftauen, Kultivieren, Inaktivieren und Einfrieren von MEFs _____	38
2.2.1.5. Kultivierung von mES- und miPS-Zellen _____	39
2.2.1.5.1. Das Auftauen, Passagieren und Einfrieren von pluripotenten murinen Zellen _____	39
2.2.1.6. Die Differenzierung von mES- und miPS-Zellen _____	40
2.2.1.6.1. Die FB-frei Kultivierung von mES- und miPS-Zellen _____	40
2.2.1.6.2. Die EB-basierte Differenzierung von mES- und miPS-Zellen _____	40
2.2.1.6.3. Die ML-basierte Differenzierung von mES- und miPS-Zellen _____	41
2.2.1.7. Herstellung der miPS-Klone aus der CCSP-rtTA2 ^s -M2/ GFP-tetO ₇ -lacZ doppel-transgenen Maus _____	42
2.2.2. Methoden zur Zellcharakterisierung _____	43

2.2.2.1.	Immunfluoreszenzfärbung _____	43
2.2.2.2.	Färbung von β -Galaktosidaseaktivität mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal-Färbung) _____	43
2.2.2.3.	Färbung von β -Galaktosidaseaktivität mit ImaGene Green™ C ₁₂ FDG lacZ Gene Expression Kit _____	44
2.2.2.4.	Transmissionselektronmikroskopie (TEM) _____	44
2.2.2.5.	Durchflusszytometrie (FACS) _____	45
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden _____	45
2.2.3.1.	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese _____	45
2.2.3.2.	Polymerase Kettenreaktion (PCR) _____	46
2.2.3.3.	Agarosegelelektrophorese _____	47
2.2.3.4.	Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) _____	48
2.2.4.	Statistische Analyse _____	49
3.	Ergebnisse _____	50
3.1.	Charakterisierung der miPS-Klone C1L9 und C1L17 _____	50
3.1.1.	Vergleichbare Morphologie der undifferenzierten miPS-Klone mit einer gut charakterisierten mES-Zelllinie _____	50
3.1.2.	Nachweis der Pluripotenz _____	51
3.2.	Die Differenzierung von mES- und miPS-Zellen zu definitivem Endoderm _____	53
3.2.1.	Verstärkte endodermale Differenzierung in ML- versus EB-Kulturen von mES-Zellen _____	53
3.2.2.	Optimierte endodermale Differenzierung in ML-Kulturen von mES-Zellen unter Verwendung von serumfreien Bedingungen _____	54
3.2.3.	Vergleichbare Bildung von definitivem Endoderm in ML-Kulturen von mES- und miPS-Zellen _____	56
3.3.	DCI induziert die Expression des Clara-Zell Markers CCSP in Differenzierungskulturen von mES- und miPS-Zellen _____	60
3.3.1.	Kinetische Studien bestätigen den induzierenden Effekt von DCI auf die CCSP Expression in Differenzierungskulturen von mES- und miPS-Zellen _____	63
3.4.	Synergistischer Effekt von DCI und KGF auf die Expression von AII-Zell Markern in mES- und miPS-Zell Differenzierungskulturen _____	64
3.4.1.	Austestung des optimalen KGF Applikationsintervalls bezüglich der AII-Zelldifferenzierung im ML _____	65

3.4.2. Die Applikation von KGF in der frühen Phase der Differenzierung hat keinen Einfluss auf die endodermale Differenzierung der mES-Zelllinie BryFoxa2 _____	66
3.5. Clara-Zellreporter miPS-Klone differenzieren in Zellen mit einer CCSP Promotor-abhängigen LacZ Expression _____	67
3.6. Der zeitliche Verlauf der transgenen GFP Expression in Differenzierungskulturen der CCSP Reporter miPS-Klone stimmt nicht mit der Expression von LacZ überein _____	70
3.7. Die transmissionselektronmikroskopische (TEM) Analyse bestätigt das Vorkommen von Clara-Zellen in den LacZ ^{pos} Bereichen _____	71
4. Diskussion _____	73
4.1. Charakterisierung der miPS Klone C1L9 und C1L17 _____	73
4.2. Die Feeder-freie Kultivierung undifferenzierter PS-Zellen _____	74
4.3. Die Erhöhung der endodermalen Differenzierung durch Änderung des partiell serumhaltigen EB-Differenzierungsprotokolls in ein definiertes serumfreies ML-Differenzierungsprotokoll _____	74
4.4. DCI induziert die Expression des Clara-Zell Markers CCSP in mES- und miPS-Zell-Differenzierungskulturen _____	77
4.5. Synergistischer Effekt von DCI und KGF auf die Expression von ATII-Zell-Markern in mES- und miPS-Zell Differenzierungskulturen _____	78
4.6. Clara-Zellrepoter miPS-Klone differenzieren in Zellen mit einer CCSP Promotor-abhängigen LacZ Expression _____	79
4.7. Die GFP Proteinexpression des miPS-Klons C1L9 stimmte mit der LacZ-Expression nicht überein _____	81
4.8. Die TEM Analyse bestätigt das Vorkommen von Clara-Zellen in den LacZ ^{pos} Bereichen _____	82
5. Perspektiven _____	84
6. Abkürzungsverzeichnis _____	85
7. Literaturverzeichnis _____	88
Lebenslauf _____	100
Danksagung _____	103

Abbildungsverzeichnis

Abb 3.1.:	Keine morphologischen Unterschiede zwischen undifferenzierten mES- und miPS-Zellen. _____	50
Abb 3.2.A.:	Die miPS-Zellen sind Oct3/4 immunopositiv. _____	51
Abb 3.2.B.:	Die miPS-Zellen sind Sox2 immunopositiv. _____	52
Abb 3.3.:	Die miPS-Klone C1L9 und C1L17 exprimieren Oct3/4, Sox2, Nanog und Klf4 mRNA. _____	52
Abb 3.4.:	Die miPS-Klone C1L9 und CL17 bilden nach subkutaner Injektion in immundefiziente Mäuse Teratome. _____	53
Abb 3.5.:	Schematische Darstellung der Durchflusztometrie der BryFoxa2 mES-Zelllinie. _____	54
Abb. 3.6.:	Verstärkte Bildung von definitivem Endoderm in ML gegenüber EB Differenzierungskulturen von mES-Zellen. _____	54
Abb. 3.7.:	Optimierte endodermale Differenzierung in ML-Kulturen von mES-Zellen unter Verwendung von serumfreien Bedingungen. _____	55
Abb. 3.8.:	Vergleichbare Bildung von definitivem Endoderm in ML-Differenzierungskulturen von mES- und miPS-Zellen. _____	57
Abb. 3.9.:	mES- und miPS-Zellen exprimieren endogenes Foxa2 und Sox17 Protein. _____	58
Abb. 3.10.:	Isotypkontrollen für die Antikörperfärbungen von Foxa2 und Sox17 zeigen kein Signal. _____	59
Abb. 3.11. :	Alle Sox17 immunopositiven mES- und miPS-Zellen in Differenzierungskulturen sind auch Foxa2 immunopositiv. _____	59
Abb. 3.13.:	Schematische Darstellung der Applikationszeiten der verschiedenen Faktoren während der Differenzierung. _____	61
Abb. 3.14.:	Die Behandlung der Differenzierungen von mES- und miPS-Zellen mit DCI führt zur höchsten CCSP Expression. _____	62
Abb. 3.15.:	Kinetische Studien bestätigen den induzierenden Effekt von DCI auf die CCSP Expression in Differenzierungskulturen von mES- und miPS-Zellen. _____	63
Abb. 3.16.:	Die Kombination von DCI (d14-26) mit einer durchgehenden KGF Applikation (d0-26) führte zur höchsten Expression des ATII-Markers SP-C. _____	66
Abb. 3.17.:	Die Applikation von KGF in der frühen Phase der Differenzierung hat keinen Einfluss auf die endodermale Differenzierung der mES-Zelllinie. _____	67
Abb. 3.18.:	Über die X-Gal-Färbungen konnten in Tag 26 Differenzierungskulturen des miPS-Klons C1L9 und C1L17 nach Dox-Induktion LacZ ^{pos} Clara-Zell-ähnliche Zellen detektiert werden. _____	68

- Abb. 3.19.: Über die X-Gal-Färbungen konnten in Tag 26 Differenzierungskulturen auch ohne Dox-Induktion LacZ^{pos} Clara-Zell-ähnliche Zellen detektiert werden. _____68
- Abb. 3.20.: ImaGene GreenTM C₁₂FDG LacZ positive Bereiche zeigen eine erhöhte Expression des Clara-Zell Markers CCSP. _____69
- Abb. 3.21.: Ein exemplarisch ausgewählter GFP^{pos} Bereich in Differenzierungskulturen des miPS-Klons C1L9 im Zeitverlauf. _____70
- Abb. 3.22.: Keine erhöhte CCSP Genexpression in den GFP^{pos} Bereichen des miPS-Klons C1L9. _____71
- Abb. 3.23.: Ultrastruktureller Nachweis von Clara-Zell-ähnlichen Zellen in X-Gal gefärbten LacZ^{pos} Bereichen. _____72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Oligonukleotide für Differenzierungsnachweise in Maus _____	30
Tabelle 2:	Primärantikörper _____	31
Tabelle 3:	Sekundärantikörper _____	32
Tabelle 4:	Primärantikörper für FACS _____	32
Tabelle 5:	Isotypkontrollen für FACS _____	32
Tabelle 6:	Standard PCR Programm _____	47
Tabelle 7:	Pipetierschema einer PCR mit der Go-TaqPolymerase _____	47
Tabelle 8:	qRT-PCR Programm mit SYBR [®] Green _____	48
Tabelle 9:	Pipetierschema einer qRT- PCR mit SYBR [®] Green _____	49

1. Einleitung

1.1. Das Atmungssystem des Menschen

Das Atmungssystem des Menschen lässt sich zum Einen in die luftleitende Atemwege unterteilen, die aus Nase, Rachen, Kehlkopf, Trachea (Luftröhre), Bronchien, Bronchiolen und terminalen Bronchiolen bestehen und zum Anderen in einen gasaustauschenden Bereich, der aus den respiratorischen Bronchiolen, Alveolargängen, Alveolarsäckchen und Alveolen besteht. Auf dem Weg über die luftleitenden Atemwege in die rechte und linke Lunge wird die atmosphärische Luft erwärmt, befeuchtet und filtriert. Der Gasaustausch zwischen Atemluft und Blut erfolgt schließlich in den Alveolen. Der Bronchialbaum wird aus 25 Teilungsgenerationen während der Embryonalentwicklung gebildet, die proximal mit den beiden Hauptbronchien beginnen und distal mit der Bildung der Alveolargänge enden [1]. Die knorpelige zylindrische Trachea verzweigt sich auf der Ebene des fünften Brustwirbels in den linken und rechten knorpeligen Hauptbronchus. Die beiden Hauptbronchien unterteilen sich weiter in Lappenbronchien [2]. Eine weitere Verzweigung der Lappenbronchien führt zur Bildung der Segmentbronchien, die in die Bronchiolen übergehen. Die Bronchiolen wiederum verzweigen sich in die terminalen Bronchiolen und enden mit den respiratorischen Bronchiolen [3].

Das respiratorische Epithel der Trachea und der beiden Hauptbronchien besteht hauptsächlich aus Flimmer-, Becher- und Basalzellen sowie aus einzelnen Bürstensaumzellen und seröse und endokrine Zellen [4]. Zum Einen haben die Basalzellen die Aufgabe zilienträgende Flimmerzellen im Epithel zu befestigen [4], zum Anderen dienen sie als Stammzellen des Atemwegsepithel [5]. Die vereinzelt vorzufindenden endokrinen Zellen innerhalb des Epithels sind vor allem an Verzweigungen von Bronchien und Bronchiolen anzutreffen [4].

Das Epithel der distalen Bronchiolen weist nur anfangs ein zweireihiges Epithel auf, das in ein einschichtiges prismatisches Epithel übergeht. In diesem Epithel sind hauptsächlich zilienträgende Flimmerzellen anzutreffen. Neben Flimmerzellen sind in den terminalen Bronchiolen auch Clara-Zellen enthalten. Vereinzelt kommen auch endokrine und seröse Zellen, sowie Becherzellen vor. Diese fehlen distal jedoch völlig [4].

Die prismatischen Clara-Zellen besitzen einen weit ins Lumen vorgewölbten zilienfreien Zellapex, der beim Menschen mit Sekretionsgranula gefüllt ist und einen basal liegenden

Zellkern hat. Die Ultrastruktur und die Funktion der Clara-Zellen sind innerhalb der Spezies sehr heterogen. Beim Menschen sezernieren sie Proteine, wie das Clara cell secretory protein (CCSP), die für die Abwehr wichtig sind und eine antiinflammatorische Wirkung aufweisen [4, 6]. Es wurde gezeigt, dass Clara-Zellen auch als Vorläuferzellen für die Regenerierung des Bronchialepithels agieren. Sie besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und können zugrundegegangene ziliotragende Zellen ersetzen [7, 8]. Sie sind hauptsächlich im Bronchialepithel der Säugetiere zu finden, in einigen Spezies, wie beispielsweise der Maus, allerdings auch in den oberen Atemwegen [9].

Respiratorische Bronchiolen stellen eine Übergangsregion zwischen Atemwegen und dem Alveolarraum dar. Deren Epithel ist prismatisch und weiter distal kubisch bestehend aus Clara-Zellen und einer nach distal abnehmender Zahl an ziliotragenden Zellen. Die respiratorischen Bronchiolen besitzen seitliche Aussackungen, Alveolen, die dem Gasaustausch dienen [4].

Die respiratorischen Bronchiolen gehen in die Alveolargänge über, die distal in die Alveolarsäckchen enden, die zahlreiche Alveolen aufweisen, welche die funktionelle Oberfläche für den Gasaustausch des Blutes darstellen. Da die Alveolen kein Flimmerepithel besitzen, erfolgt die Aufnahme und der Abtransport von Fremdpartikeln wie beispielweise Staub über Phagozyten. Das Alveolarepithel besteht aus einem Monolayer von Alveolarepithelzellen Typ I (ATI-Zellen) und Typ II (ATII-Zellen). Die ATI-Zellen sind abgeflachte, nichtteilungsfähige Zellen. Sie sind Teil der Blut-Luft-Schranke über die der Gasaustausch mittels Diffusion erfolgt und machen etwa 95 % des Alveolarepithels aus. Die ATII-Zellen hingegen sind kompakte abgerundete Zellen, die nur einen kleinen Anteil der Alveolen ausmachen und Mikrovilli an der Zelloberfläche aufweisen. Sie produzieren und sezernieren Surfactant (welches aus Phospholipiden und den Surfactantproteinen (SP-) A,B,C und D besteht), welches die Oberflächenspannung an der Blut-Luft-Schranke herabsetzt und die Alveolen während der Atmung stabilisiert. Außerdem spielen ATII-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr [10]. Zudem besitzen ATII-Zellen eine Vorläuferfunktion für ATI-Zellen und können das Alveolarepithel regenerieren [11, 12].

1.2. Entwicklung des Atmungssystems

1.2.1. Die Entwicklung des definitiven Endoderms und dessen Spezifizierung zum primitiven Vorderdarm und der Lunge

Während der Gastrulation, bei der sich die Blastozyste in die sogenannte Gastrula verwandelt, entstehen aus dem Epiblast die drei Keimblätter Ektoderm, Endoderm und Mesoderm.

Während der frühen Embryonalentwicklung besteht die vertebrale Blastozyste aus zwei verschiedenen Zellpopulationen – aus dem äußeren Throphoblast und dem inneren Embryoblast. Aus dem Embryoblast geht die zweischichtige Keimscheibe hervor, die aus den Zellschichten Epiblast und Hypoblast besteht. Aus dem Hypoblast, der früher auch als embryonales oder primitives Ektoderm bezeichnet wurde, werden die extraembryonalen Fortsätze gebildet. Aus dem Epiblast entsteht der eigentliche Embryo [13].

Die Gastrulation der Blastozyste wird über die Bildung des Primitivstreifens (PS) initialisiert. Der PS ist eine Region, die an der kaudalen Mittellinie der Keimscheibe entsteht [14]. Ungefähr gleichzeitig mit der ersten Zellverdickung löst sich in einem schmalen Bereich unter dem PS die Basalmembran des Epiblastenepithels auf. Die Migration der Epiblastzellen durch den PS aus der äußeren Schicht des Embryos in das Innere führt zur Bildung von Mesoderm und Endoderm [15, 16]. Die in der Epiblastschicht zurückbleibenden Zellen repräsentieren das Ektoderm [13]. Der Prozess der Gastrulation endet mit einer Keimscheibe, welche aus den drei Keimblätter besteht.

Das definitive Endoderm befindet sich anfänglich entlang der anterior-posterioren Körperachse. Die Regionalisierung ist von dem Zeitpunkt abhängig, an dem Epiblastzellen aus dem PS austreten. Die ersten auswandernden Zellen steuern zur Bildung des medialen und lateralen anterioren definitiven Endoderms bei, wobei die späten Zellen das posteriore definitive Endoderm hervorbringen [17, 18]. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass das Mesoderm und das definitive Endoderm aus einer gemeinsamen Population aus Vorläuferzellen entstehen. Beispielsweise haben Studien von *C. elegans* und *Xenopus* gezeigt, dass bipotente mesendodermale Vorläuferzellen Mesoderm und Endoderm hervorbringen [19].

Um wichtige Signalwege für die Bildung und die Kontrolle des definitiven Endoderms und des primitiven Vorderdarms während der Embryonalentwicklung zu untersuchen, wurden Studien an *Xenopus laevis*, Zebrafisch und Maus unternommen [18, 20]. Knockoutstudien

beschreiben mehrere Faktoren, die in die Endodermentwicklung involviert sind, insbesondere Mitglieder der TGF β (transforming growth factor- β) Familie, des kanonischen Wnt (abgeleitet von Int und Wg (wingless) aus *Drosophila melanogaster*) Signalweges, der Sox (Sry-related HMG box factor), Fox (forkhead box) und Gata (GATA-binding protein) Transkriptionsfaktorfamilien. Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Endodermbildung ausüben, sind Mitglieder der BMP (bone morphogenetic protein) Familie.

Mausembryonen, die kein Nodal (ein Mitglied der TGF β -Familie) exprimieren bilden auch keinen PS aus [21]. Weitere Studien konnten zeigen, dass der Wnt Signalweg während der Gastrulation eine wichtige Rolle für die Mesoderm- und definitive Endodermbildung spielt [22-24]. Sox17 orthologe Gene in Xenopus [25] und Zebrafisch [26] werden speziell während der Gastrulation im Endoderm exprimiert und spielen eine Schlüsselrolle in der Endodermbildung. Eine Abwesenheit von Sox17 in Knockoutmäusen resultiert in einem fehlgebildeten definitiven Darmendoderm. Eine erhöhte Apoptose führte in der Studie von Kaina-Azuma et al. zu einer Reduktion der endodermalen Zellen im primitiven Vorderdarm [27].

Zwischen Tag 7,5 und 8,5 des Mausembryos unterliegt die endodermale Schicht einer komplexen morphogenetischen Entwicklung. Die Entwicklung des primitiven Darms in der Maus beginnt mit der anterior-posterioren (AP) Spezifizierung endodermaler Zellen und der Expression AP spezifischer Marker. Über eine Invagination der anfangs zweidimensionalen Keimscheibe endodermaler Zellen wird ein primitives Darmrohr gebildet. Beeinflusst wird der Prozess durch Signale benachbarter Gewebestrukturen, wie beispielsweise das Mesoderm, welche zu einer regionalen Spezifizierung des Endoderms führen. Signalwege, die essentiell für die Morphogenese des Darmrohrs sind, sind Transkriptionsfaktoren der Signalwege von Gata und Fox [28]. Foxa1 und 2 (auch bekannt als Hnf3 α und β) werden außer im Vorderdarmendoderm, auch in der adulten Lunge exprimiert [29, 30]. Eine Nullmutation des Foxa2 Gens resultiert in Embryonalletalität. Zwar sind Zellen des definitiven Endoderms in Foxa2-Knockoutmäusen vorhanden, aber die Ausbildung eines Darmrohrs bleibt aus [31, 32]. Gata4-Knockoutmäuse sterben während der Embryonalentwicklung zwischen Tag 8,5 und 10,5 und zeigen eine gestörte ventrale Morphogenese einschließlich einer abnormalen Vorderdarmbildung [33].

Eine Unterteilung des primitiven Darmrohrs in Vorder-, Mittel-, und Enddarm ist über die lokale Expression von Transkriptionsfaktoren entlang der AP Achse charakterisiert. Ein typisches Expressionsmuster von Transkriptionsfaktoren für das Vorderdarmendoderm sind

Hex (hematopoetically expressed homeobox transcription factor) [34], Foxa2 (forkheadbox A2 transcription factor) und Sox2 (Sry-box 2 transcription factor). Pdx1 (pancreas-duodenal associated homeobox 1 transcription factor) [35] ist charakteristisch für das Mitteldarmendoderm und Cdx (caudal homeobox transcription factor) [36] für das Enddarmendoderm.

Das ventrale Vorderdarmendoderm bringt das Epithel der unteren Luftwege (Larynx, Trachea, Bronchien, Bronchiolen und Alveolen) sowie von Schilddrüse, Leber, Thymus und Pankreas hervor [13]. An Tag 9,0 der Embryonalentwicklung der Maus wird als frühester Marker Nkx2.1 (NK2 homeobox 1, oder auch thyroid transcription factor 1 [TTF1]) im ventralen anterioren Vorderdarmendoderm exprimiert [37]. Diese Nkx2.1 exprimierenden Zellen sind Vorläufer für das respiratorische Epithel und wachsen an Tag 9,5 der Embryonalentwicklung als Lungenknospen aus dem Vorderdarmendoderm aus [37]. Aber nicht nur Signale innerhalb des Endoderms sind wichtig für die Entwicklung, sondern auch umliegendes Gewebe spielt eine große Rolle für die Organspezialisierung des primitiven Darmrohrs. Das anteriore Endoderm unterliegt Signalwegen des Mesoderms, welches beispielsweise FGF (fibroblast growth factor) Signalwege freisetzt [38]. FGF Signalwege kontrollieren während der Endodermentwicklung die Anlegung der Körperachse [38-40]. Studien an niederen Wirbeltieren haben gezeigt, dass FGF2 (welches vom kardialen Mesoderm abgesondert wird) das Schicksal des ventralen Vorderdarmendoderms in Leber und Lunge kontrolliert [41, 42], wohingegen FGF4 die AP sowie die links-rechts Strukturierung beeinflusst [38, 43, 44]. Versuche an Mäusen haben gezeigt, dass hohe Konzentrationen von FGF4 eher zu einem posterioren Zellschicksal des primitiven Darmrohrs führen, wohingegen niedrige Konzentrationen in einer anterioren Genexpression resultieren [38]. Ameri et al. konnte 2010 zeigen, dass auch bei humanen embryonalen Stammzellen FGF2 die Vorder- / Mitteldarm Organ-Spezifizierung (wie z.B. Leber und Lunge) des definitives Endoderms bestimmt [45]. Dabei ist das Schicksal von der Konzentration des FGF2 abhängig. Eine hohe Konzentration bestimmt eine Lungenspezialisierung [41, 45].

Ein genauer Zeitpunkt einer Lungenspezialisierung des Vorderdarmendoderms ist zur Zeit noch unklar [39]. Allerdings ist bekannt, dass eine lokale Expression des Nkx2.1 im ventralen anterioren Vorderdarmendoderm der früheste beobachtete Schritt zur Lungenspezifizierung darstellt, noch bevor eine Laryngotrachealrinne gebildet wird [39, 46]. Die Nkx2.1 Genexpression bleibt während der gesamten embryonalen Lungenentwicklung und im adulten Zustand beim Menschen angeschaltet [47]. Während einer frühen

Entwicklungsphase ist Nkx2.1 zunächst in allen pulmonalen Epithelzellen exprimiert [41] und wird später hauptsächlich in ATII-Zellen und Clara-Zellen exprimiert [48].

1.2.2. Entwicklung der menschlichen Lunge

Die Entwicklung der humanen Lunge wird in fünf Phasen eingeteilt, die im Folgenden beschrieben werden. Je nach Literaturquelle und Autoren können die einzelnen Stadien der humanen Lungenentwicklung in ihrer zeitlichen und inhaltlichen Klassifizierung allerdings variieren.

Das erste sichtbare Zeichen der Lungenentwicklung wird in der ersten Phase (*embryonale Phase*) beobachtet, die ab der Empfängnis bis zur sechsten Schwangerschaftswoche stattfindet. Um die vierte Woche der Schwangerschaft wird in dieser Phase im ventralen anterioren Vorderdarmendoderm die Laryngotrachealrinne gebildet, die später die Grenze des zukünftigen Atmungs- und Verdauungstraktes bildet. Durch Auswachsung von Lungenepithelvorläuferzellen aus dem Vorderdarmendoderm werden zwei Lungenknospen gebildet, die lateral in das umliegende Mesenchym einwachsen und zunächst die zwei Hauptbronchien erzeugen. Das umliegende Mesenchym ist für die Bildung von Knorpelplatten, Bindegewebe, Kapillaren sowie glatter Muskulatur der Lunge verantwortlich [13]. Etwa zur selben Zeit trennt sich das Vorderdarmendoderm der Trachea von dem dorsalen ösophagalen Endoderm [49]. Fortschreitende Verzweigungen der zwei Lungenknospen während der embryonalen Phase führen zu Bildung lobärer Knospen [13]. Die zweite *pseudoglanduläre Phase* findet in der sechsten bis 16. Woche der Embryonalentwicklung statt. In dieser Phase bildet sich der luftleitende Bronchialbaum der Lunge bis einschließlich der terminalen Bronchiolen aus und ähnelt einer tubuloalveolären Drüse [50]. Für den Gasaustausch notwendige Strukturen sind noch nicht ausgebildet.

In der dritten Phase, der *kanalikulären Phase*, (16. bis 28 Woche der Embryonalentwicklung) entwickeln sich die zum gasaustauschenden System gehörenden respiratorischen Bronchiolen und Alveolargänge mit primitiven Alveolen. Das Mesenchym zwischen den Verzweigungen wird in dieser Phase stark vaskularisiert.

Ab der 28. Woche bis zur Geburt findet die *sakkuläre Phase* statt. Immer mehr Alveolarsäckchen werden gebildet, dessen Wände anfangs aus kubischem Epithel bestehen und sich schnell in ein Plattenepithel aus ATI-Zellen verdünnt. Das Kapillarnetz im Mesenchym proliferiert in dieser Phase sehr schnell, wölbt sich in die Alveolarsäckchen vor und bildet zusammen mit den ATI-Zellen die Blut-Luft-Schranke aus. Vereinzelt

zwischen den Plattenepithelzellen sind die rundlichen sekretorischen ATII-Zellen anzutreffen [13].

Die fünfte Phase ist die längste Phase. Von der 32. Woche bis zum achten Lebensjahr nimmt in dieser *alveolären Phase* die Zahl an Alveolen stetig zu. Jede respiratorische Bronchiole trägt an ihrem Ende ein Büschel dünnwandiger Alveolargänge und -säckchen. Die zunächst unreifen Alveolen wachsen weiter heran und bilden die alveolokapilläre Membran (Blut-Luft-Schranke), reifen aber erst mit dem Eindringen der Luft in die Lunge. Nach der Geburt vergrößern sich die Alveolen weiter, Bronchioli respiratorii und Alveolen vermehren sich weiter. Bis zum achten Lebensjahr etwa entstehen ständig neue unreife Alveolen. Anders als die reifen Alveoli können die unreifen Alveolen zusätzlich neue Alveolen bilden, indem sekundäre Bindegewebssepten die unreifen Alveolen unterteilen, bis etwa 300 Millionen Alveolen die menschliche Lunge auskleiden [13].

Molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Lungenentwicklung von einer Kaskade von Signalwegen kontrolliert und reguliert wird.

1.2.2.1. Wichtige Schlüsselfaktoren für die Lungenentwicklung/ Lungenregeneration

1.2.2.1.1. Keratinozytenwachstumsfaktor

Es sind 23 Mitglieder der Säugetier-FGF-Familie bekannt, die in verschiedene Prozesse während der Embryogenese, insbesondere Gastrulation, und der Organogenese involviert sind [51].

Studien in der Maus haben gezeigt, dass mesenchymal-epitheliale Signale für die Lungenknospung und die weitere Verzweigung des Bronchialbaums essentiell sind.

Beispielweise zeigt KGF (Keratinozytenwachstumsfaktor oder FGF7) in Bezug auf die Ausknospung des Lungenepithels keine induzierende Wirkung, weist allerdings einen Effekt bezüglich der Proliferation der fetalen Epithelzellen auf [52]. KGF wird in Mesenchymzellen der Lunge exprimiert und interagiert mit seinem hoch-affinen, auf den Epithelzellen der Lunge lokalisierten Rezeptor FGFR2-IIIb (KGFR) während der Organogenese [53-58]. Eine Störung des KGF/KGFR Signales inhibiert die Lungenverzweigung in fetalen Maus- und Rattenlungen [55, 57]. Es gibt Anzeichen dafür, dass in Kulturen von fetalen Lungenepithelzellen exogenes KGF die Differenzierung von ATII-Zellen induziert. In Abwesenheit von Mesenchym und Serum kann KGF ein erhöhtes Expressionslevel von

SP-A und SP-B hervorrufen sowie die Bildung von Lamellarkörperchen (ATII-Zellentypischen Organellen) fördern und hat somit einen mitogenen und auch reifungsfördernden Effekt auf isolierte fetale ATII-Zellen [52, 59, 60]. In der adulten Lunge regt eine KGF-Installation die ATII-Zellproliferation an und verhindert somit eine Lungenschädigung, die z.B. über Bleomycin [61] induziert wurde. Aber auch Schädigungen, die über Einwirkungen von Säuren [62], α -Naphthylthiourea [63] Hyperoxie [64] oder ein hydrostatisches pulmonales Ödem [65] entstehen, wirkt KGF gegen.

Über mögliche Effekte von KGF auf das Epithel der luftleitenden Atemwege ist nur wenig bekannt. Einige Studien konnten einen mitogenen und schützenden Effekt von KGF auf Clara-Zellen demonstrieren [66, 67]. Allerdings haben auch einige Publikationen die gegenteilige Wirkung von KGF auf die CCSP (Clara cell secretory protein, auch CC10) Expression postuliert. Yano et al. konnten zeigen, dass durch eine KGF Behandlung von adulten Rattenlungen die CCSP Proteinexpression abnahm [68].

1.2.2.1.2. Glukokortikoide

Studien mit Glukokortikoiden (gehören zu den Kortikosteroiden, eine Klasse der Steroidhormone) haben zeigen können, dass diese *in vitro* und *in vivo* physiologische, morphologische, biochemische und molekulare Prozesse zur Reifung der Lunge beschleunigen [69, 70]. Liggins zeigte als erster 1969 in Studien an Schafen, dass Dexamethason eine reifungsfördernde Wirkung auf fetale Lungen ausübt [71]. Heutzutage werden bei einer drohenden Frühgeburt Glukokortikoide routinemäßig in der Schwangerschaft verabreicht, um eine Lungenreifung zu induzieren und somit die Wahrscheinlichkeit eines Atemnotsyndroms (RDS, respiratory distress syndrom) bei Frühchen zu verringern [72]. Eine der Hauptursachen des Atemnotsyndroms ist der Mangel an oberflächenaktivem Surfactant, welcher zu einem Kollabieren der Alveolen führt [4, 13]. Die Gabe von Glukokortikoiden vor der Geburt fördert die Lungenreifung, indem diese auf die Lungenstruktur, kapillare/alveolare Permeabilität und das Surfactantsystem Einfluss nehmen [73, 74]. Es ist bekannt, dass Glukokortikoide eine mitogene und reifungsfördernde Wirkung auf primäre ATII-Zellen besitzen und dass dieser Effekt durch cAMP-erhöhende Substanzen (siehe 1.2.3.1.3) noch gesteigert werden kann [75, 76]. Glukokortikoide stimulieren die Produktion der Surfactantproteine und -lipide durch eine gesteigerte Genexpression sowie durch Beeinflussung von Enzymen, die die Pro-proteine von SP-B und SP-C zur reifen Form katalysieren [77, 78]. Studien haben gezeigt, dass

Knockoutmäusen, die keine Glukokortikoidrezeptoren ausbilden, kurz nach der Geburt wegen respiratorischer Insuffizienz sterben, da die Lungen dieser Mäuse stark unterentwickelt sind [79].

Neben der bereits beschriebenen Wirkung auf ATII-Zellen wurden auch Effekte auf Clara-Zellen beschrieben. Studien zeigten, dass Glukokortikoide die CCSP Expression regulieren und die Proliferation sowie Reifung der Clara-Zellen fördern [80-82]. Beispielsweise werden die Transkriptionsfaktoren HoxB5 (homeobox B5) und C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) β und δ während der Lungenentwicklung bei Anwesenheit von Glukokortikoiden positiv beeinflusst [80, 83]. C/EBP reguliert wiederum die Expression von CCSP [80].

1.2.2.1.3. cAMP-erhöhende Substanzen

Der Effekt eines erhöhten cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)-Levels in Bezug auf die Surfactantsynthese konnte schon 1987 entdeckt werden [84, 85]. Unterdessen bekannt, dass cAMP-Derivate sowie Komponenten, die das intrazelluläre cAMP-Level erhöhen (beispielsweise das Isobutylmethylxanthin, welches ein Phosphodiesterase-Inhibitor ist), die Reifung von primären ATII-Zellen vorantreiben [76]. Studien haben zudem gezeigt, dass eine Kombination aus Glukokortikoiden, cAMP und Isobutylmethylxantin die Reifung und die Erhaltung von primären fetalen und adulten ATII-Zellen unterstützt [75, 86]. Fetale ATII-Zellkulturen, die in Abwesenheit von Serum kultiviert wurden und 4 Tage mit Dexamethason und cAMP behandelt wurden, zeigten eine Bildung von Lamellarkörperchen und sezerniertes Surfactant. Die Behandlung mit Dexamethason und cAMP induzierte eine Reihe von Genen, unter anderem auch Gene die für eine Surfactantsynthese wichtig sind [76].

Ein Effekt des cAMPs bezüglich Clara-Zellen ist weitgehend unbekannt. Massaro et al. konnten an isolierten Rattenlungen zeigen, dass cAMP die Sezernierung von CCSP stimuliert [87].

Zwar ist der zugrunde liegende transkriptionale Mechanismus weitgehend unbekannt, aber Gonzales et al. konnten 2002 eine Induktion des Nkx2.1 durch die Behandlung von fetalen ATII-Zellkulturen mit Dexamethason und cAMP feststellen [76]. Zudem konnten weitere Studien einen stimulierenden Effekt von cAMP bezüglich der Nkx2.1 DNA-Bindungsaktivität beschreiben [88]. Nkx2.1 ist dafür bekannt, dass es in die Genregulierung der Lunge involviert ist (siehe 1.2.1). In der Lunge ist es für die Expression von SP-A [88, 89], SP-B

[90], SP-C [91], CCSP [92, 93] und Abca3 (ATP-binding-cassette transporter A3) [94] verantwortlich.

1.3. Erkrankungen des Atmungssystems

Erkrankungen des Atmungssystems zählen zu den führenden Todesursachen weltweit [95]. In der gesunden Lunge ist das Epithel in der Lage geschädigtes Gewebe über Vorläuferzellen und Stammzellen zu regenerieren. Eine insuffiziente oder gestörte Eigenregenerierung des Lungenepithels führt schließlich zum erkrankten Gewebe. Solche Erkrankungen können erworben oder genetisch bedingt sein. Im Folgenden sollen Erkrankungen erwähnt werden, für die eine regenerative Therapie mit Stammzellen in Frage kommen könnte.

Ein Beispiel für eine überwiegend erworbene respiratorische Erkrankung, die unter anderem das Atemwegsepithel betrifft, ist die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). COPD wird als Sammelbegriff einer Gruppe von pulmonalen Erkrankungen, wie chronisch obstruktive Bronchitis, verwendet, bei denen das Hauptsymptom Atemnot, anhaltender Husten, Auswurf von Sputum (AHA-Symptome) und in der frühen Phase die Ausbildung eines Lungenemphysems ist [96, 97]. Bei einer chronischen Bronchitis handelt es sich um eine dauerhafte Entzündung der Schleimhaut der Bronchien. Dabei verlieren die Kinozilien des Flimmerepithels ihre Beweglichkeit und die Schleimdrüsen produzieren vermehrt Sekret [98]. Schätzungen gehen davon aus, dass etwa 600 Millionen Menschen weltweit an COPD erkrankt sind. Eine Studie von 2007 ergab, dass ein Viertel der untersuchten Personen über 40 Jahren an COPD leidet [96]. Zu den Ursachen der COPD zählen das Rauchen, Umweltverschmutzungen, berufliche Belastungen, Infektionen, Vererbungen [99], oder eine nitritreiche Ernährung [100].

