

Abschlussbericht über die Förderperiode 2003 bis 2005 an die Max-Buchner-Forschungsstiftung

„Generierung funktioneller Kardiomyozyten abgeleitet aus murinen embryonalen Stammzellen für die Transplantation in ein Maus-Herzinfarkt-Modell“

Das Projekt wurde im Rahmen des Promotionsvorhabens von Sylvia Niebrügge durchgeführt.

Kontakt: sylvia.niebruegge@gmx.de

Inhalt	Abstract
	Nutzen für die Biotechnologie
	Projektbeschreibung
	Zusammenfassung
	Anhang

Abstract

Die Generierung großer Mengen funktioneller Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen (ES Zellen) ist für künftige therapeutische Anwendungen am kranken Herzen von entscheidender Bedeutung. Durch ein in diesem Projekt optimiertes Kultivierungsverfahren im 2 L-Bioreaktor kann innerhalb von 16 Tagen eine -für therapeutische Zwecke relevante- Menge von ca. 4×10^9 Kardiomyozyten bereitgestellt werden. Die generierten murinen Kardiomyozyten zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* typische kardiale Funktionalität.

The transplantation of functional cardiomyocytes derived from embryonic stem cells (ESCs) into affected myocard is presently considered a promising approach to the therapy of heart failure. An optimized cultivation strategy of ES cells in a 2 L-bioreactor makes it possible to produce a relevant number of about 4×10^9 cardiomyocytes. The generated murine cardiomyocytes demonstrated typical functionality as well *in vitro* as *in vivo*.

Nutzen für die Biotechnologie

Die Entwicklung eines geeigneten *Scale-up* Verfahrens zur Generierung von Kardiomyozyten abgeleitet aus embryonalen Stammzellen (ES Zellen) zeigt neue Möglichkeiten zur Bereitstellung von funktionalen Zellen für die zelluläre Kardiomyoplastie auf. Mit der vorgestellten Kultivierung im 2 L-Bioreaktor kann eine ausreichende Menge an funktionalen murinen Kardiomyozyten für die zellbasierte Ersatztherapie erzeugt werden. Mit diesem Ansatz ist es somit möglich, einen Pool an therapeutisch nutzbaren Kardiomyozyten bereitzustellen, der in der klinischen Anwendung einsetzbar ist.

Bisher konnte die Kultivierung von murinen ES Zellen mit anschließender Differenzierung zu Kardiomyozyten nur in Zellkulturplatten bzw. Spinnerflaschen mit einem maximalen Volumen von 250 mL etabliert werden, aus denen die Bereitstellung eines großen Pools an therapeutisch nutzbaren Zellen jedoch nicht praktikabel ist (Zweigerdt *et al.*, 2003). Ein weiterer Nachteil der genannten Systeme liegt in der fehlenden Kontrollierbarkeit. Es fehlen geeignete Regelungstechniken, z. B. für den Sauerstoffpartialdruck, die für die kontrollierte Kultivierung und somit auch für eine reproduzierbare Differenzierung und Generierung von spezialisierten Zellen unabdingbar sind.

Im Rahmen des Promotionsvorhabens ist es gelungen, einen Bioreaktorprozess im 2 L-Maßstab zu etablieren, in dem über einen Kultivierungszeitraum von 16 Tagen zuverlässig etwa 4×10^9 Kardiomyozyten produziert werden können. Diese Ausbeute an Kardiomyozyten übertrifft die in einer herkömmlichen Spinnerkultivierung (250 mL Kulturvolumen) erzeugte Menge um ein Vielfaches.

In einem nächsten Schritt lässt sich das entwickelte und optimierte Protokoll zur Massenkultivierung der in diesem Projekt eingesetzten murinen ES Zellen auf vergleichbare ES Zelllinien übertragen. Somit können die gewonnenen Erkenntnisse dazu dienen, auch andere aus ES Zellen abgeleitete Zelltypen in einem *Scale-up* Verfahren zu erzeugen und für den therapeutischen Einsatz bereitzustellen. Denkbar ist auch eine Kultivierung von humanen ES Zellen in dem vorgestellten System.

Neben der Produktion der Zellen ergeben sich aus zellbiologischer Sicht wichtige Erkenntnisse über das Differenzierungspotential muriner embryonaler Stammzellen in der Massenzellkultur und die Kultivierung dieser unter geregelten Bedingungen.

