

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Untersuchungen zu den Kulturbedingungen**

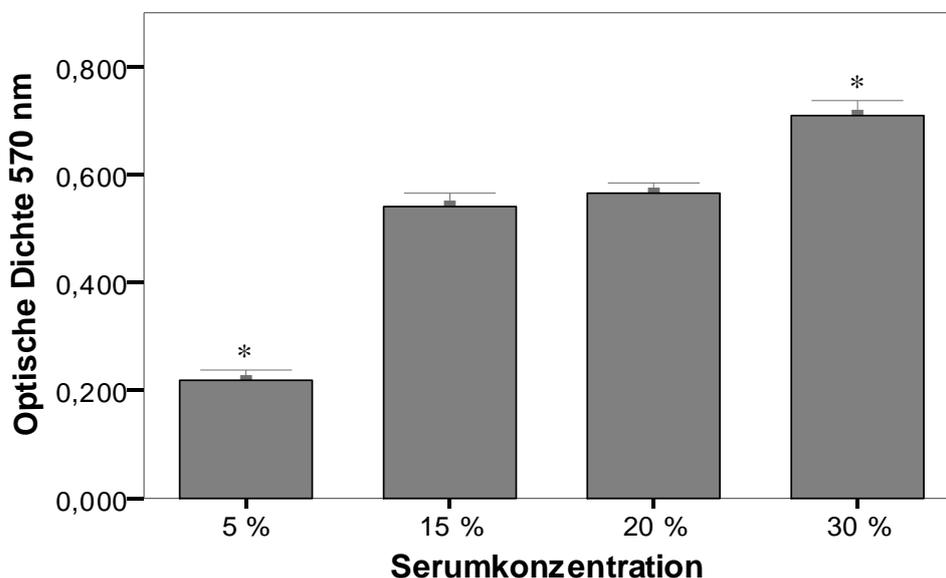
#### **3.1.1 Einfluss verschiedener Serumkonzentrationen auf die Proliferation und die Differenzierung von ES Zellen**

Der Einfluss der Serumkonzentration im Kulturmedium auf die Proliferation und die Differenzierung der embryonalen Stammzellen (ES Zellen) wurde in einem Konzentrationsbereich von 5 – 30 % untersucht.

Im Proliferationstest zeigten die Wachstumsraten der ES Zellen eine proportionale Abhängigkeit zur Serumkonzentration (Abb. 5). Dabei wurde bei einem Serumanteil von 5 % im Kulturmedium ein signifikant geringeres Wachstum der Zellen beobachtet als bei 15 % und 20 %. Unter dem Einfluss von 30 % Serum erreichten die Zellen die höchsten Proliferationsraten.

Bei der Auswertung der Differenzierungstests am Versuchstag 10 konnte kein Einfluss der Serumkonzentration auf die Differenzierung zu Herzmuskelzellen beobachtet werden (Tab. 1). Die Auswertung an Versuchstag 7 zeigte hingegen, dass zu diesem frühen Auswertungszeitpunkt bei Serumkonzentrationen von 5 % und 15 % signifikant mehr Wells kontrahierenden Kardiomyozyten enthielten als bei 20 % und 30 %. Signifikante Unterschiede zwischen Versuchstag 7 und Versuchstag 10 einer Serumkonzentration wurden ebenfalls nur bei 20 % und 30 % beobachtet.

Da ein Serum aufgrund seiner undefinierten und variablen Zusammensetzung die Standardisierung der Kulturbedingungen verhindert, wird angestrebt, den Serumanteil im Kulturmedium zu reduzieren. In diesen Voruntersuchungen konnten in den Differenzierungs- und Proliferationstests mit einer Serumkonzentration von 15 % vergleichbare Ergebnisse erreicht werden wie mit 20 % Serum. Für die Durchführung der Proliferations- und Differenzierungstests im Rahmen der der Hauptstudie wurde die Serumkonzentration in den Testmedien daher auf 15 % eingestellt.



**Abb. 5: Einfluss der Serumkonzentration auf die Proliferation von ES Zellen**

Prozentangaben geben den prozentualen Anteil des fetalen bovines Serums im Kulturmedium an; die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte der optischen Dichten; die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes (n=24). Die statistische Auswertung (ANOVA mit nachfolgendem Test nach Tamhane) erfolgte im Vergleich zum Ansatz 15 %; \* -  $p < 0,05$ .

| FBS im Kulturmedium | Versuchstag 7 |                | Versuchstag 10 |                |
|---------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
|                     | mit k. K. (%) | ohne k. K. (%) | mit k. K. (%)  | ohne k. K. (%) |
| 5 %                 | 22 (91,7)     | 2 (8,3)        | 23 (95,8)      | 1 (4,2)        |
| 15 %                | 24 (100)      | 0 (0)          | 24 (100)       | 0 (0)          |
| 20 %                | 18 (75,0) *   | 6 (25,0) *     | 24 (100) #     | 0 (0) #        |
| 30 %                | 7 (29,2) *    | 17 (70,8) *    | 21 (87,5) #    | 3 (12,5) #     |

**Tab. 1: Einfluss der Serumkonzentration auf die Differenzierung von ES Zellen**

FBS: Fetales bovines Serum; mit k. K.: Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten; ohne k. K.: Wells ohne kontrahierende Kardiomyozyten. Statistischer Vergleich ( $\chi^2$ -Test) erfolgte zum Ansatz 15 % des gleichen Versuchstages (\*) bzw. zwischen den Versuchstagen 7 und 10 einer Serumkonzentration (#); \*, # -  $p < 0,05$ .

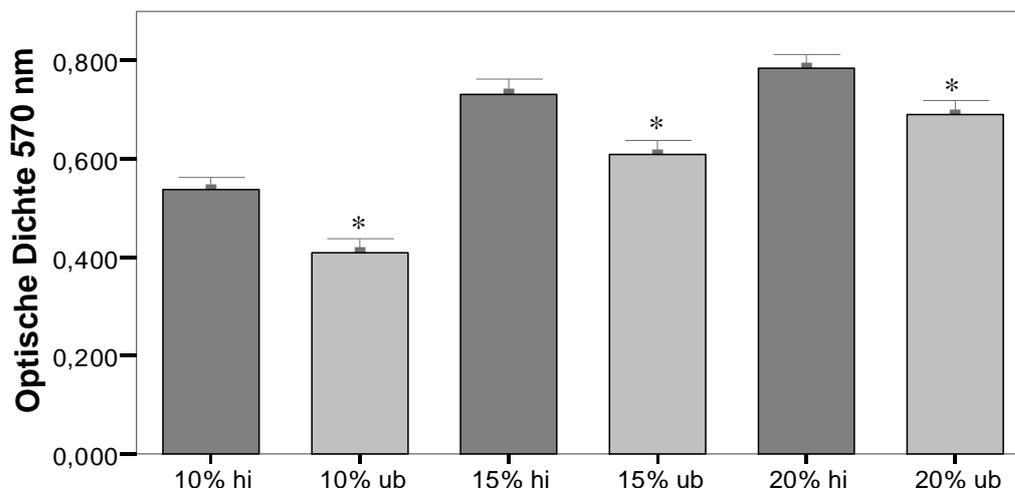
### **3.1.2 Einfluss der Hitzeinaktivierung des Serums auf die Proliferation und Differenzierung von ES Zellen**

Um den Einfluss der Hitzeinaktivierung der Serumcharge, die für die Kultivierung der embryonalen Stammzellen im Rahmen der Hauptstudie verwendet werden sollte (437A, Biochrom), zu überprüfen, wurden Proliferations- und Differenzierungstests durchgeführt. Dabei wurde jeweils der Einfluss von unbehandeltem und hitzeinaktiviertem fetalem bovinem Serum (FBS) in Konzentrationen von 10 %, 15 % und 20 % untersucht.

In den Proliferationstests wurden bei der untersuchten Serumcharge nach der Hitzeinaktivierung des FBS signifikant höhere Proliferationsraten im Vergleich zu unbehandeltem Serum erreicht (Abb. 6).

Bei der Auswertung des Differenzierungstests am Versuchstag 10 konnte kein Einfluss der Wärmebehandlung des FBS auf die Differenzierung zu Herzmuskelzellen beobachtet werden (Tab. 2). Am Versuchstag 7 waren hingegen die Anteile der Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten bei den Testansätzen mit hitzeinaktiviertem Serum deutlich höher als bei denen mit unbehandeltem Serum. Die Unterschiede waren bei den Serumkonzentrationen 10 % und 20 % signifikant.

Da die Wärmebehandlung der untersuchten Serumcharge einen positiven Einfluss auf die Proliferation der Zellen zeigte und Nachteile durch die Hitzeinaktivierung nicht zu erkennen waren, wurde hitzeinaktiviertes Serum als Bestandteil des Kulturmediums für die Kultivierung der ES Zellen im Rahmen der Hauptstudie verwendet.



**Abb. 6: Einfluss der Hitzeinaktivierung auf die Proliferation von ES Zellen**

Untersuchung der Serumcharge 437A (Biochrom); Prozentangaben geben den prozentualen Anteil des fetalen bovines Serums im Kulturmedium an; hi: hitzeinaktiviert; ub: unbehandelt. Die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte der optischen Dichten; die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes (n=20). Statistischer Vergleich (t-Test) erfolgte jeweils zwischen dem unbehandelten und dem hitzeinaktivierten Ansatz einer Serumkonzentration; \* - p < 0,05.

| FBS im Kulturmedium | Versuchstag 7 |                | Versuchstag 10 |                |
|---------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
|                     | mit k. K. (%) | ohne k. K. (%) | mit k. K. (%)  | ohne k. K. (%) |
| 10 % hi             | 21 (87,5)     | 3 (12,5)       | 24 (100)       | 0 (0)          |
| 10 % ub             | 9 (37,5) *    | 15 (62,5) *    | 23 (95,8) #    | 1 (4,2) #      |
| 15 % hi             | 20 (83,3)     | 4 (16,7)       | 24 (100)       | 0 (0)          |
| 15 % ub             | 13 (54,2)     | 11 (45,8)      | 23 (95,8) #    | 1 (4,2) #      |
| 20 % hi             | 19 (79,2)     | 5 (20,8)       | 23 (95,8)      | 1 (4,2)        |
| 20 % ub             | 8 (33,3) *    | 16 (66,6) *    | 24 (100) #     | 0 (0) #        |

**Tab. 2: Einfluss der Hitzeinaktivierung auf die Differenzierung von ES Zellen**

Untersuchung der Serumcharge 437A (Biochrom); FBS: Fetales bovines Serum; hi: hitzeinaktiviert; ub: unbehandelt; mit k. K.: Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten; ohne k. K.: Wells ohne kontrahierende Kardiomyozyten. Der statistische Vergleich ( $\chi^2$ -Test) erfolgte jeweils zwischen dem unbehandelten und dem hitzeinaktivierten Ansatz einer Serumkonzentration am selben Versuchstag (\*) bzw. zwischen den Versuchstagen 7 und 10 einer Serumkonzentration-/behandlung (#); \*, # - p < 0,05 (n=24).

### 3.1.3 Inaktivierung der STO-Fibroblasten und Trennung von ES Zellen

In Vorversuchen zur Inaktivierung der STO-Fibroblasten mit Mitomycin C und zur Aufreinigung der Stammzellen von den STO-Fibroblasten wurden verschiedene Inkubationszeiten (2 - 4 h) und Lösungsmittel für das Mitomycin (PBS, Kulturmedium für STO-Fibroblasten) überprüft. Dabei stellte sich die Inaktivierung durch Inkubation der Fibroblasten mit 10 µg/ml Mitomycin C in Kulturmedium über 4 h bei 37° C als geeignete Methode heraus (Ergebnisse nicht dargestellt).

Eine vollständige Trennung der beiden Zelllinien (embryonale Stammzellen D3 und STO-Fibroblasten) war mit der in Kapitel 2.3.1.3 beschriebenen Methode nicht möglich. Um den Grad der Trennung beurteilen zu können, wurden während der einzelnen Arbeitsschritte des Trennverfahrens die Anteile der beiden Zelltypen an der Gesamtpopulation nach Bestimmung der Zellzahlen mithilfe einer Neubauer-Kammer berechnet. Die Zellen wurden dabei anhand ihrer Morphologie und Größe den Zelllinien zugeordnet. Abweichend von der in Kapitel 2.3.1.3 angegebenen Methode wurden diese Vorversuche mit einer Anhaftzeit der Zellen in der Zellkulturflasche von 30 min durchgeführt.

Wie in Abb. 7a dargestellt, betrug der durchschnittliche Anteil der STO-Fibroblasten an der Gesamtpopulation zu Beginn des mehrere Arbeitsschritte umfassenden Trennverfahrens 6,2 %, nach Abschluss nur noch 2,4 %. Der Anteil der embryonalen Stammzellen nahm entsprechend von 93,8 % auf 97,6 % zu.

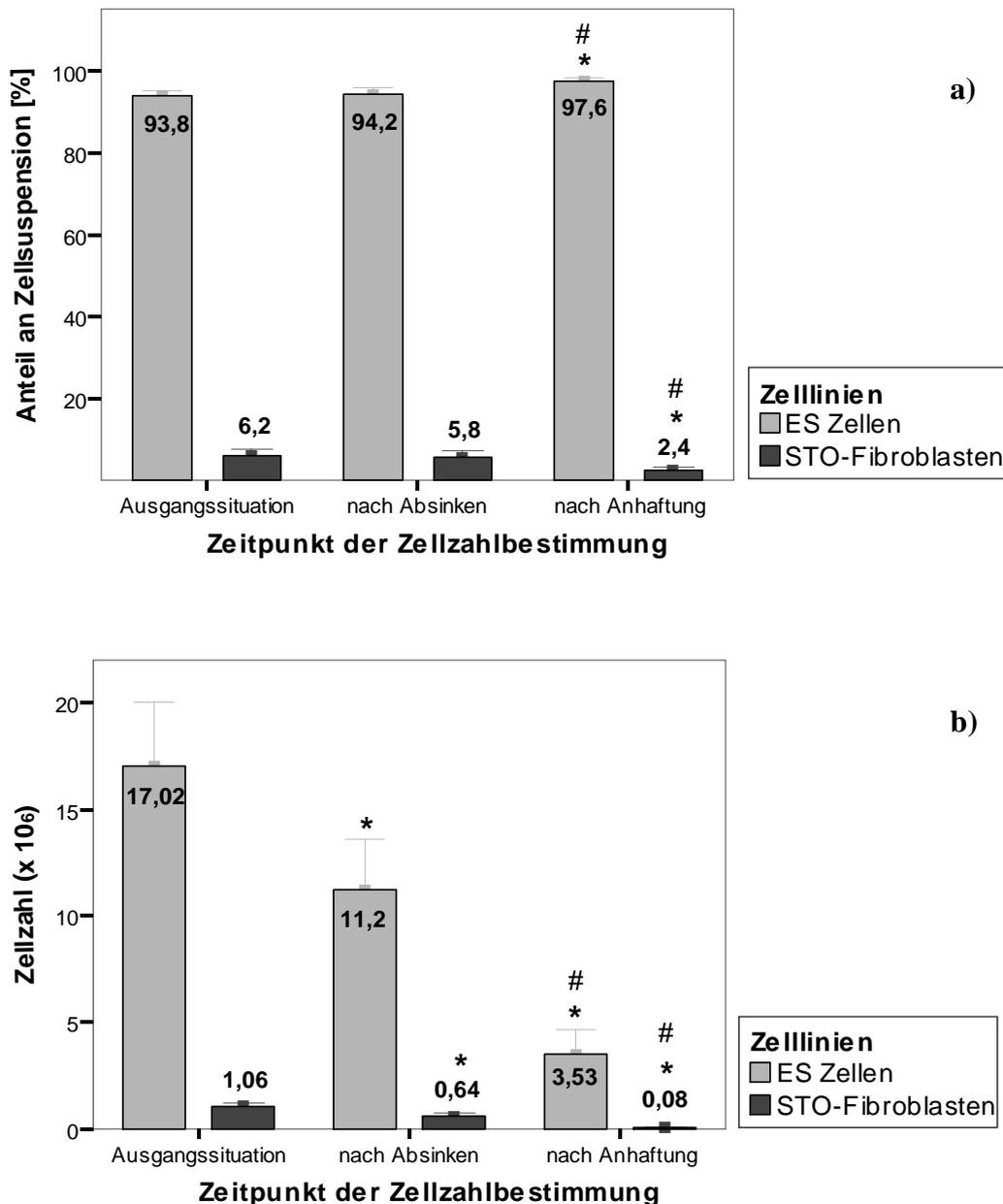
Bei der Betrachtung der absoluten Zellzahlen (Abb. 7b) wird deutlich, dass im Verlauf des Trennverfahrens sowohl die Anzahl der STO-Fibroblasten als auch die der Stammzellen signifikant abnahm. So waren nach dem letzten Arbeitsschritt (Anhaften der Zellen in der Zellkulturflasche über 30 min) nur noch etwa  $3,5 \times 10^6$  ES Zellen im Überstand.

Der Bedarf an ES Zellen bei dem Passagieren setzt sich zusammen aus der in die neue Zellkulturflasche zu überführenden Zellzahl und der für die Durchführung der geplanten Untersuchung benötigten Zellzahl (etwa  $3 \times 10^6$  Zellen je Auswertungsmethode).

