

4 Diskussion

Im Rahmen der zukünftigen Chemikalienpolitik wird u.a. die nachträgliche Überprüfung bereits zugelassener Substanzen auf ihr embryotoxisches Potential gefordert. Da die routinemäßig durchgeführten *in vivo* Tests zeit- und kostenintensiv sind und eine hohe Anzahl von Versuchstieren erfordern, besteht großer Bedarf an der Entwicklung und Validierung von Alternativmethoden für Tierversuche.

Der Embryonic Stem Cell Test (EST) (Spielmann and Scholz, 1999) wird als erster *in vitro* Embryotoxizitätstest ausschließlich mit permanenten Zelllinien durchgeführt und ist damit unabhängig von Versuchstieren.

Im EST kann das embryotoxische Potential einer Testsubstanz anhand ihrer Effekte auf die Proliferation und die Differenzierung undifferenzierter embryonaler Stammzellen der Zelllinie D3 und auf das Wachstum differenzierter Zellen (3T3-Fibroblasten) abgeschätzt werden.

Embryonale Stammzellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und durch ihre Pluripotenz aus, d.h. sie sind zum einen nahezu unbegrenzt vermehrungsfähig und können sich zum anderen in die somatischen Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren (Suda et al., 1987; Wobus and Kaomei Guan, 1998). Um ES Zellen in dem undifferenzierten Zustand kultivieren zu können, muss ihre Differenzierung unterdrückt werden. Das ist z.B. durch die gemeinsame Kultivierung der Stammzellen mit sog. *Feeder Layer* (primäre Zellen oder permanente Zelllinien, die differenzierungshemmende Faktoren produzieren) oder die Supplementierung des Kulturmediums mit Substanzen, die eine differenzierungshemmende Aktivität besitzen, möglich. Das Protokoll des Embryonic Stem Cell Test schreibt für die Hemmung der Differenzierung die Kultivierung der Stammzellen bis zum Testbeginn unter dem Einfluss von 1000 U/ml LIF (Leukemia Inhibitory Factor) vor.

Trotz Differenzierungshemmung kann es jedoch bei Kultivierung von ES Zellen mit zunehmenden Passagezahlen zu Veränderungen der Zellpopulation kommen, die z.B. auf einem steigenden Anteil differenzierter Zellen in der Population beruhen.

In der hier vorgestellten Studie wurde zum einen die permanente Stammzelllinie D3 mit dem Ziel untersucht, eine geeignete und praktikable Möglichkeit zur Differenzierungshemmung

dieser Zellen zu bestimmen. Dabei sollte auch nach Langzeitkultivierung der Stammzellen ihr Differenzierungspotential zu Herzmuskelzellen erhalten bleiben. Zum anderen sollten die sog. Stammzell-Marker SSEA-1 und Alkalische Phosphatase-Aktivität auf ihre Eignung für die Beurteilung der Stammzellen auf ihren undifferenzierten Status hin überprüft werden. Dafür wurde die Korrelation der Alkalischen Phosphatase-Aktivität bzw. der SSEA-1-Expression mit dem Potential der Zellpopulationen, zu Herzmuskelzellen zu differenzieren, bewertet. Um die ES Zellen in der Hauptstudie unter möglichst optimalen Bedingungen zu kultivieren, wurden zunächst in Voruntersuchungen die Einflüsse der Zusammensetzung des Kulturmediums auf die Proliferation und die Differenzierung überprüft und die Kulturbedingungen entsprechend variiert.

4.1 Voruntersuchungen

4.1.1 Serumkonzentration und Hitzeinaktivierung des Serums

Der Einfluss verschiedener Faktoren auf das Wachstum und die Differenzierung von ES Zellen wurde untersucht, um durch Optimierung der Kulturbedingungen für die empfindlichen embryonalen Stammzellen eine Stabilisierung des Kultursystems zu erreichen. Da Serum aufgrund seiner undefinierten Zusammensetzung die vollständige Standardisierung der Kulturbedingungen für Zellen verhindert, wird angestrebt, auf Serum als Bestandteil des Kulturmediums zu verzichten. Es ist allerdings beschrieben, dass die Routine-Kultur undifferenzierter ES Zellen unter serumfreien Bedingungen ohne *Feeder Layer* auch bei LIF-Zugabe nicht erfolgreich ist. Im Serum enthaltene bzw. vom *Feeder Layer* freigesetzte Faktoren sind für den Erhalt des undifferenzierten Zustandes der Stammzellen unbedingt erforderlich (Yamane et al., 2005; Ying et al., 2003).

