

# 1 Einleitung

Für die Untersuchung von umweltrelevanten Substanzen oder Pharmaka auf ihre möglichen reproduktionstoxikologischen Wirkungen sind bis heute nur Tierversuche behördlich anerkannt. Routinemäßig werden Substanzen in sog. Segmentstudien getestet, in denen der präkonzeptionale bis postnatale Zeitraum untersucht wird (Spielmann, 1998). Diese *in vivo* Tests sind sehr zeitaufwendig, kostenintensiv und benötigen eine hohe Anzahl von Versuchstieren (Rutledge, 1997). Aus diesen Gründen besteht ein Bedarf für die Entwicklung, Standardisierung und Validierung von Alternativmethoden für Tierversuche zur Untersuchung der möglichen Reproduktionstoxizität.

Derzeit gibt es drei etablierte *in vitro* Embryotoxizitätstests: Rat Postimplantation Whole Embryo Culture (WEC), Micromass Culture und Embryonic Stem Cell Test (EST). Der EST wurde im Jahr 2001 durch die ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) als *in vitro* Embryotoxizitätstest validiert. Im Gegensatz zu den beiden anderen Tests hat der EST den Vorteil, dass keine Tiere getötet werden müssen, da die Durchführung ausschließlich mit permanenten Zelllinien erfolgt.

Die normale Entwicklung von Embryonen kann durch mutagene oder embryotoxische Substanzen gestört werden, wenn diese Substanzen mit den Wachstums- und Differenzierungsprozessen auf der Ebene der Gen- und Proteinexpression interagieren. Da solche Prozesse in jeder einzelnen Zelle des ganzen Embryos ablaufen, wird angenommen, dass die Prozesse in der Kultur der embryonalen Stammzellen ebenfalls vorhanden sind und gleichartig auf embryotoxische Substanzen reagieren.

Im EST wird der Einfluss der Testsubstanzen auf die Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu kontrahierenden Herzmuskelzellen untersucht. Der Effekt auf die Differenzierung wird mit den zytotoxischen Effekten auf das Proliferationsverhalten undifferenzierter Stammzellen und differenzierter Zellen (3T3-Fibroblasten) verglichen. Dieses Testsystem erlaubt die Klassifizierung von Substanzen anhand ihres embryotoxischen Potentials *in vitro*.

Die ersten Studien mit dem EST (Schmidt et al., 2001; Scholz et al., 2000) zeigten eine gute Prädiktion des embryotoxischen Potentials von den untersuchten Substanzen im Vergleich zu den entsprechenden *in vivo* Daten. In der Validierungsstudie des EST konnte das

embryotoxische Potential der Testsubstanzen in 78 % der Experimente richtig vorhergesagt werden (Genschow et al., 2002; Genschow et al., 2004).

Der EST, wie er von der ECVAM validiert wurde, zeigt zurzeit jedoch mehrere Nachteile. So ist dieser Test mit einer Kulturzeit von 10 Tagen noch sehr zeitaufwendig. Außerdem umfasst er nur einen Endpunkt für die Differenzierung (die Differenzierung zu kontrahierenden Kardiomyozyten). Darüber hinaus unterliegt die lichtmikroskopische Beurteilung dieses morphologischen Endpunktes einer subjektiven Erfassung. Daraus resultierten die Untersuchungen von molekularbiologischen Endpunkten (Auswertungsparameter auf der Ebene der Gen- und Proteinexpression) (zur Nieden et al., 2001). Dabei wurde u.a. festgestellt, dass die morphologische Analyse der Differenzierung von Kardiomyozyten allein nicht ausreichend ist, um embryotoxische Effekte von Substanzen zu erkennen. Herzmuskelzellen entwickeln sich aus dem Mesoderm, Embryotoxizität kann sich jedoch an verschiedenen Zelltypen aller drei Keimblätter eines Embryos manifestieren (Schmidt et al., 2001). Aus den genannten Gründen wurden zusätzlich molekularbiologische Endpunkte etabliert, die auch die Untersuchung von Effekten auf die Entwicklung von Zellen des Endo- und Ektoderms berücksichtigen. In einem von der ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) organisierten Verbundprojekt („Weiterentwicklung eines *in vitro* Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen: Verwendung molekularer Marker zur Erfassung verschiedener Differenzierungsendpunkte“) wird an der Verkürzung der Testdauer und der besseren Quantifizierung der Ergebnisse durch die Einführung molekularbiologischer Endpunkte gearbeitet (Buesen et al., 2004). Aufgrund der vielversprechenden Daten ist es notwendig, den auf embryonalen Stammzellen basierenden Embryotoxizitätstest zu einem robusten Modell mit guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse weiter zu optimieren.