Bei der Cystischen Fibrose (CF, auch bekannt als Mukoviszidose) handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Betroffen sind verschiedene Organsysteme wie Lunge, Leber, Bauchspeicheldrüse und Darm. Ursache sind verschiedene Mutationen am langen Arm des Chromosoms 7 [101]. Das betroffene Gen codiert für das CFTR Protein (Cystic Fibrosis Transmembran Conductance Regulator), welches als cAMP (cyclic adenosine monophosphate) / PKA (protein kinase A) abhängiger Chloridkanal fungiert und in der Lunge vor allem in zilientragenden Zellen des Atemwegsepithels exprimiert wird [98]. Durch das mutierte Gen ist das Protein so stark verändert, dass keine korrekte Faltung erfolgt, wodurch die Funktion reduziert ist oder

vollständig ausbleibt. Dabei ist die häufigste Mutation das Fehlen der Aminosäure Phenylalanin und wird als $\Delta F508$ Mutation bezeichnet. Diese Mutation umfasst eine Deletion von 3 Nukleotiden im Gen (Δ =Deletion, F=Phenylalanin, 508=Position) [101].

Der ATP (Adenosintriphosphat)-assoziierte und in der apikalen Zellmembran von Epithelzellen lokalisierte Chloridkanal reguliert den Transport von Natrium- und Chloridionen in verschiedenen Organen wie beispielsweise Lunge und Leber [102]. Bei einer Mutation wird der Transport von Chloridionen aus den Zellen eingeschränkt oder kommt völlig zum Erliegen. Dadurch entsteht ein Konzentrationsunterschied von Ionen. Aufgrund des daraus resultierenden Anstiegs des osmotischen Drucks in den Zellen wird dem Sekret Wasser entzogen, so dass dieses zähflüssig wird und nur schlecht vom Flimmerepithel abtransportiert werden kann. In der Lunge kommt es durch den zähflüssigen Schleim in den Bronchien zum chronischen Husten, Bronchiektasien (Aussackung der Bronchien) und schweren Lungenentzündungen. Die andauernden Lungeninfekte können eine zunehmende Lungeninsuffizienz auslösen, welche sich durch chronischen Sauerstoffmangel und Atemnot bemerkbar macht [103].

Die derzeitigen therapeutischen Behandlungen von respiratorischen Erkrankungen sind meist unzureichend. In schweren Fällen ist der einzige Ausweg eine Lungentransplantation (s. auch Abschnitt 1.4.).

1.4. Die regenerative Medizin

Im Laufe der Jahre hat die regenerative Medizin ein weltweites Interesse ausgelöst. Das Ziel der regenerativen Medizin ist es, die Funktion von erkrankten Organen, Gewebe oder Zellen des Körpers wiederherzustellen oder zu ersetzen, ob über eine Immunmodulationstherapie (z.B. die Induktion der Regeneration durch die Gabe von biologisch aktiven Molekülen) [104], Zellersatztherapie [105] oder die Transplantation von *in vitro* hergestelltem Gewebe (Tissue engineering) [106]. Schon in den 1960er Jahren führte E.D. Thomas Knochenmarktransplantationen durch, um Patienten mit hematopoetischen Erkrankungen wie Leukämie zu behandeln. E.D. Thomas erhielt dafür 1990 den Nobelpreis für Medizin [107]. In den letzten Jahren ist es der Forschung gelungen, durch die Untersuchungen an embryonalen und adulten Stammzellen, eine für die regenerative Medizin brauchbare Zellquelle ausfindig zu machen [108].

Der Gewinnung und Verwendung von gewebespezifischen, bereits spezialisierten Zellen aus dem Patienten sind aber auch Grenzen gesetzt. Zum einen wegen der begrenzten

Isolierbarkeit, zum anderen aber auch wegen der geringen Expandierbarkeit von primären Zellen. Stammzellen können hierbei als mögliche Alternative für die Zellersatztherapie genannt werden, die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden (siehe 1.5).

1.5. Stammzellen: eine mögliche Zellquelle für die regenerative Medizin

Als mögliche Zellquelle für die regenerative Medizin bieten sich Stammzellen an, da sie eine fast unbegrenzte Kapazität zur Selbsterneuerung aufweisen. Basierend auf ihrem Differenzierungspotential werden totipotente Stammzellen, pluripotente Stammzellen, multipotente Stammzellen und unipotente Stammzellen unterschieden [109].

Bevor allerdings eine stammzellbasierte Therapie in der Klinik angewandt werden kann, müssen grundsätzliche Aspekte geklärt und erforscht werden. Stammzellen müssen in ihrer unbegrenzten Kapazität zur Selbsterneuerung und in ihrem Differenzierungspotenzial genauesten untersucht und kontrollierbar sein. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei dem Zusammenspiel zwischen Stammzellen und dem umgebenden Komponentenmilieu (z.B. Zusammensetzung aus Wachstumsfaktoren, Zell-Zell-Kontakt etc.) sowie den äußeren Faktoren wie Temperatur oder Atmosphäre [110].

1.5.1. Adulte Stammzellen

Die gebräuchliche Bezeichnung „adulte Stammzellen“ kann unter anderem missverständlich sein, da adulte Stammzellen strenggenommen nicht nur im adulten Organismus vorkommen, sondern auch in neonatalem Gewebe zu finden sind. Eine bessere Bezeichnung wäre etwa „somatische Stammzellen“. Adulte Stammzellen können nicht alle Zelltypen des Individuums hervorbringen und werden somit als multipotent bezeichnet. Unipotent werden sie bezeichnet, wenn sie nur einen bestimmten Zelltyp hervorbringen können. Ihre Aufgabe ist es, geschädigtes Gewebe kontinuierlich zu regenerieren [111]. Je nach ihrer Lokalisation werden sie beispielsweise als hämatopoetische, neurale, gastrointestinale, epidermale, hepatische oder mesenchymale Stammzellen definiert [112]. Da sie in den meisten Geweben und Organen eines jeden Individuums vorkommen, ist die Verwendung von adulten Stammzellen als autologe Zellquelle für eine Zellersatztherapie ohne ethische Bedenken möglich. Eine heutzutage bereits standardmäßig durchgeführte Therapie mit adulten Stammzellen ist beispielsweise die Knochenmarkstransplantation [113]. Grundvoraussetzung für die Verwendung von

organspezifischen Stammzellen für die regenerative Medizin ist eine genaue Identifizierung der entsprechenden Stammzellen. Zudem kann die Isolierung, je nach Organsystem, wie beispielsweise Stammzellen aus der Lunge, erschwert sein. Die Fähigkeit zur Transdifferenzierung von adulten Stammzellen, also das Hervorbringen von Zellerivaten eines anderen Keimblatts, wird kontrovers diskutiert, so dass die Verwendung von gut isolierbaren adulten Stammzellen wie Knochenmarkstammzellen nicht für alle Gewebearten wie z.B. das Lungenepithel geeignet scheint.

1.5.2. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

ES-Zellen sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden [114, 115]. Sie besitzen die Fähigkeit im undifferenzierten Zustand unbegrenzt *in vitro* zu proliferieren und haben das Potenzial sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Derivate aller Zelltypen der drei embryonalen Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm und in Zellen der Keimbahn [116, 117] zu differenzieren. Diese Fähigkeit pluripotenter Zellen in alle somatischen Zellen eines Organismus zu differenzieren, jedoch keinen vollständigen Embryo hervorzubringen, wurde durch Bradley et al. 1984 postuliert [118]. Evans et al. gelang 1981 erstmalig die erfolgreiche Isolierung pluripotenter muriner ES-Zellen [114]. Jahre später konnte Thomson et al. ES-Zellen aus dem Rhesusaffen [119] sowie humane ES-Zellen gewinnen [120]. Die Isolierung von ES-Zellen aus weiteren Spezies in den Folgejahren war ebenfalls erfolgreich [121-123].

Ein entscheidendes Merkmal von ES-Zellen ist die Expression pluripotenz-assoziiierter Transkriptionsfaktoren wie Oct3/4 (octamer binding transcription factor 3/4) [124], Nanog [125], Rex1 (RNA endonuclease transcription factor 1) [126] und Sox2 [127]. Zum Erhalt der Pluripotenz wird in ES-Zellen ein kritisches Expressionslevel an Transkriptionsfaktoren benötigt. Die notwendigen Bedingungen hierfür sind speziesabhängig. Eine weitere charakteristische Eigenschaft ist die Expression typischer Oberflächenmarker wie SSEA-1 (murin), SSEA-3, SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen, human), Tra-1-60, Tra-1-81 (tumor rejection antigen) sowie eine hohe Telomerase-Aktivität [120].

Die Standardmethode zur Erhaltung der Pluripotenz von murinen (m)ES-Zellen ist die Co-Kultivierung auf wachstumsinaktivierten murinen Fibroblasten in Anwesenheit des leukemia inhibitory factor (LIF) [128]. LIF aktiviert über Downstream-Signale den JAK-STAT Signalweg. STAT3 spielt hierbei eine wichtige Rolle zur Erhaltung der Pluripotenz und somit der Selbsterneuerung von ES-Zellen [129]. Zudem wurde festgestellt, dass Wnt/ β -

Catenin Signalwege eine wichtige Rolle für die Selbsterneuerung und die Proliferation von pluripotenten humanen (h) und mES-Zellen spielen. Die Bindung der Wnt Glykoproteine an einen membranassoziierten Rezeptorkomplex inhibiert die Bildung eines Komplexes, welcher β -Catenin abbaut. Unter anderem besteht dieser Komplex aus der Gsk3 (glycogen synthase kinase-3) [130, 131]. Durch die Inhibierung der Gsk3 mit Gsk3-Inhibitoren und dem dadurch erhöhten β -Catenin Level kann in mES und hES-Zellen der pluripotente Status auch in Abwesenheit von murinen Fibroblasten aufrecht erhalten werden [132]. Ähnlich wie bei mES-Zellen benötigen auch hES-Zellen Faktoren für den Pluripotenzerhalt. Hierbei ist allerdings die Zugabe FGF2 essentiell [133].

Als Nachweis der Pluripotenz von ES-Zellen wird neben der Expression von Pluripotenzfaktoren (siehe oben), die Bildung von Teratomen nach Injektion in immundefiziente Mäuse [118] und im Fall von nicht-humanen ES-Zellen die Generierung von chimären Nachkommen nach Injektion der ES-Zellen in die Blastozyste angesehen [134].

Da für die Gewinnung von ES-Zellen die Zerstörung der Blastozyste erforderlich ist, wird die Verwendung von hES-Zellen in der Forschung und Medizin als ethisch kontrovers angesehen. Nach dem deutschen Stammzellgesetz darf in Deutschland ausschließlich mit importierten hES-Zelllinien gearbeitet werden, die vor dem 1. Mai 2007 im Herkunftsland gewonnen wurden [135].

Obwohl der Einsatz von hES-Zellen in der regenerativen Medizin denkbar ist, gibt es jedoch, neben den ethischen Bedenken, weitere Aspekte, welche die Verwendung einschränken. Die Verwendung nicht-autologer allogener hES-Zelllinien würde eine Abstoßungsreaktion bedingen und eine Immunsuppression erforderlich machen, die wiederum erhebliche Nebenwirkungen hervorruft. Als wichtige Beispiele sind hier die Hypertonie [136] sowie ein erhöhtes Infektionsrisiko [137] zu nennen. Möglichkeiten zur Gewinnung autologer hES-Zellen könnte das therapeutische Klonen [138] oder parthenogenetisch hergestellte hES-Zellen darstellen [139]. Zudem könnten allogene HLA-gematchte parthenogenetische hES-Zellen aus Stammzellbanken verwendet werden [140].

1.5.3. Induzierte pluripotente Stammzellen

Eine mögliche Alternative für die regenerative Therapie zu ES-Zellen bieten die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen). S. Yamanaka gelang es 2006 erstmalig zunächst aus embryonalen Fibroblasten der Maus (m)iPS-Zellen zu gewinnen und legte somit den

Grundstein der iPS-Zelltechnologie. Mit Hilfe von retroviralen Vektoren transduzierte er die vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc (myelocytomatosis viral oncogene) und Klf4 (Krüppel-like faktor 4) in somatische Zellen der Maus [141]. Die über die Fbx15-Expression (F-box protein 15, auch bekannt als Fbxo15) selektierten Klone waren allerdings nicht vollständig reprogrammiert, hatten somit ähnliche Eigenschaften zu pluripotenten ES-Zellen (Morphologie, Teratombildung und Proliferation), wiesen allerdings ein anderes Expressionsprofil von Markergenen auf. Zudem konnten durch die Injektion der so generierten Zellen in die Blastozyste von Mausembyonen keine lebensfähigen Chimäre erzeugt werden und waren auch nicht keimbahnkompetent [141].

Über eine Nanog-abhängige GFP- und Puromycinresistenz-Selektion gelang es 2007 zeitgleich zwei unabhängigen Arbeitsgruppen murine Fibroblasten über eine retrovirale Transduktion der oben genannten vier Faktoren zu reprogrammieren [142, 143]. Die so hergestellten iPS-Zellen glichen den ES-Zellen im Genexpressions- und DNA-Methylierungsmuster, sowie im Proliferations- und Differenzierungspotential. Eine Teratombildung war nach Injektion der Zellen in immundefiziente Mäuse ebenfalls nachweisbar. Zudem konnte eine vergleichbare Keimbahnkompetenz zu ES-Zellen festgestellt werden. Wenig später gelang es 2007 Blelloch et al. und Meissner et al. iPS-Zellen ohne Antibiotika allein über die Morphologie zu selektieren [144, 145].

Einige Zeit später gelang die Herstellung auch von humanen (h)iPS-Zellen [146, 147]. Allerdings verwendeten Yu et al. eine andere Kombination aus Transkriptionsfaktoren. c-Myc [148] und Klf4 [149] wurden wegen ihres onkogenen Charakters durch Nanog und Lin28 für eine Induktion der Pluripotenz ersetzt. Über eine Antibiotikaresistenz wurde selektiert und die so gewonnenen iPS-Zellen charakterisiert. Der Karyotyp sowie die Expression spezifischer Markergene waren mit hES-Zellen vergleichbar. Zu einer nachweisbaren Telomeraseaktivität besaßen sie die Fähigkeit Teratome zu bilden und *in vitro* in alle drei Keimblätter zu differenzieren [147].

Seit der ersten Generierung von iPS-Zellen durch Yamanaka et al. folgten weitere zahlreiche Publikationen über die Herstellung von iPS-Zellen aus verschiedenen Spezies wie Schwein und weiteren nicht-humanen Primaten, sowie die Verwendung unterschiedlicher somatischer Zellquellen (z.B. Zellen aus Leber und Magen [150], hämatopoetische Zellen [151], neuronale Zellen [152]) und der Einsatz diverser Vektorsysteme (retroviral [146, 153], lentiviral [147, 154] und induzierbare Lentiviren [155]). Allerdings weisen die genannten Methoden erhebliche Nachteile für klinische Anwendungen auf. Die oben genannten Methoden zur Generierung von iPS-Zellen

basieren auf viralen Vektorsystemen, die in das Genom inserieren und Mutationen hervorrufen können. Aus diesem Grund wurden weitere Anstrengungen unternommen, nicht-integrierende virale und nicht-virale oder zeitweise integrierende nicht-virale Vektorsysteme für die Reprogrammierung zu verwenden. In die DNA integrierende aber kontrollierbare Elemente wie das piggyBac Transposon (ein genetisches Element, das über ein "cut and paste"-Mechanismus innerhalb des Genoms mobilisiert werden kann) [156] wurden erfolgreich eingesetzt, um miPS und hiPS-Zellen zu gewinnen. Elemente, die nicht in die DNA integrieren, wie Adenoviren [157] und Plasmide [158], konnten ebenfalls zu einer erfolgreichen Generierung von iPS-Zellen eingesetzt werden. DNA-freie Reprogrammierungen über nicht-integrierende Elemente wie Proteine [159, 160] und mRNA [161] wurden erstmals 2009 beschrieben. Solche nicht-virale, nicht-integrierende DNA-freie Methode sind auch für eine klinische Anwendungen geeignet, gehen jedoch meist mit einer niedrigen Reprogrammierungseffizienz und einer verlängerten Generierungsdauer einher [162]. Die Generierung von iPS-Zellen aus murinen embryonalen Fibroblasten über das Einbringen von DNA-Lipoplex (ein Komplex aus Plasmid-DNA und kationischen Lipiden) mittels einer liposomalen Magnetofektion (eine Methode, bei der mit Hilfe eines Magnetfeldes Nukleinsäuren in einer Zielzelle angereichert werden [163]) wurde im Juli 2012 publiziert und zeigte im Gegensatz zu den herkömmlichen nicht-integrierende Elemente eine Steigerung der Reprogrammierungseffizienz und eine verkürzte Generierungsdauer durch Plasmid-DNA [162]. Nach nur acht tägiger Reprogrammierung konnten integrationsfreie iPS-Zelllinien gewonnen werden, die *in vitro* und *in vivo* ES-Zellen glichen, u.a. besaßen sie die Fähigkeit Teratomen sowie chimären Nachkommen zu bilden [162].

1.6. Differenzierung von pluripotenten Stammzellen (PS-Zellen) in respiratorische Zelltypen

Die hohe Proliferationskapazität und das hohe Differenzierungspotential von ES-Zellen und iPS-Zellen ist die entscheidende Grundlage für die Verwendung dieser Stammzellen in der regenerativen Medizin.

1.6.1. Die Differenzierung von PS-Zellen in definitives Endoderm

Ein wichtiger Differenzierungsschritt auf dem Weg zur Bildung respiratorischen Gewebes ist die effiziente Differenzierung der PS-Zellen zunächst in definitives Endoderm, aus welchem unter anderem analog zur Embryonalentwicklung Lungenepithelzellen hervorgehen können.

Studien haben gezeigt, dass in Anlehnung an die Gastrulation, die TGF- β Faktoren Nodal oder Activin A (welches an denselben Rezeptor wie Nodal bindet) die Differenzierung von mES-Zellen und hES-Zellen in endodermale Zellen induzieren [164-166]. D'Amour et al. konnte 2005 eine Anreicherung von definitivem Endoderm (um die 80 %) in Anwesenheit von Activin A und geringem Serumgehalt in frühen hES-Zellen Kulturen erreichen. Mittels einer Transplantation dieser endodermalen Zellen unter die Nierenkapsel von immundefizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die weitere Differenzierung dieser Zellen in reiferes Endoderm-abgeleitetes Gewebe möglich ist [166]. 2007 beschrieben McLean et al, dass die Wirkung von Activin A auf die endodermale Differenzierung von hES-Zellen durch eine Inhibierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase mittels des „small molecules“ LY294002 unterstützt wird, einhergehend mit einem erhöhten Transkriptionslevel von Markern spezifisch für definitives Endoderm. Die Gruppe konnte etwa 80 % Sox17 und Cxcr4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4) positive Zellen generieren. Von den Sox17 positiven Zellen waren um die 95 % auch für Foxa2 positiv [167]. Borowiak et al. beschrieben 2009 zwei Zellmembran permeable „small molecules“, IDE1 und IDE2, die die Differenzierung von ES-Zellen Richtung definitives Endoderm effizienter erhöhen als Activin A oder Nodal. Auch in dieser Studie konnten die Forscher nahezu 80 % definitives Endoderm generieren (Sox17 und Foxa2 positiv). Die Behandlung mit Activin A erzielte hingegen 45 % Sox17 positive Zellen an Tag 6 der Differenzierung [168]. Eine Kombination aus Activin A, FGF2, BMP4 und Wnt oder VEGF (vascular endothelial growth factor) nutzten Nostro et al. 2011, definitives Endoderm in hES-Zellen zu induzieren. Sie konnten mehr als 90 % Cxcr4 / c-Kit (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog) positive Zellen erzielen die etwa zu 70 % für Sox17 positiv waren [169]. In einem serumfreien Medium, unter Verwendung von FGF2, Activin A und BMP4 und ohne Insulin gelang es Xu et al. 2011 definitives Endoderm aus hES-Zellen zu generieren [170]. Eine zusätzliche Aktivierung des FGF/MAPK Signalweges während der frühen Induktionsphase unter Gabe von Activin A ist für die definitive Endodermbildung laut Sui et al. wichtig. Die Arbeitsgruppe konnte 2012 zeigen, dass die Aktivierung von FGF

in Kombination mit Activin A definitives Endoderm in hES-Zellen Differenzierungskulturen anreichert (etwa 50 % -70 % Foxa2 und Sox17 positive Zellen) [171].

PS-Zell-abgeleitete definitive Endodermzellen sind durch die Coexpression von endodermalen Transkriptionsfaktoren wie Foxa2 [172] und Sox17 [27] charakterisiert, und werden in vielen Publikationen zur Detektion von definitiven endodermalen Zellen verwendet. Für eine genauere Aussage über das Schicksal von Zellpopulationen in Differenzierungskulturen werden Foxa2 und Sox17 oft in Kombination mit weiteren mesendodermalen bzw. endodermalen Markern wie beispielsweise Bry (Brachyury) [173], Cxcr4 [174], Gsc (goosecoid) [175] oder c-Kit [176] verwendet.

1.6.2. Die Differenzierung von PS-Zellen in anteriores Vorderdarmendoderm

Ähnlich wie in der Embryogenese befassen sich neueste Studien zunächst mit der Induktion von anteriorem Vorderdarmendoderm, aus dem Lungenepithelvorläufer hervorgehen können.

Wie schon in Abschnitt 1.6.1. beschrieben, wird in mES- und hES-Zellendifferenzierungskulturen definitives Endoderm effizient durch die Behandlung mit einer hohen Konzentration von Activin A induziert, welches den Nodal-Signalweg während der Gastrulation bei der Embryonalentwicklung imitiert [177]. Der Effekt von Activin A auf hES-Zellen kann, wie schon erwähnt, zusätzlich durch Ly294002 verstärkt werden [167]. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Behandlung von PS-Zellendifferenzierungskulturen mit Noggin (ein physiologischer BMP-Antagonist) und dem „small molecule“ SB431542 (ein Inhibitor des TGF β -Signalweges) zu einer Anteriorisierung des PS-Zell-abgeleiteten definitiven Endoderms führen und, ähnlich wie bei dem *in vivo* Prozess, einen anterioren Vorderdarmendodermphänotyp induzieren kann [177]. Der Nachweis des Vorderdarmendoderms in den PS-Zellendifferenzierungskulturen wurde über die Analyse spezifischer Marker wie Sox2, Hex (hematopoetically expressed homeobox transcription factor) und Tbx1 (T-box transcription factor 1) erbracht [178, 179].

1.6.3. Die respiratorische Differenzierung von PS-Zellen

Die erste Publikation, die beschrieb, dass PS-Zellen scheinbar in lungenspezifische Zellderivate differenzieren können, erschien 2002. Hierzu wurde im Anschluss an die Verwendung eines serumhaltigen Mediums in der Endphase der Differenzierung ein

kommerziell erhältliches serumfreies Medium „Small airway growth Medium (SAGM)“ appliziert, welches ursprünglich für die Kultivierung von primärem distalen Lungenepithel entwickelt worden war. Die Arbeitsgruppe um A. E. Bishop interpretierte die beobachtete Steigerung der mRNA Expression des ATII-Zellmarkers SP-C in Embryoid Body (EB)-basierte Differenzierungskulturen als Beleg für die Generierung von ATII-Zellen aus mES-Zellen. Zudem wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen SP-C gezeigt, die auf einem ATII-Zell-ähnlichen Phänotyp hinweisen könnte [180]. Da in dieser Publikation keine Kontrollen mitgeführt bzw. gezeigt wurden, und Immunfärbungen mit SP-C Antikörpern oft unspezifische Kreuzreaktionen zeigen, erscheinen die Ergebnisse zweifelhaft.

Dieselbe Arbeitsgruppe berichtete 2004, dass die meisten Wachstumsfaktoren im SAGM, besonders die Retinolsäure (RA) und das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin (T3), einen hemmenden Effekt auf die Differenzierung zu ATII-Zellen zu haben scheinen [181]. Die Daten der Gruppe scheinen zu belegen, dass das Weglassen von RA oder T3 zu einer dreifachen Erhöhung der Expression des ATII-Zellmarkers SP-C führte. Diese Hypothesen beruhen allerdings nur auf nicht-quantitativen RT-PCR-Daten. Eine genaue Aussage zur Qualität und Quantität von ES-Zellen-abgeleiteten ATII-Zellen erfolgte in dieser Studie nicht. Es folgte eine weitere Studie, die vermuten ließ, dass nicht primär die Zusätze des SAGMs zu einer Erhöhung der SP-C mRNA Expression führen, sondern vielmehr der Wechsel zu serumfreien Kultivierungsbedingungen in der Endphase der Differenzierung. Die Zugabe jedes einzelnen Faktors des Vollmediums SAGM zum serumfreien Grundmedium reduzierte die SP-C mRNA Expression in Differenzierungskulturen von mES-Zellen. Auszählungen der Immunfärbungen gegen pro-SP-C führten zu keinem signifikanten Unterschied innerhalb der ausgetesteten Gruppen. Die Arbeitsgruppe behauptete, dass kein signifikanter Unterschied über die Immunfluoreszenz bestätigt werden konnte, da die gezeigte Herunterregulierung der SP-C mRNA nicht ausreichte, um eine signifikante Änderung in der Anzahl der ATII-Zellen hervorzurufen [182]. An dieser Stelle muß kritisch angemerkt werden, dass auch in dieser Studie keine geeigneten Kontrollen für die SP-C Immunfärbungen mitgeführt wurden.

Ein anderes EB-basiertes und dreistufiges, partiell serumfreies Protokoll von Bishop und Kollegen unter Verwendung von Activin A führte zu einer signifikanten Erhöhung der SP-C und Nkx2.1 mRNA Expression gegenüber dem vorherigen Protokoll (Serum + SAGM). Trotz einer hohen Autofluoreszenz, zeigten durchflusszytometrische Analysen, dass am Ende der Differenzierungskulturen etwa 3 % eGFP positive Zellen detektiert werden konnten. Die Autoren berichten, dass das Genexpressionsmuster der gewonnenen

Epithelzellen eher dem von Lungenepithelvorläuferzellen des Vorderdarmendoderms und der auswachsenden Lungenknospen als dem von reifen ATII-Zellen entsprach [183]. Jedoch haben die Autoren weder statistische Daten der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt, noch zeigten sie, ob eine SP-C Antikörperfärbung mit der SP-C Promotor-abhängige eGFP Expression in der transgenen ES-Zelllinie übereinstimmte.

Qin et al. berichtete, dass die Kultivierung permeabilisierter mES-Zellen mit dem Zellextrakt der murinen ATII-Zelllinie MLE-12 die Differenzierung in ATII-Zellen verbessert [184]. mES-Zellen wurden mit einem Konstrukt transfiziert, das eine SP-C Promotor-abhängige eGFP Expression vermittelt. Die mittels des Zellextrakts reprogrammierten mES-Zellen generierten eGFP exprimierenden Zellen, exprimierten die endogenen ATII-Zellen typischen Marker wie SP-C und Nkx2.1 [184]. Die Gruppe beobachtete in mES-Zellen, die mit dem MLE12-Zellextrakt behandelt wurden, eine 3-fach erhöhte SP-C Genexpression gegenüber den mES-Zellen, die entweder gar nicht oder mit Feederzellextrakt behandelt wurden. Die Reprogrammierung schien allerdings nicht beständig zu sein. Sie beobachteten, dass die eGFP-Expression bis Tag 7 auf etwa 7 % anstieg und nahm schließlich nach 14 Tagen wieder ab. Derartige Methoden sind für eine klinische Anwendung eher bedenklich, könnten allerdings für nähere Forschungszwecke durchaus von Interesse sein.

2005 publizierte Van Vranken et al. eine Kokultur von mES-Zellen mit embryonalen Mesenchymzellen des distalen Lungengewebes. EBs wurden für fünf bis zwölf Tage direkt oder indirekt (getrennt durch eine Membran) mit embryonalem distalen Lungenmesenchym kultiviert. Es konnte festgestellt werden, dass eine indirekte Kokultur eine 14-fach erhöhte SP-C Genexpression hervorbrachte. Die Autoren schlussfolgerten, dass embryonales Lungenmesenchym in Anlehnung an die Embryonalentwicklung ebenfalls einen induzierenden Effekt auf die Differenzierung von mES-Zellen in Lungenepithel hat [185]. Die angewandten experimentellen Bedingungen und Methoden weisen allerdings kein induzierendes Potential von isolierten distalen Lungenmesenchym bezüglich der Differenzierung von ES-Zellen in funktionelle ATII-Zellen nach. Zudem wurden keine induzierenden Faktoren identifiziert. Diese Studie zeigt ausschließlich, dass *in vivo* Differenzierungen unter entsprechenden Bedingungen simuliert werden kann. In Anbetracht der generellen Schwierigkeiten von Analyseverfahren wie Antikörperfärbungen, sollten Daten von Kokulturen mit Vorsicht beurteilt werden [186].

Coraux et al. berichtete 2005 von ersten Daten, die auf eine Generierung von Clara-Zellen aus mES-Zellen auf Basis eines Monolayer-Protokolls hinweisen. Die Gruppe verglich dafür verschiedene Beschichtungskomponenten wie Kollagen Typ I, IV, VI und die denaturierte

Form des Kollagens, Gelatine, wobei nur das Kollagen I eine Generierung von Clara-Zellen induzierte. Zudem wurden KGF und RA den Differenzierungskulturen zugesetzt, allerdings wurde kein differenzierungsinduzierender Effekt erzielt. Durch Einsatz des Air-Liquid-Interface (ALI)-Modells konnten Coraux et al. schließlich reifes Atemwegsepithelähnliches Gewebe generieren, bestehend aus Clara-Zellen, Basalzellen, Becherzellen sowie zillientragenden Flimmerzellen [187]. CCSP exprimierende Zellen und zillientragende Zellen sind nicht nur in der Lunge anzutreffen, so dass der Nachweis von bronchialen/bronchiolaren Epithelzellen in ES-Zelldifferenzierungskulturen erschwert wird [188, 189] und eine eindeutige Einordnung derartiger ES-Zell-abgeleiteter Zellen schwierig ist.

Unserer Arbeitsgruppe ist es 2008 gelungen, ein vollständig serumfreies EB-basiertes Protokoll für die Differenzierung von mES-Zellen in distales Lungenepithel zu etablieren [190]. Neben einer SP-C mRNA Expression konnte der ATII-Zellphänotyp über eine pro-SP-C Immunfärbungen und den ultrastrukturellen Nachweis von Zellen mit lamellarkörperchenähnlichen Strukturen bestätigt werden. Darüber hinaus wurde die mRNA Expression weiterer Marker von distalem Lungenepithel wie SP-A, SP-D, und Aquaporin 5 nachgewiesen [190]. Eine serumfreie Kultivierung schafft definierte Kultivierungsbedingungen und bietet die Basis für die Identifizierung von Schlüsselfaktoren für die respiratorische Differenzierung. Im Gegensatz zu vielen anderen Veröffentlichungen versuchten Winkler et al. Daten zu liefern, die zumindest eine grobe Schätzung der Effizienz der Differenzierung zuließen. Zudem diskutierten Winkler et al. die verwendeten Analysemethoden kritisch, um aus ES-Zellen abgeleitete ATII-Zellen nachzuweisen.

Wie in Abschnitt 1.6.2. schon erwähnt, befassen sich neueste Studien zunächst mit der Induktion von anteriorem Vorderdarmendoderm. In einem nächsten Schritt wurde durch die Zugabe eines Faktorcocktails bestehend aus Wnt3a, FGF10, KGF, FGF2, BMP4, EGF und Heparin die Differenzierung des anterioren Vorderdarmendoderms in Nkx2.1 exprimierende Vorläuferzellen in mES- und hES-Zellen induziert [177, 178]. Es ist bekannt, dass während der Embryonalentwicklung Nkx2.1 in Lungenvorläuferzellen exprimiert wird [39, 46]. Allerdings wird eine Nkx2.1 Expression auch in Verbindung mit der Schilddrüsenentwicklung und in Vorläuferzellen des Vorderhirns beobachtet [191, 192]. Longmire et al. verwendeten für die weitere Differenzierung des anterioren Vorderdarmendoderms eine Nkx2.1-eGFP Knockin mES-Zelllinie. Sie konnten den lungen- und schilddrüsenspezifischen Phänotyp dieser generierten Nkx2.1-GFP positiven Vorläuferzellen unter anderem anhand der fehlenden Expression der neuroektodermalen

Marker Tuj1 (class III beta-tubulin, auch als Tubb3 bekannt) und Pax6 nachweisen. Die Vorläuferzellen wurden nach Aufreinigung weiter expandiert und in reifere Lungenepithelzellen *in vitro* differenziert. Durch eine Behandlung der aufgereinigten Nkx2.1 positiven Zellpopulation in den letzten 3 Tagen der Differenzierung mit Dexamethason, cAMP, IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin) und KGF konnte eine 100-fache Erhöhung der SP-C, SP-B und CCSP Genexpression induziert werden. Die Autoren berichten zudem, dass die Nkx2.1 Population erfolgreich in dezellularisierte Mauslungen intratracheal eingebracht werden konnten, alveolare Lungenregionen rebesiedelten und alveolare Strukturen bildeten [178]. Mou et al. konnten durch die subkutane Injektion von aus mES-Zellen-generierten Nkx2.1 positiven Zellen (die Tuj1 und Pax8 negativ waren) in immundefiziente Mäuse, feststellen, dass sich nach 20 bis 30 Tagen Bereiche bildeten, in denen sich Basalzellen, Clara-Zellen, zilientragende Zellen und Becherzellen entwickelten. Zusätzlich zu mES-Zellen konnten sie auch hiPS-Zellen in Nkx2.1 positive Zellen differenzieren. Diese Nkx2.1 positive Mischkultur an Zellen wurde ebenfalls in immundefiziente Mäuse subkutan injiziert. Nach 30 Tagen konnte eine p63 Genexpression festgestellt werden, die, laut Mou et al., auf Basalzellen hindeutete. Es ist allerdings bekannt, dass p63 nicht nur in Basalzellen exprimiert wird. Zilientragende Zellen, Clara-Zellen sowie Becherzellen konnten nicht detektiert werden. Auch eine Generierung von Clara-Zellen oder zilientragenden Zellen *in vitro* wird in dieser Publikation weder in mES- noch in hiPS-Zellen beschrieben [193].

1.6.4. Allgemeine Schwierigkeiten bei der Differenzierung von PS-Zellen, insbesondere in respiratorische Zellen

Ps-Zellen besitzen die Fähigkeit spontan in Zelltypen aller drei Keimblätter Mesoderm, Endoderm und Ektoderm zu differenzieren [118]. Eine hundertprozent zielgerichtete Differenzierung in nur einen oder wenige Zelltypen ist derzeit noch nicht zu erreichen, so dass Differenzierungskulturen pluripotenter Stammzellen überwiegend eine sehr heterogene Zusammensetzung aufweisen [180]. Dies bedingt die genaue Identifizierung des gewünschten Zelltyps. Anders als bei Kardiomyozyten, die in Differenzierungskulturen spontan anfangen zu kontrahieren [194], so dass ein erster mikroskopischer Nachweis ohne spezielle Methoden möglich ist, ist eine rein morphologische Identifizierung von Zellen des respiratorischen Epithels nicht möglich. Sollen neben der Identifizierung über eine spezifische Immunfärbung auch lebende Zellen angereichert werden, müssten

entsprechende spezifische Oberflächenmarker bekannt sein oder Markergene transgen eingebracht werden. Erstere fehlen insbesondere bei Zelltypen des Lungenepithels und eine spätere klinische Anwendung von transgenen Zellen ist wiederum kritisch, da Insertionsmutagenesen in diesen Zellen nicht ausgeschlossen werden können.

Kann das Problem der Visualisierung für derartige Zellen gelöst werden, stellt sich die Frage einer geeigneten Isolierungsmethode. In späten Differenzierungskulturen ist die Bildung einer extrazellulären Matrix so stark ausgereift, dass eine vollständige Vereinzelung der Zellen beeinträchtigt ist. Hierdurch wird die Aufreinigung eines speziellen Zelltyps erschwert und die Reinheit reduziert.

Ein weiteres Problem stellt die Kontamination der Differenzierungskulturen mit noch undifferenzierten, pluripotenten Stammzellen dar, welche ein tumorigenes Potential besitzen [120]. Vor einer Transplantation in den Patienten müsste eine vollständige Eliminierung dieser Zellen gewährleistet sein.

Hinzu kommt eine derzeit noch geringe Ausbeute an respiratorischen Zelltypen in den Differenzierungskulturen unter Verwendung aktueller Protokolle [180-185, 187, 190]. Wie in vorherigen Abschnitten erwähnt, gehen aus dem Endoderm neben dem Lungenepithel auch Zelltypen weiterer Organe wie z.B. Schilddrüse oder Pankreas hervor [195]. Die Komplexität der Genregulierung über Wachstumsfaktoren bzw. Transkriptionsfaktoren während der Embryonalentwicklung erschweren die Nachahmung entsprechender Bedingungen *in vitro*. Zudem beeinflussen sich in der Zellkultur benachbarte Zellen (entsprechend der embryonalen Entwicklung [52, 56]), untereinander, so dass der Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung von exogen eingebrachten Faktoren gemindert sein kann. Dies gilt insbesondere für EB-basierte Protokolle aufgrund der Komplexität der entstehenden Aggregate, in denen starke Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zelltypen auftreten [196].