Für die in der Hauptstudie geplante Überführung von  $4 \times 10^6$  Stammzellen in die neue Zellkulturflasche und eine zusätzliche Untersuchung der Zellen mit einer der beschriebenen Auswertungsmethoden war die Anzahl der embryonalen Stammzellen nach dem Trennverfahren mit 30-minütiger Anhaftzeit in gelatinebeschichteter Zellkulturflasche nicht ausreichend. Daher wurden während der Durchführung der Hauptstudie bereits nach dem

---

ersten Trennungsschritt (Absinken der Zellen über 5 min im Zentrifugenröhrchen) die ES Zellen für die weitere Kultivierung in den Zellkulturflaschen abgenommen. Die Untersuchungen der Stammzellen auf die Stammzell-Marker oder die Durchführung des EST erfolgten hingegen erst nach dem letzten Arbeitsschritt des Trennverfahrens (Anhaftung der Zellen in der gelatinebeschichteten Zellkulturflasche). Um ausreichende Zellzahlen für die Auswertungen zu gewährleisten, wurde im Rahmen der Hauptstudie diese Anhaftzeit auf 20 min verkürzt.



**Abb. 7: Bestimmung der Zellzahlen während des Trennverfahrens der ES Zellen von STO-Fibroblasten**

a) relative Anteile der beiden Zelllinien in der Zellsuspension

b) absolute Zellzahlen nach Zellzahlbestimmung mithilfe Neubauer Zählkammer

Die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte, Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes (n=12); Zeitpunkt der Zellzahlbestimmung: „Ausgangssituation“: In der Zellsuspension nach dem Abstoppen der Trypsinreaktion vor dem Absinken über 5 min; „nach Absinken“: Im Überstand nach 5 min Absinken der Zellen; „nach Anhaftung“: Im Überstand nach 30 min Kultivierung der Zellen in gelatinebeschichteten Zellkulturflaschen. Statistischer Vergleich erfolgte jeweils zum dem Zeitpunkt „Ausgangssituation“ (\*) bzw. zum Zeitpunkt „nach Absinken“ (#) der gleichen Zelllinie; \*, # - p < 0,05.

### 3.2 Qualitätskontrollen der embryonalen Stammzellen

In Anlehnung an das Protokoll des Embryonic Stem Cell Test (EST) (Spielmann and Scholz, 1999) wurden die ES Zellen nach dem Auftauen in einer Qualitätskontrolle auf ihre Eignung für die Durchführung der Proliferations- und Differenzierungstests untersucht. Dafür wurde jeweils der Einfluss von 1000 µg/ml Penicillin G (Pen, Negativkontrolle) und steigenden Konzentrationen 5-Fluorouracil (FU, 0,015 µg/ml, 0,03 µg/ml, 0,045 µg/ml, 0,06 µg/ml) auf die Proliferation und die Differenzierung der ES Zellen überprüft.

Die unbehandelte Kontrolle und die Negativkontrolle sollen im Differenzierungstest in mindestens 21 der 24 Wells kontrahierende Herzmuskelzellen aufweisen. Im Proliferationstest soll die optische Dichte dieser Kontrollen in Bereichen zwischen 0,9 und 1,6 liegen. Die Behandlung der Zellen mit FU soll zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Differenzierung und der Proliferation führen.

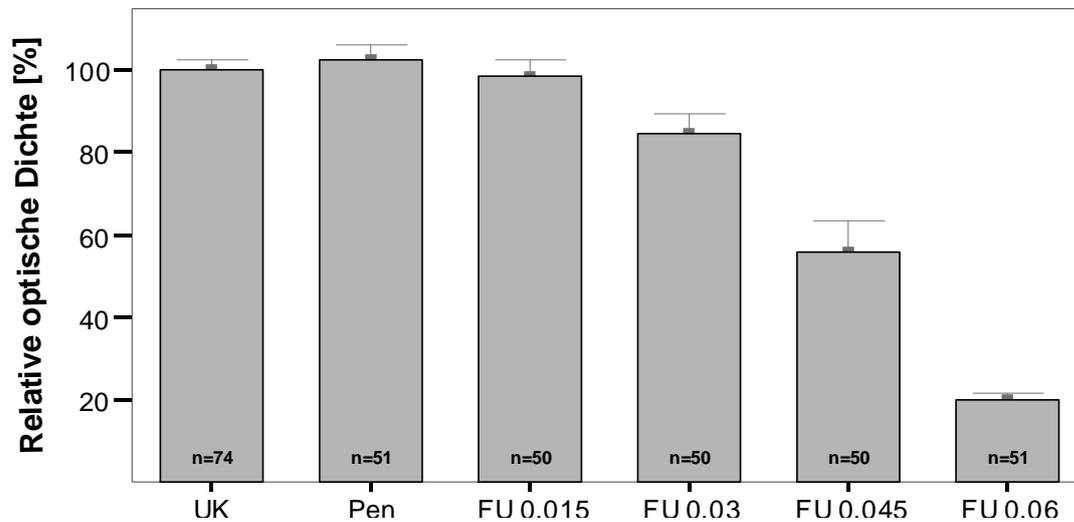
In den Abb. 8 und 9 bzw. Tab. 3 und 4 sind die Ergebnisse aus vier Qualitätskontrollen zusammengefasst dargestellt.

Ein Effekt des als nicht-embryotoxisch klassifizierten Penicillin G auf die Proliferation und die Differenzierung der ES Zellen war nicht zu beobachten.

Die mit der embryotoxischen Substanz FU inkubierten Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferation ab einer Konzentration von 0,03 µg/ml (Abb. 8). Die anhand der absoluten optischen Dichten durchgeführte statistische Auswertung der Proliferationstests ergab ein signifikant schlechteres Wachstum der Zellen ab einer Konzentration von 0,045 µg/ml Fluorouracil (Tab. 3).

Abbildung 9 zeigt die starken Schwankungen des Effektes des Fluorouracil auf die Differenzierung von Stammzellen zu Herzmuskelzellen in Konzentrationsbereichen von 0,03 µg/ml und 0,045 µg/ml. Durch die Konzentration von 0,03 µg/ml FU wurde in zwei der vier dargestellten Qualitätskontrollen die Differenzierung der ES Zellen zu kontrahierenden Herzmuskelzellen vollständig verhindert. In den beiden anderen Versuchen lagen die Anteile der Wells mit kontrahierenden Herzmuskelzellen bei 100 %.

Im Differenzierungstest war der Anteil der kontrahierenden Kardiomyozyten ab einer Konzentration von 0,03 µg/ml Fluorouracil signifikant geringer als bei der UK (Tab. 4).



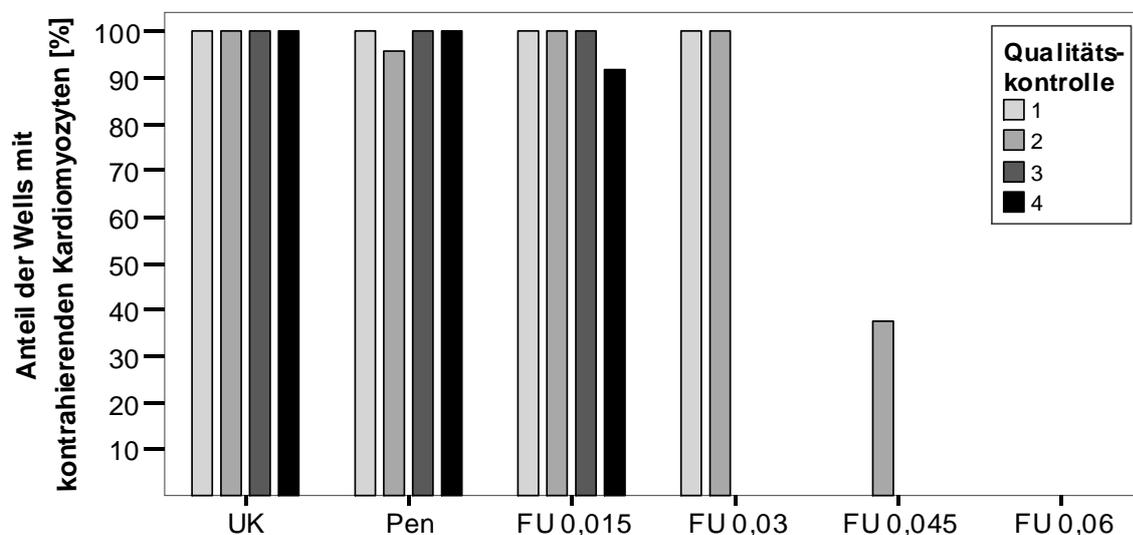
**Abb. 8: Proliferationstests von Qualitätskontrollen der ES Zellen**

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 4 Qualitätskontrollen. Die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte der relativen optischen Dichten; die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes. UK: Unbehandelte Kontrolle; Pen: Penicillin G (1000 µg/ml); FU: Fluorouracil (Konzentrationsangaben in µg/ml).

|                 | N  | Mittelwert | Standard-Abweichung | 95 %- Konfidenzintervall für Mittelwert |            |
|-----------------|----|------------|---------------------|---|------------|
|                 |    |            |                     | Untergrenze                             | Obergrenze |
| <b>UK</b>       | 74 | 0,931      | ± 0,159             | 0,894                                   | 0,968      |
| <b>Pen</b>      | 51 | 0,967      | ± 0,198             | 0,911                                   | 1,022      |
| <b>FU 0,015</b> | 50 | 0,923      | ± 0,172             | 0,874                                   | 0,972      |
| <b>FU 0,03</b>  | 50 | 0,813      | ± 0,281             | 0,734                                   | 0,893      |
| <b>FU 0,045</b> | 50 | 0,555      | ± 0,341 *           | 0,458                                   | 0,652      |
| <b>FU 0,06</b>  | 51 | 0,192      | ± 0,073 *           | 0,172                                   | 0,212      |

**Tab. 3: Proliferationstests von Qualitätskontrollen der ES Zellen**

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 4 Qualitätskontrollen. UK: Unbehandelte Kontrolle; Pen: Penicillin G (1000 µg/ml); FU: Fluorouracil (Konzentrationsangaben in µg/ml); N: Stichprobenumfang. Statistischer Vergleich (ANOVA mit nachfolgendem Test nach Tamhane) erfolgte jeweils zum Ansatz „UK“; \* -  $p < 0,05$ .



**Abb. 9: Differenzierungstests von Qualitätskontrollen der ES Zellen**

Ergebnisse aus 4 Qualitätskontrollen. Prozentualer Anteil der Wells mit kontrahierenden Herzmuskelzellen am Versuchstag 10. UK: Unbehandelte Kontrolle; Pen: Penicillin G (1000 µg/ml); FU: Fluorouracil (Konzentrationsangaben in µg/ml) (jeweils n=24).

|                 | Versuchstag 10 |                |
|-----------------|----------------|----------------|
|                 | mit k. K. (%)  | ohne k. K. (%) |
| <b>UK</b>       | 96 (100)       | 0 (0)          |
| <b>Pen</b>      | 95 (99,0)      | 1 (1,0)        |
| <b>FU 0,015</b> | 94 (97,9)      | 2 (2,1)        |
| <b>FU 0,03</b>  | 48 (50,0) *    | 48 (50,0) *    |
| <b>FU 0,045</b> | 9 (9,4) *      | 87 (90,6) *    |
| <b>FU 0,06</b>  | 0 (0) *        | 96 (100) *     |

**Tab. 4: Differenzierungstests von Qualitätskontrollen der ES Zellen**

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 4 Qualitätskontrollen. Anzahl der Wells mit bzw. ohne kontrahierenden Kardiomyozyten (k. K.) am Versuchstag 10 (n=96). UK: Unbehandelte Kontrolle; Pen: Penicillin G (1000 µg/ml); FU: Fluorouracil (Konzentrationsangaben in µg/ml); Die statistische Auswertung (exakter Test nach Fisher) erfolgte jeweils zum Ansatz „UK“; \* -  $p < 0,05$ .

### 3.3 Hauptstudie

Wie in Kapitel 2 beschrieben, wurden in der Hauptstudie die embryonalen Stammzellen (ES Zellen) mit unterschiedlichen Methoden der Differenzierungshemmung über einen Zeitraum von 50 Passagen kultiviert. Die dafür gewählten Testansätze sind im Folgenden noch einmal aufgeführt:

**A: 1000 U/ml LIF (Leukemia Inhibitory Factor)**

**B: 2000 U/ml LIF**

**C: 20 ng/ml OsM (Oncostatin M)**

**D: ohne differenzierungshemmenden Zusatz (= Positivkontrolle)**

**E: auf STO-Feeder Layer**

**F: auf STO-Feeder Layer + 1000 U/ml LIF**

Um den undifferenzierten Status der Stammzellen zu überprüfen, wurden diese Zellen nach jeder fünften Passage auf ihre Alkalische Phosphatase-Aktivität und die Expression von SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen -1) untersucht. Dafür wurden immunzytochemische, zytochemische und durchflusszytometrische Untersuchungen der Zellen und der photometrisch ausgewertete Enzym-Aktivitätstest durchgeführt (Durchführung s. Kapitel 2.3.4).

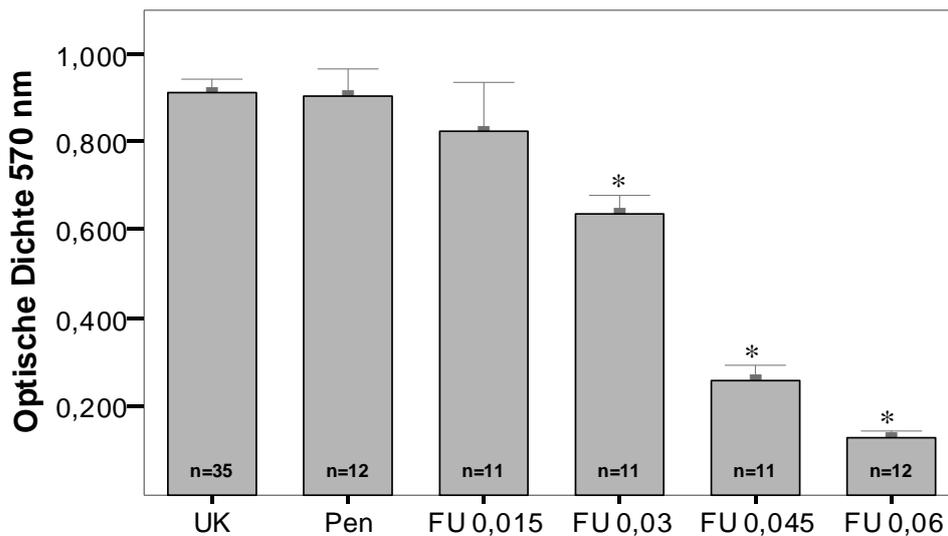
Die Untersuchung des Proliferations- und Differenzierungspotentials der Zellen wurde unter Kontrollbedingungen (unbehandelte Kontrolle, UK) und unter dem Einfluss von 1000 µg/ml Penicillin G (Pen) als Negativkontrolle bzw. 0,025 µg/ml 5-Fluorouracil (FU) als Positivkontrolle vorgenommen (Durchführung s. Kapitel 2.3.2).

### **3.3.1 Qualitätskontrolle der embryonalen Stammzellen für die Hauptstudie**

Die ES Zellen wurden vor Beginn der Versuchsreihe auf die Fähigkeit der Differenzierung zu Kardiomyozyten und die Empfindlichkeit gegenüber Substanzeinwirkung untersucht. Dazu wurde der Einfluss von 1000 µg/ml Penicillin G (Pen, Negativkontrolle) und steigenden Konzentrationen 5-Fluorouracil (FU, 0,015 µg/ml, 0,03 µg/ml, 0,045 µg/ml, 0,06 µg/ml) auf die Proliferation und die Differenzierung der ES Zellen überprüft.

Im Proliferationstest zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferationsrate, die ab einer Konzentration von 0,03 µg/ml FU statistisch signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war (Abb. 10).

Im Differenzierungstest lag der Anteil der Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten von den Ansätzen UK, Pen und 0,015 µg/ml FU jeweils bei 100 %. Ab einer Konzentration von 0,03 µg/ml FU war keine Differenzierung zu kontrahierenden Kardiomyozyten mehr zu beobachten (Tab. 5).



**Abb. 10: Proliferationstest der Qualitätskontrolle der ES Zellen für die Hauptstudie**

UK: Unbehandelte Kontrolle; Pen: Penicillin G (1000 µg/ml), FU: 5-Fluorouracil (Konzentrationsangaben in µg/ml); die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte der optischen Dichten; Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes; Statistischer Vergleich (ANOVA mit nachfolgendem Test nach Tamhane) erfolgte zum Testansatz „UK“. \* -  $p < 0,05$ ;

|                 | Versuchstag 10 |                |
|-----------------|----------------|----------------|
|                 | mit k. K. (%)  | ohne k. K. (%) |
| <b>UK</b>       | 24 (100)       | 0 (0)          |
| <b>Pen</b>      | 24 (100)       | 0 (0)          |
| <b>FU 0,015</b> | 24 (100)       | 0 (0)          |
| <b>FU 0,03</b>  | 0 (0) *        | 24 (100) *     |
| <b>FU 0,045</b> | 0 (0) *        | 24 (100) *     |
| <b>FU 0,06</b>  | 0 (0) *        | 24 (100) *     |

**Tab. 5: Differenzierungstest der Qualitätskontrolle der ES Zellen für die Hauptstudie**

Anteil der Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten pro 24-Well-Zellkulturplatte nach morphologischer Auswertung an Versuchstag 10. UK: Unbehandelte Kontrolle; Pen: Penicillin G (1000 µg/ml), FU: 5-Fluorouracil (Konzentrationsangaben in µg/ml); Der statistische Vergleich (exakter Test nach Fisher) erfolgte jeweils zum Ansatz „UK“; \* -  $p < 0,05$ .