## 1.1 Hintergrund der Arbeit

Eine grundlegende Voraussetzung für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen ist der Erhalt ihrer Pluripotenz durch Hemmung der Differenzierung. Von den verschiedenen Möglichkeiten, die Differenzierung von embryonalen Stammzellen der Maus zu unterdrücken, ist die Supplementierung des Kulturmediums mit Leukemia Inhibitory Factor (LIF) eine häufig beschriebene Methode. Auch das Protokoll des Embryonic Stem Cell Tests

(EST) (Spielmann and Scholz, 1999) schreibt die Kultivierung der ES Zellen in mit 1000 U/ml LIF supplementiertem Kulturmedium vor.

Obwohl die unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit als besondere Eigenschaft die Stammzellen erst charakterisiert, werden in veröffentlichten Studien die untersuchten Passagezahlen oft auf 10 - 20 (-30) Passagen beschränkt (Cui et al., 2004; Zandstra et al., 2000). Auch im Protokoll des EST wird die Verwendung der ES Zellen auf 25 Passagen begrenzt.

Es ist davon auszugehen, dass es mit zunehmender Passagezahl zu Veränderungen der Stammzellpopulation kommt, die z.B. durch spontane Differenzierung von einigen Zellen der Population trotz Differenzierungshemmung hervorgerufen werden können.

Im Differenzierungstest des EST sind neben den speziellen Kulturbedingungen hohe Anteile pluripotenter Stammzellen in der Zellpopulation erforderlich, um eine gerichtete Differenzierung zu Herzmuskelzellen zu ermöglichen. Bei einer ungenügenden Hemmung der Differenzierung während des Passagierens steigt der Anteil an bereits differenzierten oder determinierten Zellen in der Zellpopulation. Dadurch sind die Voraussetzungen für die erfolgreiche Durchführung des Differenzierungstests nicht mehr gegeben.

Für die praktische Durchführung des EST bedeutet das, dass nach wenigen Tests die kultivierten Zellen „zu alt“ sind. Die für den EST vorgeschriebenen Zellen werden von der ATCC (American Type Culture Collection) ohne Angabe der Passagezahl geliefert. Für die Vermehrung der embryonalen Stammzellen zum Anlegen einer laboreigenen Reserve sind mehrere Passagierungen notwendig. Vor der Verwendung der Zellen im EST sind diese nach dem Auftauen zunächst in einer sog. Qualitätskontrolle auf ihre Eignung für die Durchführung des EST zu untersuchen. Bei einer Testdauer von 10 Tagen müssen die Zellen in der Routinekultur währenddessen 4 x subkultiviert werden. Damit können nach dem Auftauen der ES Zellen und der Qualitätskontrolle nur wenige (3 - 5) Embryonic Stem Cell Tests durchgeführt werden, bevor die kritischen Passagezahlen erreicht werden.

Eine weitere Schwierigkeit stellt der Nachweis des undifferenzierten Zustandes der Stammzellen dar. In der Literatur werden zwar Methoden beschrieben, die die Untersuchung einzelner Zellen auf sog. Stammzell-Marker erlauben, eine Beurteilung der Stammzellpopulation mit Quantifizierung der undifferenzierten bzw. differenzierten Zellen wird dabei jedoch nicht vorgenommen. Da die erfolgreiche Durchführung des EST nur mit Zellpopulationen möglich ist, die größtenteils aus undifferenzierten Stammzellen bestehen,

wäre eine Untersuchung der Population vor Testbeginn mit Bestimmung der Anteile der undifferenzierten und differenzierten Zellen sinnvoll.

## **1.2 Stand der Forschung**

### **1.2.1 Stammzellen allgemein**

#### **1.2.1.1 Charakteristika**

Als Stammzellen werden alle noch nicht ausdifferenzierten Zellen eines Embryos, Fetus oder geborenen Individuums bezeichnet, die Teilungs- und Entwicklungspotential besitzen. Die damit verbundene Fähigkeit zur Differenzierung nimmt auf dem Weg der Spezialisierung während der Entwicklung der Zellen immer weiter ab.