Projektbeschreibung

Ziel des Projekts war die Generierung von Kardiomyozyten, die aus murinen embryonalen Stammzellen abgeleitet wurden. Zum einen sollte die Generierung von reinen und funktionellen Kardiomyozyten erreicht werden, zum anderen sollten diese in großen Mengen produziert werden.

ES Zellen differenzieren spontan in alle somatischen Zelltypen inklusive der Kardiomyozyten. Damit stellen sie eine ideale Quelle für die Generierung spezialisierter Zellen dar. Für einen potentiellen zelltherapeutischen Einsatz gilt es, eine hochreine Kardiomyozytenpopulation aus dem Gemisch verschiedenster Zellen zu isolieren, um das tumorigene Potential undifferenzierter ES Zellen *in vivo* auszuschalten. Auch die „Verunreinigung“ mit anderen Zelltypen ist unerwünscht.

Um die Selektion der kardialen Zellen zu ermöglichen, wurde in diesem Projekt eine transgene murine ES Zelllinie (CM7/1) eingesetzt. Diese Zelllinie weist eine Antibiotikaresistenz (G418) auf, die durch den kardialen α -MyHc Promotor gesteuert wird. Die Zugabe von G418 führt folglich zu einer Eliminierung aller nicht-kardialen Zellen (Klug *et al.*, 1996). Eine reine Kardiomyozytenpopulation kann geerntet werden.

Zur Generierung therapeutisch relevanter Mengen wurde ein 2 L-Bioreaktorprozess etabliert. Ausgangspunkt der Arbeiten war ein „*fill-and-draw*“ Bioreaktorprozess (Schröder *et al.*, 2005). In diesem Projekt galt es, die Prozessstrategie hinsichtlich der Ernte an kardialen Zellen zu optimieren. Nachdem zunächst im Spinnersystem Vorversuche durchgeführt worden sind, wurden die gewonnenen Erkenntnisse auf den Bioreaktorprozess im 2 Liter-Maßstab übertragen. Unter den veränderten Kultivierungsbedingungen konnte eine deutliche Steigerung der Kardiomyozytenproduktion erreicht werden. Im Vergleich zu dem bisherigen Bioreaktorverfahren wurde die Ernte an Kardiomyozyten um etwa 325 % gesteigert. Aus einem Bioreaktorprozess konnten maximal $4,6 \times 10^9$ Kardiomyozyten geerntet werden. Letztendlich sah der optimierte Prozess im 2 L-Bioreaktor folgendermaßen aus: Als vorteilhaft hat sich die Kultivierung von ES Zellen zur Generierung von Kardiomyozyten unter kontinuierlichen Perfusionsbedingungen herausgestellt. Ein kontinuierlicher Prozess ermöglicht homogene Kultivierungsbedingungen, die insbesondere in der Differenzierungsphase wichtig sind sowie eine vereinfachte Handhabung.

Im bisherigen Prozessprotokoll („*fill-and-draw*“ Prozess) wurden Sedimentationsschritte zum Mediumaustausch durchgeführt, die stark schwankende Kultivierungsbedingungen hervorriefen. Um die Prozessbedingungen konstant zu halten, wurde ein Perfusionsprozess entwickelt, in dem über ein Steigrohr Medium mit geringer Geschwindigkeit abgepumpt und entsprechend frisches Medium zugeführt wird (Abb. 1). Im Perfusionsverfahren erfolgte der Mediumaustausch mit einer Perfusionsrate von 0,5 L/d, das entspricht einer Verdünnungsrate von $0,25 \text{ d}^{-1}$, über ein Sedimentationsrohr, wobei die differenzierenden Zellen in Form von *Embryoid Bodies* (EBs) aufgrund ihrer hohen Sedimentationsgeschwindigkeit zurückgehalten werden konnten. *Embryoid Bodies* sind ES Zellaggregate, die aus Zellen aller drei Keimblätter bestehen. In Suspension differenzieren ES Zellen typischerweise in Form von EBs.

Die Kultivierung erfolgte in zwei Phasen: Nach einer elftägigen Expansionsphase, in der die ES Zellen in Zellen aller drei Keimblätter differenzierten, schloss sich eine mehrtägige Selektion der Kardiomyozyten mittels Zugabe von G418 an (Abb. 2). Um die Differenzierung in die kardiogene Linie zu unterstützen, wurde Retinsäure als Differenzierungsfaktor zugegeben. Die Rührung wurde zweistufig betrieben, d. h. in der Expansionsphase erfolgte die Durchmischung der Zellsuspension mit 65 upm, in der Selektionsphase wurde zur Minimierung des Scherstresses eine Rührerdrehzahl von 50 upm gewählt.