1.7. Zielsetzung

hES-Zellen könnten als geeignete Zellquelle für den Ersatz von geschädigtem respiratorischen Gewebe oder Wirkstoffscreening verwendet werden. Jedoch müssten zwei gravierende Probleme bezüglich der Verwendung von hES-Zellen berücksichtigt werden. Zum Einen ist der Umgang mit hES-Zellen ethisch umstritten, zum Anderen besteht für die klinische Anwendung das Problem der nicht patienteneigenen Zellquelle, so dass eine immunologische Inkompatibilität mit dem Empfänger bestehen würde. Die Verwendung von

hiPS-Zellen bietet erstmals eine ethisch unbedenkliche autologe Alternative zu hES-Zellen und die Möglichkeit zum Disease Modeling.

Da zur Zeit nur eine begrenzte Zahl von Studien vorhanden ist, die eine Differenzierung von PS-Zellen in Zelltypen des Atemwegsepithels untersucht haben [183, 187, 190, 197-199], sind bisher nur wenige bis keine Schlüsselfaktoren für die Differenzierung von PS-Zellen in Atemwegsepithelzellen bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein effizientes und zuverlässiges Protokoll für die Differenzierung von mES- und miPS-Zellen, in Atemwegsepithelzellen etabliert werden. Ein besonderer Fokus sollte daher auf Clara-Zellen gelegt werden, da sie in der Regeneration des Atemwegsepithel involviert sind, indem sie als Vorläuferzellen für zillientragende Zellen agieren. Zudem schützen sie das Lungenepithel über die Sezernierung z.B. von CCSP und über die Fähigkeit Fremdstoffe zu metabolisieren [200-204].

Für die vorliegende Dissertation sollten daher:

- 1) die Bildung von definitivem Endoderm in mES-Zellen mit Hilfe einer transgenen mES-Zelllinie optimiert werden und auf miPS-Zellen übertragen werden.
- 2) eine Identifizierung von spezifischen Schlüsselfaktoren für die Differenzierung von PS-Zellen in Atemwegsepithelzellen (insbesondere Clara-Zellen) erfolgen.
- 3) erste miPS-Klone aus transgenen Mäusen generiert werden, die eine Clara-Zell-spezifische Reporterexpression tragen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Autoklav	GVA 460 Typ 2239 EA	(Fritz Gössner, Hamburg) (FEDEGARI AUTOCLAVI S.p.A., Albuzzano, Italien)
Bioanalyzer	Agilent 2100	(Agilent, Böblingen)
Drucker Geldoc	DIGITAL GRAPHICS PRINTER UPD 890	(SONY, Tokyo, Japan)
Eismaschine	ZBE 150	(Ziegra, Isernhagen)
Einfrierbox	Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	(Nunc, Neerijse, Belgien)
Feinwaage	BP 210 S	(Sartorius, Göttingen)
Geldokumentation	Universal Hood II	(BioRad, München)
Horizontalgelkammer	Sub-Cell	(BioRad, München)
Inkubatoren	MCO-20AIC	(Sanyo, Bad Nenndorf)
Kolbenhubpipette	Ripette®	(Roth, Karlsruhe)
Magnetrührer	Typ MR 2002 Typ RH	(Heidolph, Schwabach) (IKA® Labortechnik, Staufen)
Mikroskop	Axio Observer A1 Olympus BX40 Zellkulturmikroskop CKX41	(Zeiss, Göttingen) (Olympus, Hamburg) (Olympus, Hamburg)
Mikrowelle	MW 13141E	(Amica, Ascheberg)
PCR- Thermocycler	Eppendorf mastercycler Eppendorf realplex	(Eppendorf, Hamburg) (Eppendorf, Hamburg)
pH- Meter	pH 539	(WTW, Weilheim)
Pipetten	0,5 - 10 µl 10 - 100 µl 100 - 1000 µl 100 - 1000 µl	(Eppendorf, Hamburg) (Eppendorf, Hamburg) (Eppendorf, Hamburg) (Eppendorf, Hamburg)
Pipetman	1 - 10 µl 2 - 20 µl 50 - 200 µl 200 - 1000 µl	(Gilson, Middletown, USA) (Gilson, Middletown, USA) (Gilson, Middletown, USA) (Gilson, Middletown, USA)
Pipettierhilfe	Pipetus®	(Hirschmann, Eberstadt)
Sterilwerkbank	HeraSafe Typ HS 15	(Heraeus Instruments, Osterode)

	Gelair BSB6	(Flow Laboratories, Meckenheim)
Spektrophotometer	Nano Drpo, ND-10000	(PeqLab, Erlangen)
UV-Leuchttisch	Transilluminator TI 1	(Biometra, Göttingen)
Vortexer	MS1 Minishaker	(IKA- Works, Wilmington, USA)
	VELP scientifica F202A0175	(StarLab, Hamburg)
	Vortexer	(Ika-Works, Wilmington, USA)
Wasserbad	GFL 1083	(Heraeus Instruments, Osterode)
Zellzählkammer		(Neubauer HBG)
Zentrifuge	Biofuge fresco	(Heraeus, Osterode)
	Heraeus Multifuge 3SR+	(Thermo Scientific)
	Megafuge 1.0	(Heraeus Instruments, Osterode)
	PICO Fuge	(Stratagene, La Jolla, USA)
	Rotana 460 RS	(Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bechergläser	100 ml bis 1000 ml	(Schott, Mainz)
Culture Slides	BD- Falcon™	(BD Bioscience, Bedford, USA)
Druckerpapier Geldoc	Type II SONY UPP-110HD, 110 mm x 20 mm	(SONY, Tokyo, Japan)
Deckgläschen	22 mm	(Menzel Gläser)
	24x 60 mm	(Menzel Gläser)
Einweg Injektionskanülen	Microlance, Nr. 1	(BD, Franklin Lakes, USA)
Einfrierröhrchen	1 ml Cryoröhrchen	(Greiner, Frickenhausen, Österreich,)
Einwegspritzen	2 ml	(Braun, Melsungen)
	10 ml	(Braun, Melsungen)
Einwegpipetten	1 ml – 50 ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
FACS Probenröhrchen	0,5 ml	(Sarstedt, Nümbrecht)
Fettstift	Dako Pen	(Dako, Glostrup, Dänemark)
Labortücher	Kimtech	(Kimberly- Clark®, England)
Messzylinder	100 ml bis 1.000 ml	Isolab Laborgeräte GmbH, Wertheim
Objektträger	96x 26 mm	(Menzel Gläser)
Parafilm	Parafilm M	(Pechiney Plastic Packaging, USA)
Reaktionsgefäße	0,2 ml PCR- Softstrips	(Biozym, Hessisch Oldendorf)
	0,5 ml Reaktionsgefäße	(Sarstedt, Nürnberg)
	1,5 ml Reaktionsgefäße	(Sarstedt, Nürnberg)
	15 ml Falcon- Röhrchen	(Greiner, Frickenhausen, Österreich)
	50 ml Falcon- Röhrchen	(Greiner, Frickenhausen, Österreich)

Spitzen	ohne Filter	0,1 bis 10 µl	(Roth, Karlsruhe)
		1 bis 200 µl	(Sarstedt, Nürnberg)
		100 bis 1.000 µl	(Sarstedt, Nürnberg)
	mit Filter	0,1 bis 10 µl	(Star Lab, Merenschwand, Schweiz)
		1 bis 200 µl	(Star Lab, Merenschwand, Schweiz)
100 bis 1.000 µl		(Star Lab, Merenschwand, Schweiz)	
		Combitips plus 1,0 ml	(Eppendorf, Hamburg)
Sterilfilter		0,22 µm Rotilabo®	(Roth, Karlsruhe)
		0,45 µm	(Nalgene, Neerijse, Belgien)
		500 ml Filter Top	(BiochromeAG, Berlin)
Zellkulturgefäße		96- Well- Platten	(Nunc, Neerijse, Belgien)
		24- Well- Platten	(Nunc, Neerijse, Belgien)
		12- Well- Platten	(Nunc, Neerijse, Belgien)
		6- Well- Platten	(Nunc, Neerijse, Belgien)
		100 mm Gewebekulturschalen	(Greiner, Kremsmünster)
Zellschaber		Einweg Zellschaber 25 cm	(Sarstedt, Nümbrecht)
Zellsiebe		40 µm	(Becton Dickinson, Heidelberg)
		100 µm	(Becton Dickinson, Heidelberg)

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Agarose NEEO Ultra Qualität	(Roth, Karlsruhe)
Ampuwa (aq.dest.)	(MHH Apotheke, Hannover)
Bovines Serumalbumin (BSA)	(Sigma, Deisenhofen)
β-Mercaptoethanol	(Invitrogen, Karlsruhe)
8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphat sodium salt	(Sigma, Deisenhofen)
Chloroform	(Sigma, Deisenhofen)
Desoxyribonucleotide Ultra Pure dNTP's Set	(Amersham, Freiburg)
Dexamethasone-Water soluble	(Sigma, Deisenhofen)
4,6- Diamino 2Phenylindol (DAPI)	(Sigma, Deisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, Deisenhofen)
Dimethylformamid (DMF)	(Sigma, Deisenhofen)
Essigsäure	(J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
Ethanol, absolut	(J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Sigma, Deisenhofen)
Ethidiumbromid 10mg/ml	(Sigma, Deisenhofen)
FACS Clean	(Becton Dickinson, Heidelberg)
FACS Flow	(Becton Dickinson, Heidelberg)
FACS Rinse	(Becton Dickinson, Heidelberg)

Fibronektin (bovines)	(Sigma, Deisenhofen)
Fetales Kälberserum (FCS)	(PAA, Cölbe)
	(HyClon, Logan, UK)
Gelatine Typ A (porcin)	(Sigma, Deisenhofen)
Glycerin	(Sigma, Deisenhofen)
GSK3-Inhibitor (Glycogen Synthase Kinase-3)	(Technische Chemie, Leibniz Universität, Hannover)
human recombinant Activin A	(PeproTechn Hamburg)
IDE-1	(Technische Chemie, Leibniz Universität, Hannover)
IDE-2	(Technische Chemie, Leibniz Universität, Hannover)
3-Isobutyl-1-methylxanthine	(Sigma, Deisenhofen)
Kaliumhexacyanoferrat II ($K_3Fe(CN)_6$)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumhexacyanoferrat III ($K_4Fe(CN)_6 \times H_2O$)	(Merck, Darmstadt)
Kollagenase Typ IV	(Invitrogen, Karlsruhe)
L-Glutamin	(Invitrogen, Karlsruhe)
LIF (leukemia inhibitory factor)	(MHH LEBAO, Hannover)
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumchlorid (NaCl)	(Sigma, Deisenhofen)
MEM nicht essentielle Aminosäuren	(Invitrogen, Karlsruhe)
Mountingmedium Immu- Mount	(Thermo, Pittsburgh)
Paraformaldehyd (PFA)	(Sigma, Deisenhofen)
Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10000 $\mu g/ml$)	(BiochromAG, Berlin)
Phenol: Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tabletten	(Sigma, Deisenhofen)
PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+}	(Invitrogen, Karlsruhe)
Propidium Jodid (PI)	(Sigma, Deisenhofen)
recombinant human Activin A	(PeproTech, Hamburg)
recombinant human KGF	(PeproTech, Hamburg)
ROCK-Inhibitor (Rho-associated kinase)	(Organische Chemie, Leibniz Universität, Hannover)
Salzsäure (HCl)	(Merck, Darmstadt)
Serum Replacement (SR)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl) aminomethan (Tris-Base)	(Merck, Darmstadt)
Triton X- 100	(Sigma, Deisenhofen)
TRIZOL® Reagent	(Invitrogen, Karlsruhe)
Trypan Blau	(PAA, Cölbe)
Trypsin	(Sigma, Deisenhofen)
Trypsin/EDTA Solution (10 x)	(BiochromAG, Berlin)

X-β-Gal (Roth, Karlsruhe)

2.1.4. Lösungen und Puffer

Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS) (1x)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Färbepuffer:	1 % BSA in PBS w/o
Gelatinelösung:	1 % (10g/L) in PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Gelelektrophorese-Puffer (25 x TAE-Puffer):	1 M Tris-acetate 25 mM Essigsäure 25 mM EDTA pH 8,0
Kollagenase IV Lösung:	0,2 % in DMEM
PBS w/o:	1 Tablette in 200 ml bidest H ₂ O
4 % PFA:	in PBS w/o
PI-Lösung:	1:75 in PBS w/o
Poly-L-Lysin-Lösung:	1:10 in bidest. H ₂ O
TBS (10x):	0,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan 1,625 M NaCl auf 4 l mit H ₂ O auffüllen pH 7,6
TBS+ (Blockpuffer):	95 % 1x TBS 0,025 % Triton-X-100 5 % Serum des Tieres, aus dem der Sekundärantikörper isoliert wurde
Trypanblaulösung:	1:10 in bidest. H ₂ O
Trypsin-Lösung:	Trypsin/EDTA Lösung 0,05/0,02 % (w/v) in 10 % PBS
X-Gal-Färbelösung:	1 M MgCl ₂ 500 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 500 mM K ₄ Fe(CN) ₆ x H ₂ O 1 mg/ml X-β-Gal-Substrat 97,5 % PBS w/o

2.1.5. Gebrauchsfertige Kits

ABSOLUTE™ QPCR SYBR® GREEN MIX	(Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)
Go-Taq Polymerase	(Promega, Mannheim)
ImaGeneGreen™ C12FDG LacZ Gene Expression Kit	((Invitrogen, Karlsruhe))
NucleoSpin RNA II Kat. 740955.250	(Macherey Nagel, Düren)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthese Kit	(Fermentas, ST Leon-Rot)

2.1.6. Molekulargewichtsmarker

Small SmartLadder SF™ (Eurogentec, Seraign, Belgien)
 (9 Banden zwischen 100 bp und 1.000 bp)

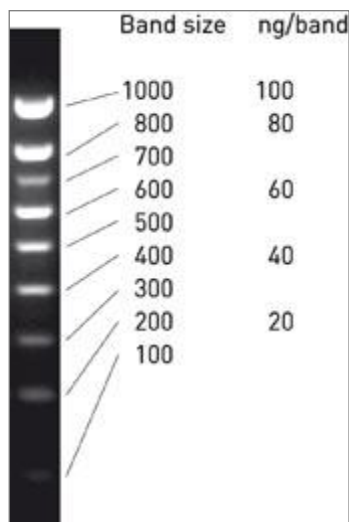


Abb. 2.1: Molekulargewichtsmarker Small SmartLadder

2.1.7. Oligonukleotide

Tabelle 2: Oligonukleotide für Differenzierungsnachweise in Maus

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Ziel	Amplifikatgröße cDNA (bp)	T _{Annealing}
r β-actin sense	CTTGATCTTCATGGTGCTAGGA	gi 145966868	312 bp	63 °C
r β-actin ras	GGTGCTGAAGGTAATGTGTCA			
CCSP sense	CCAGCTGAAGAGACTGGTGGATAC	gi 134053927	180 bp	63 °C
CCSP ras	AGGAGCCGAGGAGACACAGG			
GAPDH sense	GGC CAA GGT CAT CCA TGA	gi 7669491	352 bp	55 °C
GAPDH ras	TCA GTG TAG CCC AGG ATG			
Foxa2 sens	GCTCATGTATGTGTTTCATGCCATTC	gi 153945803	294 bp	63 °C

Foxa2 ras	GGAGCCGTGAAGATGGAAGG			
Foxj1 sens	ACTTCTTCCAGAACCTTCCTCTGG	gi 226693375	177 bp	63 °C
Foxj1 ras	ACAGGCTGAGCCGGAGTGG			
SP-B sens	TGCCTAGGAGCCAGGATGC	gi 22296600	200 bp	63 °C
SP-B ras	TGGTGGTGGTCTGTAGTTAGAGCTG			
SP-C allg. sense	AGCAAAGAGGTCCTGATGGAGA	gi 6755479	316 bp	63 °C
SP-C allg.ras	GGAGCCGCTGGTAGTCATACA			
Sox17 sens	CATGCGCTTCACCTGCTTG	gi 146134353	194 bp	63 °C
Sox17 ras	AGCGGTTGGCACAGCAGAAC			
Tubb 4 sens	CCGGCACCATGGACTCTG	gi 31981938	145 bp	63 °C
Tubb 4 ras	TCCAGGACGGCATCCACTAAC			

2.1.8. Antikörper

2.1.8.1. Primärantikörper für Immunfluoreszenz

Tabelle 2: Primärantikörper

<i>Antigen</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti.human SOX17	Goat, monoklonal, IgG	0,2 mg/ml	1:200	R&D Systems, Wiesbaden
CC10 (T-18)	Goat, polyklonal, IgG	0,2 mg/ml	1:100	Santa Cruz, Heidelberg
FOXA2	Rabbit, polyklonal, IgG	1 mg/ml	1:1000	Millipore, Darmstadt
OCT 3/4	Mouse, monoklonal, IgG _{2B}	0,2 mg/ml	1:100	Santa Cruz, Heidelberg
SOX2	Goat, polyklonal, IgG	0,2 mg/ml	1:200	Santa Cruz, Heidelberg
TTF1	Mouse, monoklonal, IgG ₁	0,088 mg/ml	1:200	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8.2. Isotypenkontrollen für Immunfluoreszenz

Normal Goat IgG	1 mg/ml	(R&D Systems, Wiesbaden)
Normal rabbit IgG	10 mg/ml	(Millipore, Darmstadt)
Mouse IgG _{2B}	0,1 mg/ml	(Dako, Glostrup, Denemark)
Mouse IgG ₁	0,1 mg/ml	(Dako, Glostrup, Denemark)

2.1.8.3. Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

Tabelle 3: Sekundärantikörper

<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Donkey DyLight 488 anti-rabbit IgG	1,5 mg/ml	1:300	(Jackson, Baltimore, USA)
Donkey DyLight 549 anti-mouse IgG	1,5 mg/ml	1:300	(Jackson, Baltimore, USA)
Donkey DyLight 488 anti-mouse IgG	1,5 mg/ml	1:300	(Jackson, Baltimore, USA)
Donkey DyLight 549 anti-goat IgG	1,5 mg/ml	1:300	(Jackson, Baltimore, USA)
Donkey Cy5 anti-Goat IgG	1,5 mg/ml	1:300	(Jackson, Baltimore, USA)

2.1.8.4. Primärantikörper für Durchflusszytometrie (FACS)

Tabelle 4: Primärantikörper für FACS

<i>Bezeichnung</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
CD4-APC human	1mg/ml	1:10, 1:100	(Miltenyi Biotec, Gladbach)

2.1.8.5. Isotypenkontrollen für FACS

Tabelle 5: Isotypkontrollen für FACS

<i>Bezeichnung</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Mouse-APC human	1mg/ml	1:10, 1:100	(Miltenyi Biotec, Gladbach)

2.1.9. Medien

2.1.9.1. Basalmedien

Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) high glucose, ohne L- Glutamin	(Invitrogen, Karlsruhe)
DMEM für Kollagenase	(Invitrogen, Karlsruhe)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)+ GlutaMAX	(Invitrogen, Karlsruhe)
Advanced Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	(Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.9.2. Kulturmedium für murine embryonale Fibroblasten (Fibroblastenmedium)

90 % DMEM
10 % Fötale Kälberserum (FCS) (PAA, Cölbe)
1 % MEM nicht essentielle Aminosäuren
2 mM L-Glutamin

2.1.9.3. Kulturmedium für murine embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen (Kultivierungsmedium)

85 % DMEM
15 % FCS (PAA,Cölbe)
1% MEM nicht essentielle Aminosäuren
0,2 mM L-Glutamin
0,1 mM β -Mercaptoethanol
10 % LIF
Für die Gelatinekultur (FB-frei) wurden zusätzlich 5 % GSK3-Inhibitor eingesetzt.

2.1.9.4. Einfriermedium für murine embryonale Fibroblasten

90 % FCS (PAA, Cölbe)
10 % DMSO

2.1.9.5. Einfriermedium für murine embryonale und induzierte pluripotente Stammzellen

60 % Kultivierungsmedium

20 % DMSO

20 % FCS (PAA, Cölbe)

2.1.9.6. Serumhaltiges Differenzierungsmedium (IMDM) für Embryoid Bodies (EBs)

85 % IMDM

15 % FCS von Tag 0 bis Tag 7 (HyClon, Logan, UK)

15% SR von Tag 7 bis Ende der Differenzierung

1 % MEM nicht essentielle Aminosäuren

0,2 mM L-Glutamin

0,1 mM mM β - Mercaptoethanol

2.1.9.7. Serumfreies Differenzierungsmedium (RPMI) für Monolayer (ML)

100 % advanced RPMI

0,2 mM L-Glutamin

2.2. Methoden

2.2.1. Methoden zur Zellkultivierung

Da Zellkulturmedien, sowie die Inkubation der Zellkulturen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit ein optimales Biotop für Mikroorganismen wie Pilze, Hefen und Bakterien bieten, verlief das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen unter sterilen Bedingungen und unter einer Sterilen Werkbank, um dessen Kontamination und negativen Beeinflussung durch Mikroorganismen zu verhindern. Zudem wurden alle Gebrauchsgegenstände vor der Anwendung mit 70 %igem Ethanol abgesprüht, sowie Lösungen und Medien entsprechend durch Autoklavieren, Trockenhitze oder Sterilfiltration sterilisiert. Die Langzeitlagerung hochgezogener und isolierter eukaryotischer Zellen fand in flüssigem Stickstoff statt.

2.2.1.1. Zellzahlbestimmung

Um eine Bestimmte Menge an Zellen pro Kulturgefäß auszusäen, musste die Zellzahl ermittelt werden. Dafür wurde eine Neubauerzählkammer verwendet. Nach pelletieren der Zellen wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in eine äquivalente Menge Kultivierungsmedium aufgenommen. Da nur die vitalen Zellen bestimmt werden sollten, wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau 1:10 versetzt. Das Zytoplasma toter Zellen wird durch das Trypanblau dunkelblau angefärbt, womit eine Unterscheidung heller erscheinender lebender Zellen möglich ist. Die Zählkammer wurde für die Zählung mit einem Deckgläschen bestückt und ein Tropfen des Zellsuspensionsgemisches unter das Deckglas auf die Kammer pipettiert. Es wurden alle lebenden Zellen in vier Großquadraten unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl mit folgender Formel bestimmt:

$$\frac{N}{Q \cdot V_K} \cdot \frac{V_G}{V_Z} = x$$

- N = Anzahl der gezählten Zellen (Zellen)
Q = Anzahl der ausgezählten Großquadrate
V_G = eingesetztes Gesamtvolumen (Trypanblau + Zellsuspension)
V_Z = Volumen der eingesetzten Zellsuspension
V_K = Kammervolumen über einem Großquadrat (=10⁻⁴ ml)
X = Zelldichte (Zellen/ml)

2.2.1.2. Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Für eine bessere Anheftung der Zellen an den Kulturgefäßboden wurden Kulturgefäße mit verschiedenen Matrixmolekülen beschichtet.

Für das Aussäen von wachstumsinaktivierten MEFs wurden 6-Well-Platten der Firma *Nunc* verwendet, die mit 1 %iger Gelatine beschichtet wurden. In 100 ml PBS mit Mg²⁺/Ca²⁺ (DPBS) wurde 1 g *porcine* Gelatine (Typ A) gelöst, oder schon fertig angesetzte 1 %ige Gelatine im Wasserbad bei 37 °C verflüssigt. Die verflüssigte Gelatine wurde in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte pipetiert und für mindestens 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Gelatine abgenommen. Die Platte wurde mit etwa 1 ml pro Vertiefung mit DPBS gewaschen und mit 2 ml MEF-Medium benetzt.

Für die feederzellfreie Kultivierung und Passagierung von mES- und miPS-Zellen, sowie Differentierungen von Embryoid bodies (EBs) wurden 6-Well-Platten mit einer 0,1 %igen Gelatinebeschichtung verwendet. Dazu wurde die fertig angesetzte 1 %ige Gelatine im Wasserbad bei 37 °C verflüssigt und 1:10 mit DPBS verdünnt. Die beschichtete 6-Well-Platte wurde mindestens für 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das hydrolysierte Kollagen abgenommen und mit offener Platte unter der sterilen Werkbank getrocknet, bis der Kulturboden milchig-trüb erschien. Jede Vertiefung der 6-Well-Platte wurde nun mit 3 ml Kultivierungsmedium benetzt.

Differentierungen des Typs Mono Layer (ML) wurden auf Platten mit 0,1 %iger Gelatine und 5 µg/ml Fibronectin (*bovines*) gehalten. Nachdem die 0,1 %ige Gelatine getrocknet war, wurde 5 µg/ml Fibronectin, welches in DPBS verdünnt wurde, auf die Vertiefungen pipetiert. Damit sich die bereits getrocknete Gelatine nicht wieder verflüssigte und sich somit ein Film von Fibronectinmolekülen darüber bilden konnte, wurde die 6-Well-Platte für mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Fibronectin verworfen und Medium vorgelegt.

2.2.1.3. Isolierung muriner embryonaler Fibroblasten

Murine embryonale Fibroblasten, oder auch als Feeder bezeichnet (MEFs), wurden zur Erhaltung der Pluripotenz von undifferenzierten murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen), sowie murinen induzierten pluripotenten Stammzellen (miPS-Zellen) verwendet. Als Zellunterlage in einer Co-Kultur wurde der undifferenzierte Zustand von mES- und miPS-Zellen über die Abgabe bestimmter Faktoren in das Zellkulturmedium gewährleistet.

Zur Isolierung von MEFs wurden Mäuseembryonen (13 d.p.c.) verwendet. Dazu wurden trächtige weibliche Mäuse durch Überstreckung des Schwanzes getötet. Zur Desinfektion wurden die Muttertiere gründlich mit 70%igem Ethanol abgesprüht. Der Bauchraum der Mäuse wurde mit Hilfe eines Skalpels unter der Sterilen Werkbank geöffnet. Nachdem die Uteri vorsichtig herauspräpariert wurden, wurden diese zur Tötung der Tag 13 Embryonen in eiskaltem PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PBS w/o) überführt. Im PBS w/o wurden anschließend die Embryonen aus den Uteri entnommen und Gliedmaßen, Kopf sowie Innereien der Föten entfernen. Darauf folgte ein 3-maliges waschen der Reste der Embryonen mit 10 ml PBS w/o. Mit Hilfe von 2 ml 0,05 % / 0,2 % Trypsin/EDTA (TE) wurden die Reste mit einer geeigneten Schere für 14 min zerkleinert. Durch zusätzlicher Zugabe von 15 ml TE und Überführung der Zellsuspension in einem 250 ml Erlenmeierkolben wurde die Dissoziation des Gewebes für 15 min bei 37 °C auf einem Magnetrührer im Brutschrank fortgesetzt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 51 ml Fibroblastenmedium (MEF-Medium) verwendet. Nach Resuspension des Gemisches durch auf- und abpipettieren mit einer 10 ml Pipette wurde die Suspension noch einmal mit 22 ml PBS w/o verdünnt und anschließend über ein Zellsieb mit 100 µm Porendicke filtriert. Das Filtrat wurde für 10 min bei 500 x g bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpelltets in je 2 ml MEF-Medium aufgenommen, gepoolt und anschließend die Zellzahl über eine Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellen wurden dann mit einer Dichte von 3×10^6 pro 100 x 20 mm Kulturgewebsschalen in 10 ml MEF-Medium ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden bis zu einer vollständigen Konfluenz im Zellbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 Gehalt inkubiert und für eine Langzeitlagerung in 90 % / 10 % FCS / Dimethylsulfoxid (DMSO) im flüssigen Stickstoff eingefroren.

2.2.1.4. Auftauen, Kultivieren, Inaktivieren und Einfrieren von MEFs

Für das Auftauen der MEFs wurden zunächst 9 ml pro Kryoröhrchen MEF-Medium kalt gestellt. Das Kryoröhrchen, in dem die Zellen gelagert wurden, wurde direkt aus dem flüssigen Stickstoff bei 37 °C im Wasserbad geschwenkt und vorsichtig angetaut, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden war. Die angetaute 1 ml Zellsuspension wurde in das vorgekühlte MEF-Medium überführt und bei 500 x g für 5 min und bei 4 °C zentrifugiert. Währenddessen wurde pro Kryoröhrchen eine 150 x 20 mm Gewebekulturschale mit 20 ml vorgewärmten Medium befüllt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen, resuspendiert und in die jeweilige Schale ausgesät. Es folgte eine über Nacht Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Alle zwei bis drei Tage, nachdem die Zellen eine 80 bis 90 %ige Konfluenz erreichten, wurden diese, je nach Proliferationsgeschwindigkeit, zwischen 1:2 und 1:3 passagiert. Dafür wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen zwei Mal mit PBS w/o gewaschen. Zum Ablösen der Zellen von dem Schalenboden wurden die Zellen in 8 ml TE bei 37 °C und 5 % CO₂ für 3 bis 5 min inkubiert. Das Ablösen des Zellrasens wurde nach der Inkubation zusätzlich durch Klopfen am Schalenrand gefördert. Durch die dreifache Menge an MEF-Medium wurde die Reaktion gestoppt und anschließend bei 4 °C und 500 x g für 5 min pelletiert, Überstand verworfen und anschließend im entsprechenden Volumen MEF-Medium resuspendiert und ausgesät. Bevor die MEFs als Kultivierungsgrundlage für mES- und miPS-Zellen verwendet werden konnten, wurden die MEFs bis Passage 3 gesplittet und letztendlich mit γ -Strahlung behandelt und somit wachstumsinaktiviert. Für die Bestrahlung wurden die Zellen wie beim Passagieren vereinzelt. Um eine optimale Bestrahlung der Zellen zu gewährleisten, wurden höchstens vier Pellets in ein 50 ml Falcon gepoolt und auf 50 ml mit MEF-Medium aufgefüllt und anschließend mit 30 Gy bestrahlt. Darauf folgte eine Zellzahlbestimmung mit einer Neubauerzählkammer. Für das optimale Verhältnis bestrahlte MEFs (FB) zu mES- oder miPS-Zellen in der Kultur sollten pro 6-Well 0,35 x 10⁶ FB ausgesät werden. Somit wurden pro Kryoröhrchen 2,4 x 10⁶ Zellen in 90 % / 10 % FCS/DMSO zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Vor dem Auftauen der FBs wurde zunächst pro Kryoröhrchen eine 6-Well-Platte mit 1 % Gelatine 20 min bei 37 °C im Brutschrank beschichtet und danach mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden pro 6-Well 2 ml MEF-Medium vorgelegt. Nach dem Auftauen der FBs

wurde das Pellet in 6 ml MEF-Medium aufgenommen homogenisiert und auf die vorbeschichtete 6-Well-Platte verteilt. Nach über Nacht Inkubation konnten die ausgesäten Zellen für die Kultur von mES- oder miPS-Zellen verwendet werden.

2.2.1.5. Kultivierung von mES- und miPS-Zellen

Zur Pluripotenzerhaltung wurden mES- und miPS-Zellen auf einem Monolayer von FB und in Kombination mit LIF haltigem Kultivierungsmedium in einer 6-Well-Platte kultiviert. Vor dem Ansätzen einer Differenzierung wurden die Stammzellen mindestens 2 Passagen FB frei kultiviert, um ein falsch positives Ergebnis zu umgehen (Näheres siehe Abschnitt 2.2.1.6.1.).

Alle drei bis vier Tage wurden die pluripotenten Kolonien vereinzelt, passagiert und entweder auf frischen FB oder frisch beschichteten 6-Well-Platten ausgesät.

2.2.1.5.1. Das Auftauen, Passagieren und Einfrieren von pluripotenten murinen Zellen

Eine Langzeitlagerung von mES- und miPS-Zellen fand im flüssigen Stickstoff statt. Bevor die Zellen aufgetaut wurden, wurde zunächst Kultivierungsmedium für mES- und miPS-Zellen auf Eis kalt gestellt. Zusätzlich wurden auf den vom Vortag vorbereiteten FB's je 6-Well 2 ml Kultivierungsmedium pipettiert und im Brutschrank aufgewärmt. Das Kryoröhrchen, in dem sich die mES- oder miPS-Zellen befanden, wurde vorsichtig bei 37 °C im Wasserbad so lange geschwenkt, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen von Zellen zu sehen war. Die angetaute 1 ml Zellsuspension wurde mit einer 1000 µl Pipette vorsichtig in ein 15 ml Falcon überführt. Daraufhin wurden 6 ml vorgekühltes Kultivierungsmedium tropfenweise unter Schütteln vorsichtig zupipettiert. Nach einer 3 minütigen Zentrifugation bei 140 x g wurde das Zellpellet in 1 ml Kultivierungsmedium aufgenommen und auf die vorbereitete 6-Well Platte mit FB ausgesät. Alle 3 bis 4 Tage wurden die angewachsenen Kolonien passagiert. Um die mES- und miPS-Zellen von den FB's abzulösen, wurden die Kolonien mit (je 6-Well) 500 µl 0,2 %iger Collagenase IV im Brutschrank bei 37 °C für 3 min enzymatisch dissoziiert. Für eine Reaktionsabschwächung der 500 µl Collagenase IV wurde diese mit mindestens 1 ml PBS w/o verdünnt. Die abgelösten Kolonien wurden bei 140 x g für 3 min pelletiert. Zur Zellverereinzlung der Kolonien wurde das Pellet in 500 µl ES-Trypsin aufgenommen und bei 37 °C im Wasserbad für 30 sec kräftig geschwenkt. Sofort wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe der dreifachen Menge an FCS

haltigem Medium gestoppt. Nach letzter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml Kultivierungsmedium vorsichtig resuspendiert und 3×10^5 Zellen pro 6-Well ausgesät. Die darauffolgenden 3 bis 4 Tage wurden die mES- und miPS-Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt inkubiert.

Für eine Langzeitlagerung wurden die mES- und miPS-Zellen in 60 % / 20 % / 20 % Kultivierungsmedium / DMSO / FSC (ES-Einfriermedium) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Wie beim Passagieren wurden die Kolonien zunächst mit 0,2 %iger Collagenase IV enzymatisch dissoziiert und die Reaktion durch Verdünnung abgeschwächt. Nach Pelletierung der Kolonien bei 140 x g für 3 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl eisgekühltem Kultivierungsmedium überführt. Unter Schütteln wurde pro Pellet 500 µl ES-Einfriermedium vorsichtig zugetropft. Das 1 ml Zellgemisch wurde in ein Kryoröhrchen überführt. Zum langsamen und schonenden Einfrieren der Zellen wurde das Kryoröhrchen im Nalgene™ *Cryo 1 °C Freezing Container* bei – 80 °C über Nacht gelagert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in den flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.6. Die Differenzierung von mES- und miPS-Zellen

2.2.1.6.1. Die FB - freie Kultivierung von mES- und miPS-Zellen

Vor Einleitung der Differenzierung von mES- und miPS-Zellen wurden diese für mindestens 2 Passagen und höchstens 10 Passagen FB-frei auf 0,1 % Gelatine kultiviert, um somit ein falsch positives Ergebnis durch FB kontaminierter Differenzierungskulturen zu umgehen. Zum Pluripotenzerhalt der mES- und miPS-Zellen wurde zusätzlich zum selbstproduzierten hekLIF 0.5 µM Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitor (GSK-i) dem Kultivierungsmedium zugesetzt. Das Passagieren der pluripotenten Zellen auf FB-freier Basis wurde ähnlich wie das Passagieren auf FB durchgeführt. Allerdings wurde das Ablösen der Kolonien mit der 0,2 % Collagenase IV statt 3 min nur 30 sec im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden auch hier alle 3 bis 4 Tage vereinzelt und Passagiert.

2.2.1.6.2. Die EB – basierte Differenzierung von mES- und miPS-Zellen

Nach Vereinzlung der pluripotenten Zellen wurde das Pellet in einer adäquaten Menge Serum-haltigem Differenzierungsmedium (IMDM) für das EB-basierte

Differenzierungsprotokoll überführt. Das IMDM enthielt neben des Iscove's Modified Dulbecco's Medium zusätzlich 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren, 0,2 mM L-Glutamin und 0,1 mM β -Mercaptoethanol. Das IMDM wurde in den ersten sieben Tagen der Differenzierung mit 15 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt, welches anschließend bis zum Ende der Differenzierung durch 15 % Serum Replacment (SR) ersetzt wurde.

Zur Einleitung einer EB-basierte Differenzierung wurden 600 vereinzelte pluripotente Zellen pro 20 μ l IMDM an Tag 0 zu einem EB getropft („hanging drops“). An Tag 3 der Differenzierung wurden die EBs in Petrischalen überführt und für zwei weitere Tage in Suspension kultiviert. An Tag 5 wurden jeweils 10 EBs pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät, welches mit 0,1 % Gelatine beschichtet war. Bis zum Ende der Differenzierung wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.1.6.3. Die ML – basierte Differenzierung von mES- und miPS-Zellen

Vor Einleitung der ML-basierten Differenzierung wurden die undifferenzierten mES- und iPS-Zellekolonien vereinzelt. Für die Differenzierung wurden zwei voneinander unabhängige Basalmedien verwendet. Zum einen wurde das IMDM verwendet, welches auch für das EB-basierte Protokoll eingesetzt wurde, und zum anderen ein Serum-freies Differenzierungsmedium (RPMI), welches zum Advanced Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) 0,2 mM L-Glutamin enthielt.

Bei Verwendung des IMDM wurden an Tag 0 der Differenzierung 6×10^3 Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät, welche mit 0,1 % Gelatine und 5 μ g/ml bovinem Fibronectin beschichtet war. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Anders hingegen bei Verwendung des RPMI's. 6×10^3 vereinzelte pluripotente Zellen wurden an Tag -1 der Differenzierung in Kultivierungsmedium ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt adhärent wurden, wurde am darauffolgenden Tag (Tag 0 der Differenzierung) das Kultivierungsmedium durch das RPMI ersetzt. Auch hier erfolgte ein Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage.