Die befruchtete Eizelle und die Blastomere im 2-, 4- und 8-Zell-Stadium werden als totipotent bezeichnet, da sich aus jeder dieser Zellen ein kompletter Organismus bilden kann. Aus den pluripotenten embryonalen Stammzellen der Inneren Zellmasse entwickeln sich in der Embryonalentwicklung die verschiedenen Zelltypen des Körpers, jedoch sind diese Zellen nicht mehr zur Bildung des plazentaren Gewebes befähigt. Auch die als embryonale Keimzellen bezeichneten Zellen der frühen Keimanlagen sind pluripotente Stammzellen.

Adulte Stammzellen sind in der Regel in ihrer Differenzierungskapazität eingeschränkt (multi- oder unipotent).

Embryonale Stammzellen (ES Zellen) können aus der Inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert werden. Diese Stammzellen sind undifferenziert und zeichnen sich durch ihre nahezu unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit sowie durch ihre Pluripotenz aus (Suda et al., 1987). Nach Reintegration in Blastozysten können sowohl embryonale Stammzellen als auch embryonale Keimzellen an der Bildung aller somatischen Zellen einschließlich der Keimzellen teilnehmen (Bradley et al., 1984; Labosky et al., 1994). Auch *in vitro* können sich diese Zellen in alle Zelltypen der drei Keimblätter, Endoderm, Ektoderm und Mesoderm, differenzieren (Doetschman et al., 1985).

Der einzige „wirkliche“ Nachweis der Pluripotenz ist die Transfektion der Stammzellen in Blastozysten der Maus zur Bildung chimärer Tiere. Dieses aufwendige zeit- und kostenintensive Verfahren ist für die angestrebte routinemäßige Überprüfung der Pluripotenz

der Zellen während der Kultivierung jedoch nicht geeignet und ist auch aus ethischen Gründen abzulehnen. Daher wird versucht, über sog. Stammzell-Marker den undifferenzierten und damit pluripotenten Zustand der Zellen nachzuweisen.

### **1.2.1.2 Marker für embryonale Stammzellen**

Neben der bereits erwähnten Pluripotenz und der Vermehrungsfähigkeit von embryonalen Stammzellen gelten die Expression von SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1) (Smith, 1992; Solter and Knowles, 1978), eine hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität (Hahnel et al., 1990; Pease et al., 1990), ein hohes Kern-Plasma-Verhältnis (Wobus, 2001) und die Expression des Transkriptionsfaktors Oct-3/4 (Scholer et al., 1990a) als typische Eigenschaften muriner ES Zellen.

Die Alkalische Phosphatase-Aktivität und das Oberflächenantigen SSEA-1 werden häufig zur Beurteilung des Differenzierungsstatus von Stammzellen herangezogen. Dabei wird davon ausgegangen, dass undifferenzierte Stammzellen diese Marker exprimieren, differenzierte Zellen hingegen nicht.

#### **1.2.1.2.1 SSEA-1**

Als eine spezifische Eigenschaft undifferenzierter pluripotenter Stammzellen wird die Expression des Oberflächenantigens SSEA-1 angesehen.

Eine von Solter und Knowles (Solter and Knowles, 1979) veröffentlichte Studie zeigte, dass das Antigen auf undifferenzierten embryonalen Karzinomzellen detektiert werden kann, nicht jedoch nach Differenzierung dieser Zellen. Auch Zellen von Mäuseembryonen im Präimplantationsstadium ab dem 8-Zell-Stadium exprimieren SSEA-1 (Solter and Knowles, 1978).

In einer von Smith durchgeführten Studie (Smith et al., 1988) exprimierten nach Kultivierung embryonaler Stammzellen unter dem Einfluss von LIF wenigstens 78 % der Zellen SSEA-1 auf ihrer Oberfläche. Die Auswertung erfolgte in dieser Arbeit durch die Auszählung der SSEA-1 positiven Zellen nach immunzytochemischer Färbung. Nach Untersuchung der Zelllinie D3 mit durchflusszytometrischen Methoden beschreibt Zandstra (Zandstra et al., 2000), dass durch Selektion der SSEA-1-positiven Zellen die Zellpopulation schnell und effizient mit undifferenzierten Stammzellen angereichert werden kann.