In vielen Studien (Cui et al., 2004; Fijnvandraat et al., 2003; Gajovic et al., 1998; Strubing et al., 1995b) und auch im Protokoll des EST (Spielmann and Scholz, 1999) wird den Kulturmedien für Stammzellen 20 % fetales bovines Serum zugefügt. Vor der Verwendung einer Serumcharge ist diese stets auf ihre Eignung für die Kultivierung der im eigenen Labor verwendeten Stammzelllinie zu überprüfen (Tessarollo, 2001).

Bei der Untersuchung verschiedener Serumkonzentrationen in der hier vorgelegten Arbeit zeigten die Proliferationsraten der ES Zellen im untersuchten Konzentrationsbereich von 5 -

30 % eine proportionale Abhängigkeit zur Serumkonzentration. Ein toxischer Effekt der hohen Serumkonzentrationen trat bei der untersuchten Serumcharge nicht auf.

Die Auswertung der Differenzierungstests am Versuchstag 10 zeigte keinen Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen. Am Versuchstag 7 wurden hingegen mit den niedrigeren Serumkonzentrationen höhere Differenzierungsraten zu Kardiomyozyten erreicht. Eine mögliche Erklärung dafür sind die bereits erwähnten Faktoren, die im Serum enthalten und an der Differenzierungshemmung der Stammzellen beteiligt sind. Die Reduktion dieser Faktoren im Kulturmedium durch Senkung des Serumanteils könnte im Differenzierungstest die Differenzierung positiv beeinflussen.

Um eine ausreichende Versorgung der ES Zellen mit den für die Differenzierungshemmung wichtigen Faktoren zu gewährleisten, wurde für die Routine-Kultur der Zellen in den Zellkulturflaschen in der vorgelegten Arbeit der Serumanteil von 20 % im Kulturmedium beibehalten. Für die Durchführung der Proliferations- und Differenzierungstests des EST ist nach den Ergebnissen der hier vorgestellten Studie aber auch ein auf 15 % reduzierter Serumgehalt im Testmedium geeignet.

Die Wärmebehandlung des für die Zellkultur verwendeten Serums ist eine Möglichkeit, im Serum enthaltene Faktoren, wie z.B. das Komplementsystem, zu inaktivieren und damit mögliche toxische Effekte auf die Zellen zu verhindern. Da in der Literatur verschiedene Effekte der Hitzeinaktivierung des Serums auf das Zellwachstum beschrieben sind (Giard, 1987), sollte der Einfluss der Hitzeinaktivierung des Serums auf die ES Zelllinie D3 untersucht werden.

Die Wärmebehandlung der für die Hauptstudie verwendeten Serumcharge (437A, Biochrom) zeigte in Vorversuchen zwar keinen Einfluss auf die Differenzierung der ES Zellen zu Kardiomyozyten, führte jedoch in den Proliferationstests zu höheren Wachstumsraten im Vergleich zu unbehandeltem Serum.

Durch die Veränderungen der Kulturbedingungen gemäß den Untersuchungsergebnissen der Vorversuche konnte eine Stabilisierung des Kultursystems bei den Proliferations- und den Differenzierungstests erreicht werden.

4.1.2 Qualitätskontrollen der ES Zellen

Vor der Durchführung des Embryonic Stem Cell Test muss laut Protokoll nach dem Auftauen der embryonalen Stammzellen deren Eignung anhand einer Qualitätskontrolle überprüft werden (Spielmann and Scholz, 1999). Dafür werden die Zellen unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von Penicillin G und steigenden Konzentrationen 5-Fluorouracil (FU) auf ihr Proliferations- und Differenzierungspotential untersucht.

Die eigenen Voruntersuchungen zeigten stark schwankende Ergebnisse für die Proliferations- und Differenzierungstests bei Konzentrationen von 0,015 - 0,03 µg/ml FU.