### 3.3.2 Morphologische Beurteilung der ES Zellen in den Zellkulturflaschen

Die Beurteilung der Kolonieforn und -dichte sowie der Morphologie der ES Zellen in den Zellkulturflaschen erfolgte mithilfe des Umkehrmikroskops (Zeiss).

Das für undifferenzierte murine embryonale Stammzellen typische Wachstum in kompakten, (hoch-)gewölbten Kolonien wurde bei den für Hauptstudie verwendeten ES Zellen während der ersten Passagen nach dem Auftauen beobachtet.

Nach Überführung der Zellen in die verschiedenen Kulturbedingungen dieser Versuchsreihe (Ansätze A - F) zeigten sich Veränderungen der Morphologie zuerst bei den als Positivkontrolle mitgeführten Zellen, die ohne Differenzierungshemmung kultiviert wurden (Ansatz D). Bereits nach zwei Subkultivierungen waren teilweise Abflachungen der Kolonien und ein vermehrtes Auftreten von fibroblastenartigen Zellen zu beobachten. Diese Veränderungen wurden mit steigender Passagezahl ausgeprägter. Die fibroblastenartigen Zellen dieses Ansatzes bildeten einen Monolayer unter den stammzellartigen Kolonien. Ab der 14. Passage waren mittelgroße bis große, kugelförmige Zellhaufen zu beobachten, die auf den fibroblastenartigen Zellen aufsaßen, und deren Zellen sich bei den Passagierungen durch das mehrmalige Aufziehen und Ausblasen mit der Pipette zur Vereinzelung der Zellen nicht vereinzeln ließen.

Von den mit Leukemia Inhibitory Factor (LIF) ohne *Feeder Layer* kultivierten Stammzellen zeigten die Zellen des Ansatzes B (2000 U/ml LIF) ab der Passage 21 eine vermehrte Ausbildung fibroblastenartiger Zellen und eine Abflachung der Kolonien. Bei den mit 1000 U/ml LIF kultivierten Zellen (Ansatz A) wurden diese Veränderungen ab der 29. Passage beobachtet. Sie verstärkten sich bei beiden Ansätzen mit zunehmender Passagezahl. Auch bei diesen beiden Versuchsansätzen traten ab der 24. (Ansatz B) bzw. 31. Passage (Ansatz A) kugelförmige, auf den fibroblastenartigen Zellen aufsitzende Zellhaufen auf.

Die Zellen, deren Kulturmedium mit Oncostatin M supplementiert wurde (Ansatz C), zeigten ab der 23. Passage auch eine Abflachung der Kolonien. Fibroblastenartige Zellen traten hingegen nur vereinzelt ab höheren Passagezahlen auf.

Die auf den inaktivierten STO-Fibroblasten kultivierten Stammzellen (Ansätze E und F) zeigten über die gesamte Versuchsdauer eine Koloniebildung mit mittelgroßen, gewölbten

Kolonien. Das Auftreten fibroblastenartiger Zellen war aufgrund der *Feeder Layer* nicht zu beurteilen.

### 3.3.3 Proliferations- und Differenzierungstest

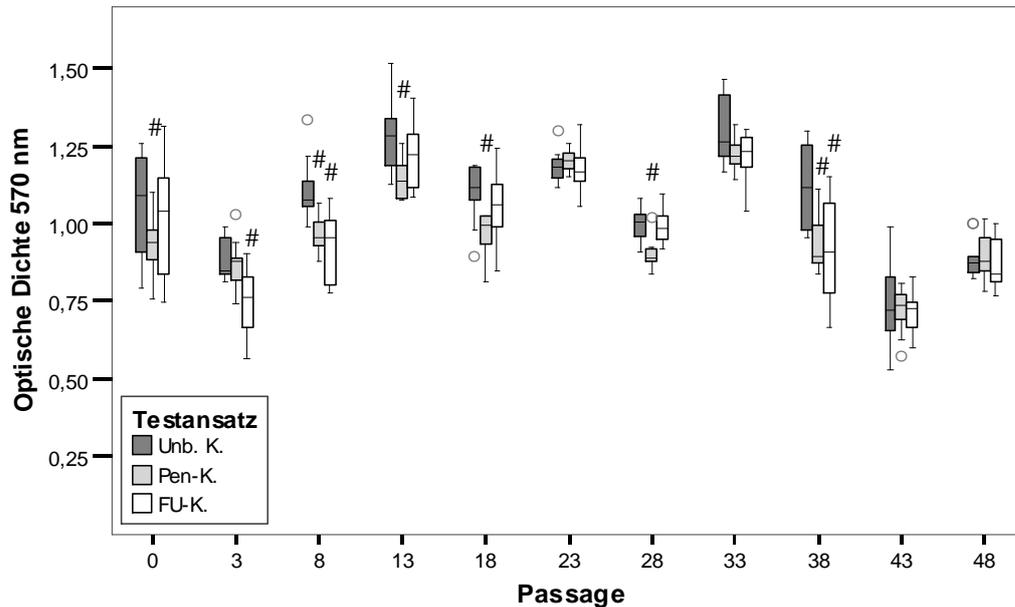
#### 3.3.3.1 Proliferationstest

Die Proliferationstests wurden für alle Ansätze sowohl als unbehandelte Kontrolle als auch unter dem Einfluss von Penicillin (1000 µg/ml, Pen-Kontrolle) und 5-Fluorouracil (0,025 µg/ml, FU-Kontrolle) durchgeführt. Die Darstellung der im Untersuchungszeitraum erhobenen Daten erfolgt getrennt nach Ansätzen in den Abb. 11-16, die Boxplots der unbehandelten Kontrolle, Pen-Kontrolle und FU-Kontrolle einer Passage wurden zur besseren Übersicht jeweils gruppiert.

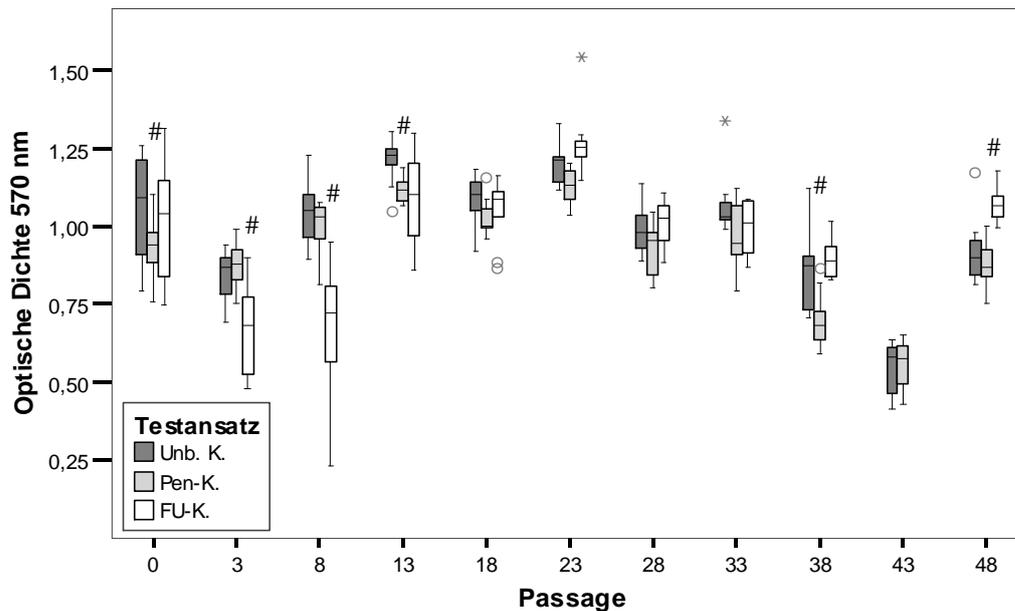
In dieser Studie zeigten nur die Zellen der Ansätze E und F, die auf *Feeder Layer* kultiviert worden waren (mit und ohne Supplementierung des Kulturmediums mit LIF), eine deutliche Hemmung der Proliferation durch 0,025 µg/ml Fluorouracil (Abb. 15 und 16), die stets signifikant war. Ein signifikanter Einfluss von Penicillin auf die Wachstumsraten dieser Zellen war nur bei Passage 13 des Ansatzes E zu beobachten.

Bei den Ansätzen A - D wurden bei einzelnen Passagen Einflüsse von Penicillin G und Fluorouracil auf das Wachstum der Zellen deutlich (Abb. 11-14). Es erreichten vor allem die Zellen der Ansätze A (1000 U/ml LIF) und C (Oncostatin M) unter dem Einfluss von Penicillin G teilweise signifikant geringere Wachstumsraten als in den unbehandelten Kontrollen. Auch die Konzentration von 0,025 µg/ml FU führte bei einigen Passagen zu einer Hemmung des Wachstums dieser Zellen (das Ergebnis der FU-Kontrolle nach 43. Passagen des Ansatzes B wird hier nicht dargestellt, da die optische Dichte den Wert der unbehandelten Kontrolle um das 1,8-fache überstieg).

Über den gesamten Untersuchungszeitraum ließ sich jedoch bei keinem der Ansätze A-F eine Änderung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Penicillin G oder Fluorouracil in Abhängigkeit von der Passagezahl feststellen.



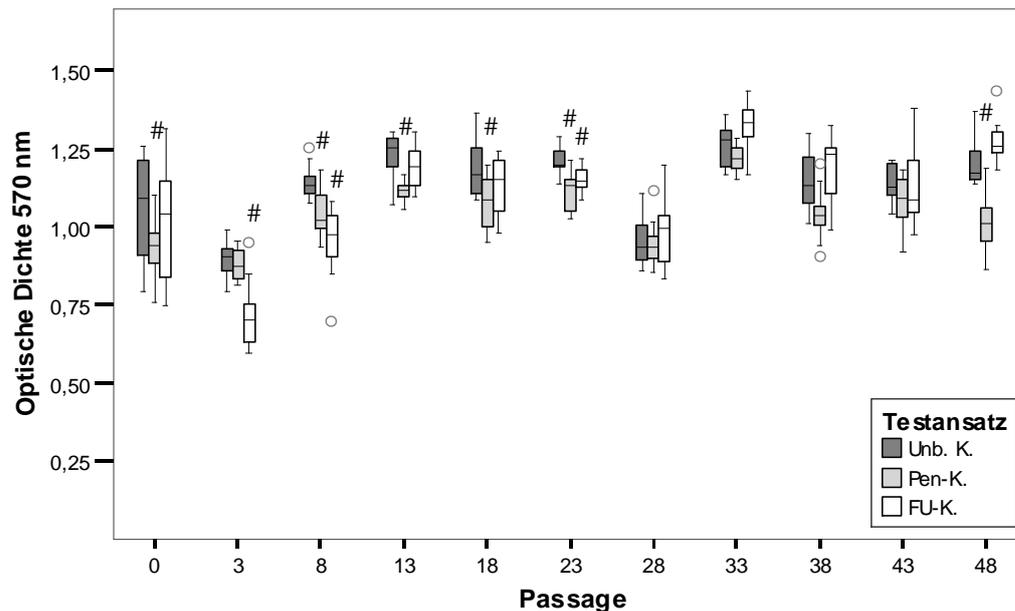
**Abb. 11: Ergebnisse der Proliferationstests von Ansatz A (1000 U/ml LIF)**



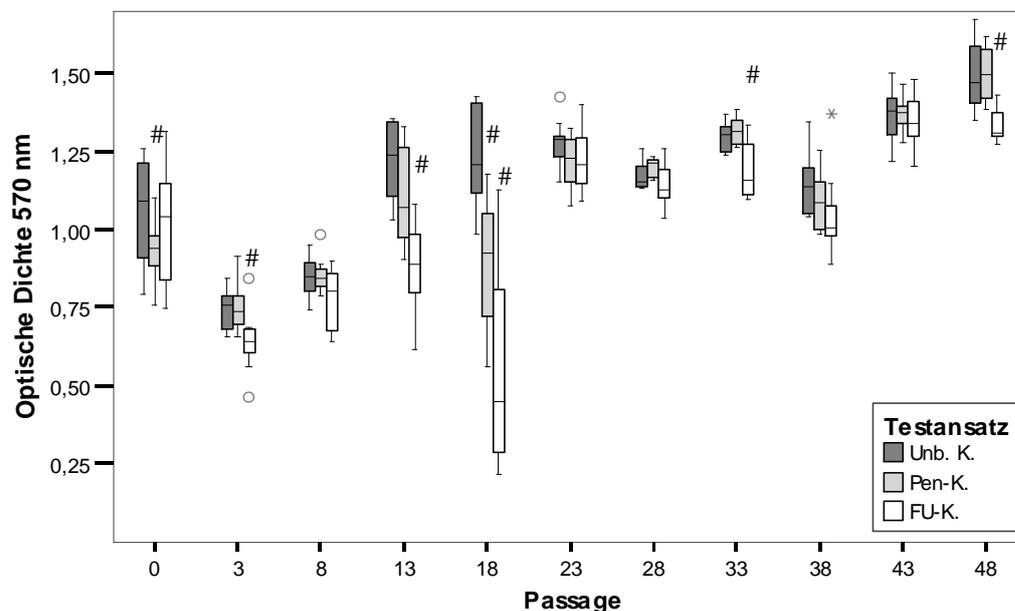
**Abb. 12: Ergebnisse der Proliferationstests von Ansatz B (2000 U/ml LIF)**

**Abb. 11 und 12:** Darstellung der optischen Dichten der Proliferationstests der Ansätze A bzw. B im Verlauf der Hauptstudie.

Unb. K.: unbehandelte Kontrolle; Pen-K.: Penicillin-Kontrolle (1000  $\mu\text{g/ml}$ ); FU-K.: Fluorouracil-Kontrolle (0,025  $\mu\text{g/ml}$ ); °: Ausreißer; \*: Extremwerte (n=10 je Boxplot); der statistische Vergleich (ANOVA mit nachfolgendem Test nach Tamhane) erfolgte jeweils zum Ansatz „Unb. K.“ der gleichen Passage; # -  $p < 0,05$ .



**Abb. 13: Ergebnisse der Proliferationstests von Ansatz C (20 ng/ml Oncostatin M)**



**Abb. 14: Ergebnisse der Proliferationstests von Ansatz D (Positivkontrolle)**

**Abb. 13 und 14:** Darstellung der optischen Dichten der Proliferationstests der Ansätze C bzw. D im Verlauf der Hauptstudie.

Unb. K.: unbehandelte Kontrolle; Pen-K.: Penicillin-Kontrolle (1000  $\mu\text{g/ml}$ ); FU-K.: Fluorouracil-Kontrolle (0,025  $\mu\text{g/ml}$ );  $\circ$ : Ausreißer; \*: Extremwerte ( $n=10$  je Boxplot); der statistische Vergleich (ANOVA mit nachfolgendem Test nach Tamhane) erfolgte jeweils zum Ansatz „Unb. K.“ der gleichen Passage; # -  $p < 0,05$ .

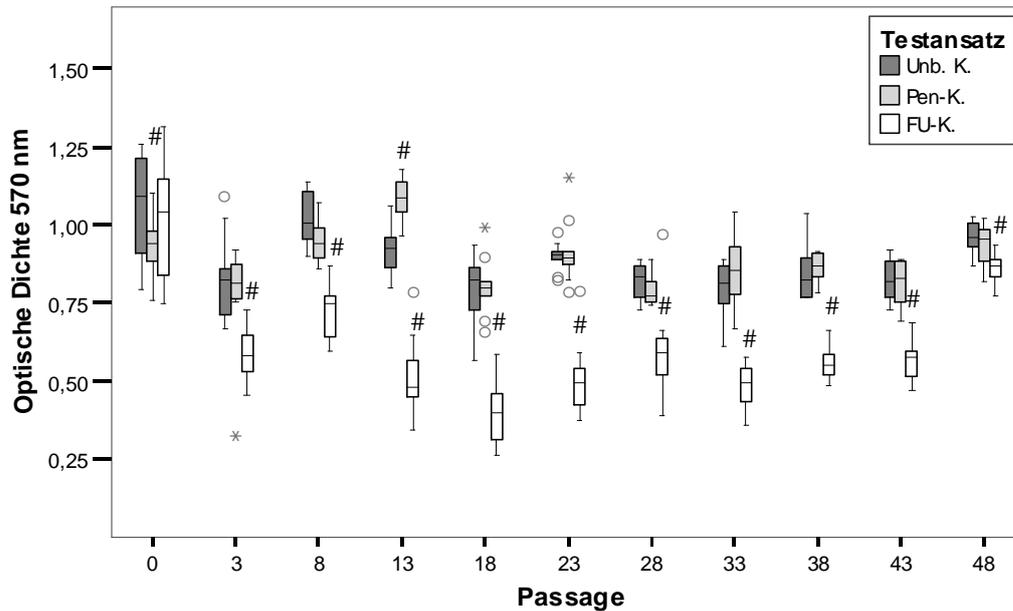


Abb. 15: Ergebnis der Proliferationstests von Ansatz E (*Feeder Layer*)

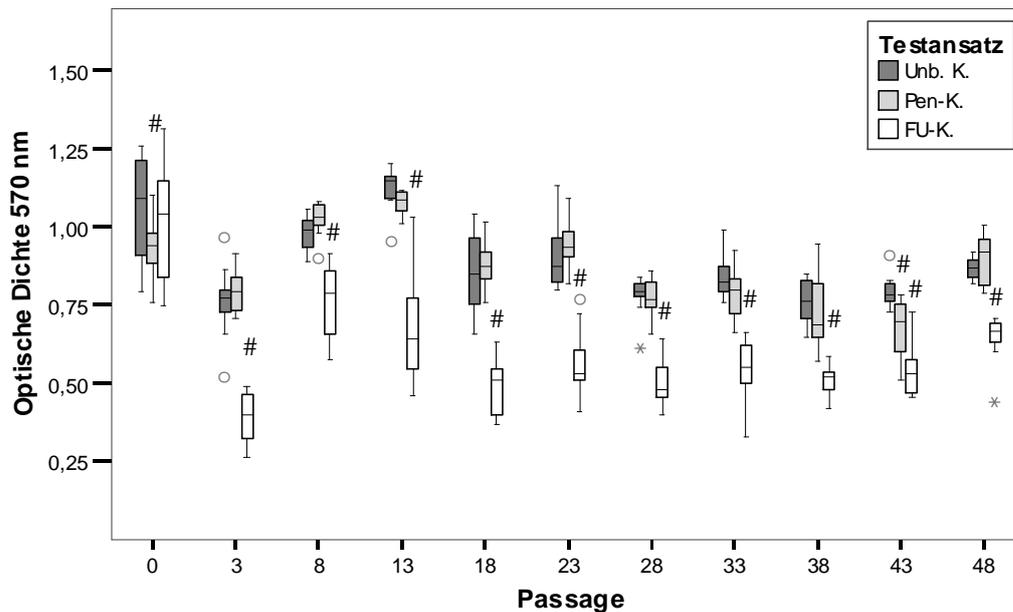


Abb. 16: Ergebnisse der Proliferationstests von Ansatz F (*Feeder Layer* + 1000 U/ml LIF)

Abb. 15 und 16: Darstellung der optischen Dichten der Proliferationstests der Ansätze E bzw. F im Verlauf der Hauptstudie.