Für die Differenzierung in Richtung definitivem Endoderm (DE) wurde dem RPMI entweder 50 ng/ μ l Activin A, 5 μ M IDE-1 oder 5 μ M IDE-2 von Tag 2 bis Tag 6 zugesetzt.

Die Differentierung von mES- und miPS-Zellen in Richtung Atemwegsepithel-ähnlichen Zellen hielt 26 Tage an. Für die Initiierung der Differenzierung Richtung Atemwegsepithel-ähnlichen Zell wurde zum einen 20 ng/ml rekombinantes humanes KGF (Keratinocyte Growth Factor, oder auch als FGF-7 bekannt) verwendet, welches an verschiedenen

Zeitpunkten der Differenzierung dem RPMI zugesetzt wurde. Zudem wurde von Tag 14 bis Tag 26 die drei Faktorkomponente DCI (10 nM Dexamethason, 0.1 mM 8-Bromoadenosin 3',5'-cyclic Monophosphat Natrium und 0.1 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin) eingesetzt, die entweder in Kombination mit oder ohne KGF verwendet wurde.

2.2.1.7. Herstellung der miPS-Klone aus der CCSP-rtTA2^S-M2/GFP-tetO₇-lacZ doppel-transgenen Maus

Unter der Verwendung eines polycistronischen lentiviralen Reprogrammierungsvektors (OKS) konnte die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Cantz (Hannover) die miPS-Klone C1L9 und C1L17 aus Schwanzspitzenfibroblasten der CCSP-rtTA2^S-M2/GFP-tetO₇-lacZ doppel-transgenen Maus generiert [205]. Für die Generierung der doppel-transgenen Maus wurde die CCSP-rtTA2^S-M2 Activatormauslinie 76 mit der Reportermaus GFP-tetO₇-lacZ gekreuzt. Die Kreuzung wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mall in Heidelberg unternommen.

Der Transaktivator wird unter einem tetrazyklinabhängigen Ratten-CCSP-Promotor exprimiert. In Anwesenheit des Transaktivators wird das Promotorelement tetO₇ aktiviert, welches die Expression von GFP und LacZ kontrolliert.

Das bedeutet, dass die aus der doppel-transgenen Maus generierten miPS-Klone nur dann GFP und lacZ exprimieren, wenn zum einen CCSP exprimiert wird und ein Tetrazyklin (hier Doxyzyklin) anwesend ist, wodurch auch der Transaktivator exprimiert wird, der für die Induktion des bidirektionalen LacZ/GFP Promotors sorgt.

2.2.2. Methoden zur Zellcharakterisierung

2.2.2.1. Immunfluoreszenzfärbung

Für den Nachweis relevanter Proteine werden spezifische Immunglobuline (primärer Antikörper) verwendet, die an das jeweilige Protein binden. Über fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper, die wiederum an den primären Antikörper binden, können anschließend die relevanten Proteine visualisiert werden.

Nach Fixierung der Zellen bzw. Gewebeschnitte mit 4 % Paraformaldehyd wurden diese 3 x mit PBS w/o gewaschen. Um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers zu vermeiden, wurden die Proben 20 min mit 1 x TBS+ bei Raumtemperatur (RT) geblockt, welches Serum von dem Tier enthielt, aus dem der sekundäre Antikörper stammte. Nach drei maligem waschen mit PBS w/o wurden die Präparate mit dem entsprechenden in Färbepuffer verdünnten primären Antikörper für mindestens 1 h bei RT und maximal 24 h bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde eine weitere Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 30 min bei RT angesetzt. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Proben nach einem letzten Waschschrift für 15 min bei RT mit DAPI (1,7 µg/ml in Färbepuffer) inkubiert.

Für die mikroskopische Analyse wurden Zellen auf Well-Platten mit PBS w/o benetzt und Gewebeschnitte mit Mountingmedium eingedeckelt. Mit Hilfe des Axio Observers A1 der Firma Zeiss wurden die Färbungen mikroskopisch beurteilt.

2.2.2.2. Färbung von β -Galaktosidaseaktivität mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal-Färbung)

Die aus der doppel-transgenen CCSP-rtTA2^S-M2/GFP-tetO₇-lacZ Maus hergestellten miPS-Klone C1L9 und C1L17 wurden an Tag 26 der Differenzierung mit einem Substrat der β -Galaktosidase gefärbt, das nach seiner Hydrolyse und Oxidation ein Indigoderivat bildet und blau ausfällt.

Für die CCSP-abhängige LacZ Expression wurden Differenzierungskulturen von Tag 24 bis Tag 26 mit 1 µg/ml Doxycyclin behandelt. An Tag 26 wurden die Differenzierungskulturen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend 2 x mit PBS w/o gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde für 10 min mit 0,2 % Triton X-100 bei RT inkubiert und 4 x mit PBS w/o gewaschen. Für die X-Gal-Färbelösung wurden 2 mM Magnesiumchlorid

(MgCl₂), 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) (K₃Fe(CN)₆), 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (IV) (K₄Fe(CN)₆ x 3H₂O) und 1 mg/ml X-Gal-Substrat in PBS w/o gelöst und auf 37 °C erwärmt. Die vorgewärmte Lösung wurde auf die Zellen gegeben und bei Dunkelheit und 37 °C für 2 bis 4 h inkubiert. Nach Eintritt der Blaufärbung wurde die Substratlösung entfernt, 2 x mit PBS w/o gewaschen und sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch analysiert.

2.2.2.3. Färbung von β -Galaktosidaseaktivität mit ImaGene Green™ C₁₂FDG lacZ Gene Expression Kit

Anders als das X-Gal ist das verwendete Substrat im ImaGreen™ C₁₂FDG lacZ Gene Expression Kit für vitale Zellen ungiftig, so dass die β -Galaktosidaseaktivität auch in lebenden Zellen analysiert werden konnte. Hierbei wird über Hydrolyse und Oxidation des C₁₂FDG ein grün fluoreszierendes Derivat gebildet, welches anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Nach Induktion der CCSP-abhängigen LacZ Expression von Tag 24 bis Tag 26 mit 1 μ g/ml Doxycyclin, wurden an Tag 26 Differenzierungskulturen zunächst für 30 min bei 37 °C mit 300 μ M Chloroquin behandelt, um die endogene β -Galaktosidase zu inhibieren und um somit ein falsch positives Ergebnis zu umgehen. Die Chloroquinlösung wurde entfernt und 33 μ M C₁₂FDG auf die Well-Platte gegeben, welches in vorgewärmtes DMEM ohne den Indikator Phenol Rot angesetzt wurde. Es fand eine Inkubation der Lösung bei 37 °C zwischen 20 und 60 min statt, bis ein positives Signal zu detektieren war. Positive und negative Bereiche wurden anschließend markiert und für elektronenmikroskopische Analysen oder Real Time gesammelt.

2.2.2.4. Die Transmissionselektronmikroskopie (TEM)

Die TEM-Analyse wurden von Prof. Dr. Andreas Schmiedel und Prof. Dr. Matthias Ochs an der Medizinischen Hochschule in Hannover durchgeführt.

An Tag 26 einer Differenzierung wurden für die X-Gal-Färbung positive Bereiche ausgeschnitten und in Fixierungslösung (3% Glutaraldehyd in 0,1 M Na-Cacodylat/HCl Puffer, pH 7,3) überführt und für mindestens 4 h bei 4 °C inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation wurde das Pellet in 0,15 M HEPES Puffer und 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen. Durch eine Fixierung mit 1 % Osmiumtetroxid (OSO₄) in 0,1 M Cacodylatpuffer und dem darauffolgendem 2 maligem Waschen mit 0,1 M Cacodylatpuffer wurden

ungesättigte Lipide zusätzlich stabilisiert. Nach erneutem Waschen mit destilliertem Wasser wurden alle Bereiche zusammen 12 bis 18 h mit einem Gemisch aus Uranylazetat und Wasser bei 4-8 °C gefärbt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer Azetonreihe dehydriert (70%, 90 %, 100 % Azeton) und in Epon eingebettet. Von dem eingebetteten Material wurde mit einem Ultra Mikrotom 70 nm Ultradünnschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden schließlich mit Bleicitrat und Uranylazetat gefärbt und mit einem Elektronenmikroskop visualisiert.

2.2.2.5. Durchflusszytometrie (FACS)

Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst mit ES-Trypsin für 30 sec bis 4 min bei 37 °C dissoziiert. $1-2 \times 10^5$ nicht markierter Zellen wurden in ein 96-Well einer V-Botton-Platte überführt und bei 300 g für 2 min pelletiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen in entsprechender Antikörperverdünnung in PBS w/o für 60 min bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS w/o wurde erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 200 bis 400 µl PBS aufgenommen und in FACS-Probenröhrchen überführt. Um falsch positive Ergebnisse durch tote Zellen zu umgehen wurde zusätzlich kurz auf Eis mit Propidiumjodid (PI) inkubiert. Dieses passiert die geschädigte Zellmembran toter Zellen und kann somit bei einer Wellenlänge von 590 nm detektiert werden. Die Messungen wurden an dem Gerät FACSCalibur durchgeführt und die erhaltenen Daten mittels der BD CellQuest Pro Software analysiert.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Zur Gesamt-RNA-Isolierung wurde das NucleoSpin[®]RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel in Kombination mit TRIzol[®] verwendet.

Die Proben wurden in 500 bis 1000 µl TRIzol[®] aufgenommen, resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach versetzen mit Chloroform wurden die Proben 15 min bei 12.000 g zentrifugiert. Die in der wässrigen Phase angesammelten Nukleinsäuren wurden nach Zentrifugation abpipetiert und mit 70 %igem Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde auf die vom Hersteller mitgelieferten RNA-Isolationssäulen überführt und weiter laut Herstellerangaben isoliert. Um kontaminierte genomische DNA zu entfernen würde

während der Isolation direkt auf der Säule ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurde 15 min bei 25 °C inkubiert. Die RNA wurde schließlich in 40 bis 60 µl RNase-freies Wasser eluiert.

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde zum einen über den RNA 600 nano Chip ((Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) oder dem Spektrophotometer (Nano Drob) gemessen. Über kapillarelektrophoretische Auftrennung der RNA auf dem Chip kann die Konzentration bezogen auf einen Standard gemessen werden. Anders als beim Nano Drop kann über die Darstellung der enthaltenen 18s und 28s rRNA eine Aussage über die Qualität der isolierten RNA getroffen werden.

Zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges (cDNA) aus der isolierten Gesamt-RNA wurde die virale Reverse Transkriptase verwendet. Die cDNA Synthese erfolgte mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit laut Herstellerangaben. Dabei wurden 750 ng RNA und OligoDT Primer für die Synthese verwendet.

2.2.3.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Analyse des Genexpressionsmusters von Zellkulturen wird die Eigenschaft der DNA-Polymerase genutzt Template DNA (hier cDNA) zu amplifizieren. Damit die Polymerase das zu amplifizierende DNA-Fragment erkennt, werden zwei spezifische Oligonukleotidprimer benötigt, die an das jeweilige 3'OH-Ende des komplementären DNA-Stranges binden. Davon ausgehend beginnt die DNA-Polymerase einen neuen doppelsträngigen DNA-Strang (Elongation) zu generieren, indem Desoxyribonukleinsäuren (dNTP's) eingebaut werden. Durch Temperaturerhöhung werden die Doppelstränge zu komplementären Einzelsträngen denaturiert, wodurch eine neue Anlagerung (Annealingschritt) der Primer erfolgen kann. Abhängig von der jeweiligen Schmelztemperatur der Primer muss die Temperatur hierfür auf ca. 45-72 °C gesenkt werden. Die Annealing-Temperatur der Primer richtet sich nach deren G/C und A/T-Gehalt und sollte für jedes Primerpaar individuell werden ermittelt. Durch mehrfache Wiederholung des PCR-Zyklus wird eine exponentielle Zunahme der gewünschten DNA-Sequenz erzeugt.

Die spezifischen Oligonukleotide wurden mithilfe der Software von Primer3 entwickelt und über MWG Biotech AG synthetisiert. In Tabelle 6 ist das verwendete PCR Programm dargestellt, wobei $T_{\text{Annealing}}$ vom jeweiligen Primer abhängig war. Die verwendeten Primer und dessen $T_{\text{Annealing}}$ sind in Tabelle 1 Abschnitt 2.1.4.3. aufgeführt. Die PCR-Reaktionen

wurden nach dem in Tabelle 7 dargestellten Schema mit der Go-Taq Polymerase durchgeführt.

Tabelle 6: Standard PCR Programm

	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
Denaturierung	94 °C	60 sec	1
Denaturierung	94 °C	60 sec	} 30-35
T _{Annealing}	x	60 sec	
Elongation	72 °C	90 sec	
Elongation	72 °C	3 min	1
Pause	4 °C	∞	

Tabelle 7: Pippetierschema einer PCR mit der Go-TaqPolymerase

<i>Reagenz</i>	<i>Menge in µl</i>
H2O	15,75
5 x PCR-Puffer	5
10 µmol Primer reverse antisens	1
10 µmol Primer sens	1
10 mM dNTP's	1
Go TaqPolymerase (1,25 U/µl)	0,25
Gesamt	24 µl + 1 µl cDNA

2.2.3.3. Agarosegelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wird die DNA mit Hilfe eines Spannungsfeldes nach ihrer Größe getrennt. Die negativ geladene DNA fließt im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Wandergeschwindigkeit hängt dabei von Größe und Form (z.B. ringförmige superhelikale, ringförmige relaxierte oder lineare DNA) des DNA-Fragmentes und der Konzentration des Gels ab. Mit Hilfe des interkalierenden organischen Farbstoffes Ethidiumbromid (EtBr, 0,5 µg/ml) konnten die DNA-Fragmente unter dem UV-Licht (254 nm- 366 nm) visualisiert werden. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 130 Volt und 100 mA für 45 bis 60 min. Mit dem GelDoc System erfolgte anschließend eine Dokumentation der Ergebnisse.

2.2.3.4. Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Für eine Quantitative Aussage der Genexpression von Zellkulturen, wurde die Methode der quantitativen PCR (qRT-PCR) am Mastercycler[®] ep *realplex* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe des nicht sequenzspezifischen Farbstoffes SYBR[®] Green, der sich in doppelsträngige DNA interkaliert, war eine Quantifizierung möglich. Durch die Interkalierung des Farbstoffes in die doppelsträngige DNA entsteht ein Komplex, der bei einer Wellenlänge von 520 nm emittiert wird. Somit kann nach jedem PCR-Zyklus eine Fluoreszenzintensität gemessen werden. Die Menge des PCR-Produktes ist dabei proportional zur Menge des aufgenommenen Farbstoffes. Da der Farbstoff nicht sequenzspezifisch ist, muss durch eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der qRT-PCR sichergestellt werden, dass ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde und demnach das Fluoreszenzsignal die tatsächliche Menge des gewünschten Produktes repräsentiert. Über eine schrittweise Temperaturerhöhung von 60 °C auf 95 °C, kommt es, je nach GC-Gehalt des Produktes, bei einer spezifischen Temperatur zur vollständigen Dissoziation. Dabei wird der Farbstoff wieder freigesetzt und die abnehmende Fluoreszenz kann verfolgt werden. Bei unterschiedlichen Amplifikaten sind mehrere Schmelzpunkte zu erwarten. In Tabelle 8 ist das verwendete qRT-PCR-Programm, in Tabelle 9 das qRT-PCR-Schema dargestellt. Der PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal den Wert der Hintergrundfluoreszenz überschreitet, wird als Ct-Wert beschrieben und ist wichtig für die Auswertung. Der Prozess befindet sich hier in der exponentiellen Phase. Das Expressionslevel des Zielgens wurde über das Transkriptionslevel des Housekeepinggens β -Actin über die Δ Ct Methode normalisiert.

Tabelle 8: qRT-PCR Programm mit SYBR[®] Green

	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklen</i>
Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	15 sec	} 40
T _{Annealing}	x (63 °C)	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	95 °C	15 sec	
Schmelzkurve	50 – 98 °C	10 sec (0,5 °C Schritte)	
Pause	∞		

Tabelle 9: Pippetierschema einer qRT- PCR mit SYBR[®] Green

Reagenz	Menge in μl
SYBR Green[®] Super Mix (2x)	
100mM KCl	
40 mM Tris-HCl, pH 8,4	
0,4 mM jedes dNTP's	12,5
iTaqPolymerase (50 U/ml)	
6 mM MgCl ₂	
SYBR Green [®]	
20 nM fluoresein	
Stabilisatoren	
H₂O	5,5
10 μmol Primer reverse antisens	1
10 μmol Primer sens	1
Tamplate (cDNA)	5 (1:5 verdünnt)
Gesamt	25

2.2.4. Statistische Analyse

Für eine statistische Analyse wurde das Programm Graph Prism 5 verwendet. Die durchflusszytometrischen und die qRT-PCR Daten wurden mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U Test oder, im Falle von mehr als 2 Gruppen, mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis Test gefolgt vom Dunn's multiple comparison Test analysiert.

Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Die Unterschiede wurden mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der miPS-Klone C1L9 und C1L17

3.1.1. Vergleichbare Morphologie der undifferenzierten miPS-Klone mit einer gut charakterisierten mES-Zelllinie

Ein typisches Merkmal undifferenzierter mES- und miPS-Zellen ist das Wachsen in Form von Kolonien, die einen klar abgegrenzten, hellen, lichtbrechenden Rand (Abb. 3.1.) sowohl auf Feeder (Abb. 3.1. A-C) als auch auf Gelatine (Feeder-frei) aufweisen (Abb. 3.1. D-F). Durch das Passagieren beim Erreichen einer kritischen Größe der Kolonien konnten die Kolonien unter Verwendung entsprechender Medienzusätze (siehe Abschnitt 2.7.4.) im undifferenzierten Zustand gehalten werden. Zwischen den undifferenzierten miPS-Klonen (siehe Abschnitt 2.2.1.7.) und der in der Arbeit verwendeten mES- Zelllinie [173] konnten im Verlauf der Kultivierung keine Unterschiede im Bezug auf Morphologie und Verhalten festgestellt werden.

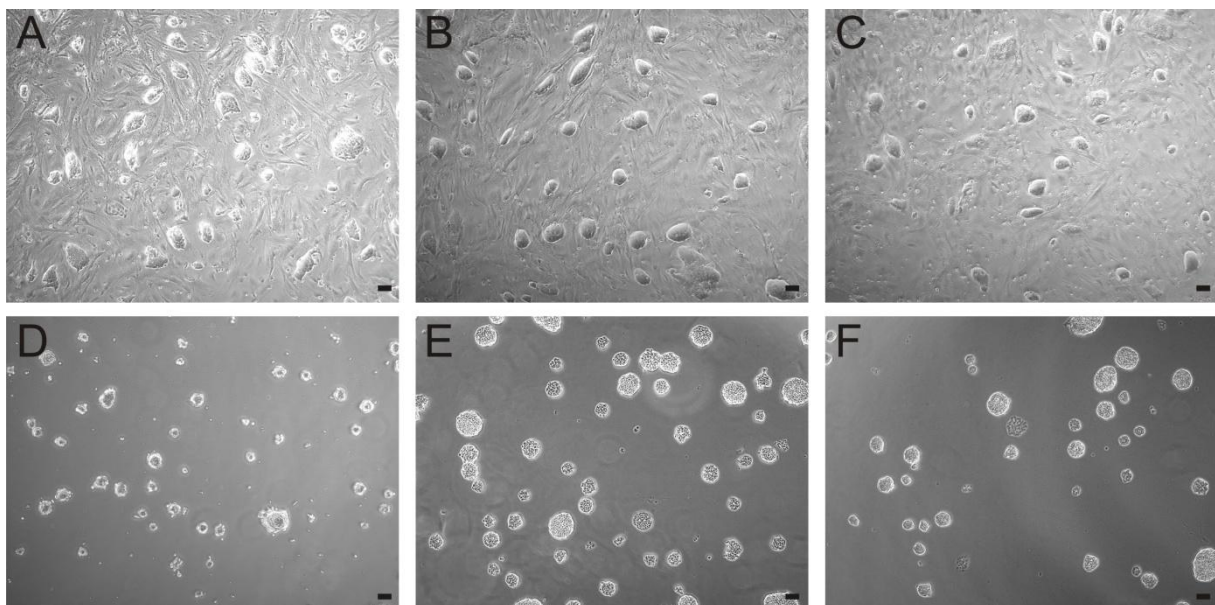


Abb 3.1.: Keine morphologischen Unterschiede zwischen undifferenzierten mES- und miPS-Zellen. Undifferenzierte mES- und miPS-Zellkolonien wurden alle 3 bis 4 Tage vereinzelt und entweder auf Feeder (A-C) oder Feeder-frei auf 0,1 % Gelatine (D-F) passagiert. **A&D:** mES-Zelllinie BryFoxa2; **B&E:** miPS-Klon C1L9; **C&F:** miPS-Klon C1L17. Messbalken 100 μm .

3.1.2. Nachweis der Pluripotenz

Für eine weitere Charakterisierung der Pluripotenz der miPS-Klone C1L9 und C1L17 wurden beide Klone mit Antikörpern immunzytochemisch gefärbt, die gegen Oct 3/4 und Sox2 gerichtet waren. Als Positivkontrolle wurde die gut charakterisierte mES-Zelllinie BryFoxa2 mitgefärbt [173]. Als Negativkontrolle wurde die dazugehörige Isotypkontrolle verwendet, um die Spezifität der Primärantikörper zu zeigen. Beide miPS-Klone waren immunopositiv für die Pluripotenzmarker Oct 3/4 (Abb. 3.2.A) und Sox2 (Abb. 3.2.B). Zudem konnte mittels der qRT-PCR die Genexpression der pluripotenz-assoziierten Marker Oct3/4, Sox2, Nanog und Klf4 verifiziert bzw. nachgewiesen werden (Abb. 3.3.).

Ein weiterer Nachweis für die Pluripotenz von PS-Zellen ist die Fähigkeit zur Teratombildung. Beide miPS-Klone, C1L9 und C1L17, brachten nach subkutaner Injektion in immundefiziente Mäuse Teratome hervor. Nach einer H&E-Färbung konnte ektodermales, mesodermales und endodermales Gewebe in den miPS-abgeleiteten Teratomen nachgewiesen werden (Abb. 3.4.).

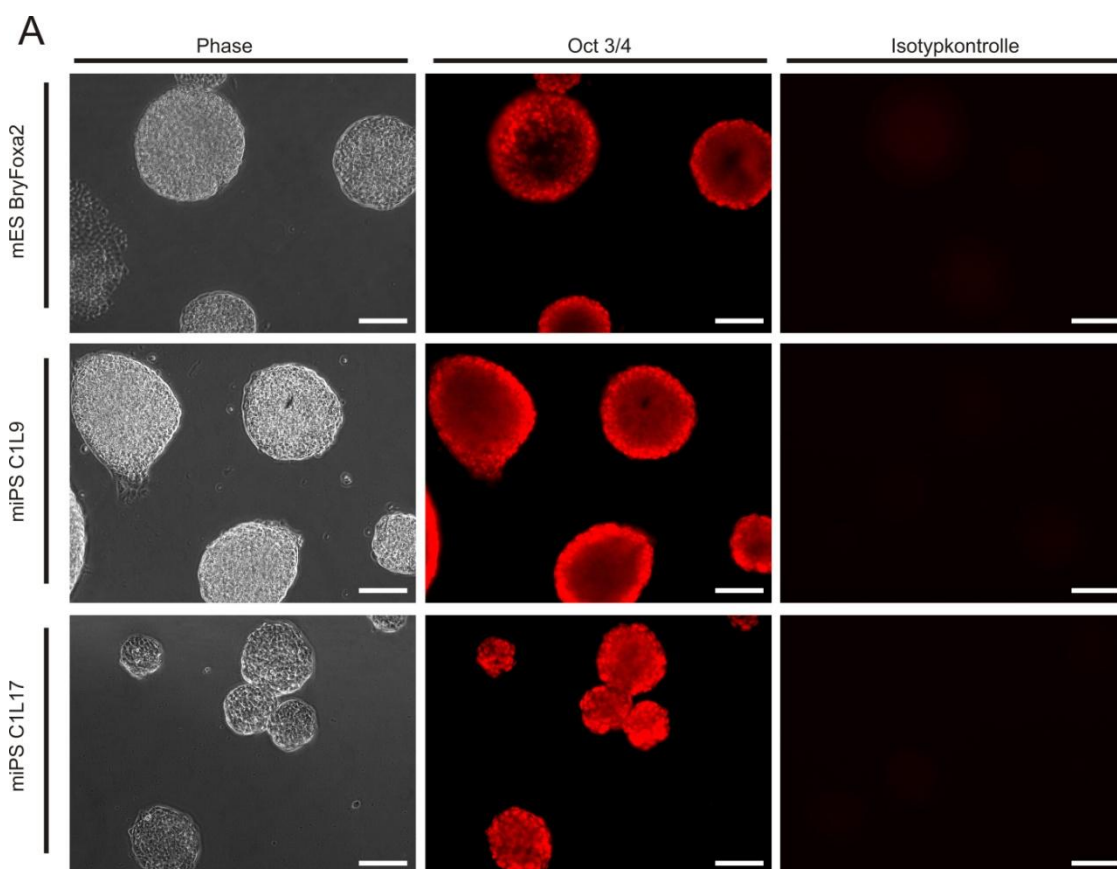


Abb 3.2.A.: Die miPS-Zellen sind Oct3/4 immunopositiv.
Messbalken 100 μm .

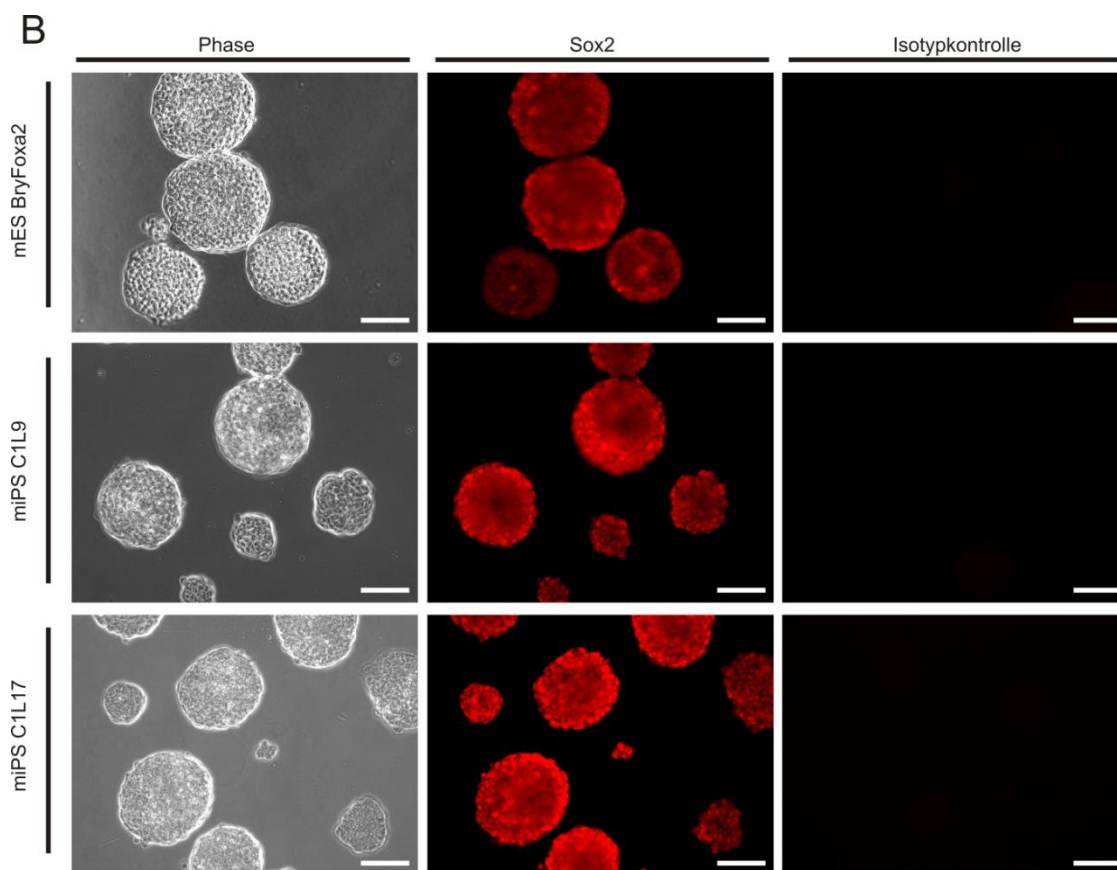


Abb 3.2.B.: Die miPS-Zellen sind Sox2 immunopositiv.
Messbalke 100 μ m.

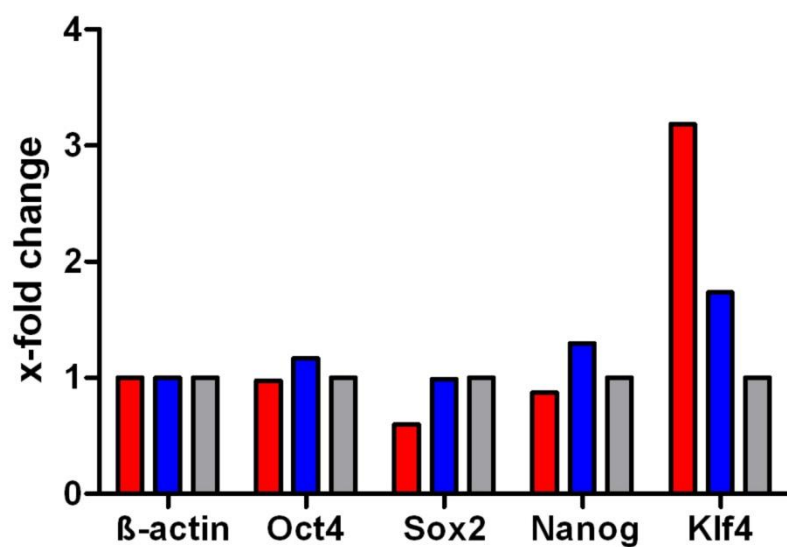


Abb 3.3.: Die miPS-Klone C1L9 und C1L17 exprimieren Oct3/4, Sox2, Nanog und Klf4 mRNA.
qRT-PCR Analyse von Oct3/4, Sox2, Nanog und Klf4 in undifferenzierten miPS-Klonen C1L9 (rot) und C1L17 (blau) in Relation zu mES-Zellen (grau) (n=1).

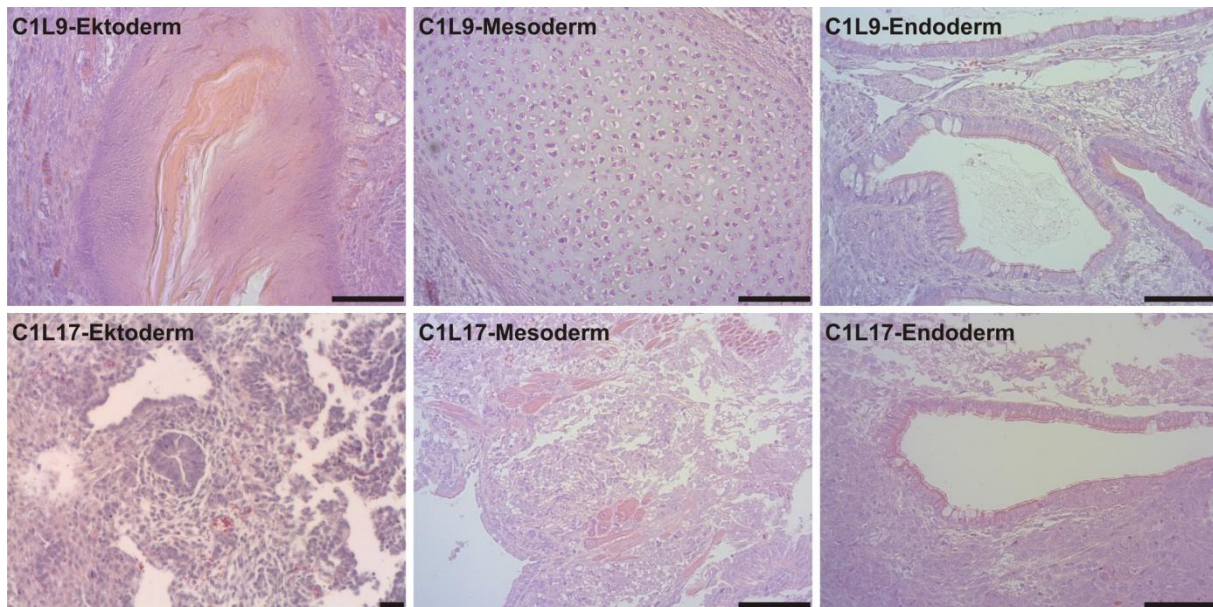


Abb 3.4.: Die miPS-Klone C1L9 und CL17 bilden nach subkutaner Injektion in immundefiziente Mäuse Teratome. H&E Färbung der miPS-abgeleiteten Teratome. Die Teratome weisen ektodermale, mesodermale und endodermale Gewebeabschnitte auf. Messbalken 100 µm.

3.2. Die Differenzierung von mES- und miPS-Zellen zu definitivem Endoderm

3.2.1. Verstärkte endodermale Differenzierung in ML- versus EB-Kulturen von mES-Zellen

Für die Analyse der Bildung von definitivem Endoderm wurde eine mES-Zelllinie verwendet, die unter dem Bry-Promotor eGFP und unter dem Foxa2-Promotor verkürztes humanes CD4 (BryFoxa2) exprimiert [173]. Die Zelllinie wurde in serumhaltigem Differenzierungsmedium (IMDM, s. Abschnitt 2.7.6.) als EBs oder ML differenziert. Nach Einleitung der Differenzierung wurde die mES-Zelllinie täglich von Tag 2 bis Tag 7 über das Vereinzelungsprotokoll (siehe Abschnitt 2.2.2.5.) dissoziiert, gegen humanes CD4 gefärbt und über Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Dabei wurden die endodermalen Foxa2-huCD4 / Bry-eGFP doppelpositiven und Foxa2-huCD4 einfachpositiven Zellen gemeinsam ausgewertet, die zusammen im weiteren Text als Foxa2-positive Zellen bezeichnet werden (Abb. 3.5.)

Während der gesamten analysierten Zeitperiode wies die ML-Kultur eine deutlich erhöhte Anzahl an endodermalen Foxa2-positiven (Abb. 3.6.) Zellen gegenüber der EB Differenzierungskultur auf. An Tag 6 wurde das Maximum an Foxa2-positive Zellen (Abb.

3.6.) positiven Zellen im ML mit $41,3 \pm 0,9$ % erreicht. Dies entsprach einer $4,5 \pm 0,1$ höheren Prozentzahl im Vergleich zur EB-Differenzierung (Abb. 3.6.).

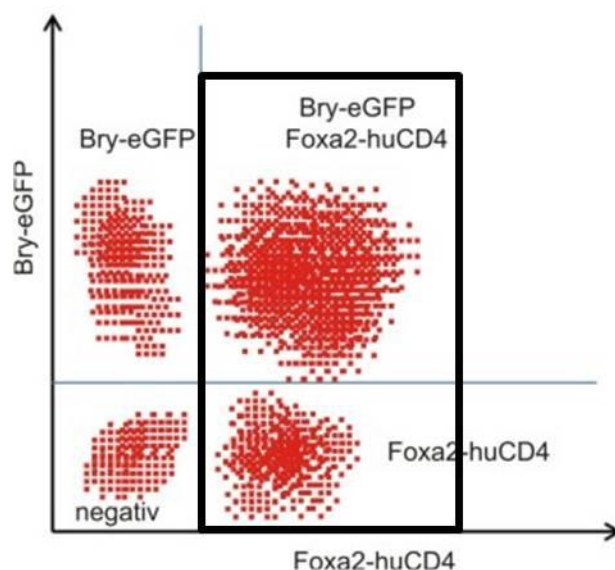


Abb 3.5.: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie der BryFoxa2 mES-Zelllinie.

Der schwarz markierte Bereich wird als Foxa2-positiv bezeichnet und umschließt die gesamten Foxa2-huCD4 positiven Zellen, einschließlich der Foxa2-huCD4/Bry-eGFP doppelpositiven und Foxa2-huCD4 einfachpositiven Zellen.