Im Protokoll des EST wird für die Werte der optischen Dichten ein Referenzbereich von 0,9 bis 1,6 für die unbehandelte Kontrolle angegeben (Spielmann and Scholz, 1999). Durch 0,06 µg/ml Fluorouracil soll eine Hemmung der Proliferation von 20 % bis 80 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erreicht werden. In der aktuellen Literatur findet man keine mechanistischen Erklärungen für die beobachteten starken Schwankungen des Proliferationsverhaltens der ES Zellen der unbehandelten Kontrollen bzw. unter dem Einfluss von Fluorouracil. Man kann jedoch spekulieren, dass es sich hierbei um phänotypische Veränderungen der Zellen aufgrund ihrer Passagenzahl handelt.

4.2 Hauptstudie

Die embryonalen Stammzellen der Zelllinie D3 wurden über einen Zeitraum von 100 Tagen (50 Passagen) mit verschiedenen Methoden zur Hemmung der Differenzierung kultiviert. Dafür wurde dem Kulturmedium entweder Leukemia Inhibitory Factor (LIF) oder humanes Oncostatin M (OsM) zugesetzt oder die Stammzellen auf einem *Feeder Layer* aus STO-Fibroblasten (mit und ohne Supplementierung des Kulturmediums mit LIF) kultiviert. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, bei dem die Zellen ohne Differenzierungshemmung kultiviert wurden.

Die Auswertung erfolgte nach jeder 5. Passage durch Untersuchung der Zellen auf SSEA-1-Expression und Alkalische Phosphatase-Aktivität mit verschiedenen Methoden (immunzytochemisch, zytochemisch, durchflusszytometrisch, photometrisch). Außerdem wurden die Differenzierungskapazität zu Herzmuskelzellen im Differenzierungstest und das Wachstumspotential im Proliferationstest überprüft.

4.2.1 Verschiedene Methoden der Differenzierungshemmung

Um die Pluripotenz von embryonalen Stammzellen zu erhalten, muss deren Differenzierung unterdrückt werden, da ohne Differenzierungshemmung eine spontane Differenzierung der Zellen einsetzt (Williams et al., 1988). Darüber hinaus werden Hinweise auf die Unerlässlichkeit der Sorgfalt bei der Kultivierung von embryonalen Stammzellen gegeben, da diese gegenüber Kulturbedingungen wie z.B. pH-Wert, Zelldichte, Zusammensetzung der Kulturmediums empfindlich reagieren (Roach and McNeish, 2002; Wobus et al., 2002; Zandstra et al., 2000).

Die Mechanismen, die bei embryonalen Stammzellen zur Zellteilung oder Differenzierung führen, sind bis heute noch nicht vollständig verstanden. Einigkeit besteht über die zentrale Rolle der STAT3-Kaskaden-Aktivierung durch Leukemia Inhibitory Factor (LIF) für die Hemmung der Differenzierung (Matsuda et al., 1999; Niwa et al., 1998). In anderen Studien wurde jedoch gezeigt, dass auch Signalwege unabhängig von der LIF-Rezeptor/STAT3-Kaskade existieren, die in der Lage sind, die Pluripotenz der Stammzellen zu erhalten (Mitsui et al., 2003)

4.2.1.1 Positivkontrolle (ohne Differenzierungshemmung)

Die Zellen der Positivkontrolle zeigten einige Tage nach Versuchsbeginn die bei Differenzierung der Stammzellen typischen Veränderungen der Morphologie. Im weiteren Verlauf waren undifferenzierte ES Zellen erkennbar, die in Kolonien auf den differenzierten, fibroblastenartigen Zellen aufsaßen. Mit den immunzytochemischen, zytochemischen bzw. durchflusszytometrischen Untersuchungen waren auch nach vielen Passagen noch SSEA-1-positive und AP-positive Stammzellen nachweisbar. Auch mit dem photometrisch ausgewerteten Enzymaktivitätstest ließ sich mindestens bis zur 14. Passage eine Aktivität der Alkalischen Phosphatase nachweisen.