Unb. K.: unbehandelte Kontrolle; Pen-K.: Penicillin-Kontrolle (1000  $\mu\text{g/ml}$ ); FU-K.: Fluorouracil-Kontrolle (0,025  $\mu\text{g/ml}$ ); °: Ausreißer; \*: Extremwerte (n=10 je Boxplot); der statistische Vergleich (ANOVA mit nachfolgendem Test nach Tamhane) erfolgte jeweils zum Ansatz „Unb. K.“ der gleichen Passage; # -  $p < 0,05$ .

### 3.3.3.2 Differenzierungstest

Die Differenzierungstests wurden für alle Ansätze (A-F) sowohl als unbehandelte Kontrolle als auch unter dem Einfluss von 1000 µg/ml Penicillin (Pen-Kontrolle) und 0,025 µg/ml 5-Fluorouracil (FU-Kontrolle) durchgeführt. Die Abbildungen 17a und 17b zeigen die Ergebnisse der morphologischen Auswertung der unbehandelten Kontrollen am Versuchstag 10 über den Untersuchungszeitraum der Hauptstudie (der von der 8. Passage durchgeführte Differenzierungstest wurde aufgrund methodischer Fehler bei der Durchführung nicht in der Auswertung der Hauptstudie berücksichtigt). Diese Darstellung in zwei Diagrammen dient nur der Übersichtlichkeit. Dabei sind in Abb. 17a die Ergebnisse der Ansätze A (1000 U/ml LIF), B (2000 U/ml LIF) und C (20 g/ml Oncostatin M) dargestellt, in Abb. 17b die Ergebnisse der Ansätze D (Positivkontrolle), E (*Feeder Layer*) und F (*Feeder Layer* + 1000 U/ml LIF).

Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der Pen- und FU-Kontrollen von Tag 7 und 10 sind in den Abbildungen 18 bis 23 dargestellt, die statistische Auswertung der Differenzierungstests im Anhang in den Tabellen A-1 bis A-24.

Bei der Auswertung des Differenzierungstests der Passage 0 der Hauptstudie lagen die Anteile der Wells mit kontrahierenden Herzmuskelzellen sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch in der Penicillin-Kontrolle bei 100 %. In der FU-Kontrolle dieser Zellen wurden hingegen nur in 54 % der Wells Kontraktionen beobachtet.

Bei den Zellen des Ansatzes D (Positivkontrolle) lag nach 3 Passagen der Anteil der Wells mit kontrahierende Kardiomyozyten nur noch bei 58,3 % in der unbehandelten Kontrolle (Abb. 17b). Mit steigender Passagezahl nahm das Differenzierungspotential dieser Zellen weiter ab. Nach der 28. Passage war in den unbehandelten Kontrollen keine Differenzierung der Zellen zu Herzmuskelzellen mehr zu beobachten. Über den Auswertungszeitraum waren die Anteile der Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten sowohl der Penicillin- als auch der Fluorouracil-Kontrollen geringer als die der unbehandelten Kontrollen (Abb. 21). Eine Ausnahme bildete die Penicillin-Kontrolle bei Passage 33, hier zeigten 4,2 % der Wells kontrahierende Kardiomyozyten.

Ansatz A (1000 U/ml LIF) erreichte in den unbehandelten Kontrollen bis zur 28. Passage Anteile der Wells mit kontrahierenden Herzmuskelzellen von mindestens 91 %. Im weiteren Verlauf der Hauptstudie nahmen die Anteile ab und lagen ab der 38. Passage nur noch in Bereichen zwischen 4 und 33 %. Wie in der Abb. 18b dargestellt, entsprachen die Ergebnisse der Pen-Kontrollen etwa denen der unbehandelten Kontrollen.

Die Zellen des Ansatzes B (2000 U/ml LIF) differenzierten in den unbehandelten Kontrollen bis zur 33. Passage in mindestens 91 % der Wells zu Herzmuskelzellen (Ausnahme: nach der 23. Passage wurden kontrahierende Kardiomyozyten nur in 75 % der Wells beobachtet).

Ab Passage 38 lagen die Anteile der Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten nur noch bei 4 – 30 %. Wie in Abb. 19b dargestellt, entsprachen die Ergebnisse der Penicillin-Kontrollen etwa denen der unbehandelten Kontrollen.

Bei den mit Oncostatin M kultivierten Zellen des Ansatzes C enthielten bis zur 43. Passage mindestens 91,6 % der Wells kontrahierende Kardiomyozyten in den unbehandelten Kontrollen (Abb. 17a) und den Penicillin-Kontrollen. Eine Ausnahme stellte die Passage 18 dar, hier ließen sich bei der Penicillin-Kontrolle nur in 17 von 24 Wells Kontraktionen beobachten (das entspricht 70,8 %). Bei der Passage 48 lag der Anteil der Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten bei 75 % für die unbehandelte Kontrolle und bei 50 % für die Penicillin-Kontrolle.

Die auf *Feeder Layer* ohne LIF-Zusatz kultivierten Zellen (Ansatz E) zeigten über den gesamten Versuchszeitraum in den Differenzierungstests der unbehandelten Kontrolle in mindestens 91,6 % der Wells kontrahierende Kardiomyozyten (Abb. 17b). In den Penicillin-Kontrollen dieses Ansatzes lagen die Anteile bei mindestens 87,5 %.

Die unter Zugabe von 1000 U/ml LIF in Co-Kultur mit *Feeder Layer* kultivierten Zellen des Ansatzes F zeigten, mit Ausnahme der Passage 3 (79,16 %), bis zur 38. Passage einen Anteil der Wells mit kontrahierenden Herzmuskelzellen von mindestens 91,6 % (Abb. 17b). Bei der Auswertung der Zellen nach Passage 48 lag der Anteil bei 50 %.

In den Penicillin-Kontrollen lagen die Anteile bis zur Passage 38 bei mindestens 91 %, in den folgenden Auswertungen wurden nur noch 37,5 % bzw. 50 % erreicht.

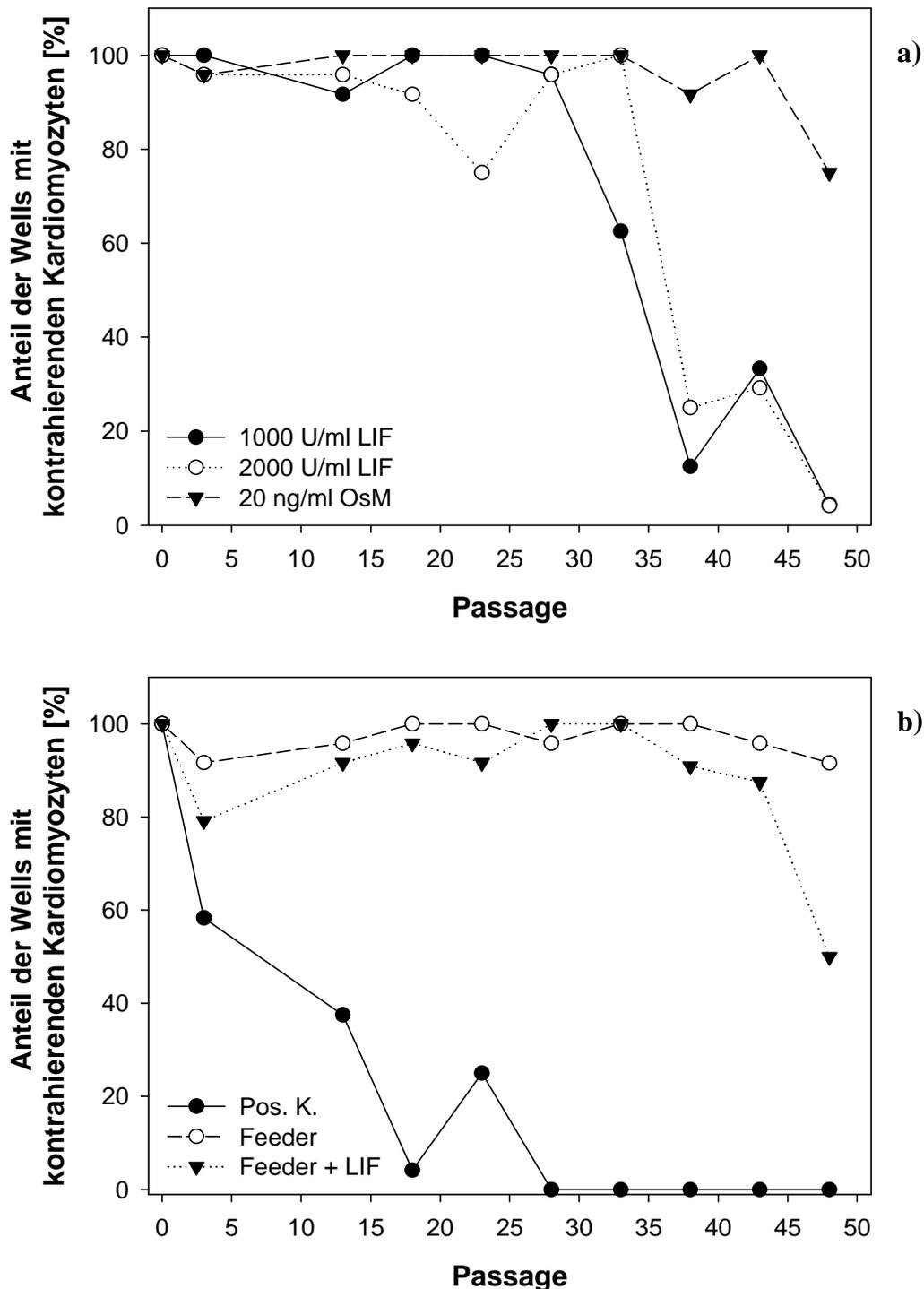
Die Auswertungen der Differenzierungstests der FU-Kontrollen zeigten bei allen Ansätzen Schwankungen über den Untersuchungszeitraum (s. Abb. 18 bis 23). Der Anteil der Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten lag dabei zwischen 0 und 100 %, allerdings nicht über den Anteilen der unbehandelten Kontrollen des entsprechenden Ansatzes (Ausnahmen: Passage 18 des Ansatzes F: UK 95,8 %, FU-Kontrolle 100 %; Passage 48 des Ansatzes E: UK 91,6 %, FU-Kontrolle 100 %). Bei den Ansätzen, bei denen mit zunehmender Passagezahl in den unbehandelten Kontrollen und Penicillin-Kontrollen eine Abnahme des Differenzierungspotentials der Zellen zu beobachten war, nahm auch in den FU-Kontrollen das Differenzierungspotential der Zellen zu Herzmuskelzellen ab.

Eine Veränderung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Fluorouracil oder Penicillin konnte in dem Untersuchungszeitraum nicht beobachtet werden (s. Tab. A-1 bis A-6 im Anhang).

Durch die von der ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) im Rahmen eines Verbundprojektes durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen der Embryoid Bodies aus dem Differenzierungstest des EST wurde gezeigt, dass bereits nach 7 Versuchstagen das Markerprotein für Herzmuskelzellen Myosin Heavy Chain (MF20) maximal exprimiert ist (Seiler et al., 2002).

Um die Möglichkeit der morphologischen Auswertung des Differenzierungstests mit dem Umkehrmikroskop bei verkürzter Kulturdauer zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Embryoid Body-Auswüchse in den 24-Well-Zellkulturplatten zusätzlich zu den Auswertungen am Versuchstag 10 auch bereits am Versuchstag 7 auf Kontraktionen untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abb. 18 bis 23 (und im Anhang in den Tab. A-7 bis A-24) dargestellt.

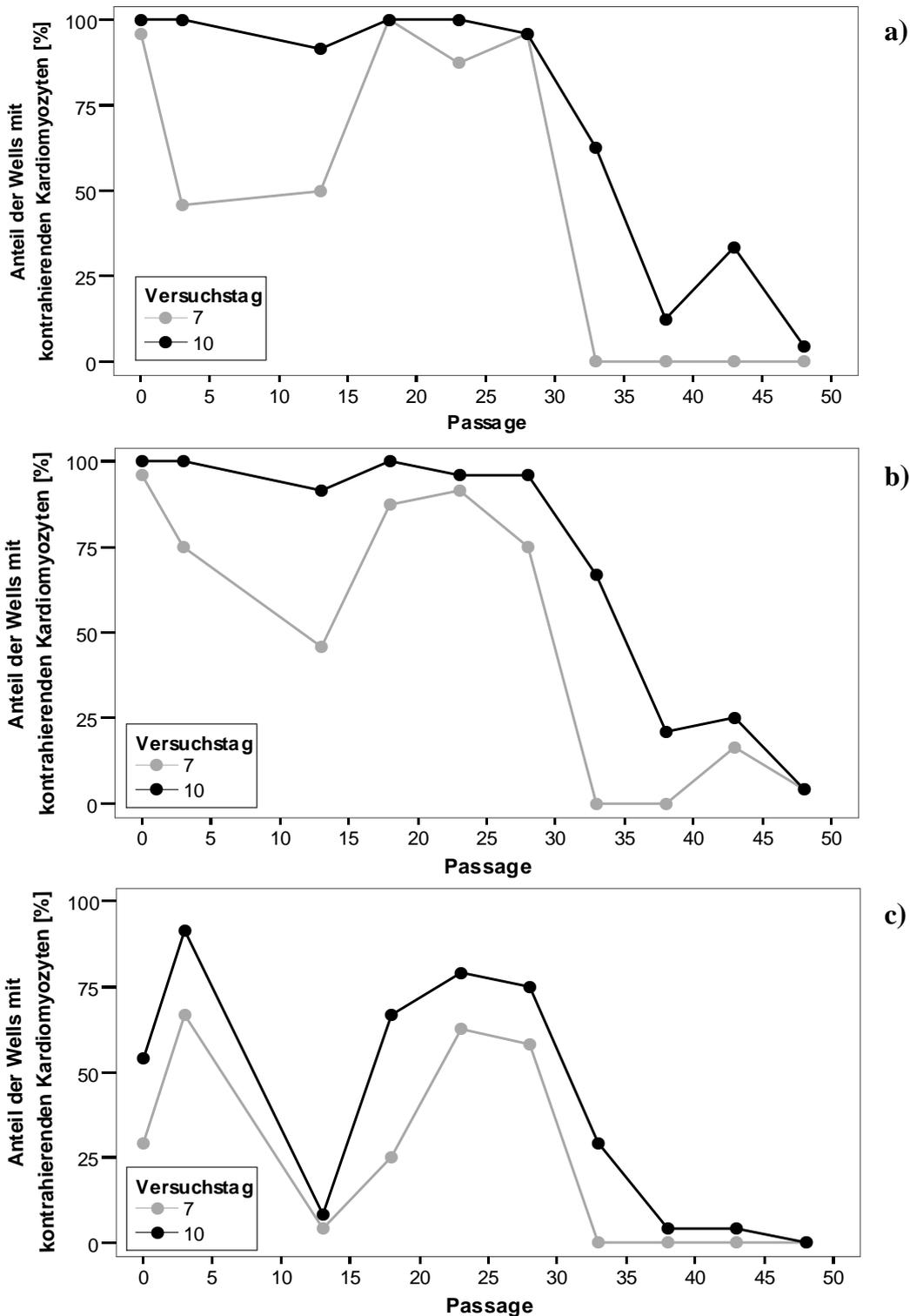
Bei allen Ansätzen waren an Versuchstag 7 teilweise schon Kontraktionen von zu Kardiomyozyten differenzierten Zellen zu erkennen. Allerdings ließ sich weder bei den unbehandelten Kontrollen noch bei den Penicillin- bzw. Fluorouracil-Kontrollen eine Korrelation zu den an Tag 10 erhobenen Daten erkennen. Die an Versuchstag 7 bestimmten Anteile der Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten ließen keine Rückschlüsse auf die Ergebnisse am Versuchstag 10 zu.