#### **1.2.1.2.2 Alkalische Phosphatase-Aktivität**

Eine hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) gilt als Marker für undifferenzierte embryonale Stammzellen (Pease et al., 1990). Für den Nachweis der Pluripotenz werden daher von vielen Wissenschaftlern zytochemische Untersuchungen auf AP-Aktivität durchgeführt oder der Substratumsatz dieses Enzyms in Enzym-Aktivitäts-Assays gemessen (Berstine et al., 1973; Pease et al., 1990; Rathjen et al., 1999; Zandstra et al., 2000).

Die Alkalische Phosphatase ist kein stammzellspezifischer Marker. Dieses Enzym kommt in fast allen Geweben adulter Säugetiere vor, eine hohe Aktivität ist jedoch auf einige wenige Gewebe beschränkt (Dünndarm, Niere, Knochen und Plazenta zeigen eine 1- bis 2-fach höhere Aktivität dieses Enzyms als die anderen Organe). Nach Untersuchungen von Jäkel haben embryonale Karzinomzellen eine etwa 4- bis 5-fach höhere Alkalische Phosphatase-Aktivität als differenzierte STO-Fibroblasten (Jakel et al., 1983). In Embryonen zeigt dieses Enzym in vielen Geweben eine hohe Aktivität in den frühen Stadien der Entwicklung. Die Untersuchungen von Blastozysten zeigten eine hohe AP-Aktivität der Zellen der Inneren Zellmasse, während die Zellen des Trophoblasten keine oder deutlich geringere Aktivitäten aufwiesen (Johnson et al., 1977).

#### **1.2.1.2.3 Weitere Marker für undifferenzierte Stammzellen**

Neben den oben genannten Markern werden in der Literatur weitere Marker für die Charakterisierung des Differenzierungsstatus von ES Zellen beschrieben. Dabei muss unterschieden werden zwischen stammzellspezifischen und nicht-stammzellspezifischen Markern.

Zu den stammzellspezifischen Markern zählt z.B. der für frühe embryonale Zellen bzw. Keimzellen spezifische Transkriptionsfaktor Oct-3/4 (Okamoto et al., 1990; Rosner et al., 1990; Scholer et al., 1990b). Auch ECMA-7 wird nur von undifferenzierten Stammzellen exprimiert (Pease et al., 1990; Sabapathy et al., 1997).

Die Zell-Adhäsionsmoleküle PECAM-1 und CD9 werden ebenfalls in undifferenzierten Stammzellen exprimiert und bei Einsetzen der Differenzierung rasch herunterreguliert (Cui et al., 2004; Oka et al., 2002; Robson et al., 2001), sie sind allerdings nicht stammzellspezifisch.

## 1.2.2 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

### 1.2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen für embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES Zellen) reagieren sehr empfindlich auf unzureichende Kulturbedingungen (Roach and McNeish, 2002). In Abhängigkeit von den Ansprüchen der zu kultivierenden Zelllinie und der Rezeptur des Basismediums müssen dem Kulturmedium z.B. Serum, Aminosäuren oder Antioxidantien zugesetzt werden. Das Basismedium stellt den größten Anteil des Kulturmediums dar. Für verschiedene Zelllinien werden zahlreiche Basismedien angeboten, deren Zusammensetzungen sich in den Gehalten an Aminosäuren, Vitaminen, Salzen/Mineralien, Glukose und organischen Supplementen (z.B. Pyruvate, Lipide) unterscheiden.

Das Serum ist der zweitgrößte Bestandteil des Kulturmediums, es wird in Anteilen von 5 – 20 % dem Kulturmedium zugesetzt. Aufgrund der hohen Stoffwechselrate und des hohen Bedarfs an Wachstumsfaktoren der embryonalen Stammzellen werden dem Kulturmedium für diese Zellen üblicherweise 20 % fetales bovines Serum (FBS) zugesetzt. Seren sind komplexe Stoffgemische, die einerseits eine entwicklungsfördernde Wirkung und andererseits in hohen Konzentrationen auch eine hemmende Wirkung (toxischer Effekt) auf Zellen besitzen können. Die optimale Konzentration eines Serums für die Zellkultur ist der Kompromiss zwischen der höchsten Konzentration zur Gewährleistung der bestmöglichen Entwicklung der Zellen und der niedrigsten Konzentration zur Vermeidung jeglicher toxischer Effekte. Andererseits können höhere Serumkonzentrationen auch zu einer verminderten Zytotoxizität durch Bindung potentiell zytotoxischer Substanzen an die im FBS enthaltenen Proteine führen. So konnten Untersuchungen zeigen, dass die Zytotoxizität von  $\text{HgCl}_2$  von der FBS-Konzentration im Kulturmedium abhing (Bohets et al., 1994).