Diese Ergebnisse entsprechen den von Rathjen beschriebenen Beobachtungen (Rathjen et al., 1990a). Nach seinen Untersuchungen kommt es bei Kultivierung von Stammzellen in hoher Zelldichte ($> 2 \times 10^3$ Zellen/cm²) auch ohne Differenzierungshemmung nicht zu einer vollständigen Differenzierung aller Zellen der Population. Durch Induktion der LIF-Produktion in den differenzierten Zellen wird die Differenzierung von noch undifferenzierten ES Zellen unterdrückt. Darüber hinaus können von Stammzellen freigesetzte Faktoren die LIF-Produktion in differenzierten Zellen anregen.

4.2.1.2 *Feeder Layer*

Zur Hemmung der Differenzierung embryonaler Stammzellen können primäre Zellen und permanente Zelllinien verwendet werden (Wobus et al., 1984). Die sog. *Feeder Layer* produzieren den Leukemia Inhibitory Factor (LIF), der entweder auf der Zelloberfläche präsentiert oder von ihnen in den Kulturmediumsüberstand abgegeben wird (Rathjen et al., 1990b). Qi untersuchte weitere Faktoren, die von der häufig als *Feeder Layer* genutzten Fibroblasten-Zelllinie STO produziert werden und einen Einfluss auf die Selbsterneuerung der ES Zellen haben (Qi et al., 2004).

Bezüglich der Eignung der permanenten STO-Fibroblasten für die Hemmung der Differenzierung von ES Zellen werden in der Literatur unterschiedliche Aussagen gemacht. Einige Autoren beschreiben in ihren Studien die Verwendung mitomycin-behandelter STO-Fibroblasten als *Feeder Layer* für die Hemmung der Differenzierung embryonaler Stammzellen (Rathjen et al., 1990b). Andere Autoren verwenden STO-Fibroblasten bei zusätzlicher Substituierung des Kulturmediums mit LIF oder mit von embryonalen Karzinomzellen konditioniertem Medium (Cui et al., 2004; Martin, 1981; Murray and Edgar, 2001; Toumadje et al., 2003).

Dem gegenüber ist nach Wobus (Wobus et al., 1984) die Langzeitkultivierung von embryonalen Stammzellen nur in direkter Co-Kultur auf *Feeder Layer* aus frisch gewonnenen primären Fibroblasten der Maus möglich, die durch Bestrahlung inaktiviert wurden. Sowohl eine Inaktivierung der Feeder-Zellen mit Mitomycin als auch die Co-Kultivierung von ES Zellen mit STO-Fibroblasten waren dagegen nicht erfolgreich (Wobus et al., 1984).

Dabei ist zu beachten, dass die zitierten Untersuchungen mit verschiedenen Stammzelllinien und unter verschiedenen Kulturbedingungen durchgeführt wurden. Da auch die zur Beurteilung des undifferenzierten Zustands der ES Zellen verwendeten Methoden sich unterscheiden, ist der direkte Vergleich der zitierten Ergebnisse mit denen der hier vorgestellten Arbeit nicht möglich. Außerdem wird in keiner der anderen Arbeiten das Differenzierungspotential der Stammzellen zu Herzmuskelzellen nach Langzeitkultivierung überprüft.

Für die hier vorliegende Arbeit wurden STO-Fibroblasten als *Feeder Layer* für die direkte Co-Kultur mit den embryonalen Stammzellen verwendet. Diese Fibroblasten wurden zuvor durch Inkubation mit Mitomycin C inaktiviert.

Nach den Ergebnissen der Hauptstudie sind mit Mitomycin C inaktivierte STO-Fibroblasten in direkter Co-Kultur geeignet, den Großteil der embryonalen Stammzellen D3 über einen langen Zeitraum im undifferenzierten Zustand zu halten. Die so kultivierten Stammzellen zeigten auch nach 100 Tagen noch eine gute Differenzierungskapazität zu Kardiomyozyten, einen hohen Anteil SSEA-1-exprimierender Zellen und eine hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität. Eine zusätzliche Supplementierung des Kulturmediums mit differenzierungshemmenden Substanzen war dabei nicht nötig.