**Abb. 17: Auswertung der Differenzierungstests der Hauptstudie**

Im Rahmen der Hauptstudie durchgeführte Differenzierungstests der unbehandelten Kontrollen. Anteile der Wells jeweils einer 24-Well-Zellkulturplatte mit kontrahierenden Kardiomyozyten nach morphologischer Auswertung der Ansätze A-F am Versuchstag 10 (n=24).

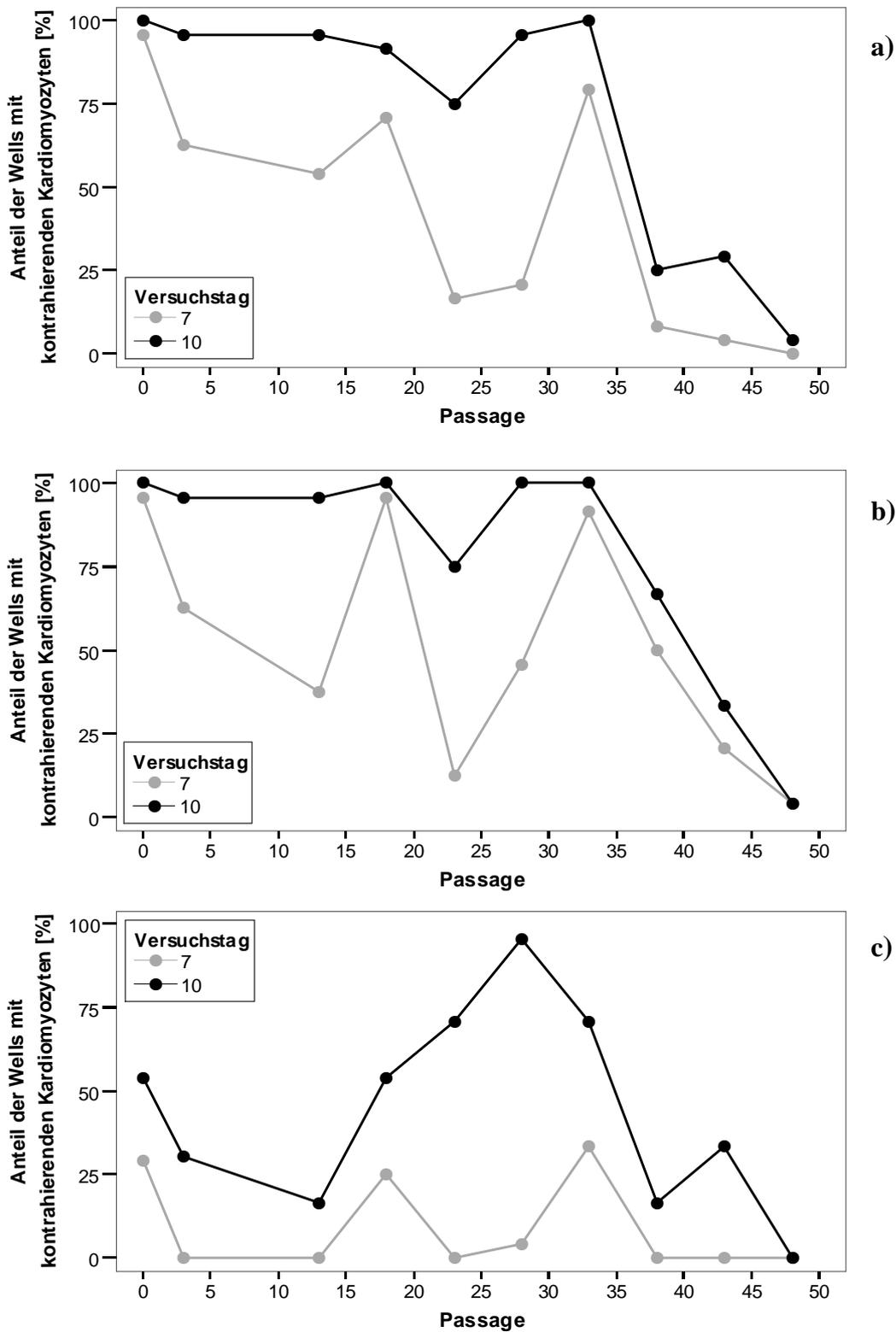
LIF: Leukemia Inhibitory Factor; OsM: Oncostatin M; Pos. K.: Positivkontrolle (Ansatz D); Feeder: *Feeder Layer* (Ansatz E); Feeder + LIF: *Feeder Layer* und 1000 U/ml LIF (Ansatz F).



**Abb. 18: Ergebnisse der Differenzierungstests von Ansatz A (1000 U/ml LIF)**

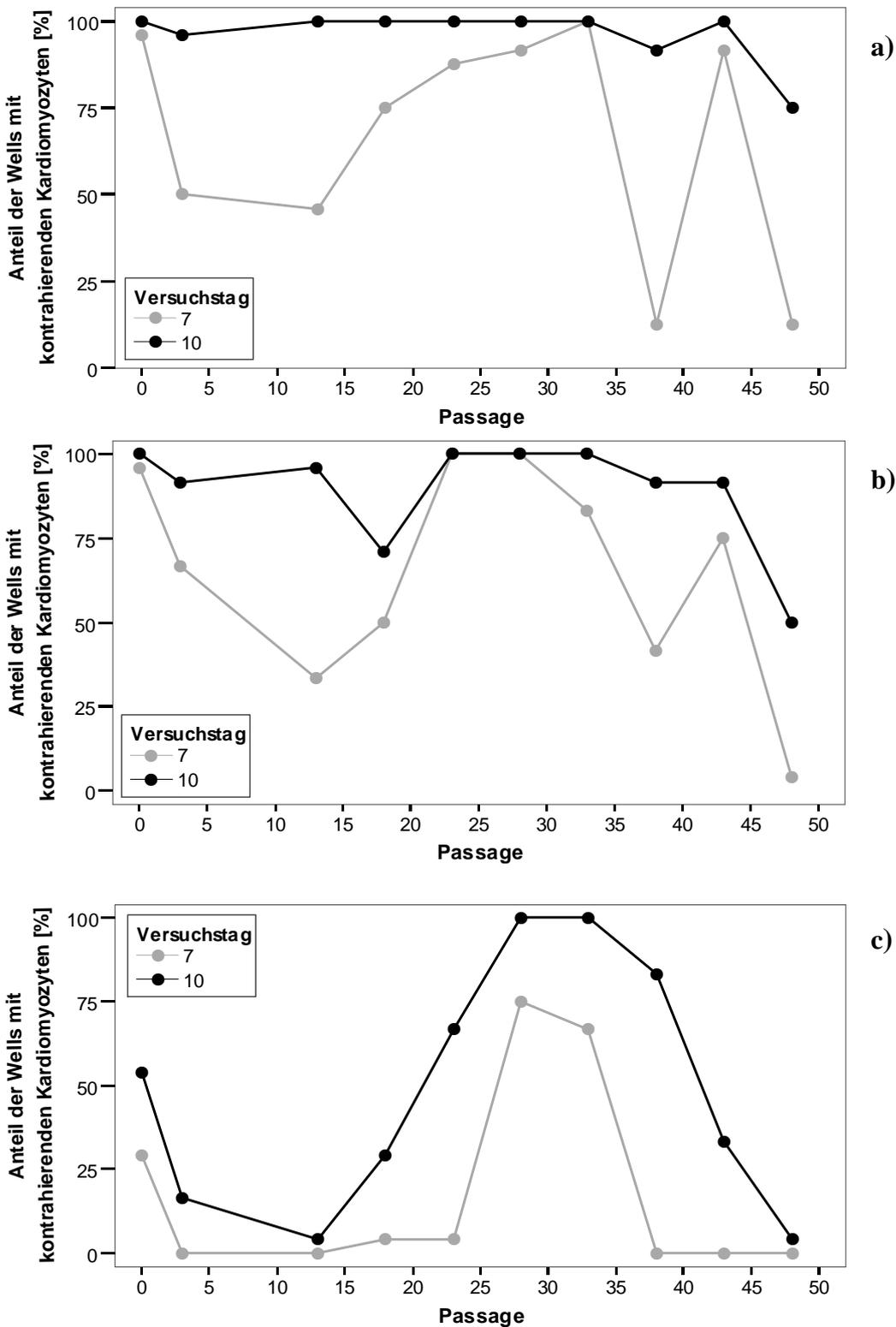
Ergebnisse der im Rahmen der Hauptstudie durchgeführten Differenzierungstests nach morphologischer Auswertung der 24-Well-Zellkulturplatte an Versuchstag 7 und 10 (n=24).

a) Unbehandelte Kontrolle; b) Penicillin G (1000 µg/ml); c) Fluorouracil (0,025 µg/ml).



**Abb. 19: Ergebnisse der Differenzierungstests von Ansatz B (2000 U/ml LIF)**

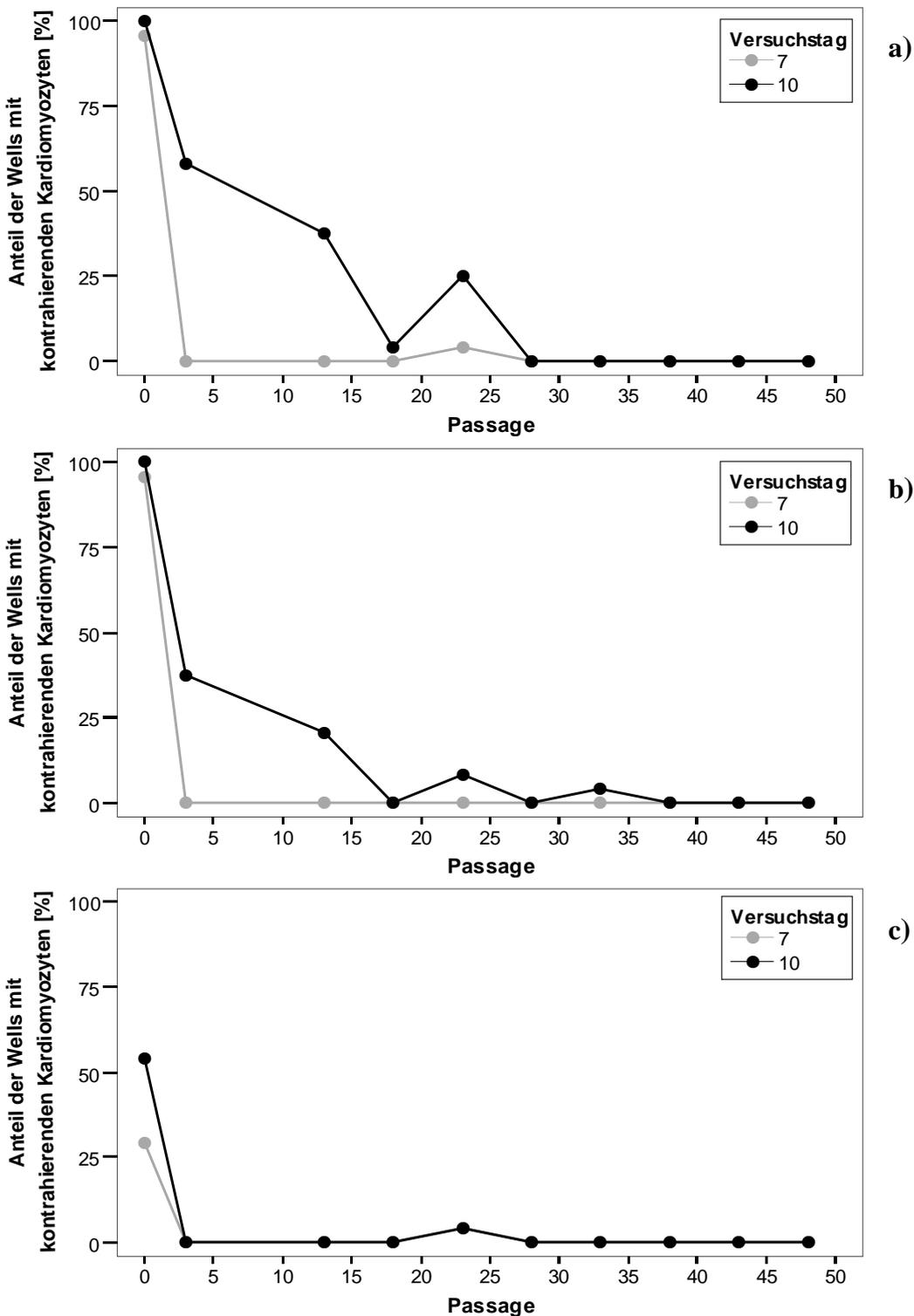
Ergebnisse der im Rahmen der Hauptstudie durchgeführten Differenzierungstests nach morphologischer Auswertung der 24-Well-Zellkulturplatte an Versuchstag 7 und 10 (n=24).  
 a) Unbehandelte Kontrolle; b) Penicillin G (1000 µg/ml); c) Fluorouracil (0,025 µg/ml).



**Abb. 20: Ergebnisse der Differenzierungstests von Ansatz C (20 ng/ml Oncostatin M)**

Ergebnisse der im Rahmen der Hauptstudie durchgeführten Differenzierungstests nach morphologischer Auswertung der 24-Well-Zellkulturplatte an Versuchstag 7 und 10 (n=24).

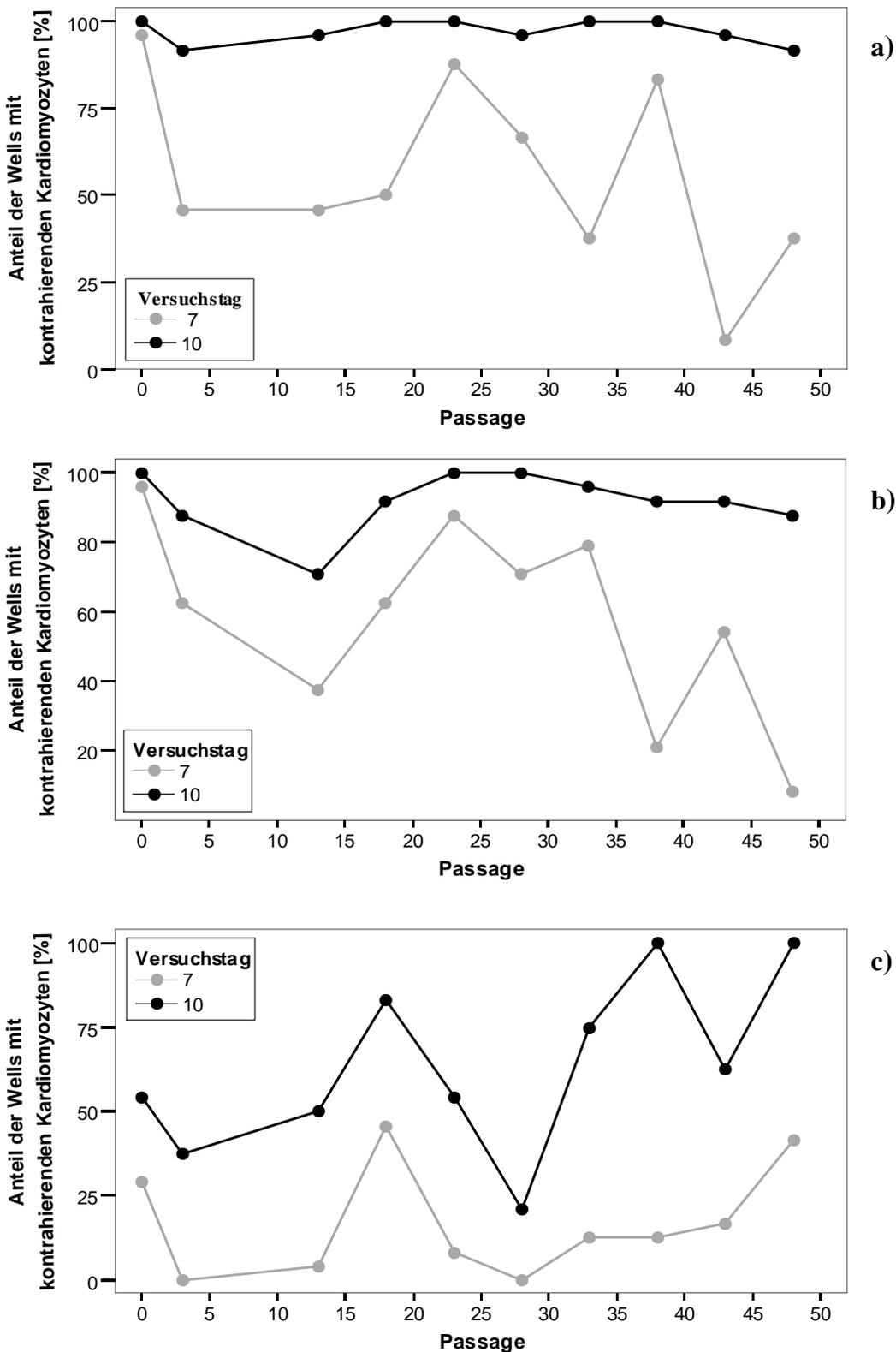
a) Unbehandelte Kontrolle; b) Penicillin G (1000 µg/ml); c) Fluorouracil (0,025 µg/ml).