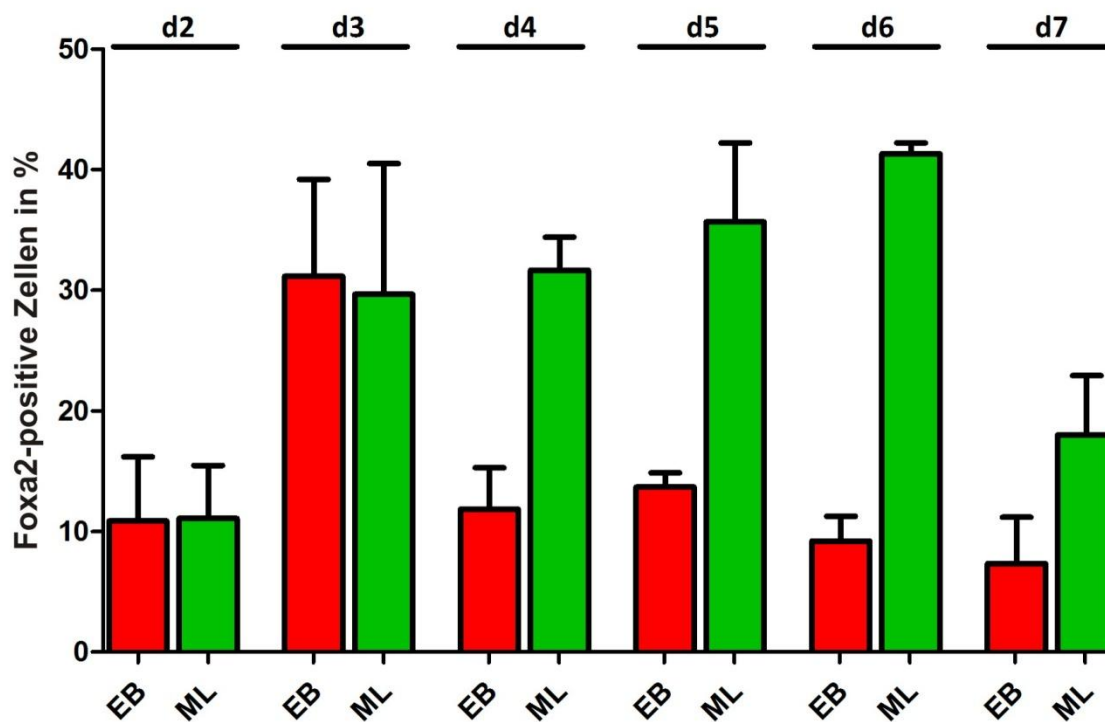


Abb. 3.6.: Verstärkte Bildung von definitivem Endoderm in ML gegenüber EB Differenzierungskulturen von mES-Zellen.

mES-Zellen wurden in serumhaltigem IMDM entweder über EB- oder ML-Kulturen differenziert und die Anzahl an positiven Zellen von Tag 2 (d2) bis Tag 7 (d7) über FACS analysiert (Mittelwert \pm SEM; n=3).

3.2.2. Optimierte endodermale Differenzierung in ML-Kulturen von mES-Zellen unter Verwendung von serumfreien Bedingungen

Um die Generierung von definitivem Endoderm in ML-Kulturen zu erhöhen, wurde das zuvor verwendete serumhaltige Differenzierungsmedium IMDM gegen das serumfreie Differenzierungsmedium RPMI (s. Abschnitt 2.7.7.) ausgetestet. Dem RPMI wurde zusätzlich von Tag 2 bis Tag 6 entweder 50 ng/ml Activin A oder 5 μ M IDE-1 bzw. 5 μ M IDE-2 zugesetzt. Auch in diesem Versuchsabschnitt erfolgte eine tägliche Analyse von Tag 4 bis Tag 7 über Durchflusszytometrie.

Anders als in der vergleichenden Differenzierung von ML gegenüber EB unter serumhaltigen Bedingungen (Abb. 3.6.) konnte hier an Tag 5 das Maximum an Foxa2-positiven Zellen detektiert werden. Während in dieser Versuchsreihe in den Kulturen mit serumhaltigem IMDM nicht mehr als $13,5 \pm 2$ % (Tag 5) Foxa2-positiv Zellen vorhanden waren (Abb. 3.7.), führte die Verwendung des serumfreien RPMIs zu einer 3-fachen Erhöhung der Foxa2-positiven Zellen an den Tagen 4 bis 6 im Vergleich zum IMDM. Die Zugabe der Small Molecules IDE-1 oder IDE-2 zum RPMI von Tag 2 bis 6 konnte keine weitere Anreicherung von Foxa2-positiven Zellen hervorbringen. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von Activin A zu einer geringgradig gesteigerten endodermalen Differenzierung gegenüber RPMI ohne Zusätze (Tag 5: $1,2 \pm 0,1$ -fach, Tag 6: $1,3 \pm 0,1$ -fach, Tag 7: $2,2 \pm 0,3$ -fach).

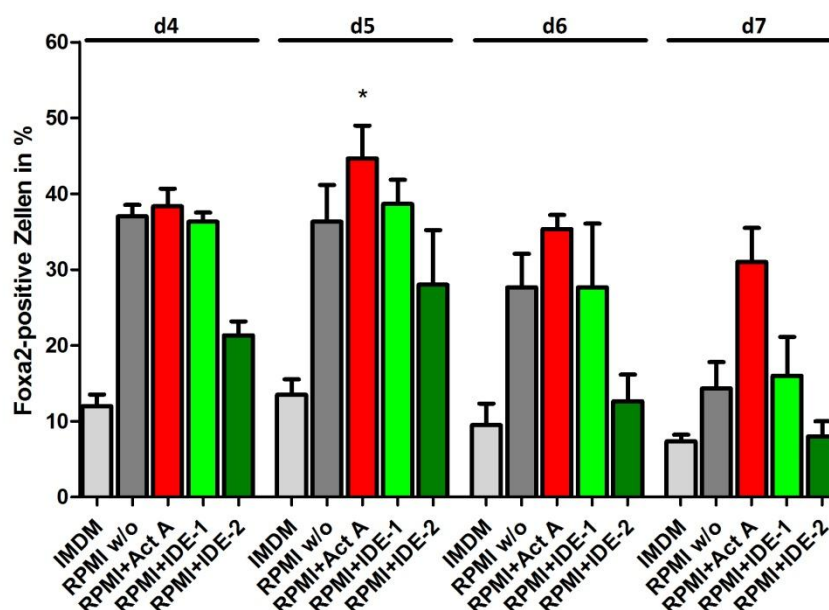


Abb. 3.7.: Optimierte endodermale Differenzierung in ML-Kulturen von mES-Zellen unter Verwendung von serumfreien Bedingungen.

mES-Zellen wurden entweder in serumhaltigem IMDM, serumfreiem RPMI ohne Zusätze (RPMI w/o), RPMI mit Activin A oder RPMI mit IDE-1 bzw. RPMI mit IDE-2 differenziert und die Anzahl an Foxa2-positiven Zellen von Tag 4 (d2) bis Tag 7 (d7) über FACS analysiert (Mittelwert \pm SEM; n=3; *p<0,05 vs. IMDM).

3.2.3. Vergleichbare Bildung von definitivem Endoderm in ML-Kulturen von mES- und miPS-Zellen

Für einen direkten Vergleich zwischen der mES-Zelllinie BryFoxa2 und dem miPS-Klon C1L9 wurden beide über das ML-Protokoll in serumhaltigem IMDM oder in serumfreien RPMI mit oder ohne 50 ng/ml Activin A von Tag 2 bis Tag 6 differenziert. Für eine quantitative Analyse bezüglich der Genexpression der endodermalen Marker Foxa2 und Sox17 wurde von Tag 4 bis Tag 7 mRNA gesammelt, zu cDNA umgeschrieben und mittels quantitativen Real Time (qRT)-PCR quantifiziert. Die Daten der qRT-PCR konnten die Daten der Durchflusszytometrie bestätigen. Das RPMI supplementiert mit Activin A führte zur höchsten Genexpression des endodermalen Markers Foxa2 sowohl in mES- als auch in miPS-ML-Kulturen. Gleiches gilt für den weiteren endodermalen Marker Sox17. Bei der mES-Zelllinie BryFoxa2 konnte ein Maximum der Foxa2 mRNA Expression an Tag 5 detektiert werden, die im Vergleich zu undifferenzierten Zellen um das $407 \pm 90,1$ -Fache höher war. Die maximale Genexpression von Sox17 in der mES-Zelllinie BryFoxa2 wurde an Tag 6 erreicht und zeigte eine $679,1 \pm 231,6$ -fache Erhöhung gegenüber undifferenzierter mES-Zellen (Abb. 3.8.).

Die definitive Endodermbildung in ML-Kulturen des miPS-Klons C1L9 verhielt sich bis auf das verspätete Maximum der Foxa2 Genexpression an Tag 7 relativ ähnlich zur mES-Zelllinie BryFoxa2. Auch hier war der Ansatz mit Activin A derjenige, der die höchste Foxa2 und Sox17 Expression hervorbrachte. Im Gegensatz zum undifferenzierten miPS-Klon C1L9 war an Tag 7 die Foxa2 Expression um das $411,8 \pm 246,2$ -Fache erhöht, Sox17 an Tag 6 um das $113,9 \pm 64,5$ -Fache (Abb. 3.8.).

Zum Vergleich der endodermalen Differenzierung auch auf Proteinebene wurden die mES-Zelllinie BryFoxa2 und der miPS-Klon C1L9 über das ML-Protokoll mit RPMI plus Activin A differenziert. Eine Immunfluoreszenzfärbung wurde von Tag 4 bis Tag 7 gegen endogenes Foxa2 und Sox17 Protein durchgeführt und die Anzahl an positiven Zellen in Prozent analysiert. In Differenzierungskulturen der mES-Zelllinie BryFoxa2 konnte ein Maximum von 36 ± 18 % an Foxa2 immunopositiven Zellen an Tag 5 detektiert werden (Abb. 3.11.). Ein verspäteter Peak der Foxa2 positiven Zellen in den Kulturen des miPS-Klons C1L9 an Tag 7 mit $44 \pm 8,4$ % bestätigte die Kinetik der Foxa2 mRNA Expression (Abb. 3.8). Die Doppelfärbung von endogenem Foxa2 und Sox17 konnte zeigen, dass die meisten Sox17 immunopositiven Zellen auch Foxa2 exprimierten (Abb. 3.9.).

Für die nachfolgenden Versuche wurde das serumfreie RPMI plus 50 ng/ml Activin A (d2-6) als Basaldifferenzierungsmedium (BM) verwendet.

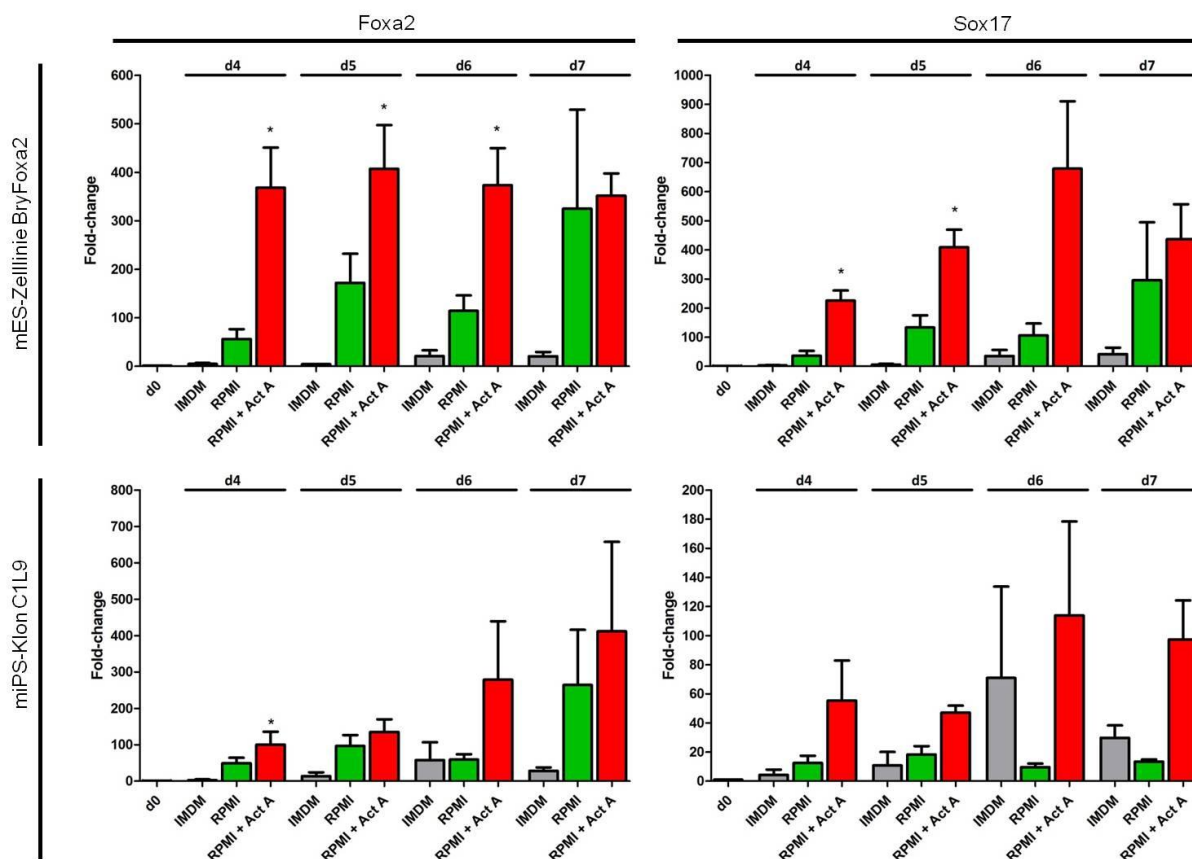


Abb. 3.8.: Vergleichbare Bildung von definitivem Endoderm in ML-Differenzierungskulturen von mES- und miPS-Zellen.

Für einen direkten Vergleich wurden die mES-Zelllinie BryFoxa2 und der miPS-Klon C1L9 im ML entweder in serumhaltigem IMDM oder serumfreiem RPMI mit oder ohne 50 ng/ml Activin A von Tag (d) 4 bis 7 differenziert. Die endodermalen Marker Foxa2 und Sox17 wurden über qRT-PCR analysiert und die Expression auf β -Actin normalisiert. Angegeben ist die x-Fache Änderung (Fold-change) der Markerexpression im Vergleich zu undifferenzierten (d0) mES- bzw miPS-Zellen. (Mittelwert \pm SEM; n=3; *p<0,05 vs. IMDM)

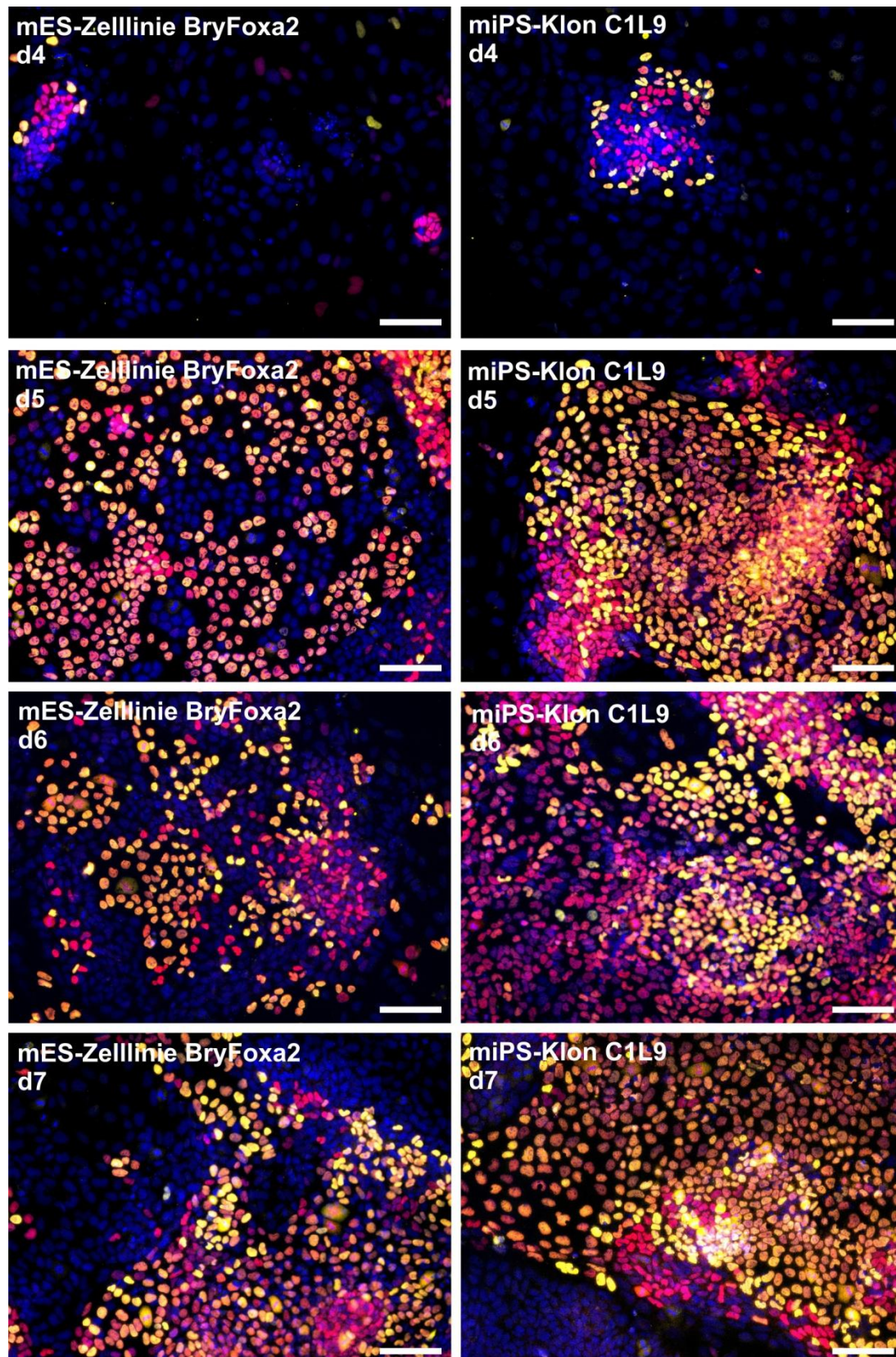


Abb. 3.9.: mES- und miPS-Zellen exprimieren endogenes Foxa2 und Sox17 Protein.

Die mES-Zelllinie BryFoxa2 und der miPS-Klon C1L9 wurden mit dem ML-Protokoll in RPMI mit 50 ng/ml Activin A von Tag (d) 4 bis 7 differenziert und gegen endogenes Foxa2 und Sox17 gefärbt. Die Immunfärbungen zeigten, dass die meisten Sox17 positiven Zellen auch für Foxa2 positiv waren. **Rot:** Foxa2; **Gelb:** Sox17; **Blau:** Dapi. Messbalken: 100 μ m.

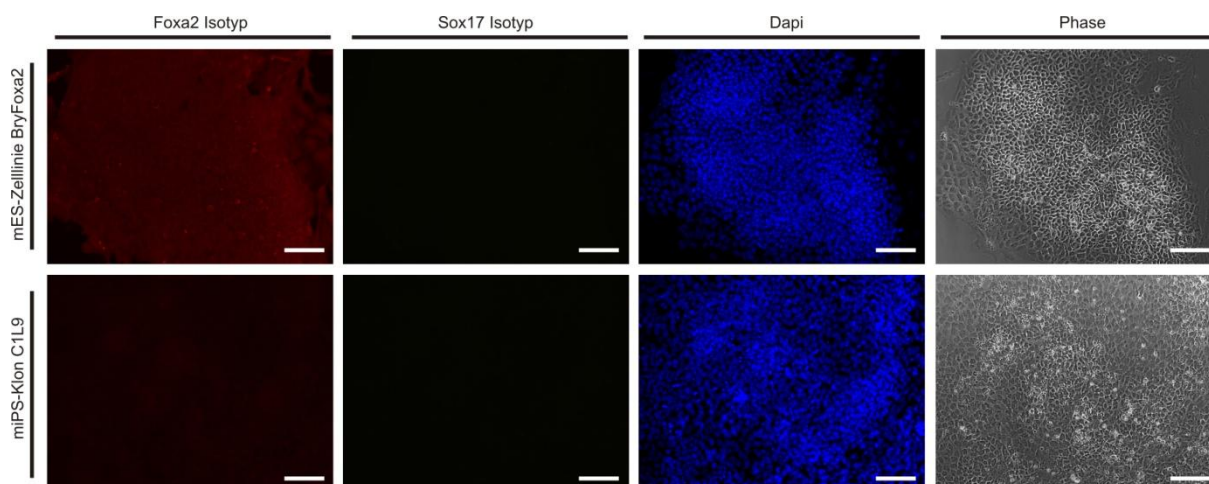


Abb. 3.10.: Isotypkontrollen für die Antikörperfärbungen von Foxa2 und Sox17 zeigen kein Signal.

Zur Überprüfung der Spezifität der primären Antikörper wurden entsprechende Isotypkontrollen mitgeführt. Abgebildet ist eine exemplarische Auswahl der Isotypkontrollen für die Antikörperfärbungen von Foxa2 und Sox17. Messbalken: 100 μ m.

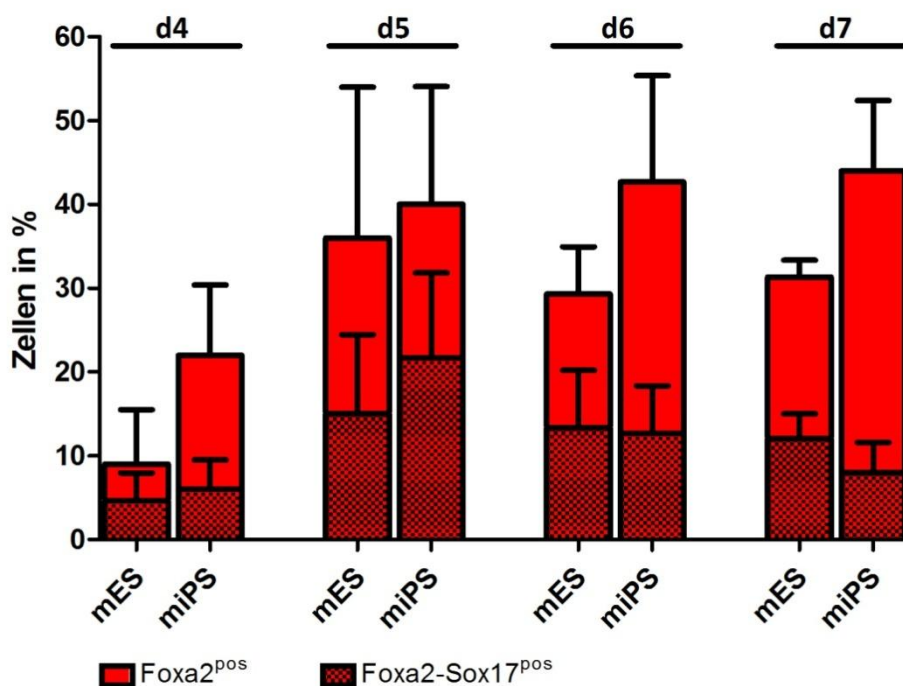


Abb. 3.11.: Alle Sox17 immunopositiven mES- und miPS-Zellen in Differenzierungskulturen sind auch Foxa2 immunopositiv.

Für einen direkten Vergleich wurden die mES-Zelllinie BryFoxa2 und der miPS-Klon C1L9 im ML in RPMI mit 50 ng/ml Activin A von Tag (d) 4 bis 7 differenziert und gegen endogenes Foxa2 und Sox17 gefärbt. Abgebildet ist der prozentuale Anteil an Foxa2 einfach- (rot) und davon Foxa2/Sox17 doppelpositiven Zellen (gemustert) (Mittelwert \pm SEM; n=3).

3.3. DCI induziert die Expression des Clara-Zell Markers CCSP in Differenzierungskulturen von mES- und miPS-Zellen

Im Nachfolgenden wurde der Effekt verschiedener Schlüsselfaktoren auf die bronchoalveoläre Differenzierung der mES-Zelllinie BryFoxa2 und des miPS-Klons C1L9 untersucht. Dabei wurde der Fokus auf CCSP exprimierende Atemwegsepithelzellen gelegt. Für diese Versuchsreihe wurden die Zellen über das ML-Protokoll in BM mit oder ohne KGF (Tag 0-26) und/oder DCI (Tag 10/14-26) differenziert (Abb. 3.13.). Die Zeitpunkte zur Applikation von DCI und KGF während der Differenzierung wurde in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen zur ATII-Zelldifferenzierung in EBs definiert [206] und in Anlehnung an die klinische Anwendung von Kortikosteroiden während des späten zweiten oder dritten Drittels einer Schwangerschaft zur Lungenreifung des Fetus bei drohender Frühgeburt [207]. An Tag 26 der Differenzierung wurde das Genexpressionslevel von Markern spezifisch für Atemwegsepithelzellen (Clara-Zellen, zilientragende Zellen) und Alveolarepithelzellen (ATII-Zellen) analysiert.

Die signifikant höchste Expression des Clara-Zell Markers CCSP wurde durch die Behandlung mit DCI (Tag 14-26) erzielt, sowohl in Differenzierungskulturen der mES-Zelllinie BryFoxa2 als auch des miPS-Klons C1L9. In Tag 26 Differenzierungskulturen der mES-Zelllinie BryFoxa2 führte die Supplementierung mit DCI zu einer 19.663 ± 8.270 -fachen erhöhten CCSP mRNA Expression gegenüber undifferenzierter mES-Zellen (d0) und zu einem $51,7 \pm 21,7$ -fachen Anstieg ($p < 0,05$ vs. BM, $n=9$) gegenüber nicht-behandelter Differenzierungskulturen (BM). In Tag 26 Differenzierungskulturen des miPS-Klons C1L9 konnte das 8.315 ± 2.222 -Fache an CCSP Expression gegenüber undifferenzierter miPS-Zellen (d0) und das $11,3 \pm 3$ -fache im Vergleich zu Differenzierungskulturen in BM ohne Zusätze gemessen werden ($p < 0,01$ vs. BM, $n=8$). Ähnliche Daten bezüglich der CCSP Genexpression konnten auch mit der Supplementierung von DCI ab Tag 10 erzielt werden (Abb 3.14.). Die Zugabe von DCI (Tag 10-26, $n=3$) induzierte einen 20.953 ± 16.429 -fachen Anstieg in mES-Zelldifferenzierungskulturen gegenüber undifferenzierten mES-Zellen und einen 3.997 ± 1.252 -fachen Anstieg in miPS-Zelldifferenzierungskulturen im Vergleich zu undifferenzierten miPS-Zellen. Zudem konnte, ähnlich wie bei der Applikation von DCI ab Tag 14, beobachtet werden, dass, im Vergleich zum DCI alleine, eine kombinierte Behandlung von DCI mit KGF zu einer verminderten CCSP Expression führte (Abb. 3.14). Die alleinige Applikation von KGF resultierte entweder in einem ähnlichen (mES-Zellen)

oder reduzierten (miPS-Zellen) CCSP Expressionslevel im Vergleich zum BM ohne Zusätze.

Im Gegensatz zu CCSP wurde die höchste Expression von Foxj1 (forkhead box j1), ein Marker für ziliotragende Zellen, in unbehandelten Differenzierungskulturen (BM) gemessen. An Tag 26 konnte in mES-Zelldifferenzierungskulturen im Vergleich zu Tag 0 mES-Zellen eine $751,4 \pm 509,7$ -fache Erhöhung und in miPS-Zelldifferenzierungskulturen gegenüber Tag 0 miPS-Zellen eine $492,7 \pm 64,2$ -fache Erhöhung der Foxj1 mRNA Expression erzielt werden. Die Zugabe von DCI führte zu einer gegenüber dem BM reduzierten Foxj1 Expression. Der DCI Ansatz wies in den mES-Zelldifferenzierungskulturen $8,9 \pm 6,1$ -mal weniger und in den miPS-Zelldifferenzierungskulturen $3,4 \pm 0,4$ -mal weniger Foxj1 als der jeweilige BM Ansatz auf. Auch die frühere Zugabe des DCIs ab Tag 10 erzielte ein ähnliches Ergebnis (Abb. 3.14.). Die Untersuchung eines weiteren ziliotragenden Zellmarkers, Tubb4 (β -tubulin 4) zeigte, dass in mES-Zellen an Tag 26 der Differenzierung im BM $22,8 \pm 9,6$ -mal mehr Tubb4 vorhanden war als in Tag 0 mES-Zellkulturen (n=12). Für den miPS-Klon konnte mit $27,5 \pm 4,5$ -mal mehr Tubb4 mRNA Ähnliches festgestellt werden (n=12). Jegliche Behandlungen der Kulturen mit DCI (ab Tag 10 oder Tag 14) und/oder KGF hatten auf mES-Zellen einen inhibierenden Effekt bezüglich der Tubb4 Expression, oder zeigten in miPS-Zellen keinen Einfluss auf die Tubb4 Genexpression (Abb 3.14.).

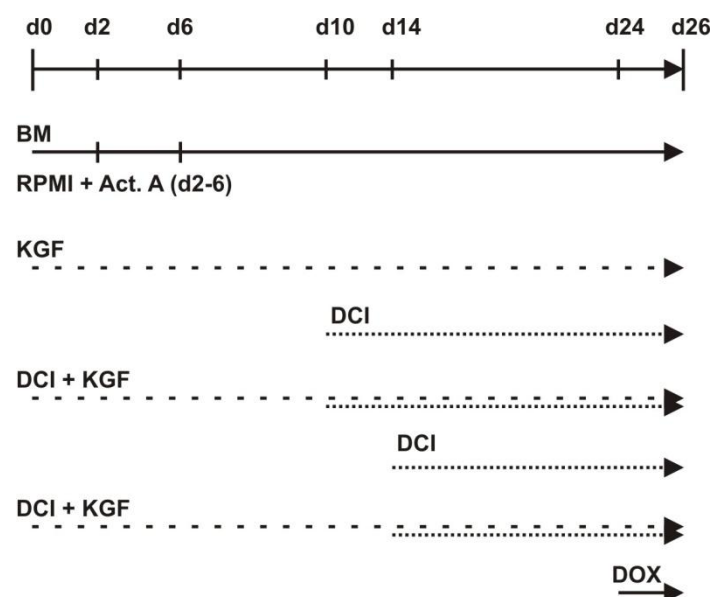


Abb. 3.13.: Schematische Darstellung der Applikationszeiten der verschiedenen Faktoren während der Differenzierung.

In der Reihenfolge von oben nach unten zu lesen: BM (Activin A Tag 2-6); KGF; 3. DCI (DCI Tag 10-26); DCI (Tag 10-26) + KGF; DCI (DCI Tag 14-26); DCI (DCI Tag 14-26) + KGF; Dox (Tag 24-26). Act A = Activin A, BM = Basalmedium.

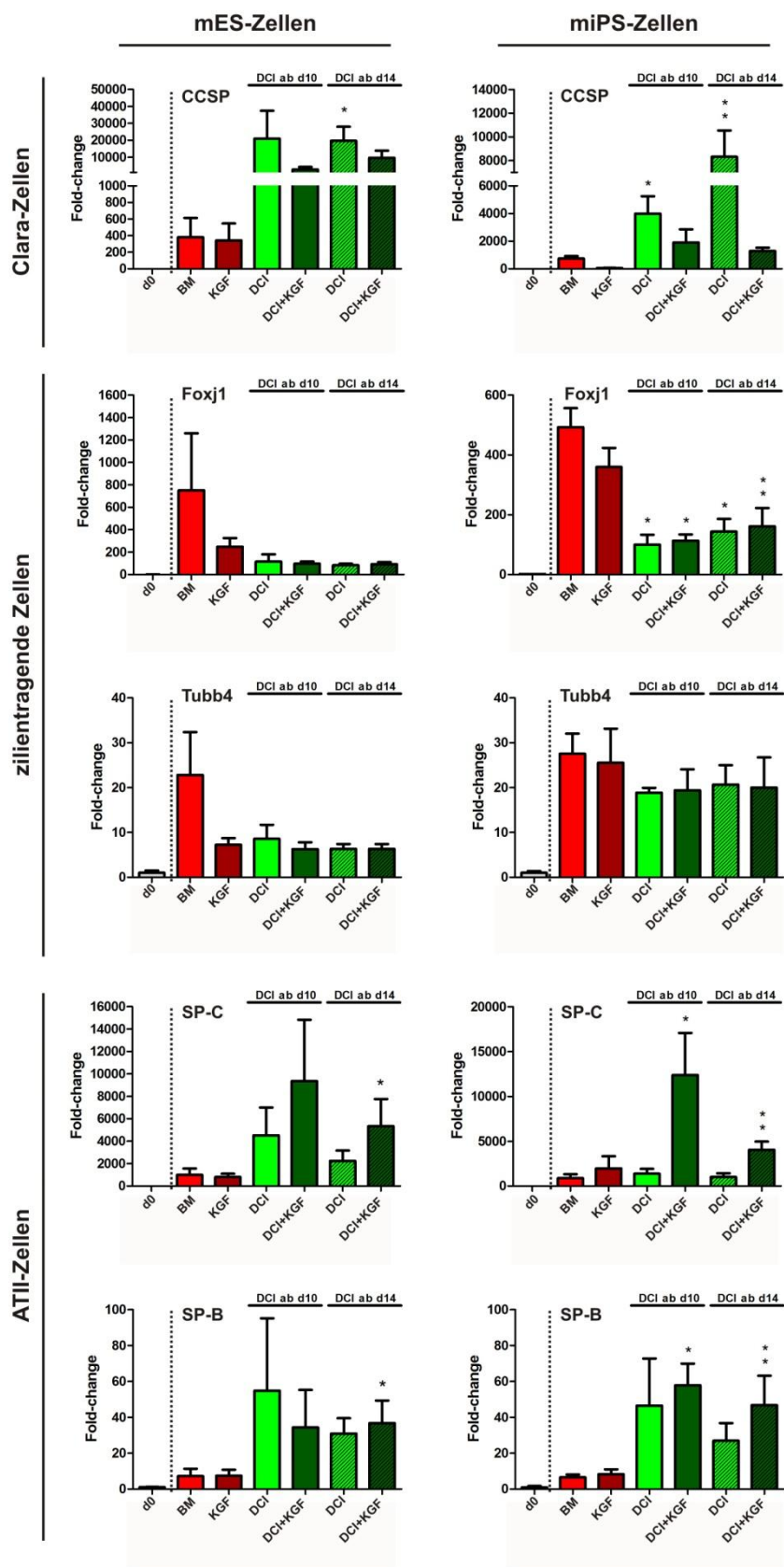


Abb. 3.14.: Die Behandlung der Differenzierungen von mES- und miPS-Zellen mit DCI führt zur höchsten CCSP Expression.

Die mES-Zelllinie BryFoxa2 und der miPS-Klon C1L9 wurden im BM ohne Zusätze, DCI, KGF oder alle Komponenten (DCI+KGF) zusammen differenziert. An Tag 26 der Differenzierung wurden Marker für Clara-Zellen, zilienträgende Zellen und ATII-Zellen über qRT-PCR analysiert und die Expression auf β -Actin normalisiert. Angegeben ist die x-Fache Änderung (Fold-change) der Markerexpression im Vergleich zu undifferenzierten (d0) mES- bzw. miPS-Zellen. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. BM; $n = 3-12$).

3.3.1. Kinetische Studien bestätigen den induzierenden Effekt von DCI auf die CCSP Expression in Differenzierungskulturen von mES- und miPS-Zellen

Zur Analyse der Expressionskinetik von CCSP wurden die mES-Zelllinie BryFoxa2 und der miPS-Klon C1L9 über das ML-Protokoll in BM ohne Zusätze oder mit DCI (Tag 14-26) differenziert und die CCSP mRNA Expression an verschiedenen Tagen der Differenzierung gemessen (n=3).

Die Studie zeigte eine ähnliche Expressionskinetik von CCSP während der Differenzierung von mES- und miPS-Zellen. Eine erste CCSP Genexpression über dem Hintergrundexpressionslevel konnte an Tag 18 (miPS-Zellen) bzw. Tag 21 (mES-Zellen) durch die DCI Behandlung induziert werden (Abb. 3.15.). Wie schon zuvor beobachtet, wurde auch in dieser Versuchsreihe eine höhere CCSP Expression durch die Behandlung mit DCI gegenüber der BM Kontrolle erzielt.

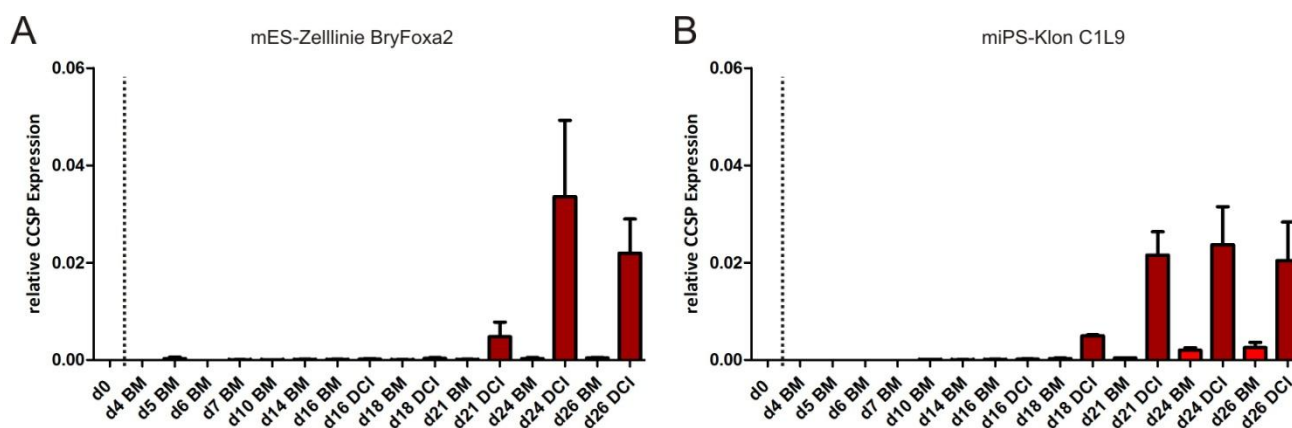


Abb. 3.15.: Kinetische Studien bestätigen den induzierenden Effekt von DCI auf die CCSP Expression in Differenzierungskulturen von mES- und miPS-Zellen.