Die Stammzellen, die auf *Feeder Layer* bei gleichzeitiger Supplementierung des Kulturmediums mit LIF kultiviert worden waren, zeigten bei der Auswertung des Differenzierungstests nach der 48. Passage einen geringeren Anteil Wells mit kontrahierenden Kardiomyozyten als die Zellen, die nur auf *Feeder Layer* (ohne LIF) kultiviert worden waren. Eine weitere Kultivierung der ES Zellen und weitere Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt wären nötig gewesen, um eine Veränderung der Zellpopulation mit einer dauerhaft eingeschränkter Differenzierungskapazität der Zellen von methodischen Schwankungen abzugrenzen. Der hohe Anteil der SSEA-1-positiven Zellen in der Zellpopulation und die im photometrisch ausgewerteten Enzymaktivitätstest gemessene hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität sprechen jedoch eher für eine Schwankung und gegen eine dauerhaft verringerte Differenzierungskapazität.

4.2.1.3 Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

Die Isolierung embryonaler Stammzellen aus Blastozysten und ihre Langzeitkultivierung im undifferenzierten Zustand sollen durch die Supplementierung des Kulturmediums mit LIF möglich sein (Nichols et al., 1990; Smith et al., 1988; Williams et al., 1988).

Allerdings werden in den zu Stammzellen publizierten Studien oft keine Angaben zur tatsächlich untersuchten Kulturdauer gemacht oder die Passagezahlen auf maximal 30 Passagen beschränkt. Darüber hinaus wird der undifferenzierte Zustand der Stammzellen mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen. So führte die Kultivierung von ES Zellen über „viele Passagen“ unter Zugabe von LIF zum Kulturmedium zu keinen Veränderungen der Wachstumseigenschaften bzw. des Phänotyps der Zellen und der Zellkolonien (kompakte Kolonien kleiner Zellen mit großem Kern-Plasma-Verhältnis) (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Andere Autoren beurteilten den undifferenzierten Status der kultivierten ES Zellen

durch Untersuchung auf die Alkalische Phosphatase-Aktivität (Pease et al., 1990) oder die Expression des Oberflächenantigens SSEA-1 (Matsui et al., 1992).

Nach den hier vorgestellten Ergebnissen der Hauptstudie ist es durch die Supplementierung des Kulturmediums mit 1000 U/ml LIF möglich, den undifferenzierten Phänotyp der ES Zellen über einen gewissen Zeitraum zu erhalten (16 Passagen Vorbereitung + 29 Passagen Hauptstudie = 45 Passagen). Bei längerer Kultivierung der Zellen kam es jedoch trotz LIF zu Veränderungen der Zellpopulation, die sich in einer veränderten Zell- und Koloniemorphologie, einer verminderten SSEA-1-Expression und Alkalischen Phosphatase-Aktivität und einer reduzierten Differenzierungskapazität im Differenzierungstest zeigten.

Der Anteil undifferenzierter Stammzellen in der Population nahm mit steigenden Passagezahlen ab. Das entspricht den von anderen Autoren veröffentlichten Untersuchungen, dass die Differenzierung von ES Zellen trotz LIF stattfinden kann (Bader et al., 2000; Murray and Edgar, 2001; Shen and Leder, 1992).

Üblicherweise werden in der Literatur 1000 U/ml LIF für die Differenzierungshemmung von ES Zellen angegeben. Es ist allerdings auch beschrieben, dass für die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung von Stammzelllinien eine um ein vielfaches erhöhte LIF-Konzentration im Kulturmedium nötig sein kann (Baharvand and Matthaie, 2004).

In der hier vorgelegten Arbeit wurden daher auch ES Zellen mit der erhöhten Konzentration von 2000 U/ml LIF kultiviert. Diese erhöhte Konzentration reichte allerdings nicht aus, um die Differenzierung von embryonalen Stammzellen bei Langzeitkultivierung zu verhindern. Bei dem Vergleich der mit 1000 U/ml und 2000 U/ml LIF kultivierten Stammzellen wurde deutlich, dass bei Supplementierung des Kulturmediums mit 2000 U/ml LIF morphologische Veränderung der Zellpopulation und die Abnahme der Expression von SSEA-1 sogar etwas früher eintraten als mit 1000 U/ml LIF, die Differenzierungskapazität der Zellen hingegen blieb etwas länger erhalten.