Das Serum unterliegt aufgrund des Ausgangsmaterials und des Herstellungsprozesses einer Chargenvariabilität und ist daher vor der Verwendung auf die Eignung für die Zellkultur und eine mögliche Toxizität zu überprüfen. Dafür wird das zu testende Serum dem Kulturmedium in Konzentrationen bis zu 30 % zugesetzt (Tessarollo, 2001). Wird das Wachstum der Zellen bei hohen Serumkonzentrationen gehemmt, spricht das für eine Toxizität des Serums. Im Hinblick auf die Durchführung des Embryonic Stem Cell Test (EST) kommen für die Kultivierung der ES Zellen nur Seren in Betracht, mit denen gleichzeitig hohe Proliferationsraten und hohe Differenzierungsraten erreicht werden. Daher ist jede

Serumcharge vor ihrer Verwendung für die Kultivierung von ES Zellen auf diese Eignung zu überprüfen.

Die Hitzeinaktivierung des Serums vor der Verwendung in Zellkulturmedien ist eine weit verbreitete Behandlung, die zur Zerstörung bzw. zur Inaktivierung von Inhaltsstoffen, wie z.B. des Komplementsystems, führen soll (Triglia and Linscott, 1980; Ward, 1979). Durch die Wärmebehandlung werden aber auch wachstumsfördernde Inhaltsstoffe zerstört. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Effekte der Hitzeinaktivierung, z.B. auf die im Serum enthaltenen Proteine und Lipopolysaccharide (Meszaros et al., 1995), und die damit in Zusammenhang stehenden Folgen, z.B. für die Anhaftung der Zellen in den Zellkulturgefäßen (Giard, 1987), sollte der Einfluss der Hitzeinaktivierung des Serums auf die ES Zellen untersucht werden.

Die ersten zur Erforschung der embryonalen Entwicklung untersuchten embryonalen Zellen wurden aus Teratokarzinomen isoliert. Teratokarzinome bestehen aus verschiedenen differenzierten Zellen unterschiedlicher Gewebe und enthalten auch undifferenzierte embryonale Zellen (Martin and Evans, 1975a). Die sog. embryonalen Karzinomzellen (EC Zellen) weisen aber aufgrund der variierenden und undefinierten Einflüsse innerhalb eines Tumors Nachteile auf, z.B. einen instabilen Karyotyp und eine geringe Keimbahnbesiedlung nach Reintegration in Embryonen (Martin, 1980; Nicolas et al., 1976). Die erste erfolgreiche Kultivierung von Zellen der Inneren Zellmasse von Blastozysten und die Etablierung permanenter Zelllinien von pluripotenten embryonalen Stammzellen aus frühen Embryonen wurde in den frühen 80ern durchgeführt (Evans and Kaufman, 1981). Später wurden aus primordialen Keimzellen pluripotente Keimzelllinien etabliert (Stewart et al., 1994).

Bereits kurz nach der Isolierung der ersten Stammzelllinien (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) wurde die Notwendigkeit einer Differenzierungshemmung deutlich, da es (ohne Differenzierungshemmung) spontan zu einer Differenzierung der kultivierten Zellen kam. Wie auch von einigen Karzinomzelllinien bekannt (Martin and Evans, 1975b), wurde erst durch die Co-Kultur mit sog. Ammenzellen (*Feeder Layer*) eine Kultivierung der embryonalen Stammzellen der Maus über einen längeren Zeitraum ohne sichtbare morphologische Veränderungen möglich.

Die Funktion der *Feeder Layer* zur Hemmung der Differenzierung von ES Zellen kann durch Kulturmedium, das zuvor von anderen Zellen „konditioniert“ wurde, ersetzt werden.



Lösliche Faktoren, die von heterologen Zelltypen freigesetzt werden, können also die Differenzierung embryonaler Stammzellen unterdrücken, wodurch die Kultivierung einer homogenen Stammzellpopulation ohne „Verunreinigung“ durch *Feeder*-Zellen ermöglicht wird.

Nach Isolierung eines für die Differenzierungshemmung verantwortlichen Polypeptids aus den von *Feeder*-Zellen konditionierten Kulturmedien wurde dieses zunächst als „Differentiation Inhibiting Activity“ (DIA) bezeichnet. Weitere Untersuchungen zeigten, dass DIA mit dem Molekül Leukemia Inhibitory Factor (LIF) identisch ist (Moreau et al., 1988; Nichols et al., 1990; Smith et al., 1988; Williams et al., 1988).