An die Kultivierung schloss sich routinemäßig eine Charakterisierung der generierten Zellen an. Außerdem wurde die Reinheit der murinen Kardiomyozytenpopulation geprüft. Mit immunohistochemischen Analysen konnten spezifische kardiale Proteine und ein hoher myofibrillärer Organisationsgrad der generierten Kardiomyozyten detektiert werden. Die Zellen wurden somit eindeutig als kardial identifiziert.

Um die Reinheit der selektierten Zellpopulation zu überprüfen, wurden verschiedene Testsysteme eingesetzt. Neben MF20-Färbungen sowie kardial-spezifischer Fluoreszenzfärbungen erfolgten zytometrische FACS-Messungen, die quantitative Aussagen zur Reinheit der geernteten Kultur ermöglichten.

Für einen klinischen Einsatz ist die Funktionalität der Zellen ein weiteres entscheidendes Kriterium. Die für Kardiomyozyten typische Kontraktionsfähigkeit wurde während der Kultivierungen beobachtet und nahm im Differenzierungsverlauf kontinuierlich zu. In pharmakologischen Tests wurde gezeigt, dass die Zellen mit notwendigen funktionellen β -Rezeptoren ausgestattet sind. Neben der Funktionalität *in vitro* wurde auch die Funktionalität *in vivo* getestet. Hierzu wurden die im Bioreaktor generierten Kardiomyozyten in ein Maus-Infarktmodell transplantiert (Kooperation mit der Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. T. Braun). Zusammenfassend konnte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach Transplantation der im Bioreaktor generierten Kardiomyozyten demonstriert werden. Auch vier Wochen nach der Transplantation ließen sich transplantierte Zellen im Empfängermyokard nachweisen (Abb. 3). Histologische Auffälligkeiten, die auf eine Teratomabildung schließen lassen, wurden nicht beobachtet.

Zusammenfassung

Im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung in der Humanmedizin muss für eine Zellersatztherapie eine relevante Menge an Kardiomyozyten produziert werden. Infolge eines Myokardinfarktes können bis zu 35 % des Herzgewebes funktionslos werden, das entspricht etwa 2×10^9 Kardiomyozyten (Kajstura *et al.*, 1998; Schröder *et al.*, 2005).

In dem optimierten Prozess wurden $4,6 \times 10^9$ Kardiomyozyten geerntet. Damit könnte mit einem Bioreaktorprozess innerhalb kurzer Zeit ausreichend Transplantationsmaterial für eine Zellersatztherapie erzeugt werden.

Die Reinheit der generierten Zellen sowie ihre Funktionalität *in vitro* als auch *in vivo* konnte demonstriert werden.

Der vorgestellte Prozess zur Produktion muriner Kardiomyozyten kann als Grundlage für die Produktion großer Mengen an spezialisierten Zellen gesehen werden.

Anhang

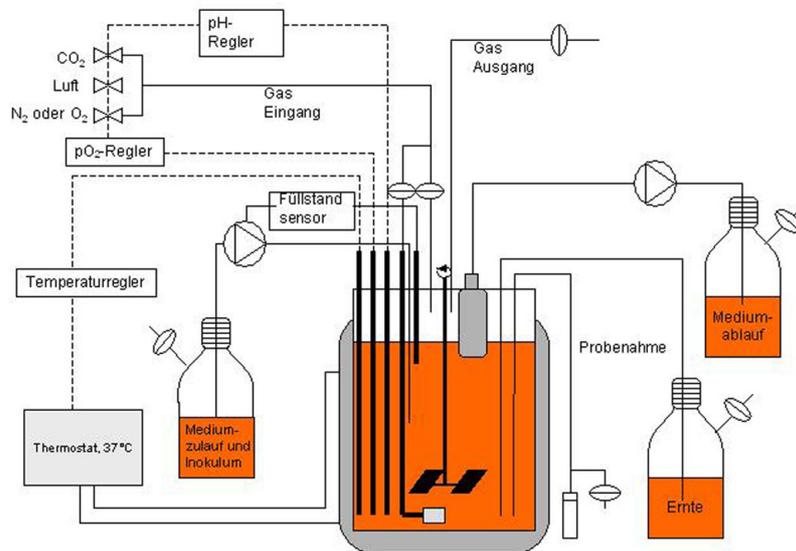


Abb. 1 Schematischer Aufbau des 2 Liter-Bioreaktors für den Perfuisionsprozess. Der Mediumwechsel erfolgte über ein Sedimentationsrohr und wurde über einen Füllstandssensor geregelt.