Es ist jedoch zu beachten, dass die ES Zellen in Abständen von 5 Passagen (das entspricht 10 Tagen) untersucht wurden. Da sich die Veränderungen der Zellpopulationen (z.B. der Verlust der Differenzierungskapazität) auch zwischen diesen Auswertungszeitpunkten manifestieren können, sind beobachtete Unterschiede von einer Auswertung zur nächsten vorsichtig zu interpretieren.

4.2.1.4 Oncostatin M

Oncostatin M (OsM) ist ebenfalls ein zur Familie der Interleukine-6 gehörendes Molekül. Die zu dieser Familie gehörenden Zytokine zeigen Überschneidungen in vielen Eigenschaften und Funktionen, wobei OsM strukturell und funktionell LIF am ähnlichsten ist (Gómez-Lechón, 1999). Aufgrund des fehlenden Oncostatin-Rezeptors bei murinen Stammzellen (Ichihara et al., 1997) ist für die Hemmung der Differenzierung murines Oncostatin M nicht geeignet. Nach Untersuchungen von Piquet-Pellorce (Piquet-Pellorce et al., 1994) ist hingegen humanes OsM fähig, am LIF-Rezeptor der ES Zellen zu binden und so deren Differenzierung zu verhindern.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde humanes OsM in einer Konzentration von 20 ng/ml verwendet. Es erwies sich als geeignet für die Hemmung der Differenzierung von ES Zellen über eine Kulturdauer von mindestens 43 Passagen bei Erhalt des Differenzierungspotentials zu Herzmuskelzellen. Dabei ist zu beachten, dass die ES Zellen bis zum Beginn der Hauptstudie bereits über 16 Passagen unter dem Einfluss von 1000 U/ml LIF kultiviert worden waren. Wie auch bei den ES Zellen, die mit LIF auf *Feeder Layer* kultiviert wurden, ist die Bewertung des Abfalls des Differenzierungspotentials bei der 48. Passage schwierig. Der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil der SSEA-1-exprimierenden Zellen und die photometrisch gemessene Alkalische Phosphatase-Aktivität blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum auf einem hohen Niveau. Auch hier wäre eine weitere Kultivierung der ES Zellen und weitere Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt nötig gewesen, um eine Veränderung der Zellpopulation mit dauerhaft eingeschränkter Differenzierungskapazität von methodischen Schwankungen abzugrenzen.

4.2.2 Proliferations- und Differenzierungstest

4.2.2.1 Proliferationstest

Für die Proliferationstests, durchgeführt mit der Zelllinie D3, bezogen von der ATCC (American Type Culture Collection), wird im Protokoll des Embryonic Stem Cell Test (EST) (Spielmann and Scholz, 1999) ein Referenzbereich für die optische Dichte von 0,9 bis 1,6 angegeben. Die große Breite des Referenzbereichs ist in methodischen Schwankungen begründet. Die in der hier beschriebenen Studie generierten Ergebnisse der Proliferationstests

zeigten ebenfalls Schwankungen der absoluten Werte der optischen Dichten bei den Passagen. Die Konzentration von 0,025 µg/ml 5-Fluorouracil (FU) im Testmedium führte bei den Versuchsansätzen, die auf *Feeder Layer* kultiviert worden waren, bei den meisten ausgewerteten Passagen zu einer Hemmung des Zellwachstums. Die mit LIF oder OsM kultivierten Zellen hingegen zeigten in den Proliferationstests nur bei einigen Passagen eine schwache Hemmung des Zellwachstums durch 0,025 µg/ml FU.

Die Zellen, die bis zum Testbeginn auf *Feeder Layer* kultiviert wurden, waren demnach empfindlicher gegenüber Fluorouracil. Allerdings ließ sich über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Änderung der Empfindlichkeit der Zellen der verschiedenen Ansätze gegenüber Penicillin G (1000 µg/ml) oder FU (0,025 µg/ml) in Abhängigkeit zu der Passagezahl feststellen. Um solche Veränderungen der Empfindlichkeit der Zellen nachzuweisen, wären Untersuchungen mehrerer Konzentrationen Fluorouracil erforderlich gewesen, darauf musste aber aufgrund des Umfangs der Hauptstudie verzichtet werden.