### **1.2.2.2 Hemmung der Differenzierung von embryonalen Stammzellen**

Der Erhalt des pluripotenten Zustandes der Stammzellen während ihrer Kultivierung stellt eine Grundvoraussetzung für die Verwendung von ES Zellen in allen Bereichen dar. Um embryonale Stammzellen im undifferenzierten, pluripotenten Zustand zu kultivieren, muss ihre Differenzierung gehemmt werden, da sie sonst spontan in Zellen der drei Keimblätter differenzieren.

Für die Hemmung der Differenzierung von ES Zellen sind verschiedene Methoden beschrieben. Sie kann sowohl durch eine gemeinsame Kultivierung der ES Zellen mit anderen Zellen oder durch die Zugabe von Substanzen mit differenzierungshemmender Aktivität zum Kulturmedium erreicht werden. Das gilt sowohl für die Isolierung der ES Zellen aus der Inneren Zellmasse einer Blastozyste als auch für die routinemäßige Kultivierung dieser Zellen.

Im Folgenden wird auf verschiedene Methoden der Differenzierungshemmung eingegangen.

#### **1.2.2.2.1 Feeder Layer**

Wie bereits erwähnt, sind verschiedene Zelltypen befähigt, Leukemia Inhibitory Factor (LIF) zu produzieren. Solche Zellen können als sog. Ammenzellen oder *Feeder Layer* die Differenzierung embryonaler Stammzellen hemmen. Für die erfolgreiche Hemmung der Differenzierung muss von den *Feeder*-Zellen entweder eine ausreichende Menge der löslichen Form des LIF ins Kulturmedium abgegeben oder als gebundene Form auf ihrer Oberfläche präsentiert werden (Rathjen et al., 1990b). Von den Anteilen der matrix-

gebundenen bzw. löslichen Form ist abhängig, ob die Stammzellen in direktem Kontakt mit den Ammenzellen kultiviert werden müssen oder eine „Konditionierung“ des Kulturmediums möglich ist. So ermöglicht die Freisetzung des löslichen LIF von bestimmten Zelllinien (z.B. BRL- Buffalo Rat Liver Cells oder embryonalen Karzinomzellen) in das Kulturmedium eine Differenzierungshemmung von ES Zellen mit diesem Medium (Martin, 1981; Smith and Hooper, 1987).

Als *Feeder Layer* für die Co-Kultur mit embryonalen Stammzellen können sowohl primäre embryonale Fibroblasten als auch permanente Zelllinien genutzt werden. Dabei ist die Eignung der Zelllinie bzw. der „Charge“ bei primären Zellen vor Verwendung als *Feeder Layer* zu überprüfen, da es je nach Zelltyp Unterschiede in dem Potential der Differenzierungshemmung gibt (Wobus et al., 1984).

Bei einigen Zelllinien, wie z.B. STO-Fibroblasten, besteht Uneinigkeit darüber, ob diese Zellen ausreichend LIF ins Kulturmedium freisetzen oder nur über das membran-gebundene LIF in direkter Co-Kultur mit ES Zellen deren Differenzierung verhindern können (Rathjen et al., 1990b; Smith and Hooper, 1983). Von einigen Autoren werden die Stammzellen zur Hemmung der Differenzierung sowohl auf *Feeder Layer* kultiviert als auch dem Kulturmedium Leukemia Inhibitory Factor zugesetzt (Cui et al., 2004; Toumadje et al., 2003).

#### **1.2.2.2.2 Leukemia Inhibitory Factor**

Seit 1988 wird beschrieben, dass die Kultivierung embryonaler Stammzellen aus der Maus im undifferenzierten Zustand durch die Supplementierung des Kulturmediums mit Leukemia Inhibitory Factor (LIF) möglich ist (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988).

Es handelt sich dabei um einen Wachstums- und Differenzierungsfaktor mit vielfältigen biologischen Aktivitäten, der zur Familie der Interleukine-6 gehört. Ursprünglich wurde LIF als Zytokin, welches die Differenzierung der murinen M1 Myeloid-Zelllinie induziert, entdeckt. LIF besitzt also sowohl differenzierungshemmende als auch –induzierende Eigenschaften.