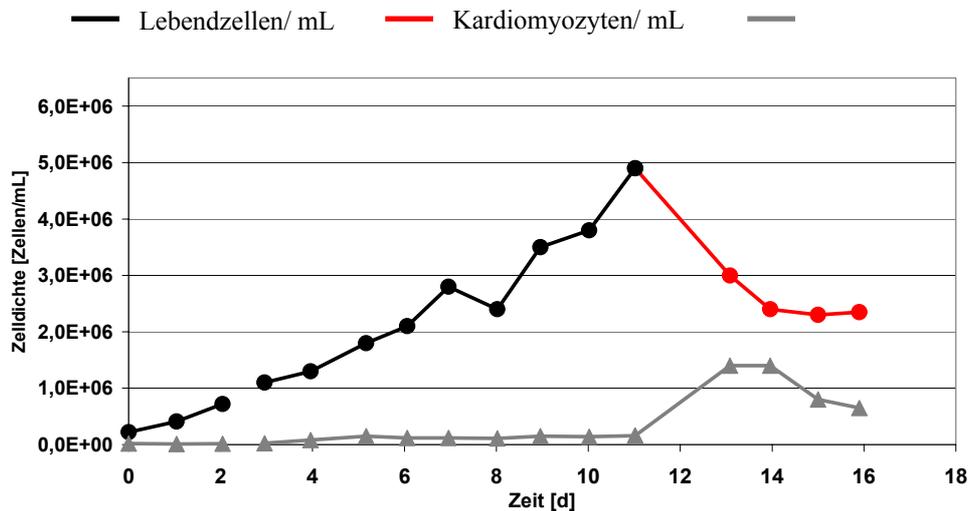


Abb. 2 Entwicklung der Zelldichte während des Prozessverlaufs im 2 L-Bioreaktor. Start der Kultivierung mit 1 Liter; Verdopplung des Volumens an Tag 2; Start des Perfuisionsbetriebes ab Tag 3; Zugabe von G418 zur Selektion der Kardiomyozyten an Tag 11.

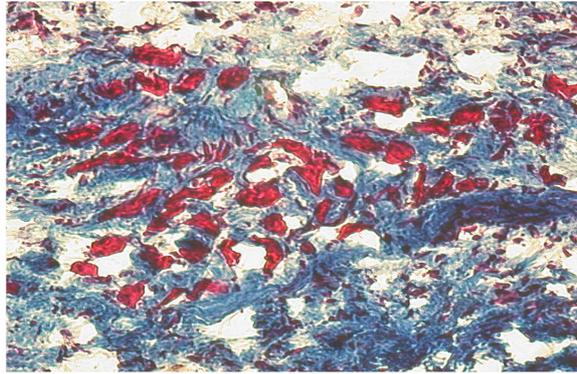


Abb. 3: Der Schnitt durch das infarzierte Areal im linken Ventrikel zeigt die Integration der transplantierten Kardiomyozyten in das fibroisierte Herzgewebe 28 Tage nach der Transplantation. Rot = transplantierte Zellen in der Infarktnarbe, blau = fibroisiertes Herzgewebe. Schnitt: H. Ebel, Halle.

Literatur

- Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. (1998).
Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans.
Proc Natl Acad Sci U S A 95(15):8801-5.
- Klug, M.G., Soonpaa, M.H., Koh, G.Y., Field, L.J. (1996).
Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts.
J Clin Invest 98: 216-224.
- Schroeder M., Niebruegge S., Werner A., Willbold E., Burg M., Ruediger M., Field L.J., Lehmann J., Zweigerdt R. (2005).
Embryonic Stem Cell Differentiation and Lineage Selection in a Stirred Bench Scale Bioreactor with Automated Process Control.
Biotechnol. Bioeng. 92 (7): 920-33.
- Zweigerdt, R., Burg, M., Willbold, E., Abts, HF, Ruediger, M. (2003).
Generation of confluent cardiomyocyte monolayers derived from embryonic stem cells in suspension: a cell source for new therapies and screening strategies.
Cytotherapie 5 (5): 399-413.