Zur Analyse der CCSP Genexpression im Zeitverlauf wurden die mES-Zelllinie BryFoxa2 (A) und der miPS-Klon C1L9 (B) im ML-Protokoll entweder im BM ohne Zusätze oder mit DCI (Tag 14-26) differenziert. An unterschiedlichen Tagen (d) wurde im Verlauf der Differenzierung die CCSP Expression über qRT-PCR analysiert und die Expression auf β -Actin normalisiert. Abgebildet ist die x-ache Änderung (Fold-change) der Markerexpression im Vergleich zu undifferenzierten (d0) mES- bzw. miPS-Zellen. (Mittelwert \pm SEM; n=3).

3.4. Synergistischer Effekt von DCI und KGF auf die Expression von ATII-Zell Markern in mES- und miPS-Zell Differenzierungskulturen

Die Expression der beiden ATII Marker SP-C und SP-B wurden in mES- und miPS-Zelldifferenzierungskulturen am stärksten über die Kombination aus DCI und KGF induziert. Durch die kombinierte Behandlung von DCI und KGF waren die mRNA Expressionslevel von SP-C (mES- und miPS-Zellen) und SP-B (miPS-Zellen DCI ab Tag14) höher als die Summe der jeweiligen Einzelbehandlungen, was auf einen synergistisch stimulierenden Effekt von DCI und KGF auf die alveoläre Differenzierung hindeutet. Die Supplementierung der Differenzierungskulturen von mES-Zellen mit DCI ab Tag 14 und KGF resultierte in einer 5.340 ± 2.428 -fach erhöhten SP-C Expression gegenüber Tag 0 und einer $5,4 \pm 2,5$ -fachen Erhöhung zu Differenzierungskulturen ohne Behandlung ($p < 0,05$ vs. BM, $n=9$). Mit einer kombinierten Behandlung aus DCI ab Tag 10 und KGF konnte sogar ein 9.363 ± 5.427 -facher Anstieg an SP-C gegenüber Tag 0 erreicht werden und war im Vergleich zum BM um das $9,4 \pm 5,5$ -Fache erhöht ($n=3$). Die Behandlung mit DCI ab Tag 14 und KGF führte an Tag 26 der Differenzierung des miPS-Klons zu einem $4.042 \pm 914,5$ -fachen Anstieg von SP-C im Vergleich zu Tag 0 und einer $4,7 \pm 1,1$ -fachen Steigerung im Vergleich zur Differenzierung im BM ($p < 0,01$ vs. BM, $n=8$). In miPS-Zelldifferenzierungskulturen, die mit DCI ab Tag 10 und KGF behandelt wurden, war die SP-C Expression um das 12.376 ± 4.692 -Fache gegenüber undifferenzierter miPS-Zellen erhöht und zeigten gegenüber der Differenzierung im BM eine $14,4 \pm 5,6$ -fach erhöhte SP-C Expression ($p < 0,05$ vs. BM, $n=3$) (Abb. 3.14.).

Mit der Behandlung von DCI ab Tag 14 und KGF konnte das Expressionslevel von SP-B $5,1 \pm 1,7$ -fach (mES-Zellen, $p < 0,05$ vs. BM) und $7,2 \pm 2,5$ -fach (miPS-Zellen, $p < 0,01$ vs. BM) an Tag 26 der Differenzierung gesteigert werden. Eine Behandlung der Kulturen mit DCI ab Tag 10 und KGF brachte ähnliche Ergebnisse mit einer Steigerung des Expressionslevels in Tag 26 mES-Zelldifferenzierungskulturen um das $4,8 \pm 1,7$ -Fache und in miPS-Zelldifferenzierungskulturen um das $8,9 \pm 1,8$ -Fache gegenüber dem BM ($p < 0,05$ vs. BM, $n=3$) (Abb. 3.14.). Im Gegensatz zu DCI ab Tag 14 konnte bei mES-Zellen allerdings beobachtet werden, dass eine alleinige Applikation von DCI ab Tag 10 in einem höheren SP-B Expressionslevel resultierte als die Kombination mit KGF ($18,74 \pm 13,79$ mal höher als im BM; $n=3$) (Abb. 3.14.).

3.4.1 Austestung des optimalen KGF Applikationsintervalls bezüglich der ATII-Zelldifferenzierung im ML

In vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe auf Basis des EB-Protokolls wurde die durchgängige Supplementierung mit KGF ab Tag 0 bzw. 5 bis zum Ende der Differenzierung als bester Versuchsansatz für die Differenzierung von mES- und miPS-Zellen in ATII-Zellen identifiziert [208]. Diese durchgehende KGF Supplementierung (Tag 0-26) wurde zunächst auch in der vorliegenden Arbeit verwendet (siehe 3.3). Es sollte nachfolgend verifiziert werden, dass die durchgehende KGF Applikation zusammen mit DCI auch im ML-Protokoll die ATII-Zelldifferenzierung am stärksten induziert.

Die mES-Zelllinie BryFoxa2 wurde über das ML-Protokoll entweder im BM ohne Zusätze, mit Zugabe von DCI (Tag 14-26) oder einer Kombination aus DCI (Tag 14-26) und KGF differenziert. Die Supplementierung mit KGF erfolgte entweder während der ganzen Differenzierung von Tag 0-26, während einer frühen (Tag 0-5; Tag 0-10; Tag 0-14), einer mittleren (Tag 5-10; Tag 5-14) oder einer späten Differenzierungsphase (Tag 10-26; Tag 14-26). An Tag 26 der Differenzierung wurde der ATII-zellspezifische Marker SP-C über qRT-PCR analysiert.

Die Kombination aus DCI und einer durchgehenden KGF Supplementierung von Tag 0-26 konnte in diesem Versuchsansatz eine $25,11 \pm 9,359$ -fach erhöhte SP-C Genexpression im Vergleich zum BM an Tag 26 der Differenzierung hervorbringen ($p < 0,05$ vs. BM, $n=3$) (Abb. 3.16.). Dies entspricht einer 47.362 ± 17.655 -fachen Steigerung gegenüber undifferenzierten mES-Zellen (d0). Die Supplementierung mit KGF in der frühen und mittleren Differenzierungsphase erbrachte keine signifikante Verbesserung der SP-C Genexpression gegenüber dem BM. Demgegenüber konnte durch die Applikation von KGF in der späten Phase der Differenzierungskulturen ein deutlicher Anstieg der SP-C Expression beobachtet werden. Mit der Zugabe von KGF von Tag 10-26 konnte eine $8,17 \pm 4,34$ -fache Erhöhung der SP-C Expression gegenüber dem BM erzielt werden. Mittels der Supplementierung mit KGF von Tag 14-26 wurde eine $17,05 \pm 7,96$ -mal höhere SP-C Genexpression als im BM erreicht ($p < 0,05$ vs. BM, $n=3$) und war um 32.163 ± 15.008 -mal höher als in undifferenzierten mES-Zellen (Abb. 3.16.).

Die Ergebnisse bestätigen, dass auch im ML-Protokoll die Kombination aus DCI (d14-26) und einer durchgehenden KGF Supplementierung (d0-26) die höchste SP-C Expression in den mES-Zelldifferenzierungskulturen induziert gefolgt von der KGF Applikation in der späten Phase.

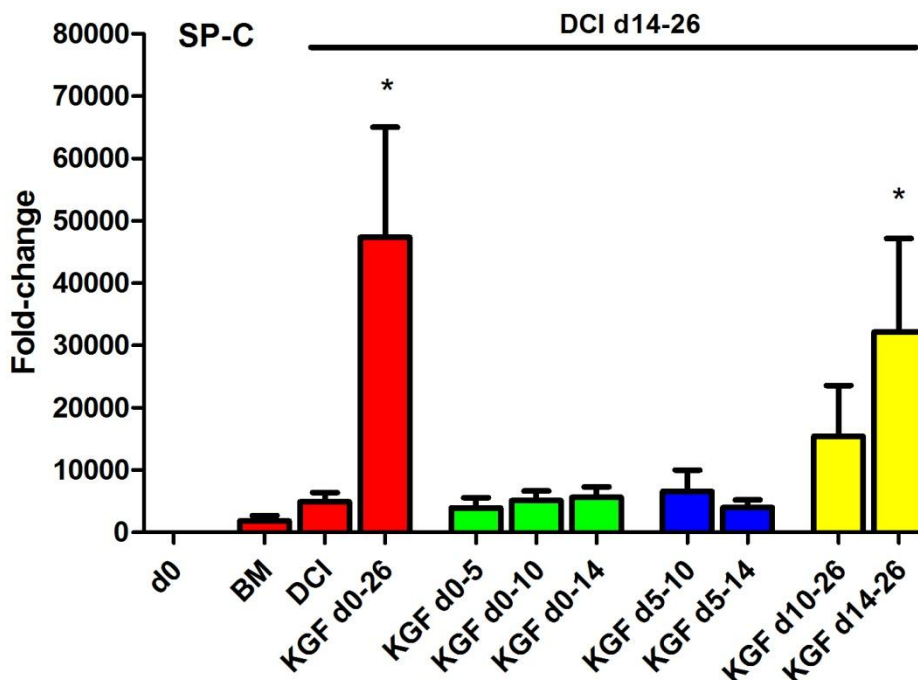


Abb. 3.16.: Die Kombination von DCI (d14-26) mit einer durchgehenden KGF Applikation (d0-26) führte zur höchsten Expression des ATII-Markers SP-C.

Die mES-Zelllinie BryFoxa2 wurde für 26 Tage im ML im BM ohne Zusätze, mit DCI (d14-26) ohne KGF oder DCI (d14-26) in Kombination mit unterschiedlichen Applikationsintervallen von KGF differenziert. Der zuvor ausgetestete Ansatz mit einer durchgehenden KGF (d0-26) Applikation (rot, siehe Abb. 3.14) wurde mit einer KGF-Applikation in der frühen (grün), mittleren (blau) und späten (gelb) Differenzierungsphase verglichen. Die SP-C Genexpression wurde über qRT-PCR analysiert und die Expression auf β -Actin normalisiert. Abgebildet ist die x-Fache Änderung (Fold-change) der Markerexpression im Vergleich zu undifferenzierten (d0) mES-Zellen. (Mittelwert \pm SEM; n=3; *p<0,05 vs. BM).

3.4.2. Die Applikation von KGF in der frühen Phase der Differenzierung hat keinen Einfluss auf die endodermale Differenzierung der mES-Zelllinie BryFoxa2

Um den Mechanismus eines möglichen Effekts von KGF (d0-26) in der frühen Phase der Differenzierung zu untersuchen, welcher zusammen mit Mechanismen in der späteren Phase die alveoläre Differenzierung fördert, wurde die Bildung von definitivem Endoderm quantifiziert. Die mES-Zelllinie BryFoxa2 wurde über das ML-Protokoll von Tag 4 bis Tag 7 differenziert und täglich über Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurde die mES-Zelllinie im BM mit oder ohne 20 ng/ml KGF differenziert (n=5).

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die zusätzliche Applikation von KGF zu keiner signifikanten Veränderung des prozentualen Anteils an Foxa2-positiven endodermalen Zellen gegenüber dem BM geführt hat (Abb. 3.17).

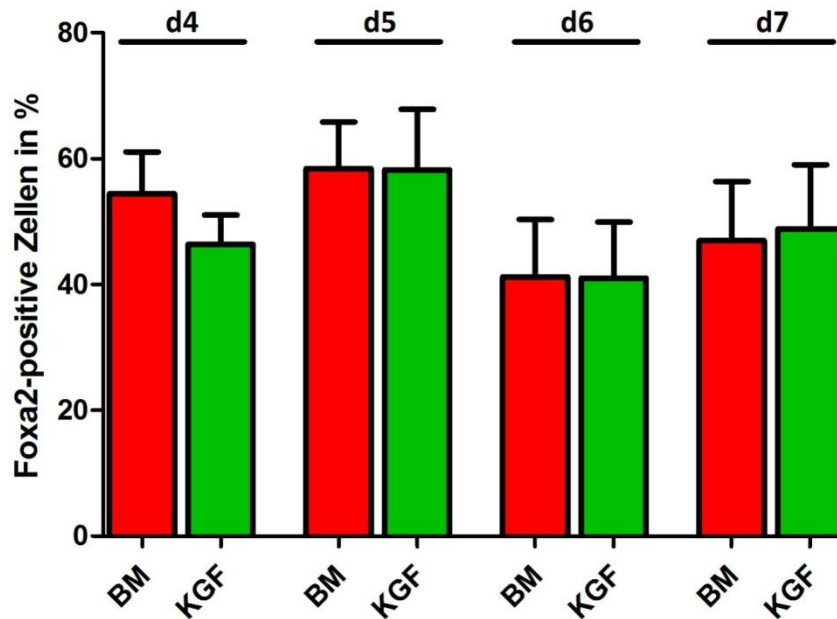


Abb. 3.17.: Die Applikation von KGF in der frühen Phase der Differenzierung hat keinen Einfluss auf die endodermale Differenzierung der mES-Zelllinie.

Die mES-Zelllinie BryFoxa2 wurde mit dem ML-Protokoll im BM mit oder ohne 20 ng/ml KGF bis Tag 7 differenziert. Von Tag (d) 4 bis 7 wurde die Anzahl der Foxa2-positiven Zellen über Durchflusszytometrie analysiert. (Mittelwert \pm SEM; n=5).

3.5. Clara-Zellreporter miPS-Klone differenzieren in Zellen mit einer CCSP Promotor-abhängigen LacZ Expression

Die beiden miPS-Klone C1L9 und C1L17 wurden aus doppeltransgenen Mäusen generiert (CCSP-rtTA^S-M2/GFP-tetO₇-LacZ), die unter dem 2,3 kb großen Ratten CCSP-Promotor einen tetrazyklinabhängigen Transaktivator (rtTA^S-M2) exprimieren. Die Reporterexpression wurde in den CCSP-rtTA^S-M2/GFP-tetO₇-LacZ Mäusen überwiegend im Atemwegssepithel exprimiert (Abb. 3.18. A).

Die miPS-Klone C1L9 und C1L17 wurden über das etablierte ML-Protokoll differenziert und von Tag 24 bis 26 mit Doxyzyklin (Dox) behandelt.

Beide miPS-Klone generierten an Tag 26 der Differenzierung eine deutliche Anzahl an LacZ exprimierenden Zellen, die nach PFA-Fixierung über eine X-Gal-Färbung (Abb. 3.18. B-F) detektiert werden konnten. Allerdings konnte in einigen Differenzierungen eine positive X-Gal-Färbung auch ohne Dox-Induktion hervorgerufen werden (Abb. 3.19.).

Für Untersuchungen der Genexpression in LacZ exprimierenden Bereichen wurden die Differenzierungen von Tag 24 bis 26 mit Dox behandelt und über eine Lebendfärbung mit ImaGene GreenTM C₁₂FDG lacZ Gene Expression Kit nachgewiesen (Abb. 3.20).

Anschließend wurden ImaGene Green™ C₁₂FDG lacZ positive (LacZ^{pos}) und negative (LacZ^{neg}) Bereiche in den Kulturen herausgeschnitten und über eine qRT-PCR das Genexpressionsmuster analysiert.

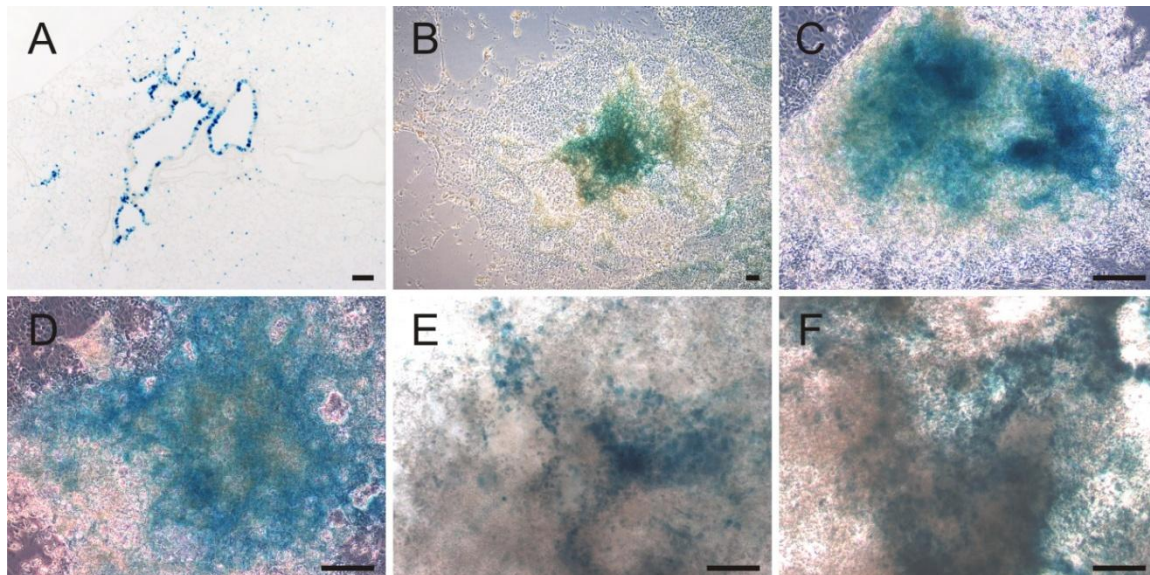


Abb. 3.18.: Über die X-Gal-Färbungen konnten in Tag 26 Differenzierungskulturen des miPS-Klons C1L9 und C1L17 nach Dox-Induktion LacZ^{pos} Clara-Zell-ähnliche Zellen detektiert werden.

Die miPS-Klone C1L9 und C1L17, die aus CCSP-rtTA2^S-M2/GFP-tetO₇-LacZ Mäusen mit einer LacZ Expression überwiegend im Atemwegsepithel stammen (A), wurden bis Tag 26 differenziert. Von Tag 24 bis 26 erfolgte eine Dox-Induktion. Nach einer 1 bis 4-stündigen Inkubation der Tag 26 Kulturen mit der X-Gal-Lösung waren deutlich LacZ^{pos} Bereiche (blau) in den C1L9 (B;C;D) und den C1L17 Kulturen (E;F) zu erkennen. Messbalken 100 µm.

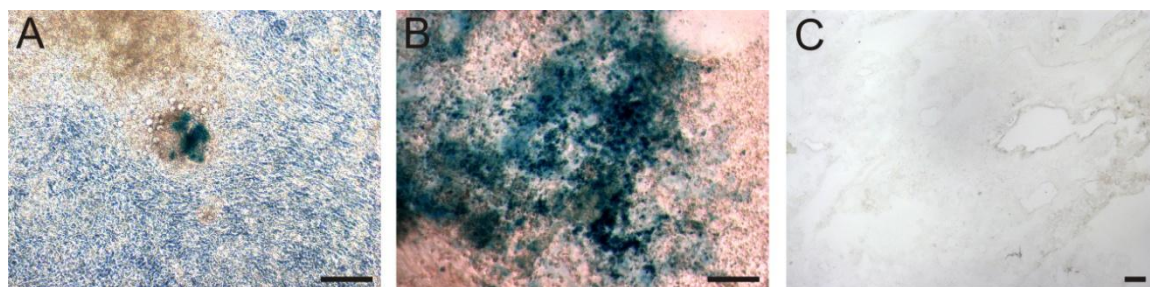


Abb. 3.19.: Über die X-Gal-Färbungen konnten in Tag 26 Differenzierungskulturen auch ohne Dox-Induktion LacZ^{pos} Clara-Zell-ähnliche Zellen detektiert werden.

Die miPS-Klone C1L9 und C1L17 wurden bis Tag 26 differenziert und als Negativkontrolle nicht mit Doxyzyklin behandelt. Nach einer 1 bis 4-stündigen Inkubation der Tag 26 Kulturen mit der X-Gal-Lösung waren auch hier deutlich LacZ^{pos} Bereiche (blau) in den C1L9 (A) und den C1L17 Kulturen (B) zu erkennen. Demgegenüber zeigten Lungenschnitte von nicht mit Doxyzyklin behandelten CCSP-rtTA2^S-M2/GFP-tetO₇-LacZ Mäusen (C) keine positive X-Gal-Färbung. Messbalken 100 µm.

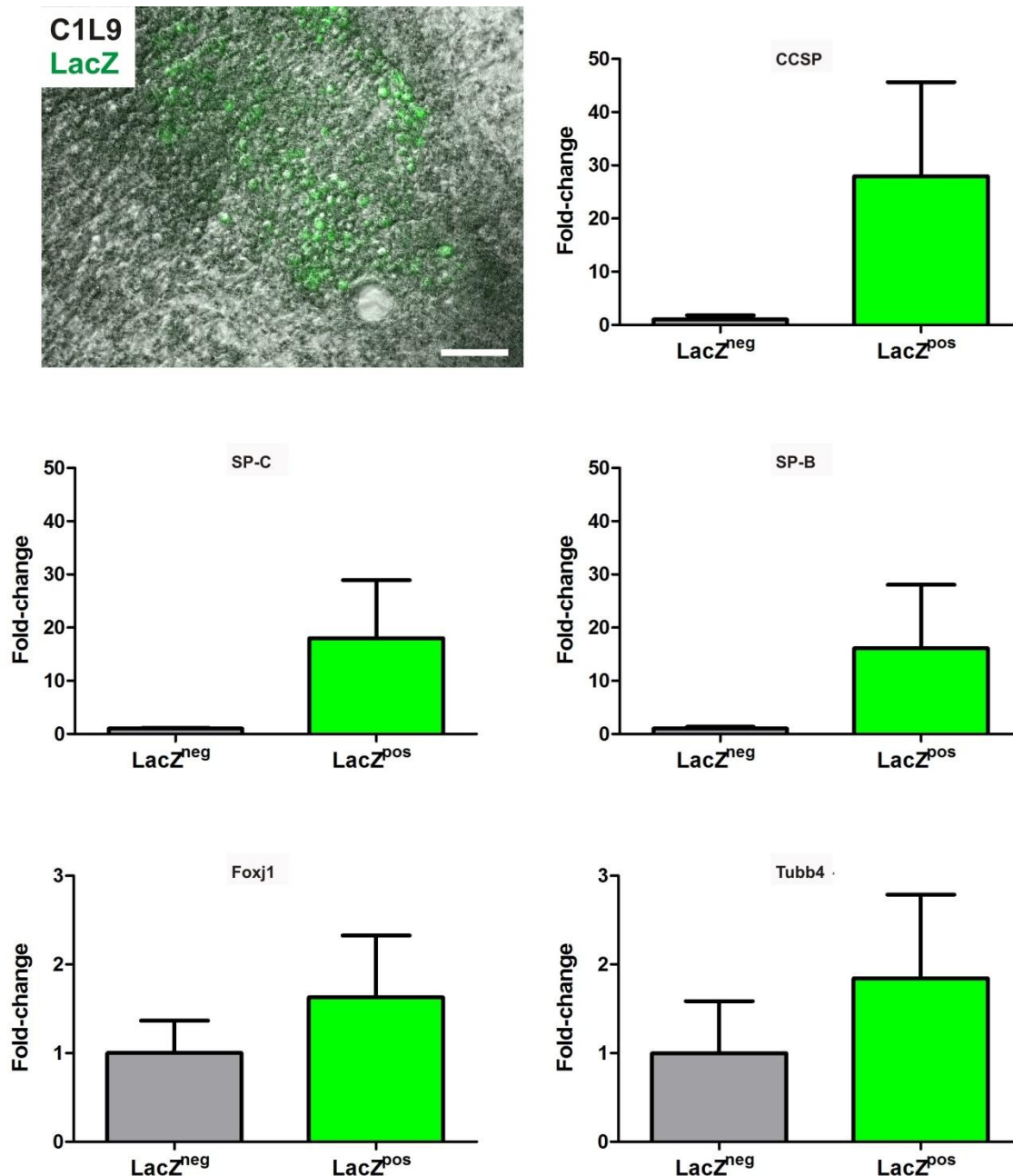


Abb. 3.20.: ImaGene Green™ C₁₂FDG LacZ positive Bereiche zeigen eine erhöhte Expression des Clara-Zell Markers CCSP.

An Tag 26 der Differenzierung von C1L9 erfolgte eine Lebendfärbung mit ImaGene Green™ C₁₂FDG (C1L9 LacZ). Die Genexpression der positiven und negativen LacZ-Bereiche wurde mittels der qRT-PCR analysiert. Expressionslevel wurden auf β-Actin normalisiert. Abgebildet ist die x-fache Änderung (Fold-change) der Markerexpression in den LacZ positiven (LacZ^{pos}) im Vergleich zu den negativen (LacZ^{neg}) Bereichen (Mittelwert ± SEM; n=3). Messbalken 100 μm.

Im Vergleich zu LacZ^{neg} Bereichen konnte in den LacZ^{pos} Bereichen eine 27,9 ± 17,7-fache Anreicherung des Clara-zell-spezifischen Markers CCSP gemessen werden. Auch der Marker SP-C, welcher in adulten ATII-Zellen, aber auch in Lungenepithelvorläuferzellen während der Lungenentwicklung exprimiert wird [209], war in LacZ^{pos} Bereichen 18 ± 10,9-

fach im Vergleich zu LacZ^{neg} Bereichen erhöht. Zudem konnte auch eine $16,1 \pm 11,9$ -fach erhöhte SP-B Genexpression in LacZ^{pos} Bereichen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren die für ziliert tragende Zellen spezifischen Marker Foxj1 und Tubb4 in LacZ^{pos} Bereichen nur geringfügig angereichert (Abb. 3.20.).

3.6. Der zeitliche Verlauf der transgenen GFP Expression in Differenzierungskulturen der CCSP Reporter miPS-Klone stimmt nicht mit der Expression von LacZ überein

Der miPS-Klon C1L9 wurde über das etablierte ML-Protokoll differenziert. Dabei wurde die GFP Expression täglich unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Unter Berücksichtigung der Hintergrundfluoreszenz konnten die ersten echten GFP positiven (GFP^{pos}) Zellen an Tag 10 detektiert werden. Vereinzelt wurden GFP^{pos} Bereiche für die Wiedererkennung mit einem wasserfesten Stift am Plattenboden markiert und täglich die Fluoreszenz dokumentiert. Es konnte gezeigt werden, dass die GFP-Fluoreszenz bis Tag 14 zunahm, um schließlich bis Tag 26 wieder abzunehmen (Abb. 3.21.). Zudem wurden die mit wasserfestem Stift markierten GFP^{pos} Bereiche exemplarisch auf eine β -Galaktosidaseaktivität getestet, indem nach PFA-Fixierung eine 4-stündige Inkubation mit dem X-Gal-Substrat durchgeführt wurde. Es konnte beobachtet werden, dass keines der GFP^{pos} Bereiche auch X-Gal positiv waren. Folglich gab es keine Übereinstimmung der GFP Expression mit der LacZ Expression.

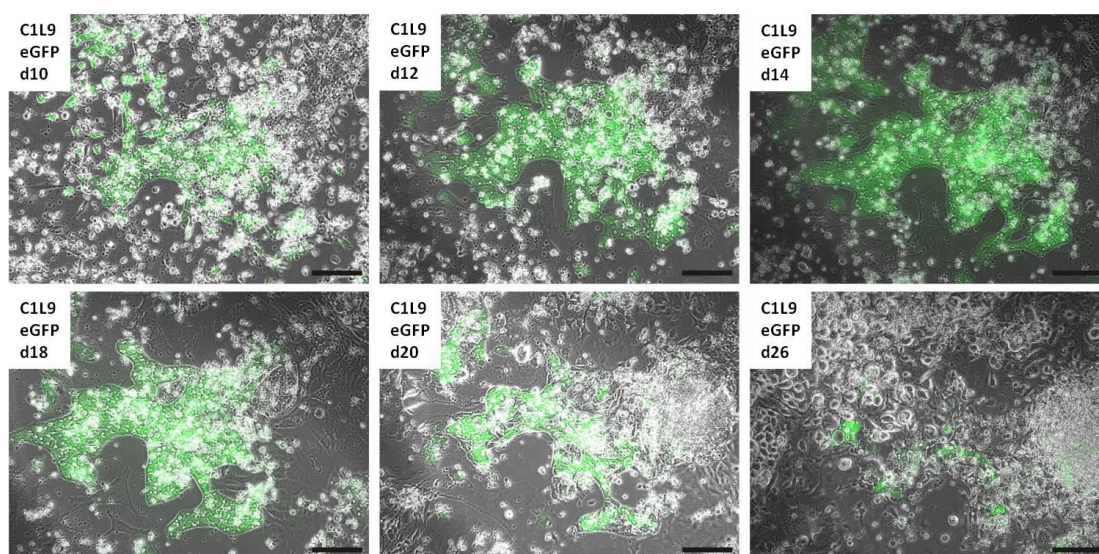


Abb. 3.21.: Ein exemplarisch ausgewählter GFP^{pos} Bereich in Differenzierungskulturen des miPS-Klons C1L9 im Zeitverlauf.

Der miPS-Klon C1L9 wurde im ML-Protokoll mit Zugabe von DCI (Tag 14-26) differenziert. Die GFP-Fluoreszenz wurde täglich bis Tag 26 dokumentiert. Abgebildet ist ein zeitlicher Ausschnitt von Tag 10 bis Tag 26. Messbalken 100 μm .

Über eine Isolierung der GFP^{pos} und GFP negativen (GFP^{neg}) Bereiche sollte anschließend das CCSP Expressionsmuster über qRT-PCR analysiert werden. In den GFP^{pos} Bereichen konnte im Vergleich zu den GFP^{neg} Bereichen keine Anreicherung der CCSP Genexpression nachgewiesen werden (Abb. 3.22.).

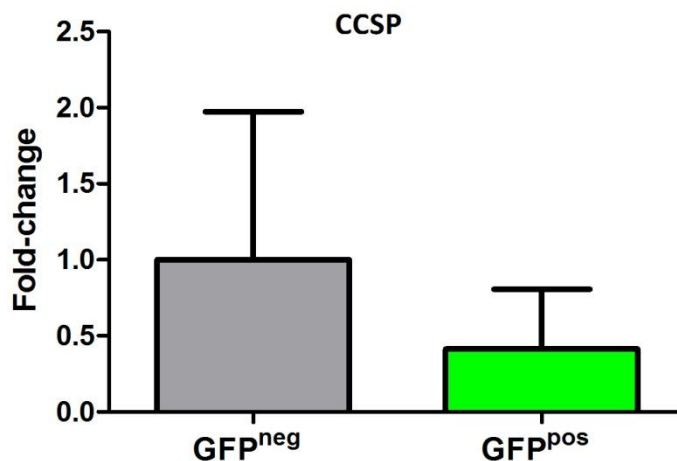


Abb. 3.22.: Keine erhöhte CCSP Genexpression in den GFP^{pos} Bereichen des miPS-Klons C1L9.

Die CCSP Genexpression an Tag 26 war in den GFP^{pos} Bereichen im Vergleich zu den GFP^{neg} Bereichen nicht erhöht. Abgebildet ist die x-fache Änderung (Fold-change) der Markerexpression im Vergleich zu den negativen Bereichen (Mittelwert ± SEM; n=2).

3.7. Die transmissionselektronmikroskopische (TEM) Analyse bestätigt das Vorkommen von Clara-Zellen in den LacZ^{pos} Bereichen

Die TEM wurden von Prof. Dr. Andreas Schmiedel und Prof. Dr. Matthias Ochs der Anatomie an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Für eine ultrastrukturelle Analyse der LacZ^{pos} Bereiche wurden diese an Tag 26 der ML-Differenzierung des miPS-Klons C1L9 gesammelt, fixiert, Ultradünnschnitte angefertigt und über TEM untersucht.

In den LacZ^{pos} Bereichen konnten Zellen detektiert werden, die eine für Clara-Zellen der Nagetierlunge typische Ultrastruktur aufwiesen. Die aus miPS-abgeleiteten Zellen hatten einen für Clara-Zellen typischen vorgewölbten zilienfreien Zellapex mit sekretorischen Granula (Abb. 3.23. B). Die Zellen zeigten zudem Mikrovilli und laterale Zell-Zell-Kontakte inklusive Tight Junctions. In den Zellen konnten außerdem glattes endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien vom Cristae-Typ nachgewiesen werden. Einige dieser Zellen waren in epithelartigen Strukturen organisiert, bestehend aus einem einschichtigen

Zelllayer aus nicht-zilientragenden Zellen. Diese Epithelzellen zeigten eine basal-apikale Orientierung und waren auf einer Basallamina ansässig, die an subepitheliales Bindegewebe angrenzte (Abb. 3.23. D). Somit bestätigte die ultrastrukturelle Analyse der LacZ^{pos} Bereichen das Vorhandensein von Clara-Zell-ähnlichen Zellen (Abb. 3.23.).

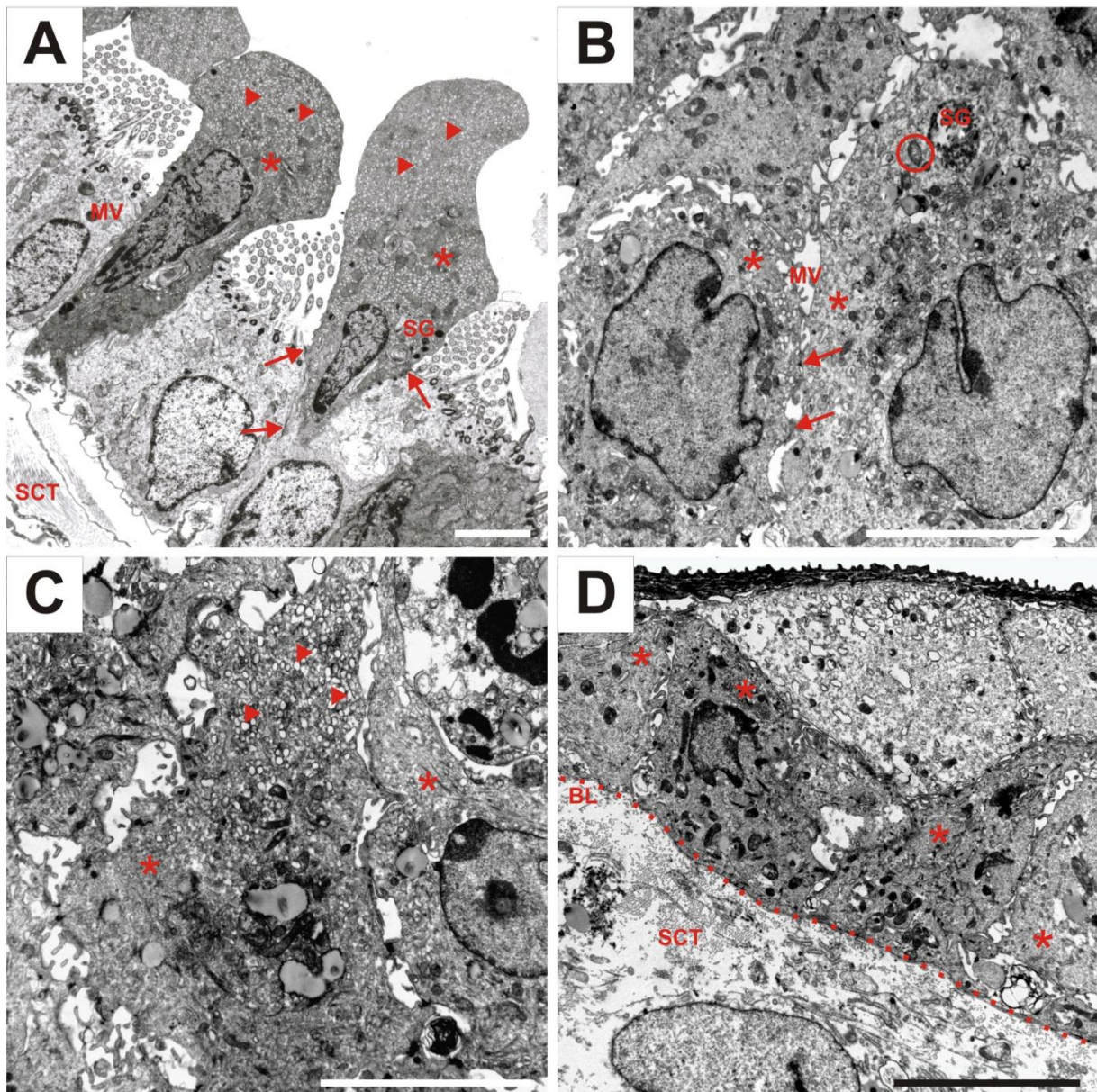


Abb. 3.23.: Ultrastruktureller Nachweis von Clara-Zell-ähnlichen Zellen in X-Gal gefärbten LacZ^{pos} Bereichen.

An Tag 26 der Differenzierung des miPS-Klons C1L9 erfolgte eine X-Gal-Färbung. Positive Bereiche wurden über TEM analysiert. **A:** Clara-Zellen der adulten Rattenlunge. **B-D:** miPS-abgeleitete Clara-Zell-ähnliche Zellen. **Pfeil:** Tight Junctions; **Pfeilspitze:** glattes endoplasmatisches Retikulum; **Stern:** Clara-Zelle; **Kreis:** Mitochondrion (Cristae Typ); **BL:** Basallamina; **MV:** Mikrovilli; **SCT:** subepitheliales Bindegewebe; **SG:** Sekretorische Granula. Messbalken 5 µm.