**Abb. 21: Ergebnisse der Differenzierungstests von Ansatz D (Positivkontrolle)**

Ergebnisse der im Rahmen der Hauptstudie durchgeführten Differenzierungstests nach morphologischer Auswertung der 24-Well-Zellkulturplatte an Versuchstag 7 und 10 (n=24).

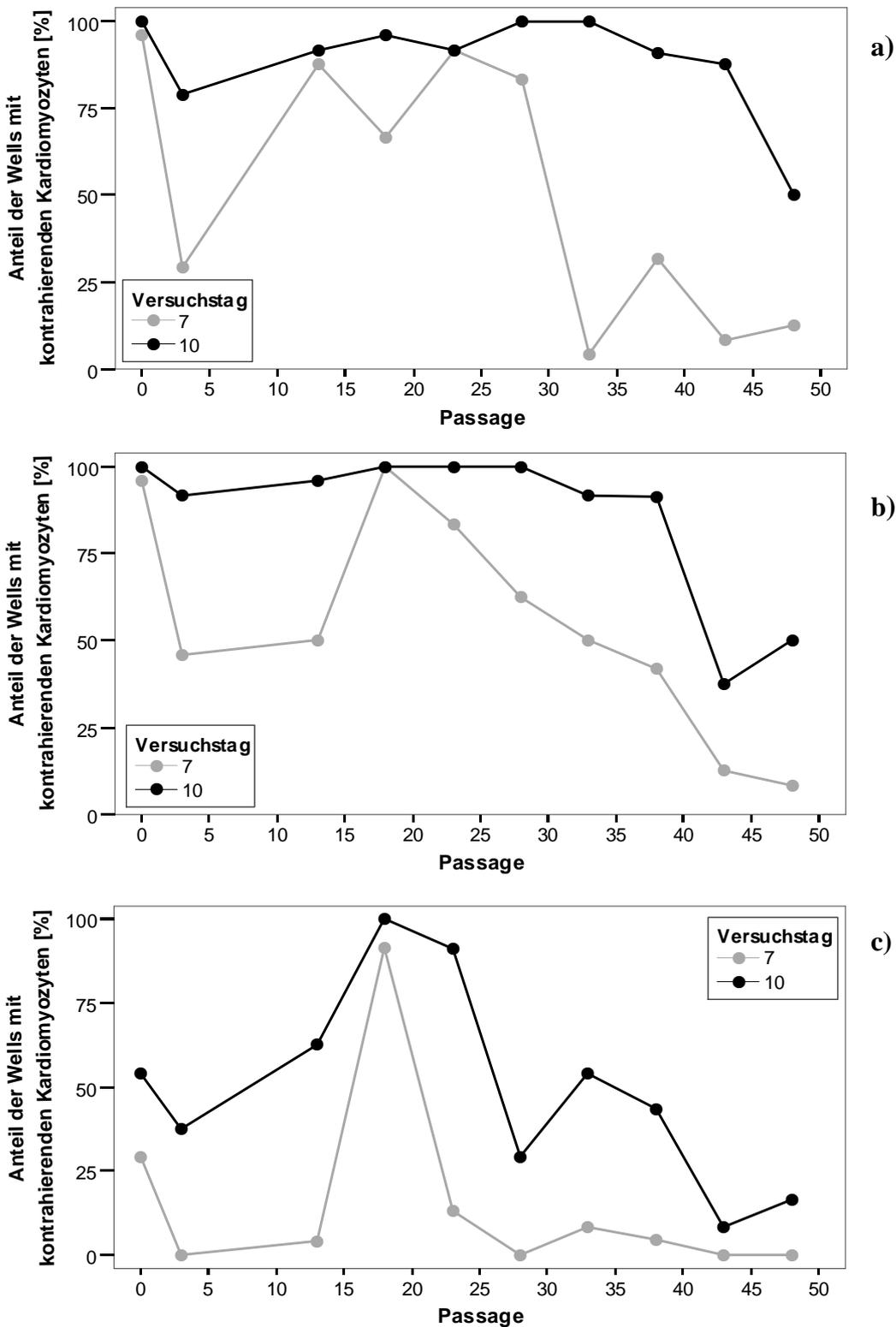
a) Unbehandelte Kontrolle; b) Penicillin G (1000 µg/ml); c) Fluorouracil (0,025 µg/ml).



**Abb. 22: Ergebnisse der Differenzierungstests von Ansatz E (Feeder Layer)**

Ergebnisse der im Rahmen der Hauptstudie durchgeführten Differenzierungstests nach morphologischer Auswertung der 24-Well-Zellkulturplatte an Versuchstag 7 und 10 (n=24).

a) Unbehandelte Kontrolle; b) Penicillin G (1000 µg/ml); c) Fluorouracil (0,025 µg/ml).



**Abb. 23: Ergebnisse der Differenzierungstests von Ansatz F (*Feeder Layer* + LIF)**

Ergebnisse der im Rahmen der Hauptstudie durchgeführten Differenzierungstests nach morphologischer Auswertung der 24-Well-Zellkulturplatte an Versuchstag 7 und 10 (n=24).

a) Unbehandelte Kontrolle; b) Penicillin G (1000 µg/ml); c) Fluorouracil (0,025 µg/ml).

### 3.3.4 Durchflusszytometrische Untersuchungen

#### 3.3.4.1 Untersuchung der ES Zellen auf die Expression von SSEA-1

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Stammzellen auf die Expression des Oberflächenantigens SSEA-1 wurden die Zellen mit dem FITC-gekoppelten Antikörper Anti-SSEA-1 (MC-480) inkubiert und im FACScan (Becton Dickinson) analysiert.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen mit Bestimmung des SSEA-1-positiven Anteils in der untersuchten Zellpopulation erfolgte jeweils im Vergleich zu den ungefärbten Zellen des gleichen Ansatzes (Negativkontrollen) mit Hilfe der WinList®-Software. Die im Folgenden dargestellten Diagramme (Abb. 24a und b) wurden unter Verwendung der mittleren Werte (%-Angaben) erstellt. Diese Darstellung in zwei Diagrammen und die Verbindungslinien zwischen den Werten eines Ansatzes dienen der Übersichtlichkeit.

In Voruntersuchungen wurden ES Zellen, die über 12 – 34 Passagen mit 1000 U/ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF) kultiviert worden waren, durchflusszytometrisch auf ihre SSEA-1-Expression untersucht. Die Anteile der SSEA-1-positiven ES Zellen lagen dabei in Bereichen zwischen 90 % und 98 %, eine Abhängigkeit des Anteils der SSEA-1-positiven Zellen in der Population von der Passagezahl konnte nicht beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Bei den im Rahmen der Hauptstudie durchgeführten Untersuchungen lag der Anteil der SSEA-1 positiven Zellen an der Zellpopulation anfangs bei 95 % (Passage 0 der Versuchsreihe).

Nach 2 Passagierungen waren von den Zellen der Positivkontrolle (Ansatz D, kultiviert ohne Differenzierungshemmung) nur noch ca. 78 % SSEA-1-positiv. Nach einem leichten Anstieg auf ca. 80 % bei Passage 7 und 12 fiel der Anteil der SSEA-1-positiven Zellen mit zunehmender Passagezahl bis auf ca. 4 % bei Passage 47 (Abb. 24b).

Bei den Zellen der Ansätze A (1000 U/ml LIF) und B (2000 U/ml LIF) blieb der Anteil der SSEA-1 positiven Zellen bis zur 12. Passage bei mindestens 90 % (Abb. 24a). Mit steigender Passagezahl nahm dann der Anteil der positiven ES Zellen des Ansatzes B ab. Ab der 27. Passage lag er nur noch bei 42 - 45 %. Die Auswertung des Ansatzes A zeigte ein Absinken

des Anteils der SSEA-1 positiven Zellen auf ca. 85 % bei Passage 17 und ab Passage 32 einen weiteren Abfall bis auf ca. 28 % bei Passage 47.

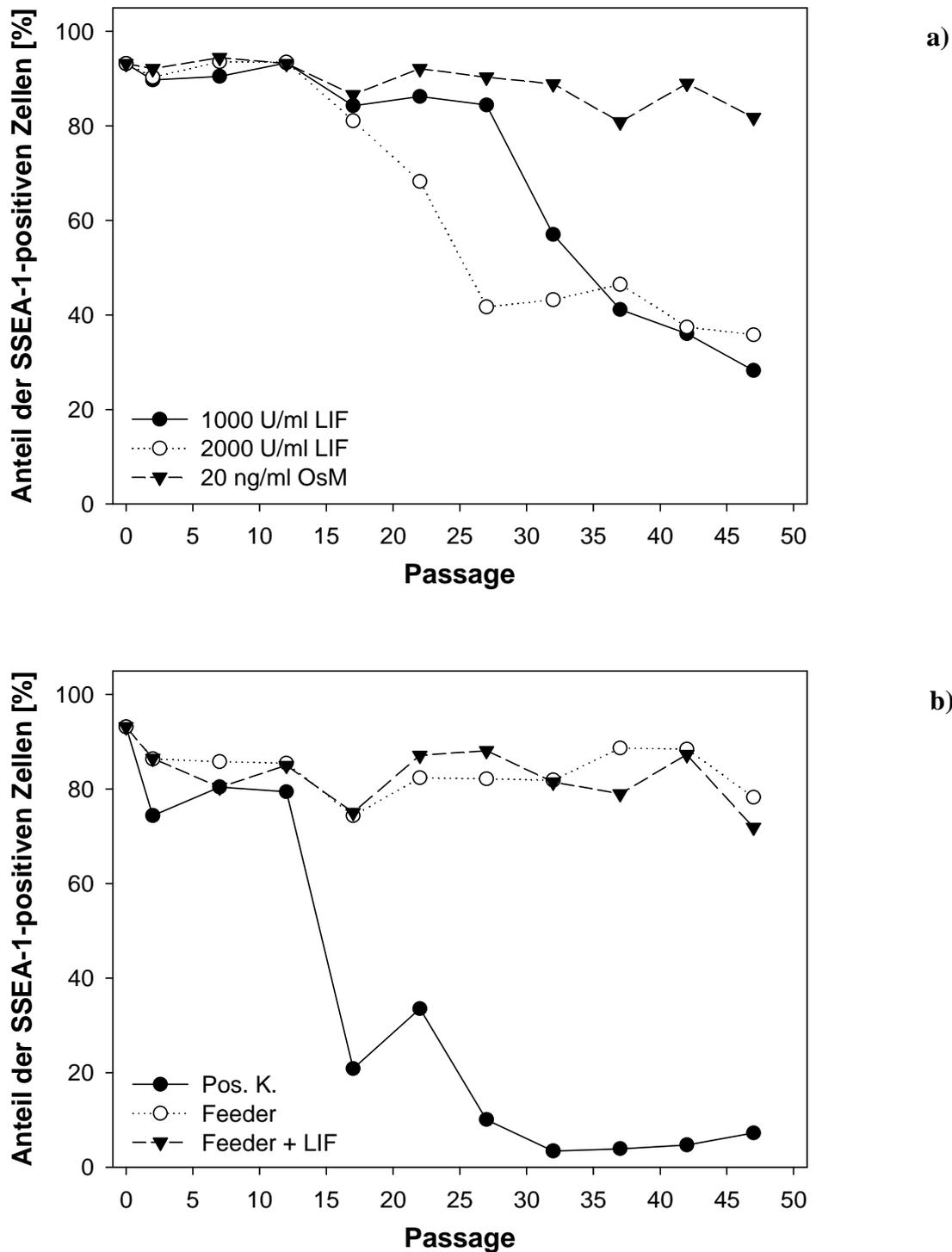
Die mit Oncostatin M kultivierte Zellpopulation wies über den gesamten Auswertungszeitraum Anteile von SSEA-1 positiven Zellen in Bereichen zwischen 80 % und 94 % auf (Abb. 24a).

Bei den auf *Feeder Layer* kultivierten ES Zellen lagen die Anteile der SSEA-1-positiven Zellen bis zur 42. Passage in Bereichen von ca. 80 – 90 % (Abb. 24b).

Ausnahmsweise lagen bei der Auswertung der Passage 17 die Anteile der SSEA-1-positiven Zellen bei etwa 75 % und damit etwas niedriger als in den darauf folgenden Auswertungen. Bei der Auswertung der Passage 47 waren von den ES Zellen, die ohne LIF auf *Feeder Layer* kultiviert wurden (Ansatz E), etwa 80 % SSEA-1-positiv, während bei den mit LIF kultivierten Zellen des Ansatzes F der Anteil der positiven Zellen bei etwa 70 % lag.

Die statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse auf SSEA-1 wurde mit den absoluten Werten mittels  $\chi^2$ -Test nach Pearson durchgeführt. Dabei wurden die zu den verschiedenen Auswertungszeitpunkten (Passagen) gemessenen SSEA-1-positiven Zellen jedes Ansatzes (A-F) mit den bei Passage 0 gemessenen Zahlen verglichen.

Die beobachteten Anteile der SSEA-1-positiven Zellen waren bei allen Ansätzen (A-F) zu allen Auswertungszeitpunkten statistisch signifikant geringer bzw. höher als die Anteile bei Passage 0 der Hauptstudie.



**Abb. 24: Durchflusszytometrische Untersuchungen der ES Zellen auf die Expression von SSEA-1**

Prozentualer Anteil der SSEA-1-positiven Zellen an den Zellpopulationen der Ansätze A - F nach Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Anti-SSEA-1.

LIF: Leukemia Inhibitory Factor; OsM: Oncostatin M; Pos. K.: Positivkontrolle (Ansatz D); Feeder: *Feeder Layer* (Ansatz E); Feeder + LIF: *Feeder Layer* und 1000 U/ml LIF (Ansatz F).

### 3.3.4.2 Untersuchung der ES Zellen auf Alkalische Phosphatase-Aktivität

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der ES Zellen auf ihre Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) wurden diese mit einer Substratlösung (Alkaline Phosphatase Substrate Kit, Vector) inkubiert. Die Umwandlung des Substrats in ein rot-fluoreszierendes Reaktionsprodukt durch die Alkalische Phosphatase der Zellen soll zu einer der AP-Aktivität entsprechenden Rotfärbung der Zellen führen. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung erfolgte im Vergleich zu den ungefärbten Zellen der Negativkontrollen des entsprechenden Ansatzes mit Hilfe der WinList®-Software. Die im Folgenden dargestellten Diagramme (Abb. 25a und b) wurden unter Verwendung der mittleren Werte (%-Angaben) erstellt. Diese Darstellung in zwei Diagrammen und die Verbindungslinien zwischen den Werten eines Ansatzes dienen der Übersichtlichkeit.

In mehreren Vorversuchen wurden embryonale Stammzellen, die über den Kulturzeitraum von 24-28 Passagen mit 1000 U/ml LIF zur Hemmung der Differenzierung kultiviert worden waren, auf ihre AP-Aktivität untersucht. Die FACScan-Analysen ergaben dabei Anteile von 83 - 98 % AP-positiven Zellen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Der Anteil der AP-positiven Zellen der im Rahmen der Hauptstudie untersuchten Stammzellen lag bei der Auswertung der Passage 0 bei 98,8 %.

In der Positivkontrolle nahmen die Anteile der AP-positiven Zellen bis zur 36. Passage ab auf ca. 40 %, in den darauf folgenden Auswertungen lagen die Anteile jedoch in Bereichen von 58 – 70 % (Abb. 25b).

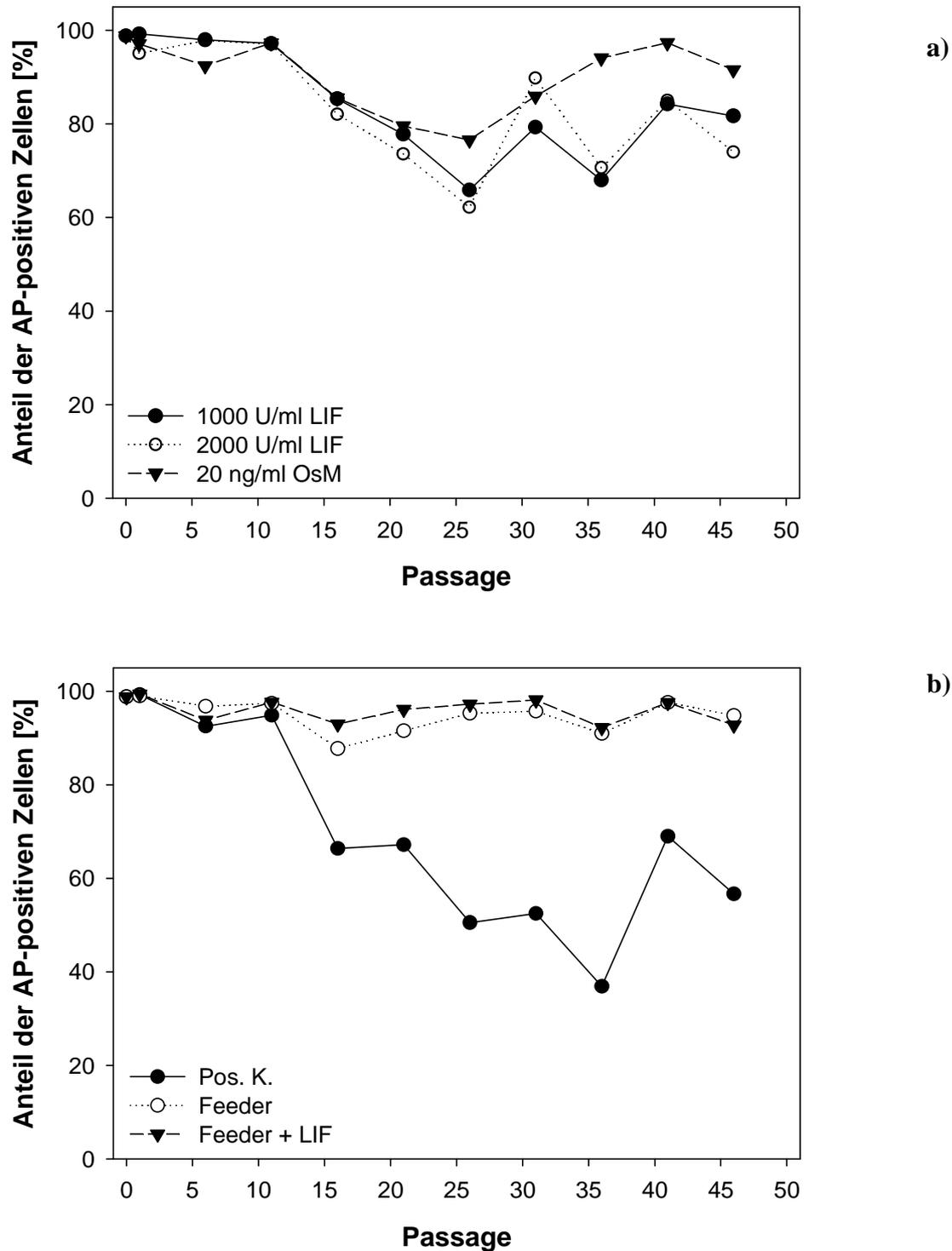
Bei den mit LIF kultivierten Zellen zeigte sich eine Abnahme des Anteils der AP-positiven Zellen auf 68 % (1000 U/ml LIF) bzw. 63 % (2000 U/ml LIF) nach 26 Passagen. Die Auswertungen der folgenden Passagen ergaben Anteile von 69 – 89 % AP-positiver Zellen (Abb. 25a).