*In vivo* spielt die maternale LIF-Expression eine wichtige Rolle bei der Implantation der Blastozyste (Stewart et al., 1992)

Als entscheidender Faktor zur Hemmung der Differenzierung von murinen Stammzellen wurde die Aktivierung eines spezifischen Rezeptorkomplexes mit nachfolgender Aktivierung der STAT3-Kaskade (STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription) identifiziert

(Matsuda et al., 1999; Metcalf, 2003; Niwa et al., 1998; Raz et al., 1999). LIF bindet an einen Rezeptor-Komplex, der aus einem LIF-spezifischen Rezeptor und einer gp130-Untereinheit besteht (Gearing et al., 1991; Hibi et al., 1990). gp130 ist eine gemeinsame Untereinheit von Rezeptoren der IL-6 Zytokin-Familie, deren Vorhandensein für die Differenzierungshemmung bei ES Zellen unbedingt erforderlich ist (Yoshida et al., 1994). Durch nachfolgende Aktivierung rezeptorassoziierter Janus-Kinasen kommt es zu einer Phosphorylierung und Dimerisation von STAT3-Molekülen. Im Zellkern kontrollieren die STAT3-Dimere die Transkription von Genen, die die Selbsterneuerung der Zellen regulieren.

Die differenzierungshemmende Wirkung des LIF ist konzentrationsabhängig und reversibel (Viswanathan et al., 2002; Zandstra et al., 2000). Bezüglich der Potenz des LIF-Moleküls, die Differenzierung embryonaler Stammzellen über einen längeren Zeitraum zu unterdrücken, werden jedoch unterschiedliche Angaben gemacht. Viele Autoren berichten von der Möglichkeit der „Langzeitkultivierung“ von pluripotenten Stammzellen mit LIF, machen allerdings keine Angaben zur tatsächlich untersuchten Kulturdauer.

Die differenzierungshemmende Wirkung des LIF scheint auch von den Kulturbedingungen der Zellen abzuhängen. Die routinemäßige Kultivierung der Zellen findet üblicherweise als Adhäsionskultur in Zellkulturflaschen statt, bei der die Stammzellen in dreidimensionalen Kolonien wachsen.

Hingegen können Stammzellen zur Induktion der Differenzierung auch in embryo-ähnlichen Zellaggregaten, den sog. Embryoid Bodies (EBs), kultiviert werden.

Bei der Kultivierung der embryonalen Stammzellen in EBs beobachteten mehrere Autoren die selektive Wirkung von LIF. Nach Murray (Murray and Edgar, 2001) findet eine Differenzierung von Stammzellen in EBs zu primitivem Endoderm auch in Gegenwart von LIF statt, die Differenzierung zu viszeralem und parietalem Endoderm wird aber durch LIF gehemmt. Dem gegenüber beschreiben Shen und Leder (Shen and Leder, 1992), dass die Weiterentwicklung zu viszeralem und parietalem Endoderm aus dem primitiven Endoderm durch LIF nicht verhindert wird. Hingegen erfolgt in Gegenwart von LIF keine Differenzierung mesodermaler Zellen (z.B. Blut- oder Herzmuskelzellen) aus dem primitiven Ektoderm. Die Autoren verweisen dabei jedoch auch auf die bei Untersuchung verschiedener Zelllinien auftretenden variablen Ergebnisse. Auch Bader (Bader et al., 2000) beobachtete, dass in Embryoid Bodies bestimmte Entwicklungsrichtungen der Differenzierung, wie z.B.

die Kardiomyogenese, durch LIF gehemmt, aber andere Differenzierungsrichtungen, z.B. zu Fibroblasten, Endothel- oder Epithelzellen, nicht unterdrückt werden. Andererseits sollen geringe Mengen löslichen LIFs sogar die Differenzierung zu Herzmuskelzellen unterstützen, dies allerdings erst nach 4 Tagen der Entwicklung. Die Initiierung der Kardiogenese in dem primären Mesoderm findet nur in Abwesenheit von LIF statt.

#### **1.2.2.2.3 Andere Substanzen mit differenzierungshemmenden Eigenschaften**

Substanzen mit differenzierungshemmender Aktivität für embryonale Stammzellen lassen sich größtenteils den Zytokinen zuordnen. Auch Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), Oncostatin M (OsM), ciliary neurotrophic factor (CNTF) und Cardiotrophin 1 (CT-1) gehören zu dieser Familie. Diese Faktoren haben vielfältige, sich überschneidende Effekte auf eine Vielzahl verschiedener Zelltypen. So können auch OsM, CNTF und CT-1 über Wechselwirkung mit dem LIF-Rezeptor die Differenzierung von ES Zellen unterdrücken (Conover et al., 1993; Pennica et al., 1995; Rose et al., 1994; Yoshida et al., 1994).