4. Diskussion

Studien an PS-Zellen haben gezeigt, dass sie, neben ihrer unbegrenzten Teilungsfähigkeit, die Fähigkeit besitzen, in Zellderivate aller drei Keimblätter Mesoderm, Endoderm und Ektoderm zu differenzieren [118, 142, 143, 210]. Die PS-Zell-abgeleiteten Zellquellen eröffnen der stammzellbasierten Behandlungsstrategie neue therapeutische Möglichkeiten für schwere Lungenerkrankungen wie beispielsweise die CF. Denkbar ist die Verwendung dieser Zellen für Zellersatz- und Gewebeersatztherapien. Zudem können Patientenspezifische hiPS-Zellen als Modellsystem für genetisch bedingte Lungenerkrankungen herangezogen werden. Die Verwendung von PS-Zellen eröffnet der Forschung zudem neue Möglichkeiten für das Screening von Wirkstoffen und zur Untersuchung unbekannter Schlüsselfaktoren und Mechanismen in der Embryonalentwicklung.

Bislang existieren vergleichsweise wenige Veröffentlichungen bezüglich der Differenzierung von PS-Zellen in Atemwegsepithelzellen [183, 187, 190, 197-199]. Trotz der Schwierigkeiten mit derzeitigen Analyseverfahren werden in den Veröffentlichungen methodische Einschränkungen nicht erwähnt oder sogar völlig ignoriert [211]. Obwohl einige innovative Publikationen über die effiziente Generierung PS-Zell-abgeleiteter Lungeneithelvorläuferzellen berichten [177, 178, 193, 212], wurden Schlüsselfaktoren spezifisch für die weitere bronchoalveoläre Subspezifizierung bisher wenig untersucht.

In der vorliegenden Dissertation sollte ein effizientes und zuverlässiges Protokoll für die Differenzierung von mES- und miPS-Zellen in Atemwegsepithelzellen mit dem Fokus auf Clara-Zellen etabliert werden. Dabei sollte zunächst i) ein definiertes serumfreies ML-Protokoll erstellt werden, ii) Schlüsselfaktoren für die Differenzierung identifiziert werden und iii) erste miPS-Klone mit einer Clara-Zell-spezifischen Reportergenexpression generiert werden.

4.1. Charakterisierung der miPS Klone C1L9 und C1L17

Nach dem Waddington Model („epigenetic landscape“) ist der Prozess, den somatische Zellen in der Entwicklung durchleben und einen differenzierten Phänotyp einnehmen, nicht reversibel [213]. Über die Reprogrammierung von somatischen Zellen kann das

Zellschicksal jedoch verändert werden, so dass beispielsweise aus einem differenzierten Zustand wieder ein pluripotenter undifferenzierter Zustand erzeugt werden kann [141-143]. Ein entscheidendes Merkmal von PS-Zellen ist die Expression pluripotenz-assoziiierter Transkriptionsfaktoren [124, 125, 142, 143, 214, 215]. Tatsächlich konnten in den neu generierten miPS-Klonen, C1L9 und C1L17, vergleichbar mit der hier verwendeten etablierten mES-Zelllinie BryFoxa2 eine mRNA Expression der pluripotenz-assoziierten Marker Oct 3/4, Sox2, Nanog und Klf4 mittels qRT-PCR nachgewiesen werden. Auch auf Proteinebene konnten die kernlokalisierten Transkriptionsfaktoren Oct 3/4 und Sox2 nachgewiesen werden.

Studien haben gezeigt, dass bei subkutaner Injektion in immundefiziente Mäuse PS-Zellen die Fähigkeit haben Teratome zu bilden, die Gewebestrukturen des Ektoderms, Mesoderms und Endoderm zeigen [120, 216-218]. Bei beiden generierten miPS-Klonen konnte die Bildung derartiger Teratome beobachtet werden, was die Fähigkeit in alle drei Keimblätter zu differenzieren bestätigte.

Durch den Nachweis der genannten Merkmale konnte eine Pluripotenz der beiden generierten miPS-Klone C1L9 und C1L17 verifiziert werden.

4.2. Die Feeder-freie Kultivierung undifferenzierter PS-Zellen

Vor Einleitung einer Differenzierung sollten die undifferenzierten miPS-Zellen mindestens zwei Passagen auf Gelatine beschichteten Kulturgefäßen Feeder-frei kultiviert werden, um so einer möglichen Kontamination der Differenzierungskulturen mit Feeder und damit einer Verfälschung der Analyseergebnisse vorzubeugen.

4.3. Die Erhöhung der endodermalen Differenzierung durch Änderung des partiell serumhaltigen EB-Differenzierungsprotokolls in ein definiertes serumfreies ML-Differenzierungsprotokoll

Ein wichtiger Differenzierungsschritt für die Generierung von Zellen des Atemwegsepithels ist die Bildung von definitivem Endoderm, aus dem sich im Laufe der Embryogenese unter anderem das Lungenepithel entwickelt [195].

Eine für PS-Zellen häufig beschriebene und verwendete Differenzierungsmethode basiert auf der Grundlage einer Suspensionskultur. Über Zellaggregation und den Entzug der pluripotenz-erhaltenden Faktoren wird die Bildung einer dreidimensionalen Struktur

ermöglicht, die als EB bezeichnet wird [164, 190, 219-222]. Über die Bildung derartiger Strukturen entstehen Zell-Zell-Interaktionen die, wie in einer natürlichen Embryonalentwicklung, eine spontane Differenzierung der PS-Zellen in Derivate aller drei Keimblätter fördern [219, 220]. Durch den festen Verbund der Zellen innerhalb eines EBs ist allerdings eine gerichtete und künstliche Beeinflussung der Differenzierung über exogen zugefügte Faktoren nur schwer möglich, da diese beispielsweise Zellen im Inneren des EBs nur schwer oder gar nicht erreichen. Um eine gerichtete Differenzierung von PS-Zellen zu ermöglichen, ist es notwendig, dass applizierte Faktoren wie das Activin A gleichmäßig einen Großteil der Zellen erreichen und somit beeinflussen kann [223]. Aus diesem Grund sollte aus dem bestehenden dreidimensionalen EB-Protokoll ein gerichtetes zweidimensionales ML-Protokoll etabliert werden.

Tatsächlich konnte durch die Änderung des bereits etablierten dreidimensionalen und partiell serumhaltigen EB-Differenzierungsprotokolls [190, 206] in ein zweidimensionales ML-Differenzierungsprotokoll der prozentuale Anteil der Zellen, die den endodermalen Marker *Foxa2* exprimieren, erhöht werden (Abb. 3.6.). Eine zusätzliche Anreicherung des definitiven Endoderms wurde über die Verwendung des serumfreien RPMI Mediums erzielt. Dies stimmt mit dem Ergebnis anderer Studien überein, die ebenfalls durch die Umstellung auf serumfreie Bedingungen eine Erhöhung der endodermalen Differenzierung von PS-Zellen erzielen konnten [164]. Darüber hinaus können durch das Weglassen von fetalem Kälberserum, welches ein Naturprodukt mit sehr variabler Zusammensetzung darstellt, definiertere Kulturbedingungen erzielt werden. Da ein großer Unterschied in der Zusammensetzung der verschiedenen Chargen von fetalem Kälberserum besteht, wird für Langzeitstudien ein großer Vorrat dieser kommerziell erworbenen Seren angelegt. Langzeitlagerungen der Seren können jedoch zu einer allmählichen Veränderung/Aktivitätsabnahme der Serumbestandteile (z.B. Proteine) und hierdurch zu einer veränderten Wirkung auf die Differenzierung von PS-Zellen führen. Möglicherweise haben in der vorliegenden Arbeit ähnliche Mechanismen zu den unterschiedlichen Ergebnissen unter Verwendung des serumhaltigen Protokolls geführt. Der Vorteil eines serumfreien Protokolls gegenüber einem serumhaltigen Protokoll wird bei näherer Betrachtung der Versuchswiederholung des serumhaltigen Ansatzes (IMDM, ML-Protokoll, Abb. 3.6 und 3.7) deutlich. Trotz gleicher Kulturbedingungen und unter Verwendung derselben mES-Zelllinie ergab die Versuchswiederholung des serumhaltigen Ansatzes (Abb. 3.7) einen geringeren prozentualen Anteil an definitivem Endoderm. Unter Verwendung desselben Kälberserums bestand der einzige Unterschied darin, dass die

beiden Versuchsreihen in einem Abstand von sechs Monaten unternommen wurden. Die Versuchswiederholung mit dem serumfreien BM in Abb. 3.17. erzielte hingegen nahezu ähnliche Ergebnisse wie die erste Versuchsreihe, in Abb. 3.7. dargestellt, obwohl auch hier zwischen den beiden Wiederholungen ein zeitlicher Unterschied von etwa sechs Monaten bestand.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass TGF- β Faktoren, wie das Activin A, analog zur Gastrulation *in vivo*, die Differenzierung von mES-Zellen und hES-Zellen in endodermale Zellen induziert [164-166]. Die endodermale Differenzierung kann aber nicht nur über rekombinante Proteinen induziert werden, sondern auch über die Verwendung von „Small Molecules“ [168]. In der vorliegenden Studie führte die Applikation von Activin A nur zu einem leichten Anstieg des prozentualen Anteils (etwa 40 %) von aus mES-abgeleitetem definitiven Endoderm (Abb 3.7.). Dies steht im Widerspruch zu anderen Studien, die eine deutlich höhere Induktion der Endodermbildung durch Activin A zeigen konnten (etwa 70 % bis 80 %) [164, 224]. Eine mögliche Erklärung für die nur geringe induzierende Wirkung von Activin A in dieser Studie ist die schon relativ hohe Endoderminduktion durch das verwendete serumfreie RPMI Medium. Der fehlende Effekt der „Small Molecules“ IDE-1 und IDE-2 auf die endodermale Differenzierung der mES-Zellen könnte durch die vollständige Abwesenheit von Serum erklärt werden, da eine frühere Studie zur Endoderminduktion durch IDE-1 und IDE-2 die Anwesenheit von Serum für notwendig postulierte [168]. Darüber hinaus sollte erwähnt werden, dass für die verschiedenen Studien der hier genannten Publikationen unterschiedliche ES-Zelllinien verwendet wurden, die bekanntlich untereinander auch ein unterschiedliches Differenzierungsverhalten und -potenzial zeigen können [211]. Zudem spielen die verschiedenen Kultivierungsbedingungen eine große Rolle [222, 225], vor allem auch die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren, die entweder exogen appliziert werden [173, 222, 226, 227] oder aber auch endogen produziert werden [225]. Auch das gewählte Analyseverfahren sowie die Wahl der endodermalen Marker für die Detektion sollten kritisch hinterfragt werden. Es ist bekannt, dass ein einzelner Marker für die Auswertung der Differenzierungskulturen nicht ausreicht, da sich die Expression eines Markers nicht nur auf das definitive Endoderm beschränkt. Es werden überlappende Expressionen auch im Mesoderm und extraembryonalen Endoderm beobachtet, so dass oft Marker wie Sox17 oder Foxa2 in Kombination mit weiteren mesendodermalen bzw. endodermalen Markern verwendet werden [173-176]. Je nach Kombination der gewählten Markerexpression kann auch das Ergebnis variieren.

In nachfolgenden Versuchen konnte auch in den serumfreien miPS-Zelldifferenzierungskulturen eine zu den mES-Zellen vergleichbar hohe Induktion der endodermalen Marker über die Applikation von Activin A hervorgerufen werden (Abb. 3.8.). Obwohl andere Studien über scheinbar effektivere Protokolle mit einem höheren prozentualen Anteil als etwa 40 % an endodermalen Zellen berichten, stellte das im Rahmen dieser Arbeit etablierte definierte serumfreie ML-Protokoll eine zuverlässige Grundlage dar, um spezifische Schlüsselfaktoren für die Differenzierung von mES- und miPS-Zellen in Atemwegsepithelzellen zu identifizieren.

4.4. DCI induziert die Expression des Clara-Zell Markers CCSP in mES- und miPS-Zell-Differenzierungskulturen

In dieser Studie wurde die Differenzierung von mES- und miPS-Zellen in Epithelzellen der Atemwege letztendlich mit dem neu etablierten ML-Protokoll durchgeführt unter Verwendung des serumfreien Mediums RPMI und der Applikation von 50 ng/ml Activin A (Tag 2-6) als Basaldifferenzierungsmedium (BM). Es konnte festgestellt werden, dass eine zusätzliche Behandlung der Kulturen mit der Dreifaktorkomponente DCI in einer Induktion des Clara-Zellmarkers CCSP in mES- und miPS-Zell Differenzierungskulturen resultiert (Abb. 3.14.). Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten bezüglich der Wirkung von DCI auf primäre Clara-Zellen überein [80-82]. Interessanterweise scheint das DCI einen gegenteiligen Effekt auf die Generierung von zilientragenden Zellen aus PS-Zellen zu haben. Die Expression des Foxj1, welches ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Ziliogenese ist [228], war in der Gegenwart von DCI reduziert. Es ist beschrieben, dass Clara-Zellen als Vorläuferzellen für zilientragende Zellen agieren [203], so dass die Vermutung besteht, dass DCI unter anderem die Differenzierung und Erhaltung des Clara-Zellphänotyps in den PS-Zelldifferenzierungskulturen unterstützt, indem eine Dedifferenzierung der Clara-Zellen zu zilientragenden Zellen verhindert wird. Im Gegensatz zu DCI scheint KGF einen inhibitorischen Effekt auf die Differenzierung der PS-Zellen in Clara-Zellen zu haben und bestätigt damit Studien an adulten Rattenlungen [68]. Neueste Studien von Longmire et al. berichten von einer reifungsfördernden Wirkung der Kombination aus DCI und KGF auf mES-Zell-abgeleitete und aufgereinigte Nkx2.1 positive Vorläuferzellen. Die aufgereinigten Nkx2.1 positiven Vorläuferzellen wurden in dieser Studie allerdings erst während der letzten drei Tage der Differenzierung (Tag 22-25) mit der Kombination aus DCI und KGF behandelt [178]. An dieser Stelle muss kritisch angemerkt

werden, dass Longmire et al. eine weitere Reifung der Nkx2.1 positiven Vorläuferzellen *in vitro* in Lungenepithelzellen, außer über die mRNA Genexpression, nicht weiter untersucht haben. Zudem war in der vorliegenden Studie die CCSP mRNA Expression in den nicht-aufgereinigten mES-Zelldifferenzierungskulturen unter Verwendung von DCI ohne KGF 20.000-fach gegenüber undifferenzierter mES-Zellen erhöht. Demgegenüber konnten Longmire und Kollegen trotz Anteriorisierung des definitiven Endoderms und anschließender Aufreinigung der Nkx2.1 positiven Vorläuferzellen und deren Weiterkultivierung *in vitro* nur eine etwa 5.000-fach höhere CCSP mRNA Expression gegenüber undifferenzierter mES-Zellen erzielen. Dies spricht für die Notwendigkeit einer detaillierten Untersuchung der Wirkung der einzelnen Komponenten DCI und KGF auf die atemwegsspezifische Differenzierung, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde.

4.5. Synergistischer Effekt von DCI und KGF auf die Expression von ATII-Zell-Markern in mES- und miPS-Zell Differenzierungskulturen

Studien an isolierten primären adulten ATII-Zellen konnten einen synergistischen Effekt der Kombination aus DCI und KGF auf den Erhalt des ATII-Zellphänotyps *in vitro* zeigen [229]. Schmeckeber et al. konnten in einer aktuellen Studie nachweisen, dass DCI und KGF auch auf die EB-basierte Differenzierung von mES- und miPS-Zellen in ATII-Zellen einen synergistischen Effekt ausüben [208]. In der vorliegenden Studie konnte der synergistische Effekt der Kombination aus DCI und KGF auf die ATII-Zelldifferenzierung von mES- und miPS-Zelldifferenzierungen auch im ML-Protokoll bestätigt werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Schmeckeber et al. konnte auch auf Basis des ML-Protokolls die höchste SP-C mRNA Expression erzielt werden, wenn DCI (d14-26) mit einer durchgehenden KGF Applikation (d0-26) kombiniert wurde (Abb. 3.16.). Zudem führte in der vorliegenden Studie die KGF Supplementierung ausschließlich in der späten Phase zur zweithöchsten SP-C Expression. Hieraus lässt sich schließen, dass über die bekannte Wirkung von KGF auf die Proliferation und Differenzierung von ATII-Zellen [230] hinaus, noch weitere Mechanismen in einer früheren Differenzierungsphase eine Rolle spielen müssen. Eine Wirkung von KGF auf die Endodermbildung in der frühen Phase der Differenzierung konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, so dass möglicherweise andere noch nicht bekannte Mechanismen in dieser frühen Phase durch KGF beeinflusst werden und einen Einfluss auf die spätere SP-C Expression in den

Differenzierungskulturen haben. Auch Schmeckebeier et al. konnte im EB-basierten und partiell serumhaltigen Protokoll keinen Effekt von KGF auf die Endodermbildung feststellen [208].

4.6. Clara-Zellreporter miPS-Klone differenzieren in Zellen mit einer CCSP Promotor-abhängigen LacZ Expression

Die oft stark heterogene Zusammensetzung der Differenzierungskulturen von PS-Zellen erschwert den Nachweis von generierten Lungenepithelzellen. Die Detektion spezifischer Zelltypen über Antikörperfärbungen wird unter anderem durch mögliche Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper mit anderen Zelltypen in den Differenzierungskulturen und durch einen oft noch unreifen Phänotyp des gesuchten Zelltyps einhergehend mit einem niedrigen Proteinexpressionslevel erschwert. Die Verwendung von transgenen Zelllinien mit einer zelltypspezifischen Reporterexpression kann hilfreich sein, um verlässlich bestimmte Zellderivate in den PS-Zelldifferenzierungskulturen zu detektieren und weitere Untersuchungen durchzuführen. Infolgedessen sollte für eine Charakterisierung von Atemwegsepithelzellen in den Differenzierungskulturen miPS-Klone verwendet werden, die unter dem CCSP-Promotor Reportertransgene exprimieren.

Die kombinierte Nutzung lungenspezifischer Promotoren, wie CCSP und SP-C, mit tetrazyklinregulierenden Systemen wird als Standardmethode für die Untersuchung von Genen in respiratorischen Epithelzellen *in vivo* genutzt [231-235]. Das häufigste verwendete tetrazyklinregulierende System (Tet-On) besteht aus einem reversen tetrazyklinabhängigen Transaktivator (rtTA) und dessen Promotorelement P_{tet} [236-238]. Für die Bindung des Transaktivators an seinen Promotor, der wiederum ein Reporter gen kontrolliert, ist die Anwesenheit eines Tetrazyklins (hier Dox) notwendig. Herkömmliche Versionen des rtTA zeigen eine begrenzte Tetrazyklinsensitivität und eine Restaffinität zu dessen Promotor auf, so dass eine durch den Transaktivator induzierte Hintergrundtransgenexpression auch in Abwesenheit eines Tetrazyklins auftreten kann. Für diese Studie wurde daher eine verbesserte Version des rtTA verwendet. Die rtTA2^S-M2 Version wies in Lungen doppeltransgener Mäuse keine Hintergrundaktivitäten auf und war für Tetrazykline sensitiver als die alte Version [238].

Transgene Mäuse, die die neue Generation des Tetrazyklintransaktivators exprimierten [239], wurden mit GFP-tetO₇-LacZ exprimierenden Reporter-mäusen gekreuzt [240]. Aus Schwanzspitzenfibroblasten der generierten CCSP-rtTA2^S-M2/GFP-tetO₇-LacZ

doppeltransgenen Nachkommen wurden die miPS-Klone C1L9 und C1L17 gewonnen. Die miPS-Klone ermöglichten eine vereinfachte Analyse von miPS-Zellen-abgeleiteten Atemwegsepithelzellen. Durch die Verwendung des optimierten ML-Differenzierungsprotokolls konnte eine deutliche Anzahl an LacZ exprimierenden Zellen an Tag 26 der Differenzierung beider miPS-Klone generiert werden (Abb. 3.18.). Die qRT-PCR Analyse der LacZ^{pos} und LacZ^{neg} Bereiche, die über das ImaGene GreenTMC₁₂FDG-Kit detektiert wurden, bestätigte eine erhöhte CCSP Expression in den LacZ^{pos} Bereichen (Abb. 3.20.). Auch die ATII-Zellmarker SP-C und SP-B waren gegenüber den negativen Bereichen angereichert. Eine mögliche Erklärung ist, dass das 2,3 kb große CCSP Ratten-Promotorelement eine Transgenexpression nicht nur in Clara-Zellen vermittelt, sondern auch in ATII-Zellen [233, 241]. Tatsächlich vermittelte die verwendete Aktivatormauslinie 76 in einer Studie von Duerr et al. in beiden Zelltypen, Clara-Zellen und ATII-Zellen, eine Transgenexpression in neugeborenen Mäusen, wobei in adulten Mäusen die Transgenexpression in Clara-Zellen hoch blieb und in ATII-Zellen abnahm. Zudem ist bekannt, dass SP-C während der frühen Lungenentwicklung zunächst in Vorläuferzellen des Lungenepithels exprimiert wird und erst anschließend in einer späteren Phase der Lungenentwicklung ein ATII-zellspezifischer Marker wird [209]. Darüber hinaus haben Studien zeigen können, dass zumindest SP-B mRNA und das SP-B pro-Protein ebenfalls in adulten primären Clara-Zellen exprimiert wird [242]. Es ist folglich nicht abschließend geklärt, ob in den miPS-Zelldifferenzierungskulturen das verwendete CCSP-Reporterkonstrukt eine Transgenexpression vorwiegend in Clara-Zellen oder in beiden Zelltypen, Clara-Zellen und ATII-Zellen oder in noch unreifen Vorläuferzellen des Lungenepithels vermittelt. Zudem muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass eine Quantifizierung der LacZ^{pos} Bereiche bis zum derzeitigen Zeitpunkt nicht möglich war. Wegen der starken extrazellulären Matrix in späten Differenzierungskulturen ist die Vereinzelung der Zellen in den Kulturen und die weitere Quantifizierung (beispielsweise über FACS) erschwert. Eine genaue Aussage der Effizienz von LacZ^{pos} Bereichen kann daher nicht getroffen werden.

Im Gegensatz dazu waren die Marker für zilientragende Zellen, Foxj1 und Tubb4, in den LacZ exprimierenden Zellen nicht vermehrt induziert, so dass das Reporterkonstrukt offensichtlich keine Transgenexpression in zilientragenden miPS-Zellderivaten vermittelt und bestätigte somit das Expressionsmuster, welches in den transgenen Mäusen gesehen wurde [238]. Die Verifizierung des bronchialen/bronchiolaren Zelltyps von CCSP exprimierenden Zellen in PS-Zelldifferenzierungskulturen wird zudem dadurch erschwert,

da CCSP exprimierende Zellen nicht nur in der Lunge, sondern auch in weiteren Organen vorkommen [188, 189]. Somit ist es zwingen notwendig weitere Clara-Zell-spezifische Marker in die fortlaufenden Untersuchungen mit einzubeziehen, um eine sichere Aussagen über den Phänotyp der Zellen in den LacZ^{pos} Bereichen machen zu können.

Eine unerwartete LacZ Expression konnte allerdings auch in Differenzierungskulturen der miPS-Zellen C1L9 und C1L17 gefunden werden, die nicht mit Dox induzierten wurden. Wie schon erwähnt wies die rtTA2^S-M2 Version in Lungen keine Hintergrundaktivität auf und war für Tetrazykline sensitiver als die alte Version. Eine trotzdem vorhandene Hintergrundaktivität in den miPS-Klonen ohne Dox-Induktion kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, da nähere Untersuchungen diesbezüglich nicht vorgenommen wurden. Eine mögliche weitere Erklärung für die unerwartete LacZ Expression in Differenzierungskulturen der miPS-Klone ohne Dox-Induktion könnte eine über die Reprogrammierung der Mausschwanzfibroblasten stattgefundene epigenetische Modifikation darstellen. In wie weit eine epigenetische Veränderung zu einer Veränderung des Konstrukts geführt hat, ist allerdings nicht klar und bedarf weiterer Untersuchungen. Unspezifische Aktivitäten können ebenfalls entstehen, wenn beispielsweise induzierbare Promotoren der Kontrolle eines Verstärkerelements unterliegen (enhancer trap) wie in dem hier verwendeten Konstrukt, in dem der TetO₇ Promotor von zwei CMVm (cytomegalovirus IE promoter) Elementen flankiert wird. Desweiteren können auch Verstärkerelemente im Genom der Zielzelle derartige Effekte induzieren [243].

In jedem Fall deuten die Daten der qRT-PCR Analyse der LacZ^{pos} und LacZ^{neg} Bereiche auf eine spezifische CCSP-abhängige Induktion der LacZ Expression hin.

4.7. Die GFP Proteinexpression des miPS-Klons C1L9 stimmte mit der LacZ-Expression nicht überein

Die miPS-Klone, die aus der CCSP-rtTA2^S-M2/GFP-tetO₇-LacZ doppeltransgenen Maus generiert wurden, sollten neben LacZ auch gleichzeitig GFP exprimieren. Die regulierte Expression der beiden Gene sollte über den bidirektionalen Promotor TetO₇, der von zwei CMVm Promotorelementen flankiert ist, ermöglicht werden [240].

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die GFP-Expression nicht mit der LacZ-Expression übereinstimmte. In den GFP^{pos} Bereichen konnte keine lungenspezifische mRNA Expression nachgewiesen werden.

Die Daten deuten darauf hin, dass die GFP-Expression, abweichend von der LacZ-Expression, unspezifisch und unabhängig vom transgenen bidirektionalen CCSP-Promotor-Konstrukt in den Zellen exprimiert wurde. Auch hierfür lässt sich nur vermuten, dass über die Reprogrammierung hervorgerufene epigenetische Veränderungen, zu einer unspezifischen Expression (im Gegensatz zu der LacZ Expression) geführt haben. Ohne weitere Untersuchungen bleibt jedoch die Frage offen, warum die LacZ Expression spezifisch durch den Transaktivator induziert wird, aber die GFP Expression unspezifisch durch eine mögliche epigenetische Modifikation wird.

4.8. Die TEM Analyse bestätigt das Vorkommen von Clara-Zellen in den LacZ^{pos} Bereichen

Für die weitere Charakterisierung des Phänotyps von Zellen mit einer Transgenexpression können zusätzliche Nachweismethoden herangezogen werden. Neben spezifischen Antikörperfärbungen kann auch der Nachweis spezifischer ultrastruktureller Merkmale Aufschluss über den vorliegenden Zelltyp geben. Aus diesem Grund wurden die aus dem miPS-Klon C1L9 generierten LacZ^{pos} Bereichen auf das Vorhandensein von Zellen mit einer Clara-Zell typischen Ultrastruktur untersucht.

Über die TEM Analyse konnte der Nachweis erbracht werden, dass ein Clara-Zell-ähnlicher Zelltyp der vorherrschende Phänotyp in den LacZ^{pos} Bereichen war (Abb 3.23). Obwohl nicht quantifiziert, konnte eine deutliche Anreicherung von Zellen mit einer Ultrastruktur typisch für nicht-zilientragende, nicht-schleim-produzierende atemwegsspezifische Clara-Zellen nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass die Ultrastruktur von Clara-Zellen zwischen verschiedenen Spezies variiert. Bei Clara-Zellen der Nagetiere sind glattes endoplasmatisches Retikulum und sekretorische Granula im apikalen Zellapex charakteristische Merkmale, sowie große Mitochondrien und laterale Zellfortsätze [244, 245]. Die Zellen, die in den LacZ^{pos} Bereichen gefunden wurden, wiesen eine apikal-basal orientierte Differenzierung auf und waren über die laterale Plasmamembran über Tight Junctions miteinander verbunden, Anzeichen für eine epitheliale Differenzierung der Zellen. In den apikalen Zellbereichen war glattes endoplasmatisches Retikulum zu finden. Obwohl relativ selten, konnten sekretorische Granula nachgewiesen werden sowie Mitochondrien und Microvilli-ähnliche apikale und laterale Zellfortsätze. Allerdings waren, im Vergleich zu Clara-Zellen der Nagetierlunge, diese Charaktereigenschaften nicht vollständig entwickelt, was auf einen teilweise unreifen Phänotyp der Zellen hindeutet. Dies könnte ein Grund

sein, warum in den LacZ^{pos} Bereichen bisher keine anti-CCSP-immunpositiven Zellen über eine Antikörperfärbung nachgewiesen werden konnten. In zukünftigen Studien könnte über die weitere Differenzierung in Air-Liquid-Interface Kulturen eine Reifung der aus miPS-Zellen abgeleiteten Atemwegsepithelzellen induziert werden.

5. Perspektiven

Im Rahmen dieser Studie ist es gelungen, ein definiertes serumfreies Differenzierungsprotokoll zu etablieren, welches als geeignete Grundlage für die Austestung von Schlüsselfaktoren für die bronchoalveoläre Differenzierung von mES- und miPS-Zellen diene. In der vorliegenden Arbeit konnte DCI als Schlüsselfaktor für die Differenzierung der PS-Zellen in Clara-Zellen identifiziert werden. Demgegenüber scheint die zusätzliche Applikation von KGF contrainduziert zu sein und vielmehr synergistisch die alveoläre Spezifizierung zu fördern. Zudem konnte weltweit zum ersten Mal die Differenzierung von Clara-Zell-Reporter miPS-Zellen in Atemwegsepithelzellen über eine spezifische Reporterexpression nachgewiesen werden.

Für die weitere Optimierung des Protokolls könnte analog zu aktuellen Publikationen eine gezielte Anteriorisierung des definitiven Endoderms in anteriores Vorderdarmendoderm vorgenommen werden, gefolgt von einer gezielter Differenzierung des Vorderdarmendoderms in Lungenepithelzellen [177, 178, 193].

Die Untersuchung der Ultrastruktur hat gezeigt, dass die Clara-Zell-ähnlichen Zellen in den LacZ^{POS} Bereichen der Differenzierungskulturen der miPS-Klone einen eher unreifen Clara-Zellphänotyp aufwiesen. Für eine Förderung der Reifung dieser Zellen ist zukünftig geplant, die unreifen Clara-Zell-ähnlichen Zellen aufzureinigen und über das Air-Liquid-Interface-Modell (mit dem eine Blut-Luft-Schranke imitiert werden soll) weiter zu kultivieren. In diesem Zusammenhang soll auch die Fähigkeit der Clara Zell-ähnlichen Zellen überprüft werden, in zilientragende Zellen differenzieren zu können.

Desweiteren soll ein Protokoll für eine effiziente Dissoziation der Zellen auch in älteren Differenzierungskulturen mit einer stark ausgebildeten extrazellulären Matrix etabliert werden, zum einen für die Quantifizierung der generierten Clara-Zell-ähnlichen Zellen und zum anderen für die Verwendung dieser Zellen in einem geeigneten Tiermodell zur Überprüfung der Funktionalität.

Das etablierte Differenzierungsprotokoll für mES- und miPS-Zellen soll anschließend auch auf hES- und hiPS-Zellen übertragen und ausgetestet werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abca3	ATP-binding-cassette transporter A3
Act A	Activin A
ALI	Air-Liquid-Interface
AP	anterior-posteriores
ATI-Zellen	Alveolarepithelzellen Typ I
ATII-Zellen	Alveolarepithelzellen Typ II
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Basalmedium
BMP	bone morphogenetic protein
Bry	Brachyury
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCSP	Clara cell secretory protein, auch als CC10 bekannt
Cdx	caudal homeobox transcription factor
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CF	cystische Fibrose, Mukoviszidose
CFTR Protein	cystic Fibrosis Transmembran Conductance Regulator
c-Kit	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
c-Myc	myelocytomatosis viral oncogene
CMVm	cytomegalovirus IE promoter
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
d	Tag
DCI	Dexamethason, 8-Bromoadenosin 3',5'-cyclic Monophosphat Natrium und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	Embryoid Body
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS	Durchflusszytometrie
FB	bestrahlte MEFs

Fbx15	F-box protein 15, auch als Fbxo15 bekannt
FCS	fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
Fox	forkhead box transcription factor
G ata	GATA-binding protein
GFP	green fluorescent protein
Gsc	goosecoid
Gsk3	glycogen sythase kinase-3
h ES-Zellen	humane embryonale Stammzellen
Hex	hematopoetically expressed homeobox transcription factor
hiPS-Zellen	humane induzierten pluripotenten Stammzellen
HoxB5	homeobox B5
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IMDM	serumhaltiges Differenzierungsmedium
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
KGF	Keratinocytenwachstumsfaktor, auch als FGF7 bekannt
Klf4	Krüppel-like faktor 4
LIF	leukemia inhibitory factor
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mES-Zellen	murine embryonale Stammzellen
miPS-Zellen	murine induzierte pluripotente Stammzellen
ML	Monolayer
neg	negativ
Nkx2.1	NK2 homeobox 1, auch thyroid transcription factor 1 (TTF1) bekannt
Oct3/4	octamer binding transcription factor 3/4
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pdx1	pancreas-duodenal associated homeobox 1 transcription factor
PI	Propidiumjodid
PKA	protein kinase A
pos	positiv

PS	Primitivstreifen
PS-Zellen	pluripotente embryonale Stammzellen
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
RA	Retinolsäure
RDS	Atemnotsyndrom (RDS, respiratory distress syndrom)
Rex1	RNA endonuclease transcription factor 1
RPMI	serumfreies Differenzierungsmedium
RT	Raumtemperatur
SAGM	Small airway growth Medium
Sox	Sry-related HMG box factor
SP- (A, B, C, D)	Surfactantprotein
SR	Serum Replacment
SSEA	stage-specific embryonic antigen
T3	Trijodthyronin
Tbx1	T-box transcription factor 1
TE	Trypsin/EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGFβ	transforming growth factor-β
Tra	tumor rejection antigen
Tuj1	class III beta-tubulin, auch als Tubb3 bekannt
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wnt	abgeleitet von Int und Wg (wingless) aus <i>Drosophila melanogaster</i>
w/o	with out

7. Literaturverzeichnis

1. Tittel, K., *Beschreibende und funktionelle Anatomie des Menschen*. URBAN&FISCHER Verlag, 2004. **14. Auflage**(Das Atmungssystem): p. 313.
2. Schwegler, J.S., *Der Mensch Anatomie und Physiologie*. Thieme, 2002. **3. Auflage**(Atmung): p. 215-240.
3. Konletzko, Wendel, and Wiesner, *Erkrankungen der Lunge*. de Gruyter, 1994(Struktur und Funktion): p. 3-45.
4. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. Elsevier URBAN & FISCHER Verlag, 2010. **3. Auflage**(Atmungsorgane): p. 263-285.
5. Hong, K.U., et al., *In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(4): p. L643-9.
6. Charles G. Plopper, D.M.H., Alan R. Buckpitt, *The Lung*. Scientific Foundations, 1997. **2**(35): p. 517-533.
7. Rawlins, E.L., et al., *Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 410-7.
8. Rawlins, E.L., et al., *The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 525-34.
9. Chang, M.M.J., L. Shih, and R. Wu, *Pulmonary epithelium: Cell types and function*, in *The pulmonary epithelium in health and disease*, D. Proud, Editor. 2008, John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, England. p. 1-26.
10. Wright, J.R., *Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense*. J Clin Invest, 2003. **111**(10): p. 1453-5.
11. Adamson, I.Y. and D.H. Bowden, *The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Am J Pathol, 1974. **77**(2): p. 185-97.
12. Evans, M.J., et al., *Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂*. Am J Pathol, 1973. **70**(2): p. 175-98.
13. Keith L. Moore, T.V.N.P., *Embryologie*. ELSEVIER, Urban & Fischer Verlag, München, 2007. **5. Auflage**(4.7. Derivate der Keimblätter): p. 85.
14. Lawson, A. and G.C. Schoenwolf, *Epiblast and primitive-streak origins of the endoderm in the gastrulating chick embryo*. Development, 2003. **130**(15): p. 3491-501.
15. Bellairs, R., *The primitive streak*. Anat Embryol (Berl), 1986. **174**(1): p. 1-14.
16. Hay, E.D., *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it*. Dev Dyn, 2005. **233**(3): p. 706-20.
17. Kimura, W., et al., *Fate and plasticity of the endoderm in the early chick embryo*. Dev Biol, 2006. **289**(2): p. 283-95.
18. Lewis, S.L. and P.P. Tam, *Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function*. Dev Dyn, 2006. **235**(9): p. 2315-29.
19. Rodaway, A. and R. Patient, *Mesendoderm. an ancient germ layer?* Cell, 2001. **105**(2): p. 169-72.
20. Wells, J.M. and D.A. Melton, *Vertebrate endoderm development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 393-410.
21. Conlon, F.L., et al., *A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse*. Development, 1994. **120**(7): p. 1919-28.
22. Kelly, O.G., K.I. Pinson, and W.C. Skarnes, *The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice*. Development, 2004. **131**(12): p. 2803-15.
23. Lickert, H., et al., *Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm*. Dev Cell, 2002. **3**(2): p. 171-81.