Der AP-positive Anteil der mit Oncostatin M kultivierten Zellen nahm bis zur 26. Passage auf ca. 76 % ab, stieg bei den folgenden Passagen jedoch wieder auf 87 – 97 % an (Abb. 25a).

Bei den auf *Feeder Layer* kultivierten Zellen lagen die Anteile der AP-positiven Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum in Bereichen von 91 – 97 % (Abb. 25b).

Die statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse auf SSEA-1 wurde mit den absoluten Werten mittels  $\chi^2$ -Test nach Pearson durchgeführt. Dabei wurden die zu den verschiedenen Auswertungszeitpunkten (Passagen) gemessenen AP-positiven Zellen jedes Ansatzes (A-F) mit den bei Passage 0 gemessenen Zahlen verglichen.

Die beobachteten Anteile der SSEA-1-positiven Zellen waren bei allen Ansätzen (A-F) zu allen Auswertungszeitpunkten statistisch signifikant geringer als bei Passage 0.



**Abb. 25: Durchflusszytometrische Untersuchungen der ES Zellen auf Alkalische Phosphatase-Aktivität**

Prozentualer Anteil der Alkalische Phosphatase (AP)-positiven Zellen an den Zellpopulationen der Ansätze A - F;

LIF: Leukemia Inhibitory Factor; OsM: Oncostatin M; Pos. K.: Positivkontrolle (Ansatz D); Feeder: *Feeder Layer* (Ansatz E); Feeder + LIF: *Feeder Layer* und 1000 U/ml LIF (Ansatz F).

### 3.3.5 Enzym-Aktivitätstest auf Alkalische Phosphatase-Aktivität

Das Prinzip dieses Enzym-Aktivitätstests beruht auf der Umwandlung eines farblosen Substrats (Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate for ELISA, Sigma) durch die Alkalische Phosphatase (AP) der Zellen in gelbes p-Nitrophenol. Die Messungen der optischen Dichten des gelben Reaktionsproduktes erfolgten im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm. Für die hier dargestellten Ergebnisse wurden die mittleren Werte (Median) der nach Ablauf von 15 Minuten erreichten optischen Dichten (OD) herangezogen. Die Darstellung in zwei Diagrammen (Abb. 26a und b) und die Verbindungslinien zwischen den Werten eines Ansatzes dienen der Übersichtlichkeit. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

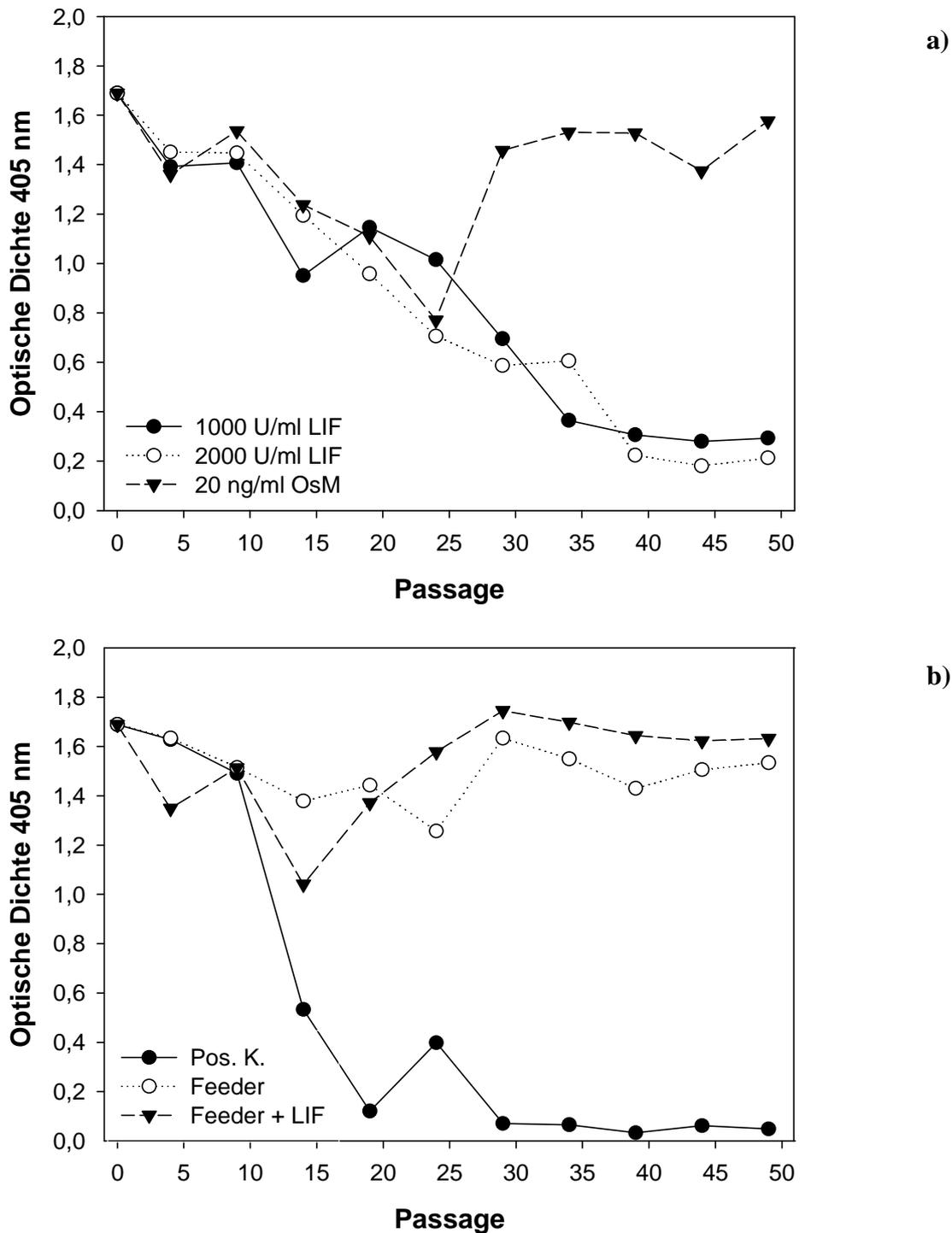
In Voruntersuchungen wurden Stammzellen, die über mehrere Passagen (15 - 26 Passagen) mit 1000 U/ml LIF kultiviert worden waren, auf ihre AP-Aktivität untersucht. Dabei lagen die nach 15 min gemessenen optischen Dichten in Bereichen von 0,8 bis 1,6. Eine Abhängigkeit der AP-Aktivität von der Passagezahl konnte dabei nicht festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

In der Hauptstudie fiel die optische Dichte von ursprünglich ca. 1,7 bei Passage 0 bei den Zellen der Positivkontrolle bis zur 14. Passage auf Werte von ca. 0,45. Ab der 29. Passage lag die OD dieses Ansatzes bei ca. 0,07 (Abb. 26b).

Die mit LIF kultivierten ES Zellen der Ansätze A (1000 U/ml LIF) und B (2000 U/ml LIF) zeigten über den Untersuchungszeitraum eine (kontinuierliche) Abnahme der alkalischen Phosphatase-Aktivitäten bis zu OD-Werten von 0,3 (Ansatz A) bzw. 0,2 (Ansatz B) bei Passage 49 (Abb. 26a).

Die unter Supplementierung des Kulturmediums mit 20 ng/ml Oncostatin M kultivierten Zellen des Ansatzes C zeigten nach einem Abfall der optischen Dichte bis zur Passage 24 auf einen Wert von ca. 0,8 in den darauf folgenden Auswertungen wieder OD-Werte von mindestens 1,3 (Abb. 26a).

Die auf *Feeder Layer* kultivierten Zellen zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum optische Dichten zwischen 1,2 und 1,7. Eine Ausnahme stellt die Passage 14 der mit LIF auf *Feeder Layer* kultivierten Zellen des Ansatzes F dar, hier lag die optische Dichte nur bei ca. 1,0 (Abb. 26b).



**Abb. 26: Untersuchung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität von ES Zellen mittels Enzym-Aktivitätstest**

Photometrisch bestimmte Alkalische Phosphatase-Aktivität der Zellen nach 15-minütiger Inkubation mit Substratlösung (Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate for ELISA, Sigma); LIF: Leukemia Inhibitory Factor; OsM: Oncostatin M; Pos. K.: Positivkontrolle; Feeder: *Feeder Layer*.

### 3.3.6 Immunzytochemische und zytochemische Untersuchungen

#### 3.3.6.1 Immunzytochemische Färbung der ES Zellen gegen SSEA-1

Nach Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-SSEA-1 (MC 480) und einem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper wurden die auf Culture Slides fixierten ES Zellen mithilfe des Photomikroskops (Axiophot) unter Verwendung der Fluoreszenzeinrichtung untersucht. Zusätzlich erfolgte eine lichtmikroskopische Untersuchung der Zellen. Durch den Vergleich der mit dem Fluoreszenzmikroskop und mit dem Lichtmikroskop aufgenommenen Fotos der gleichen Bildausschnitte sollte eine Beurteilung des „Verhältnisses von gefärbten zu ungefärbten Zellen“ erfolgen.

#### Voruntersuchungen

Embryonale Stammzellen der Zelllinie D3, die nach dem Auftauen über einige Passagen permanent in Kulturmedium mit LIF (Leukemia Inhibitory Factor) kultiviert worden waren, zeigten nach Markierung des Oberflächenantigens SSEA-1 bei der Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop eine deutliche grüne Fluoreszenz.

Um die Spezifität des primären Antikörpers gegenüber SSEA-1 zu überprüfen, wurden Fibroblasten als Negativkontrolle eingesetzt, da diese kein SSEA-1 auf ihrer Oberfläche tragen. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte keine Immunreaktion bei den Fibroblasten (Abb. 27B). Eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers konnte daher ausgeschlossen werden. Durch weitere Untersuchungen, bei denen die Stammzellen nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden, konnte auch eine unspezifische Bindung dieses Antikörpers ausgeschlossen werden (Abb. 27A).

In weiteren Voruntersuchungen wurden vergleichend sowohl mit 1000 U/ml LIF kultivierte Stammzellen als auch ES Zellen, die über einige Passagen ohne Hemmung der Differenzierung kultiviert worden waren, auf die Expression von SSEA-1 untersucht. Dabei war subjektiv ein Unterschied zwischen den Zellpopulationen der beiden Ansätze erkennbar. Bei den mit LIF kultivierten Zellen blieb über den Untersuchungszeitraum von 3 Passagen das Verhältnis von gefärbten Zellen zu ungefärbten Zellen konstant, es waren nahezu alle in dem Bildausschnitt vorhandenen Zellen markiert. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die ohne Differenzierungshemmung kultiviert worden waren, mit zunehmender Passagezahl eine Verschiebung des Verhältnisses von markierten zu unmarkierten Zellen. Außerdem wurden

bei diesem Ansatz auch morphologische Veränderungen der Zellen (groß, fibroblastenartig) deutlich (Ergebnisse nicht dargestellt).

### Hauptstudie

Bei der Passage 0 der Versuchsreihe zeigten nahezu alle untersuchten Zellen eine deutliche grüne Fluoreszenz. Im lichtmikroskopischen Bild waren nur vereinzelt fibroblastenartige Zellen erkennbar, der Großteil der Zellen zeigte die typische Morphologie von undifferenzierten Stammzellen (Abb. 27C).

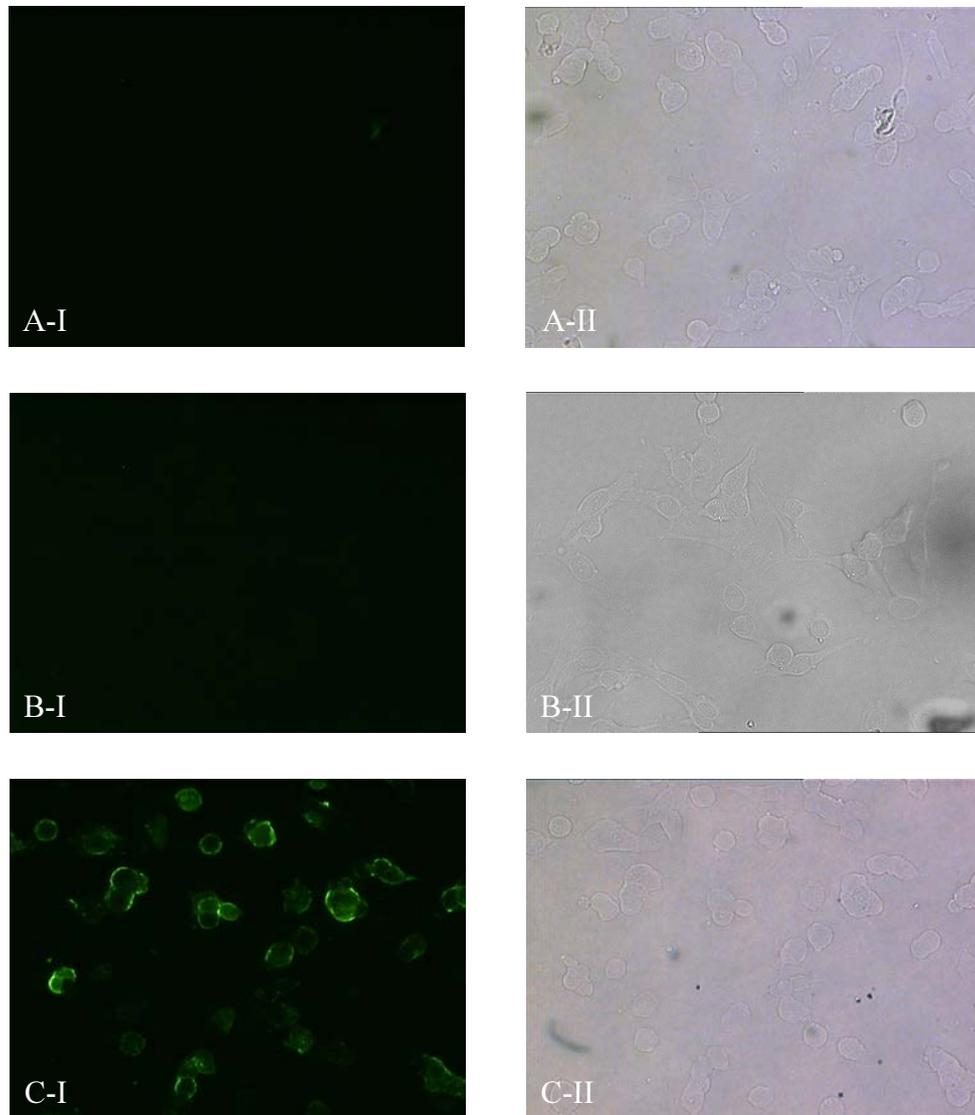
Im Verlauf der Hauptstudie war bei den Zellen der Positivkontrolle (Ansatz D) mit zunehmender Passagezahl eine Verschiebung des Verhältnisses von markierten zu unmarkierten Zellen erkennbar. Über den Zeitraum von Passage 0 bis Passage 16 nahm subjektiv der Anteil der unmarkierten Zellen zu. Diese unmarkierten Zellen stellten sich bei der lichtmikroskopischen Untersuchung meist als große, fibroblastenartige Zellen dar (Abb. 28B).