Dabei kann auch die Herkunft der Substanz einen Einfluss auf ihre differenzierungshemmende Wirkung haben. So bindet das murine Oncostatin (mOsM) nicht an den gleichen funktionellen Rezeptor wie murines LIF und humanes Oncostatin (hOsM) (Ichihara et al., 1997) und ist somit für die Hemmung der Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen nicht geeignet.

Ying und seine Mitarbeiter (Ying et al., 2003) haben kürzlich gezeigt, dass BMP (bone morphogenetic protein) ebenfalls für die Vermehrung der Stammzellen unbedingt erforderlich ist. Außerdem wurde nachgewiesen, dass zwei weitere Transkriptionsfaktoren, Oct-3/4 (Niwa et al., 2000) und Nanoq (Chambers et al., 2003; Chambers and Smith, 2004; Mitsui et al., 2003), eine entscheidende Rolle spielen bei der Erhaltung des undifferenzierten Status von ES Zellen. Dani und seine Mitarbeiter zeigten, dass ESRF (ES cell renewal factor) ein von LIF unabhängigen Faktor ist, der von differenzierten Zellen freigesetzt wird und die Differenzierung von Stammzellen unterdrücken kann (Dani et al., 1998).

#### **1.2.2.3 Differenzierung von embryonalen Stammzellen**

Bei der Kultivierung von zunächst undifferenzierten, pluripotenten Stammzellen in embryo-ähnlichen Aggregaten, den sog. Embryoid Bodies (EBs), differenzieren die Zellen *in vitro* in

die verschiedenen Zelltypen der drei Keimblätter (Doetschman et al., 1985). So wurde z.B. die Differenzierung in Blut-, Nerven-, Epithel-, Muskel- und Herzmuskelzellen beschrieben (Bagutti et al., 1996; Doetschman et al., 1985; Strubing et al., 1995a; Wobus et al., 1991). Diese differenzierten Zellen zeigen die physiologischen Eigenschaften von spezialisierten Zellen. In den letzten Jahren sind Protokolle entwickelt und optimiert worden, die eine *in vitro* Entwicklung von Stammzellen in bestimmte Differenzierungsrichtungen fördern (Fairchild et al., 2000; Guan et al., 2001; Pasumarthi and Field, 2002). Dabei wurden die Einflüsse verschiedener Faktoren auf das Differenzierungspotential der ES Zellen deutlich. So sind z.B. die verwendete Zelllinie, die Anzahl der in den Embryoid Bodies differenzierenden Zellen und die Dauer der einzelnen Kultivierungsschritte in den Differenzierungsprotokollen von Bedeutung. Außerdem beeinflussen die Qualität des dem Kulturmedium zugesetzten Fetalen Bovinen Serums und weitere Zusätze zum Kulturmedium die Differenzierung der Zellen (Kanno et al., 2004; Wobus et al., 2001). Für die maximale Induktion einiger Differenzierungsrichtungen sind Zusätze von Differenzierungsfaktoren zu bestimmten Zeitpunkten der Kultur notwendig (Bain et al., 1996; Rohwedel et al., 1999). So wurden z.B. konzentrations- und zeitabhängige Effekte von Retinsäure auf die Differenzierung von ES und EC Zellen beschrieben (Drab et al., 1997; Wobus et al., 1997). Bei der Entwicklung der undifferenzierten Stammzellen in spezialisierte somatische Zelltypen werden Prozesse durchlaufen, die denen der frühembryonalen Entwicklung entsprechen (Leahy et al., 1999; Rolletschek et al., 2004). Dabei werden bei der *in vitro* Differenzierung keimblatt- und gewebsspezifische Gene exprimiert (Drab et al., 1997; Maltsev et al., 1993; Wobus et al., 1995). Diese *in vitro* differenzierten Zellen besitzen die entsprechenden gewebstypischen funktionellen Eigenschaften, wie z.B. Aktionspotentiale oder Ionenkanäle (Maltsev et al., 1994; Maltsev et al., 1999; Wobus et al., 1997).