24. Yoshikawa, Y., et al., *Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse*. Dev Biol, 1997. **183**(2): p. 234-42.
25. Clements, D. and H.R. Woodland, *Changes in embryonic cell fate produced by expression of an endodermal transcription factor, Xsox17*. Mech Dev, 2000. **99**(1-2): p. 65-70.
26. Alexander, J. and D.Y. Stainier, *A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish*. Curr Biol, 1999. **9**(20): p. 1147-57.
27. Kanai-Azuma, M., et al., *Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice*. Development, 2002. **129**(10): p. 2367-79.
28. Morrisey, E.E., et al., *GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo*. Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3579-90.
29. Monaghan, A.P., et al., *Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm*. Development, 1993. **119**(3): p. 567-78.
30. Clevidence, D.E., et al., *Members of the HNF-3/forkhead family of transcription factors exhibit distinct cellular expression patterns in lung and regulate the surfactant protein B promoter*. Dev Biol, 1994. **166**(1): p. 195-209.
31. Ang, S.L. and J. Rossant, *HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development*. Cell, 1994. **78**(4): p. 561-74.
32. Weinstein, D.C., et al., *The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo*. Cell, 1994. **78**(4): p. 575-88.
33. Kuo, C.T., et al., *GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation*. Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 1048-60.
34. Barbera, J.P.M., Clements, M., Thomas, P., Rodriguez, T., Meloy, D., Kioussis, D., Beddington, R. S. P., *The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation*. Development, 2000. **127**: p. p. 2433-2445.
35. Offield, M.F., et al., *PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum*. Development, 1996. **122**(3): p. 983-95.
36. Kinkel, M.D., et al., *Cdx4 is required in the endoderm to localize the pancreas and limit beta-cell number*. Development, 2008. **135**(5): p. 919-29.
37. Cardoso, W.V., *Molecular regulation of lung development*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 471-94.
38. Dessimoz, J., et al., *FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo*. Mech Dev, 2006. **123**(1): p. 42-55.
39. Cardoso, W.V. and J. Lu, *Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies*. Development, 2006. **133**(9): p. 1611-24.
40. Rossi, J.M., et al., *Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm*. Genes Dev, 2001. **15**(15): p. 1998-2009.
41. Serls, A.E., et al., *Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung*. Development, 2005. **132**(1): p. 35-47.
42. Roszell, B., et al., *Efficient derivation of alveolar type II cells from embryonic stem cells for in vivo application*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(11): p. 3351-65.
43. Wells, J.M. and D.A. Melton, *Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers*. Development, 2000. **127**(8): p. 1563-72.
44. Yamauchi, H., et al., *Fgf4 is required for left-right patterning of visceral organs in zebrafish*. Dev Biol, 2009. **332**(1): p. 177-85.
45. Ameri, J., et al., *FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner*. Stem Cells, 2010. **28**(1): p. 45-56.

46. Lazzaro, D., et al., *The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain*. *Development*, 1991. **113**(4): p. 1093-104.
47. Hosgor, M., et al., *Thyroid transcription factor-1 expression during normal human lung development and in patients with congenital diaphragmatic hernia*. *J Pediatr Surg*, 2002. **37**(9): p. 1258-62.
48. Ikeda, K., et al., *Gene structure and expression of human thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(14): p. 8108-14.
49. Morrissey, E.E. and B.L. Hogan, *Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development*. *Dev Cell*, 2010. **18**(1): p. 8-23.
50. Kitaoka, H., P.H. Burri, and E.R. Weibel, *Development of the human fetal airway tree: analysis of the numerical density of airway endtips*. *Anat Rec*, 1996. **244**(2): p. 207-13.
51. Itoh, N. and D.M. Ornitz, *Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family*. *Dev Dyn*, 2008. **237**(1): p. 18-27.
52. Cardoso, W.V., et al., *FGF-1 and FGF-7 induce distinct patterns of growth and differentiation in embryonic lung epithelium*. *Dev Dyn*, 1997. **208**(3): p. 398-405.
53. Finch, P.W., et al., *Pattern of keratinocyte growth factor and keratinocyte growth factor receptor expression during mouse fetal development suggests a role in mediating morphogenetic mesenchymal-epithelial interactions*. *Dev Dyn*, 1995. **203**(2): p. 223-40.
54. Mason, I.J., et al., *FGF-7 (keratinocyte growth factor) expression during mouse development suggests roles in myogenesis, forebrain regionalisation and epithelial-mesenchymal interactions*. *Mech Dev*, 1994. **45**(1): p. 15-30.
55. Peters, K., et al., *Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung*. *EMBO J*, 1994. **13**(14): p. 3296-301.
56. Peters, K.G., et al., *Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse*. *Development*, 1992. **114**(1): p. 233-43.
57. Post, M., et al., *Keratinocyte growth factor and its receptor are involved in regulating early lung branching*. *Development*, 1996. **122**(10): p. 3107-15.
58. Shiratori, M., et al., *Keratinocyte growth factor and embryonic rat lung morphogenesis*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **15**(3): p. 328-38.
59. Chelly, N., et al., *Role of keratinocyte growth factor in the control of surfactant synthesis by fetal lung mesenchyme*. *Endocrinology*, 2001. **142**(5): p. 1814-9.
60. Chelly, N., et al., *Keratinocyte growth factor enhances maturation of fetal rat lung type II cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **20**(3): p. 423-32.
61. Deterding, R.R., et al., *Prevention of bleomycin-induced lung injury in rats by keratinocyte growth factor*. *Proc Assoc Am Physicians*, 1997. **109**(3): p. 254-68.
62. Yano, T., et al., *Keratinocyte growth factor reduces lung damage due to acid instillation in rats*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **15**(4): p. 433-42.
63. Mason, C.M., et al., *Keratinocyte growth factor attenuates lung leak induced by alpha-naphthylthiourea in rats*. *Crit Care Med*, 1996. **24**(6): p. 925-31.
64. Barazzone, C., et al., *Keratinocyte growth factor protects alveolar epithelium and endothelium from oxygen-induced injury in mice*. *Am J Pathol*, 1999. **154**(5): p. 1479-87.
65. Welsh, D.A., et al., *Keratinocyte growth factor attenuates hydrostatic pulmonary edema in an isolated, perfused rat lung model*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(3): p. H1311-7.
66. Fehrenbach, H., et al., *Keratinocyte growth factor-induced proliferation of rat airway epithelium is restricted to Clara cells in vivo*. *Eur Respir J*, 2002. **20**(5): p. 1185-97.

67. Yildirim, A.O., et al., *Keratinocyte growth factor protects against Clara cell injury induced by naphthalene*. Eur Respir J, 2008. **32**(3): p. 694-704.
68. Yano, T., et al., *KGF regulates pulmonary epithelial proliferation and surfactant protein gene expression in adult rat lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1146-58.
69. Platzker, A.C., et al., *Surfactant in the lung and tracheal fluid of the fetal lamb and acceleration of its appearance by dexamethasone*. Pediatrics, 1975. **56**(4): p. 554-61.
70. Johnson, J.W., et al., *Glucocorticoids and the rhesus fetal lung*. Am J Obstet Gynecol, 1978. **130**(8): p. 905-16.
71. Liggins, G.C., *Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids*. J Endocrinol, 1969. **45**(4): p. 515-23.
72. Roberts, D. and S. Dalziel, *Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(3): p. CD004454.
73. Ballard, P.L., *Hormones and lung maturation*. Monogr Endocrinol, 1986. **28**: p. 1-354.
74. Kikkawa, Y., et al., *Morphologic development of fetal rabbit lung and its acceleration with cortisol*. Am J Pathol, 1971. **64**(2): p. 423-42.
75. Ballard, P.L., et al., *Regulated gene expression in cultured type II cells of adult human lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. **299**(1): p. L36-50.
76. Gonzales, L.W., et al., *Differentiation of human pulmonary type II cells in vitro by glucocorticoid plus cAMP*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(5): p. L940-51.
77. Guttentag, S.H., et al., *Surfactant protein B processing in human fetal lung*. Am J Physiol, 1998. **275**(3 Pt 1): p. L559-66.
78. Solarin, K.O., et al., *Expression and glucocorticoid regulation of surfactant protein C in human fetal lung*. Pediatr Res, 1997. **42**(3): p. 356-64.
79. Cole, T.J., et al., *Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation*. Genes Dev, 1995. **9**(13): p. 1608-21.
80. Berg, T., et al., *Glucocorticoids regulate the CCSP and CYP2B1 promoters via C/EBPbeta and delta in lung cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(3): p. 907-12.
81. Oshika, E., et al., *Glucocorticoid-induced effects on pattern formation and epithelial cell differentiation in early embryonic rat lungs*. Pediatr Res, 1998. **43**(3): p. 305-14.
82. Roth, F.D., et al., *Budesonide effects on Clara cell under normal and allergic inflammatory condition*. Histochem Cell Biol, 2007. **127**(1): p. 55-68.
83. Mendelson, C.R., *Endocrinology of the Lung. Development and Surfactant Synthesis*. Humana Press, 2000(1): p. 1-44.
84. Odom, M.J., J.M. Snyder, and C.R. Mendelson, *Adenosine 3',5'-monophosphate analogs and beta-adrenergic agonists induce the synthesis of the major surfactant apoprotein in human fetal lung in vitro*. Endocrinology, 1987. **121**(3): p. 1155-63.
85. Whitsett, J.A., et al., *Induction of surfactant protein in fetal lung. Effects of cAMP and dexamethasone on SAP-35 RNA and synthesis*. J Biol Chem, 1987. **262**(11): p. 5256-61.
86. Gonzalez, R.F., L. Allen, and L.G. Dobbs, *Rat alveolar type I cells proliferate, express OCT-4, and exhibit phenotypic plasticity in vitro*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(6): p. L1045-55.
87. Massaro, G.D., et al., *Regulation of secretion in Clara cells: studies using the isolated perfused rat lung*. J Clin Invest, 1981. **67**(2): p. 345-51.
88. Li, J., E. Gao, and C.R. Mendelson, *Cyclic AMP-responsive expression of the surfactant protein-A gene is mediated by increased DNA binding and transcriptional activity of thyroid transcription factor-1*. J Biol Chem, 1998. **273**(8): p. 4592-600.

89. Bruno, M.D., et al., *Lung cell-specific expression of the murine surfactant protein A (SP-A) gene is mediated by interactions between the SP-A promoter and thyroid transcription factor-1*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6531-6.
90. Margana, R.K. and V. Boggaram, *Functional analysis of surfactant protein B (SP-B) promoter. Sp1, Sp3, TTF-1, and HNF-3alpha transcription factors are necessary for lung cell-specific activation of SP-B gene transcription*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 3083-90.
91. Kelly, S.E., et al., *Transcription of the lung-specific surfactant protein C gene is mediated by thyroid transcription factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 6881-8.
92. Zhang, L., J.A. Whitsett, and B.R. Stripp, *Regulation of Clara cell secretory protein gene transcription by thyroid transcription factor-1*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1350**(3): p. 359-67.
93. Ray, M.K., et al., *Transcriptional regulation of a mouse Clara cell-specific protein (mCC10) gene by the NKx transcription factor family members thyroid transcription factor 1 and cardiac muscle-specific homeobox protein (CSX)*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2056-64.
94. Besnard, V., Y. Xu, and J.A. Whitsett, *Sterol response element binding protein and thyroid transcription factor-1 (Nkx2.1) regulate Abca3 gene expression*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(6): p. L1395-405.
95. Organization, W.H., *The top 10 causes of death*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>, June 2011.
96. Schirnhofner, L., et al., *COPD prevalence in Salzburg, Austria: results from the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study*. Chest, 2007. **131**(1): p. 29-36.
97. Mullen, J.B., et al., *Reassessment of inflammation of airways in chronic bronchitis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1985. **291**(6504): p. 1235-9.
98. Lange, S., *Radiologische Diagnostik der Thoraxerkrankungen: Lehrbuch und Atlas Thieme*, 2010. **4. Auflage**(4. Emphysem, chronische obstruktive Lungenerkrankung und Asthma): p. 119-136.
99. Biedermann, A.K., Thomas, *Alpha-1-Antitrypsin-Mangel – eine versteckte Ursache der COPD: Überblick über Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie*. Medizin, Deutsches Ärzteblatt, 2006. **103**(26): p. 1828-1832.
100. Varraso, R., et al., *Prospective study of cured meats consumption and risk of chronic obstructive pulmonary disease in men*. Am J Epidemiol, 2007. **166**(12): p. 1438-45.
101. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
102. Cuthbert, A.W., *New horizons in the treatment of cystic fibrosis*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(1): p. 173-83.
103. Rowe, S.M., S. Miller, and E.J. Sorscher, *Cystic fibrosis*. N Engl J Med, 2005. **352**(19): p. 1992-2001.
104. Stoick-Cooper, C.L., R.T. Moon, and G. Weidinger, *Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine*. Genes & development, 2007. **21**(11): p. 1292-315.
105. Riazi, A.M., S.Y. Kwon, and W.L. Stanford, *Stem cell sources for regenerative medicine*. Methods in molecular biology, 2009. **482**: p. 55-90.
106. Muneoka, K., et al., *Mammalian regeneration and regenerative medicine*. Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews, 2008. **84**(4): p. 265-80.
107. Hamblin, T.J., *E. Donnall Thomas, M.D. Nobel laureate 1990*. Leukemia research, 1991. **15**(2-3): p. 71.
108. Mimeault, M., R. Hauke, and S.K. Batra, *Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2007. **82**(3): p. 252-64.
109. Wobus, A.M., *Potential of embryonic stem cells*. Mol Aspects Med, 2001. **22**(3): p. 149-64.

110. Discher, D.E., D.J. Mooney, and P.W. Zandstra, *Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells*. Science, 2009. **324**(5935): p. 1673-7.
111. Young, H.E. and A.C. Black, Jr., *Adult stem cells*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **276**(1): p. 75-102.
112. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
113. Sun, C.L., et al., *Prevalence and predictors of chronic health conditions after hematopoietic cell transplantation: a report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study*. Blood, 2010. **116**(17): p. 3129-39; quiz 3377.
114. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
115. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
116. Niwa, H., et al., *Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3*. Genes Dev, 1998. **12**(13): p. 2048-60.
117. Ko, K., et al., *In vitro derivation of germ cells from embryonic stem cells*. Front Biosci, 2010. **15**: p. 46-56.
118. Bradley, A., et al., *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. Nature, 1984. **309**(5965): p. 255-6.
119. Thomson, J.A., et al., *Isolation of a primate embryonic stem cell line*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(17): p. 7844-8.
120. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
121. Cherny, R.A., et al., *Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells*. Reproduction, fertility, and development, 1994. **6**(5): p. 569-75.
122. Notarianni, E., et al., *Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep*. Journal of reproduction and fertility. Supplement, 1991. **43**: p. 255-60.
123. Stranzinger, G.F., *Embryonic stem-cell-like cell lines of the species rat and Bovinae*. International journal of experimental pathology, 1996. **77**(6): p. 263-7.
124. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.
125. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
126. Ben-Shushan, E., et al., *Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site*. Molecular and cellular biology, 1998. **18**(4): p. 1866-78.
127. Masui, S., et al., *Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(6): p. 625-35.
128. Nichols, J., E.P. Evans, and A.G. Smith, *Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity*. Development, 1990. **110**(4): p. 1341-8.
129. Takeda, K., et al., *Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(8): p. 3801-4.
130. Kimelman, D. and W. Xu, *beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7482-91.
131. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Dev Cell, 2009. **17**(1): p. 9-26.

132. Kirby, L.A., et al., *Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor, SB-216763, promotes pluripotency in mouse embryonic stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39329.
133. Xu, R.H., et al., *Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells*. Nature methods, 2005. **2**(3): p. 185-90.
134. Koller, B.H., et al., *Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(22): p. 8927-31.
135. Beier, H.M., *Tätigkeitsbericht der Zentralen Ethik-Kommission für Stammzellforschung (ZES)*. Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, 2011. **5**(1): p. p.10-13.
136. Robert, N., G.W. Wong, and J.M. Wright, *Effect of cyclosporine on blood pressure*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(1): p. CD007893.
137. Marcen, R., *Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection*. Drugs, 2009. **69**(16): p. 2227-43.
138. French, A.J., et al., *Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts*. Stem Cells, 2008. **26**(2): p. 485-93.
139. Hubner, K., et al., *Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells*. Science, 2003. **300**(5623): p. 1251-6.
140. Brudermüller, G., et al., *Forschung am Menschen. Ethische Grenzen medizinischer Machbarkeit*. Königshausen & Neumann, 2005(Technische Hindernisse für die klinische Verwendung von embryonalen Stammzellen; Immunhistokompatibilität): p. 225-233.
141. Yamanaka, S. and K. Takahashi, *[Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2006. **51**(15): p. 2346-51.
142. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-7.
143. Wernig, M., et al., *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 318-24.
144. Blöchl, R., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 245-7.
145. Meissner, A., M. Wernig, and R. Jaenisch, *Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(10): p. 1177-81.
146. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
147. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
148. Dalla-Favera, R., et al., *Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(24): p. 7824-7.
149. Zhang, W., et al., *The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18391-8.
150. Aoi, T., et al., *Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells*. Science, 2008. **321**(5889): p. 699-702.
151. Eminli, S., et al., *Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells*. Nat Genet, 2009. **41**(9): p. 968-76.
152. Kim, J.B., et al., *Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4*. Nature, 2009. **461**(7264): p. 649-3.
153. Maherali, N., et al., *Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(1): p. 55-70.

154. Sommer, C.A., et al., *Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette*. Stem Cells, 2009. **27**(3): p. 543-9.
155. Brambrink, T., et al., *Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 151-9.
156. Woltjen, K., et al., *piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 766-70.
157. Stadtfeld, M., et al., *Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 230-40.
158. Okita, K., et al., *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors*. Science, 2008. **322**(5903): p. 949-53.
159. Zhou, H., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(5): p. 381-4.
160. Cho, H.J., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation*. Blood, 2010. **116**(3): p. 386-95.
161. Warren, L., et al., *Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(5): p. 618-30.
162. Park, H.Y., et al., *Efficient Generation of Virus-Free iPS Cells Using Liposomal Magnetofection*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45812.
163. Plank, C., et al., *The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery*. Biol Chem, 2003. **384**(5): p. 737-47.
164. Kubo, A., et al., *Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture*. Development, 2004. **131**(7): p. 1651-62.
165. Yasunaga, M., et al., *Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(12): p. 1542-50.
166. D'Amour, K.A., et al., *Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(12): p. 1534-41.
167. McLean, A.B., et al., *Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 29-38.
168. Borowiak, M., et al., *Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(4): p. 348-58.
169. Nostro, M.C., et al., *Stage-specific signaling through TGFbeta family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells*. Development, 2011. **138**(5): p. 861-71.
170. Xu, X., V.L. Browning, and J.S. Odorico, *Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells*. Mech Dev, 2011. **128**(7-10): p. 412-27.
171. Sui, L., et al., *FGF signaling via MAPK is required early and improves Activin A-induced definitive endoderm formation from human embryonic stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **426**(3): p. 380-5.
172. Sasaki, H. and B.L. Hogan, *Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo*. Development, 1993. **118**(1): p. 47-59.
173. Gadue, P., et al., *Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16806-11.
174. Teo, A.K., et al., *Activin and BMP4 synergistically promote formation of definitive endoderm in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2012. **30**(4): p. 631-42.

175. Kim, P.T. and C.J. Ong, *Differentiation of definitive endoderm from mouse embryonic stem cells*. Results Probl Cell Differ, 2012. **55**: p. 303-19.
176. Gouon-Evans, V., et al., *BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(11): p. 1402-11.
177. Green, M.D., et al., *Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(3): p. 267-72.
178. Longmire, T.A., et al., *Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(4): p. 398-411.
179. Zorn, A.M. and J.M. Wells, *Vertebrate endoderm development and organ formation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. **25**: p. 221-51.
180. Ali, N.N., et al., *Derivation of type II alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells*. Tissue Eng, 2002. **8**(4): p. 541-50.
181. Rippon, H.J., et al., *Initial observations on the effect of medium composition on the differentiation of murine embryonic stem cells to alveolar type II cells*. Cloning Stem Cells, 2004. **6**(2): p. 49-56.
182. Samadikuchaksaraei, A. and A.E. Bishop, *Effects of growth factors on the differentiation of murine ESC into type II pneumocytes*. Cloning Stem Cells, 2007. **9**(3): p. 407-16.
183. Rippon, H.J., et al., *Derivation of distal lung epithelial progenitors from murine embryonic stem cells using a novel three-step differentiation protocol*. Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1389-98.
184. Qin, M., et al., *Cell extract-derived differentiation of embryonic stem cells*. Stem Cells, 2005. **23**(6): p. 712-8.
185. Van Vranken, B.E., et al., *Coculture of embryonic stem cells with pulmonary mesenchyme: a microenvironment that promotes differentiation of pulmonary epithelium*. Tissue Eng, 2005. **11**(7-8): p. 1177-87.
186. Gruh, I. and U. Martin, *Transdifferentiation of stem cells: a critical view*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **114**: p. 73-106.
187. Coraux, C., et al., *Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(2): p. 87-92.
188. Geick, A., et al., *Uteroglobin promoter-targeted c-MYC expression in transgenic mice cause hyperplasia of Clara cells and malignant transformation of T-lymphoblasts and tubular epithelial cells*. Transgenic Res, 2001. **10**(6): p. 501-11.
189. Ibanez-Tallon, I., N. Heintz, and H. Omran, *To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease*. Hum Mol Genet, 2003. **12 Spec No 1**: p. R27-35.
190. Winkler, M.E., et al., *Serum-free differentiation of murine embryonic stem cells into alveolar type II epithelial cells*. Cloning Stem Cells, 2008. **10**(1): p. 49-64.
191. Bingle, C.D., *Thyroid transcription factor-1*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(12): p. 1471-3.
192. Kimura, S., et al., *The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary*. Genes Dev, 1996. **10**(1): p. 60-9.
193. Mou, H., et al., *Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(4): p. 385-97.
194. Mauritz, C., et al., *Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells*. Circulation, 2008. **118**(5): p. 507-17.
195. Lawson, K.A., J.J. Meneses, and R.A. Pedersen, *Cell fate and cell lineage in the endoderm of the presomite mouse embryo, studied with an intracellular tracer*. Dev Biol, 1986. **115**(2): p. 325-39.
196. Smits, A.M., et al., *A new in vitro model for stem cell differentiation and interaction*. Stem Cell Res, 2009. **2**(2): p. 108-12.

197. Nishimura, Y., et al., *Ciliated cells differentiated from mouse embryonic stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(5): p. 1381-8.
198. Van Haute, L., et al., *Generation of lung epithelial-like tissue from human embryonic stem cells*. Respir Res, 2009. **10**: p. 105.
199. Wong, A.P., et al., *Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTRTR protein*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(9): p. 876-82.
200. Plopper, C.G., L.H. Hill, and A.T. Mariassy, *Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung. III. A study of man with comparison of 15 mammalian species*. Exp Lung Res, 1980. **1**(2): p. 171-80.
201. Plopper, C.G., A.T. Mariassy, and L.H. Hill, *Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung: I. A comparison of rabbit, guinea pig, rat, hamster, and mouse*. Exp Lung Res, 1980. **1**(2): p. 139-54.
202. Plopper, C.G., A.T. Mariassy, and L.H. Hill, *Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung: II. A comparison of horse, steer, sheep, dog, and cat*. Exp Lung Res, 1980. **1**(2): p. 155-69.
203. Reynolds, S.D. and A.M. Malkinson, *Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(1): p. 1-4.
204. Singh, G. and S.L. Katyal, *Clara cell proteins*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **923**: p. 43-58.
205. Warlich, E., et al., *Lentiviral Vector Design and Imaging Approaches to Visualize the Early Stages of Cellular Reprogramming*. Molecular Therapy, 2011. **19**(4): p. 782-789.
206. Schmeckeber, S., et al., *Keratinocyte growth factor and dexamethasone plus elevated cAMP levels synergistically support pluripotent stem cell differentiation into alveolar epithelial type II cells*. Tissue Engineering, 2012. **in press**.
207. Roberts, D. and S. Dalziel, *Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth*. Cochrane Database Syst Rev, 2006. **3**: p. CD004454.
208. Schmeckeber, S., et al., *Keratinocyte growth factor and dexamethasone plus elevated cAMP levels synergistically support pluripotent stem cell differentiation into alveolar epithelial type II cells*. Tissue Eng Part A, 2012.
209. Zhou, L., et al., *Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3beta, surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung*. J Histochem Cytochem, 1996. **44**(10): p. 1183-93.
210. Thomson, J.A., et al., *Isolation of a primate embryonic stem cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7844-8.
211. Singh, S.R., P.K. Mishra, and S.X. Hou, *Stem Cells: Organogenesis and Cancer*. Transworld Research Network, 2010(2). Embryonic stem cells: Differentiation into respirator cell derivatives. Christina Mauritz and Ulrich Martin): p. 17-38.
212. Cheng, X., et al., *Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(4): p. 371-84.
213. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: a landscape takes shape*. Cell, 2007. **128**(4): p. 635-8.
214. Masui, S., et al., *Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 625-35.
215. Zhang, P., et al., *Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression*. J Biol Chem, 2010. **285**(12): p. 9180-9.
216. Reubinoff, B.E., et al., *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(4): p. 399-404.
217. Lensch, M.W. and T.A. Ince, *The terminology of teratocarcinomas and teratomas*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(11): p. 1211; author reply 1211-2.

218. Blum, B. and N. Benvenisty, *The tumorigenicity of human embryonic stem cells*. Adv Cancer Res, 2008. **100**: p. 133-58.
219. Leahy, A., et al., *Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation*. J Exp Zool, 1999. **284**(1): p. 67-81.
220. Dang, S.M., et al., *Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture*. Stem Cells, 2004. **22**(3): p. 275-82.
221. Chinzei, R., et al., *Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes*. Hepatology, 2002. **36**(1): p. 22-9.
222. Parashurama, N., et al., *Activin alters the kinetics of endoderm induction in embryonic stem cells cultured on collagen gels*. Stem Cells, 2008. **26**(2): p. 474-84.
223. Zhang, H., et al., *Efficient and repetitive production of hematopoietic and endothelial cells from feeder-free monolayer culture system of primate embryonic stem cells*. Biol Reprod, 2006. **74**(2): p. 295-306.
224. Tada, S., et al., *Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture*. Development, 2005. **132**(19): p. 4363-74.
225. Takenaga, M., M. Fukumoto, and Y. Hori, *Regulated Nodal signaling promotes differentiation of the definitive endoderm and mesoderm from ES cells*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 12): p. 2078-90.
226. Nakanishi, M., et al., *Directed induction of anterior and posterior primitive streak by Wnt from embryonic stem cells cultured in a chemically defined serum-free medium*. FASEB J, 2009. **23**(1): p. 114-22.
227. Hansson, M., et al., *A late requirement for Wnt and FGF signaling during activin-induced formation of foregut endoderm from mouse embryonic stem cells*. Dev Biol, 2009. **330**(2): p. 286-304.
228. You, Y., et al., *Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(4): p. L650-7.
229. Wang, J., et al., *Differentiated human alveolar epithelial cells and reversibility of their phenotype in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(6): p. 661-8.
230. Shannon, J.M., S.A. Gebb, and L.D. Nielsen, *Induction of alveolar type II cell differentiation in embryonic tracheal epithelium in mesenchyme-free culture*. Development, 1999. **126**(8): p. 1675-88.
231. Ray, P., et al., *Regulated overexpression of interleukin 11 in the lung. Use to dissociate development-dependent and -independent phenotypes*. J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2501-11.
232. Wang, Z., et al., *Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1587-600.
233. Tichelaar, J.W., W. Lu, and J.A. Whitsett, *Conditional expression of fibroblast growth factor-7 in the developing and mature lung*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 11858-64.
234. Perl, A.K., et al., *Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10482-7.
235. Perl, A.K., et al., *Conditional recombination reveals distinct subsets of epithelial cells in trachea, bronchi, and alveoli*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(5): p. 455-62.
236. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
237. Gossen, M., et al., *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.
238. Duerr, J., et al., *Use of a new-generation reverse tetracycline transactivator system for quantitative control of conditional gene expression in the murine lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **44**(2): p. 244-54.

239. Urlinger, S., et al., *Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7963-8.
240. Krestel, H.E., et al., *A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(7): p. E39.
241. Perl, A.K., J.W. Tichelaar, and J.A. Whitsett, *Conditional gene expression in the respiratory epithelium of the mouse*. Transgenic Res, 2002. **11**(1): p. 21-9.
242. Lin, S., et al., *Surfactant protein B (SP-B) -/- mice are rescued by restoration of SP-B expression in alveolar type II cells but not Clara cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 19168-74.
243. Pankiewicz, R., et al., *Reversal of the silencing of tetracycline-controlled genes requires the coordinate action of distinctly acting transcription factors*. J Gene Med, 2005. **7**(1): p. 117-32.
244. Plopper, C.G., *Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell*. Am Rev Respir Dis, 1983. **128**(2 Pt 2): p. S37-41.
245. Plopper, C.G. and D.M. Hyde, *Epithelial cells of bronchioles*. Comparative biology of the normal lung, ed. P.R. A. 1992, Boca Raton: CRC Press. 85-92.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katherina-Elpida Katsirntaki
Geburtsdatum: 22.10.1982
Geburtsort: Hannover
Staatsangehörigkeit: Griechisch

Promotion

seit 09/2008 Promotion im Fachbereich Biologie an der Universität Hannover zum Thema: „*Bronchoalveoläre Spezifizierung von pluripotenten Stammzellen: Der Effekt von Dexamethason, cAMP-erhöhende Substanzen und Keratinozytenwachstumsfaktor.*“ Angefertigt wird die Arbeit in den Leibniz Forschungslaboratorien (LEBAO) der Medizinischen Hochschule Hannover.

Stipendium

seit 09/2008 Vergabe eines Stipendiums von der Medizinischen Hochschule Hannover zur Anfertigung der Dissertation.

Studium

10/2002 – 09/2008 Studium der Biologie an der Technischen Universität Carolo – Wilhelmina zu Braunschweig mit Abschluss Diplom – Biologin.

09/2008 Diplomarbeit: „*Vergleichende mesendodermale Differenzierung von murinen induzierten pluripotenten Stammzellen und murinen embryonalen Stammzellen*“. Angefertigt wurde die Arbeit in den Leibniz For-schungslaboratorien (LEBAO) der Medizinischen Hochschule Hannover.

Schul Ausbildung

08/1999 – 06/2002 Gymnasium Isernhagen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

07/1995 – 07/1999 Realschule Isernhagen

08/1993 – 06/1995 Orientierungsstufe Altwarmbüchen, Isernhagen

08/1989 – 06/1993 Comenius – Grundschule Hannover

Verzeichnis eigener Veröffentlichungen

Bisherige Publikationen

Bronchoalveolar sublineage specification of pluripotent stem cells: effect of dexamethasone plus cAMP-elevating agents and keratinocyte growth factor. Katherina Katsirntaki*, Christina Mauritz*, Sabrina Schmeckeber, Malte Sgodda, Verena Puppe, Julia Duerr, Susanne C. Schubert, Andreas Schmiedl, Matthias Ochs, Tobias Cantz, Marcus A. Mall, Ulrich Martin (*Zur Veröffentlichung eingereicht*)

Keratinocyte growth factor and dexamethasone plus elevated cAMP levels synergistically support pluripotent stem cell differentiation into alveolar epithelial type II cells. Sabrina Schmeckeber*, Christina Mauritz*, Katherina Katsirntaki, Malte Sgodda, Verena Puppe, Julia Duerr, Susanne Schubert, Andreas Schmiedl, Qiong Lin, Jiri Paleček, Gerald Draeger, Matthias Ochs, Martin Zenke, Tobias Cantz, Marcus Mall, Ulrich Martin. (*Tissue Engineering Part A. 2012 Nov 23*)

Abstracts

Key factors for the differentiation of murine embryonic (mESCs) and induced pluripotent stem cells (miPSCs) into respiratory epithelial cells. S. Schmeckeber*, K. Katsirntaki*, C. Mauritz*, M. Sgodda, V. Puppe, J. Duerr, A. Schmiedl, Q. Lin, M. Ochs, M. Zenke, T. Cantz, M. Mall, U. Martin.

10th European Respiratory Society (ERS) Lung Science Conference, March 30 – April 1, 2012, Estoril, Portugal.

Differentiation of murine embryonic (mESCs) and induced pluripotent stem cells (miPSCs) into definitive endoderm and airway epithelial cells. K. Katsirntaki*, C. Mauritz, A. Schmiedl, T. Cantz, S. Schmeckeber, V. Puppe, M. Mall, M. Ochs, U. Martin.

6th International Meeting – Stem Cell Network North Rhine – Westphalia, April 5 – 6, 2011, Essen, Germany.

Differentiation of murine embryonic (mESCs) and induced pluripotent stem cells (miPSCs) into definitive endoderm and airway epithelial cells. K. Katsirntaki*, C. Mauritz, T. Cantz, V. Puppe, M. Mall, U. Martin.

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology – Lung Development and Repair, February 6 – 11, 2011, Santa Fe, New Mexico, USA.

Differentiation of airway epithelial cells from murine embryonic (mESCs) and induced pluripotent stem cells (miPSCs) via enhanced definitive endoderm generation. K. Katsirntaki*, C. Mauritz, T. Cantz, M. Mall, U. Martin.

5th Annual Meeting of the German Society of Stem Cell Research, September 30 – October 2, 2010, Lübeck, Germany.

Mit einem * gekennzeichnete Namen sind als Erstautoren definiert

Serum free differentiation of murine embryonic stem cells (mESCs) towards clara cells via enhanced definitive endoderm formation. K. Katsirntaki*, C. Mauritz, U. Martin.

Combined Meeting, XVIIth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT); 4th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research (GSZ); 16th Annual Meeting of the German Society of Gene Therapy (DGGT); Co-organized by the European Branch of the International Society for Cellular Therapy (ISCT), November 20 – 25, 2009, Hannover, Germany.

Vortrag

Optimized differentiation protocols for the generation of murine and human pluripotent stem cells into respiratory epithelial cells. K. Katsirntaki*, C. Mauritz* (gehalten von C. Mauritz).

3rd EACTS Meeting on Cardiac and Pulmonary Regeneration, December 14 – 15, 2012, Berlin, Germany.

Ehrungen

01/2013 **Posterpreis** von dem Deutschen Zentrum für Lungenforschung für das Poster „*Differentiation of murine and human pluripotent stem cells into respiratory epithelial cells*“ auf dem 2. Jahrestreffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung 2013, Bad Nauheim, Deutschland.

03/2012 **Posterpreis** von der European Respiratory Society für das Poster „*Key factors for the differentiation of pluripotent stem cells into lung epithelial cells*“ auf der 10th ERS Lung Science Conference 2012, Estoril, Portugal.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulrich Martin danke ich ganz herzlich für die Vergabe des Themas, für die Möglichkeit die Arbeit im LEBAO anfertigen zu können sowie die Unterstützung und Betreuung während der Promotion.

Bei Prof. Dr. Ngezahayo bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Dr. Christina Mauritz möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken! Danke, dass du immer für mich da warst, dass du mich immer unterstützt hast und mir bei allen Schwierigkeiten und Rätzeln stets zur Seite standest.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern aus dem LEBAO, besonders der Arbeitsgruppe von AG Mauritz. Liebe Wiebke Schulze und liebe Sandra Menke, euch danke ich aus tiefstem Herzen! Vielen Dank für eure Unterstützung bei dieser Arbeit und für die tolle Zeit im Labor.

Alexandra Haase, Ruth Olmer, Anett Witthuhn und Ralf Haller danke ich für ein tolles Büroklima und für die Beantwortung jeglicher Fragen.

Jennifer Beier, Sebastian Werneburg und Ingrid Schmidt-Richter danke ich für die vielen netten Gespräche zwischendurch und das Erschaffen einer netten Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt Jenny. Jenny, ich danke dir für den vielen Spaß den wir täglich bei der Arbeit hatten und für deine ständige Unterstützung, hilfreichen und aufbauenden Gespräche und für "JenKat".

Auch Zlata Vukadinovic-Nikolic und Mareike Derks danke ich für ein abwechslungsreiches Arbeitsklima und den tollen und interessanten Gesprächen zwischendurch.

Katerina Antonaki, καρδούλα μου γλυκιά! Danke für alles! Ich danke dir, dass du immer an meiner Seite stehst, egal was ist. Auch dir liebste Aysun Yilmaz! Ich bin so froh, Freunde wie euch zu haben. Ohne euch wäre vieles schwerer gewesen.

Bei Sandra Laggies und Stephanie Sievers möchte ich mich für die schöne Studienzeit bedanken. Wenn ihr nicht gewesen wäret, wäre die Studienzeit sicherlich nur halb so lustig gewesen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Athanasios Melachrinos und seiner Familie bedanken! Atha, danke dass es dich gibt, dass du mir immer gut zuredest und mir immer Kraft und Mut gibst.

An dieser Stelle möchte ich meiner ganzen Familie danken. Auch denen, die nicht in Deutschland leben. Besonders **meinen Eltern**, denen ich diese Arbeit widme und die mich zu dem gemacht haben, was ich heute bin. Ich danke euch für eure ständige Unterstützung in allen Lebenslagen, für euer Vertrauen und für euer Verständnis.

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Bronchoalveoläre Spezifizierung von pluripotenten Stammzellen: Der Effekt von Dexamethason, cAMP-erhöhenden Substanzen und Keratinozytenwachstumsfaktor.“

selbstständig verfasst habe. Alle verwendeten Hilfsmittel, Quellen und zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen habe ich vollständig angegeben.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Isernhagen, Januar 2013

Katherina-Elpida Katsirntaki