Auch bei der software-gestützten Auswertung der Fotos war bei den Zellen der Positivkontrolle eine relative Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit erkennbar (Abb. 29). Allerdings zeigt das Diagramm die großen Schwankungen der Werte für die Fluoreszenz. Aufgrund der sehr zeitintensiven Auswertungsmethode dieser Färbungen wurden jeweils nur drei repräsentative Fotos einer Passage ausgewertet. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

Im Gegensatz zur Positivkontrolle war der Großteil der Zellen, die mit den verschiedenen Methoden zur Hemmung der Differenzierung kultiviert worden waren (Ansätze A, B, C, E und F), auch mit steigender Passagezahl SSEA-1-positiv markiert. Bei der Betrachtung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ließ sich bis zur Passage 16 subjektiv keine Abnahme der Fluoreszenz erkennen. Bis zu dieser Passage war zudem bei der lichtmikroskopischen Untersuchung kein Anstieg des Anteils fibroblastenartiger Zellen erkennbar (Abb. 28A). Auch bei dem Vergleich der unter fluoreszenzmikroskopischen und unter lichtmikroskopischen Bedingungen aufgenommenen Bilder der Zellen war keine Abnahme des Anteils der markierten Zellen zu beobachten. Allerdings war die Intensität der Färbungen/der Fluoreszenz je nach Passage sehr unterschiedlich stark. Auch bei der

computergestützten Auswertung der Fotos dieser Ansätze wurden große Schwankungen der Werte für die „Fluoreszenz“ deutlich (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die immunzytochemische Färbung der Zellen gegen SSEA-1 wurde nach der 16. Passage der Hauptstudie nicht weiter durchgeführt.



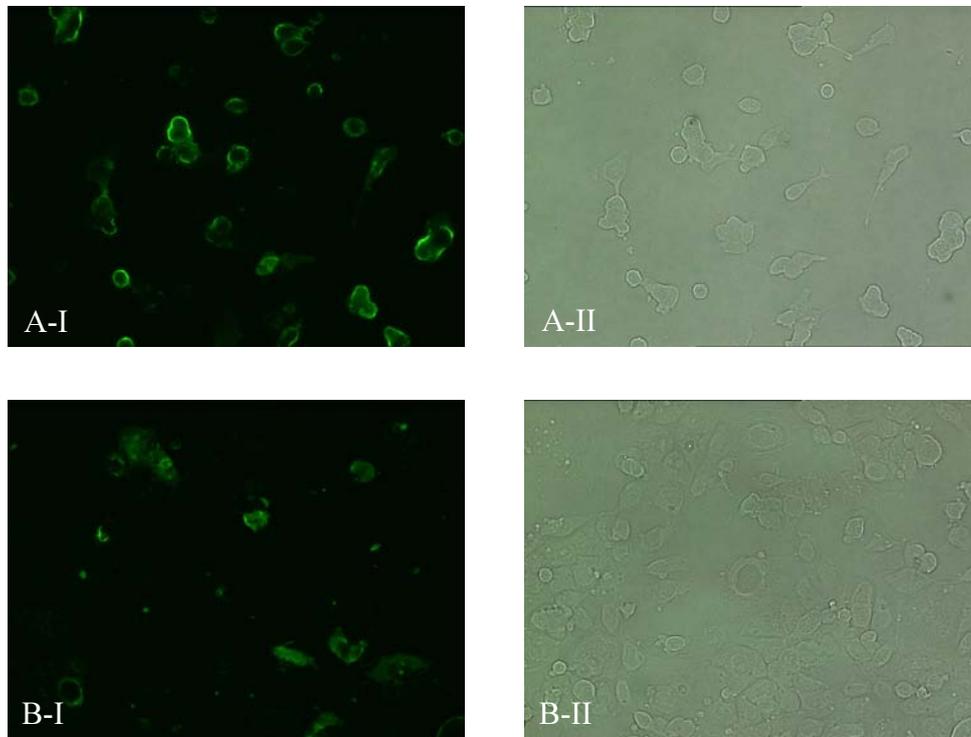
**Abb. 27: Immunzytochemische Färbung der Zellen gegen SSEA-1**

A: ES Zellen (Negativkontrolle, Inkubation nur mit dem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper)

B: Fibroblasten (Negativkontrolle, nach immunzytochemischer Färbung gegen SSEA-1)

C: ES Zellen der Passage 0 der Hauptstudie nach immunzytochemischer Färbung gegen SSEA-1

Die mit I bezeichneten Fotos zeigen die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, die mit II bezeichneten Fotos die lichtmikroskopische Aufnahme des Bildausschnitts A, B bzw. C (Vergrößerung x 88,5).



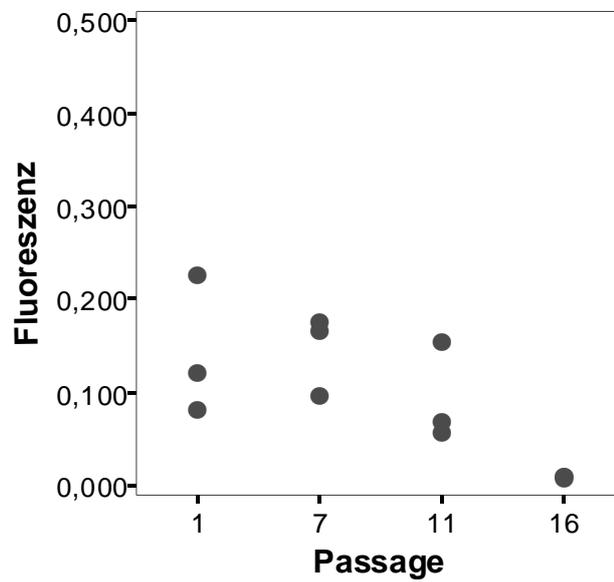
**Abb. 28: Immunzytochemische Färbung der Zellen gegen SSEA-1**

(Inkubation mit Anti-SSEA-1 und FITC-gekoppeltem sekundärem Antikörper) nach Passage 16 der Hauptstudie

A: 1000 U/ml Leukemia Inhibitory Factor (Ansatz A)

B: Positivkontrolle (Ansatz D, ohne Differenzierungshemmung kultiviert)

Die mit I bezeichneten Fotos zeigen die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, die mit II bezeichneten Fotos die lichtmikroskopische Aufnahme des Bildausschnitts A bzw. B (Vergrößerung x 88,5).



**Abb. 29: Auswertung der Zellen der Positivkontrolle nach immunzytochemischer Färbung gegen SSEA-1**

Ergebnis der Software-gestützten Auswertung der immunzytochemischen Färbungen der Zellen der Positivkontrolle gegen SSEA-1 (n=3).

### **3.3.6.2 Zytochemische Untersuchung der ES Zellen auf Alkalische Phosphatase-Aktivität**

Die zytochemische Untersuchung der Zellen auf ihre Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) wurde nach Inkubation mit einer Substratlösung (Alkaline Phosphatase Substrate Kit, Vector) durchgeführt. Die infolge der Enzymreaktion auftretende Rotfärbung der Zellen ist sowohl unter lichtmikroskopischen als auch unter fluoreszenzmikroskopischen Bedingungen sichtbar.

#### **Vorversuche**

Embryonale Stammzellen der Zelllinie D3, die nach dem Auftauen über einige Passagen permanent in Kulturmedium mit LIF kultiviert worden waren, zeigten nach Inkubation mit der oben genannten Substratlösung eine deutliche Rotfärbung der Zellen. Diese Zellen waren bei der Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop als rot-fluoreszierende Zellen erkennbar. Die zur Kontrolle der Spezifität der Färbung mit der Substratlösung inkubierten Fibroblasten zeigten keine Rotfärbung der Zellen im Lichtmikroskop und keine Fluoreszenz unter Fluoreszenzbedingungen (Abb. 30A).

In weiteren Voruntersuchungen wurden vergleichend sowohl mit 1000 U/ml LIF kultivierte Stammzellen als auch ES Zellen, die über einige Passagen ohne Hemmung der Differenzierung kultiviert worden waren, auf die Alkalische Phosphatase-Aktivität untersucht. Dabei war subjektiv kein Unterschied zwischen den Zellen der beiden Ansätze erkennbar. Über den Untersuchungszeitraum von 3 Passagen blieb das Verhältnis von gefärbten Zellen zu ungefärbten Zellen relativ konstant, es waren nahezu alle in dem Bildausschnitt vorhandenen Zellen gefärbt. Bei der computergestützten Auswertung der Fotos konnten ebenfalls auch mit zunehmender Passagezahl keine Unterschiede in dem Verhältnis von gefärbten zu ungefärbten Zellen innerhalb eines Ansatzes nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

#### **Hauptstudie**

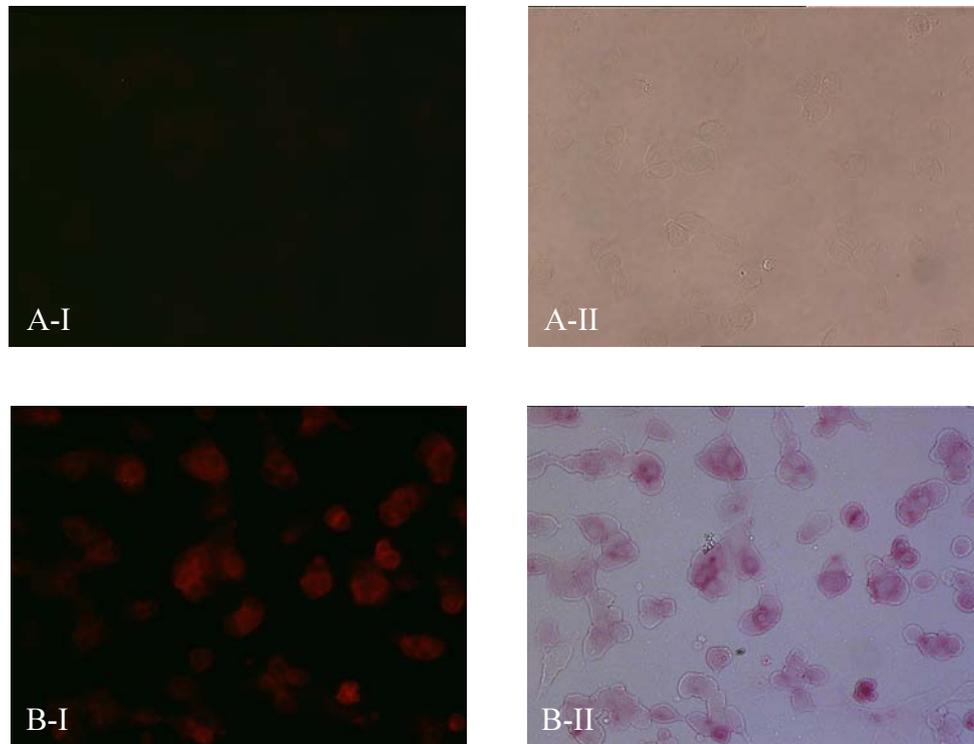
Bei Passage 0 der Hauptstudie zeigten nach der zytochemischen Färbung der ES Zellen nahezu alle untersuchten Zellen eine rote Fluoreszenz. Im lichtmikroskopischen Bild waren nur sehr vereinzelt fibroblastenartige Zellen erkennbar, der Großteil der Zellen zeigte die

typische Morphologie von undifferenzierten Stammzellen (kleine, runde Zellen) und eine deutliche Rotfärbung (Abb. 30B).

Im Verlauf der Hauptstudie traten bei allen Ansätzen extreme Schwankungen in der Intensität der Färbungen zwischen den einzelnen Passagen auf. Bei den unter Differenzierungshemmung kultivierten Zellpopulationen (Ansätze A - C und E - F) waren trotzdem nahezu alle Zellen AP-positiv (Abb. 31A zeigt einen repräsentativen Bildausschnitt der ES Zellen des Ansatzes A nach Passage 16 der Hauptstudie).

Nur bei der Positivkontrolle konnte im Verlauf der Hauptstudie mit zunehmender Passagezahl subjektiv eine Verschiebung des Verhältnisses der gefärbten zu ungefärbten Zellen erkannt werden. Außerdem zeigten die mit dem Lichtmikroskop aufgenommenen Fotos der Zellen der Positivkontrolle den mit steigender Passagezahl zunehmenden Anteil großer, flacher (fibroblastenartiger) Zellen, die keine oder nur eine schwache Rotfärbung aufwiesen. Die bereits bei der morphologischen Untersuchung der Zellen beschriebenen Zellhaufen, die in den Zellkulturflaschen den fibroblastenartigen Zellen aufsaßen, waren nach zytochemischer Färbung AP-positiv (Abb. 31B). Bei der computergestützten Auswertung der Fotos der Positivkontrolle wurden die starken Schwankungen der Färbungen deutlich, die Fluoreszenz nahm bis zur 11. Passage ab, lag aber bei Passage 16 wieder deutlich höher (Abb. 32). Aufgrund der sehr zeitintensiven Auswertungsmethode dieser Färbungen wurden jeweils nur drei repräsentative Fotos einer Passage ausgewertet. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

Die zytochemische Färbung der Zellen wurde ebenfalls nach der 16. Passage der Hauptstudie nicht weiter durchgeführt.



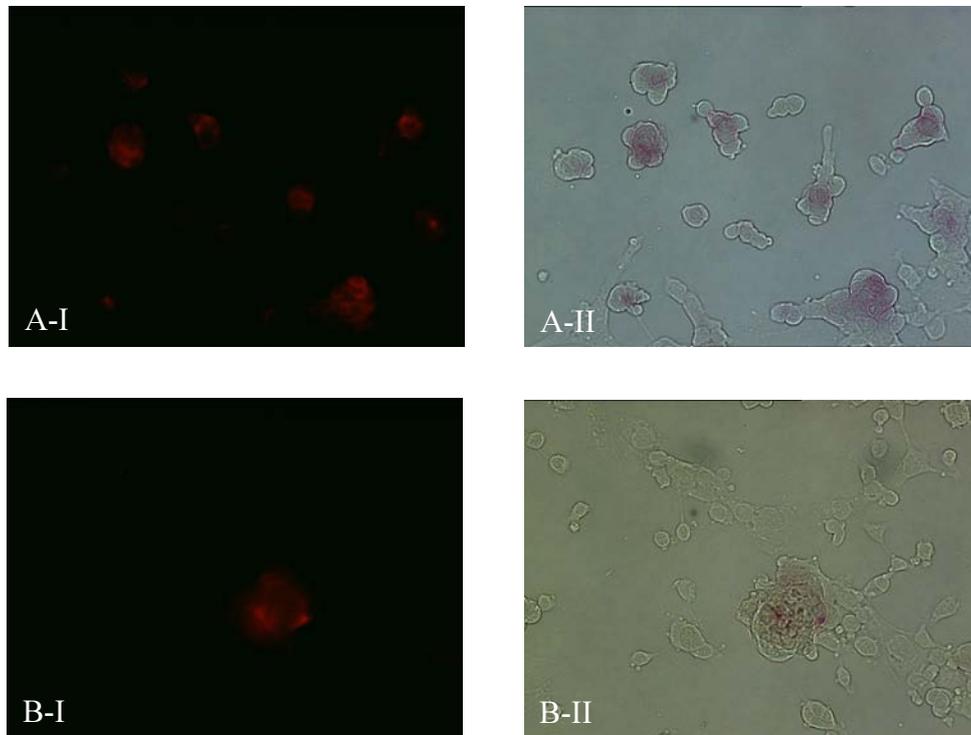
**Abb. 30: Zytochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität**

(Inkubation mit Substratlösung Alkaline Phosphatase Substrate Kit, Vector)

A: Fibroblasten (Negativkontrolle)

B: ES Zellen der Passage 0 der Hauptstudie

Die mit I bezeichneten Fotos zeigen die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, die mit II bezeichneten Fotos die lichtmikroskopische Aufnahme des Bildausschnitts A bzw. B (Vergrößerung x 88,5).



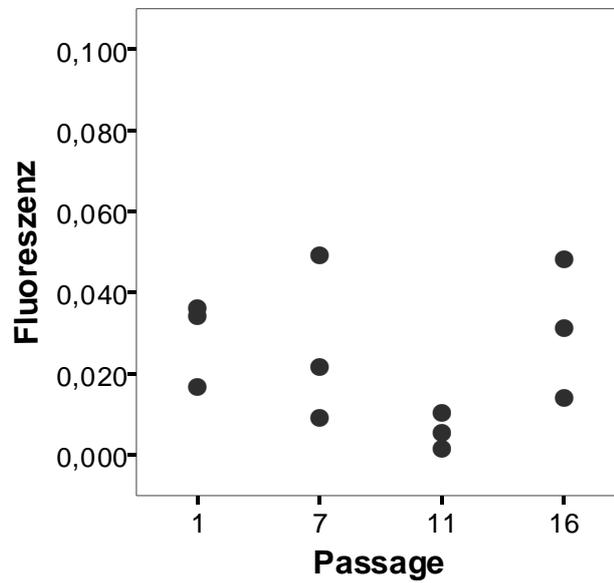
**Abb. 31: Zytochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität**

ES Zellen nach 16 Passagen der Hauptstudie (Inkubation mit Substratlösung Alkaline Phosphatase Substrate Kit, Vector)

A: 1000 U/ml Leukemia Inhibitory Factor (Ansatz A)

B: Positivkontrolle (Ansatz D, ohne Differenzierungshemmung kultiviert)

Die mit I bezeichneten Fotos zeigen die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, die mit II bezeichneten Fotos die lichtmikroskopische Aufnahme jeweils des Bildausschnitts A bzw. B (Vergrößerung x 88,5).



**Abb. 32: Auswertung der Zellen der Positivkontrolle nach zytochemischer Untersuchung auf Alkalische Phosphatase-Aktivität**

Ergebnis der software-gestützten Auswertung der zytochemischen Färbung der Zellen der Positivkontrolle (n=3).