4.2.2.2 Differenzierungstest

In Anlehnung an den Embryonic Stem Cell Test wurde die Fähigkeit der Stammzellen, unter bestimmten Kulturbedingungen zu Herzmuskelzellen zu differenzieren, am Versuchstag 10 des Differenzierungstests morphologisch ausgewertet. Dazu wurde unter dem Umkehrmikroskop der Anteil der Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte bestimmt, in denen sich kontrahierende Kardiomyozyten beobachten ließen.

Im EST Protokoll wurde als Qualitätskriterium festgelegt, dass die unbehandelte Kontrolle eines Differenzierungstests in mindestens 21 von 24 Wells kontrahierende Kardiomyozyten aufweisen muss. Die mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz behandelten Ansätze werden im EST für die Auswertung (Ermittlung der 50 %-Hemmkonzentration) jeweils relativ zur UK angegeben. Eine statistische Auswertung zur Ermittlung signifikanter Ereignisse erfolgt dabei nicht. In der vorliegenden Arbeit wurde die statistische Auswertung der Differenzierungstests anhand der absoluten Werte zwar durchgeführt, jedoch ließen sich daraus keine neuen Erkenntnisse für die Interpretation der Ergebnisse ziehen.

Für die Beurteilung der Differenzierungstests der Hauptstudie sind die Ergebnisse über den gesamten Untersuchungszeitraum zu betrachten. Gerade in der Zellkultur ist die Abweichung einzelner Werte vorsichtig zu interpretieren. Z.B. ist die bei der 18. Passage beobachtete schlechtere Differenzierungsrate der Penicillin-Kontrolle des Ansatzes C statistisch

signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der gleichen Passage. Aufgrund der guten Ergebnisse der im weiteren Studienverlauf durchgeführten Differenzierungstests ist diese Beobachtung allerdings eher durch methodische Schwankungen zu erklären.

Die Konzentration von 0,025 µg/ml FU im Testmedium führte bei den Versuchsansätzen, die auf *Feeder Layer* kultiviert wurden, bei den meisten ausgewerteten Passagen zu einer Hemmung der Differenzierung zu Herzmuskelzellen. Die Ergebnisse der mit LIF oder OsM kultivierten Zellen schwankten von einer deutlichen bis zu keiner Hemmung der Differenzierung durch 0,025 µg/ml FU. Wie auch bei den Proliferationstests wären für den Nachweis einer veränderten Empfindlichkeit der ES Zellen Untersuchungen mehrerer Konzentrationen Fluorouracil nötig gewesen, darauf musste aber aufgrund des Umfangs der Hauptstudie ebenfalls verzichtet werden.

Die Auswertung des Differenzierungstests durch Untersuchung der Embryoid Body-Auswüchse auf Kontraktionen ist zeitaufwendig und erfordert Erfahrung (Buesen et al., 2004). Die von anderen Arbeitsgruppen durchgeführten Untersuchungen zur Auswertung der Differenzierungstests mit durchflusszytometrischen Methoden umfassen zusätzlich zur Beurteilung von der Differenzierung zu Herzmuskelzellen auch andere Differenzierungsrichtungen und erlauben somit eine objektivere und umfassendere Bewertung der Effekte einer Testsubstanz. In diesen Untersuchungen wurde eine maximale Expression der für Herzmuskelzellen spezifischen Markerproteine Myosin Heavy Chain und α -Actinin bereits an Tag 7 der Differenzierung beobachtet (Seiler et al., 2002).

Im Hinblick auf die anzustrebende Verkürzung der Kulturdauer der Zellen im EST wurden in der vorgelegten Arbeit die Differenzierungstests zusätzlich nach 7 Tagen morphologisch ausgewertet. Die bei der Auswertung nach 7 Versuchstagen erhobenen Daten für die Differenzierung der Zellen ließen sich jedoch nicht mit den am Versuchstag 10 ermittelten Ergebnissen korrelieren. Eine Verkürzung des Testprotokolls ist daher mit der morphologischen Auswertung des Differenzierungstests nicht möglich.

4.2.3 Marker für den undifferenzierten Zustand von Stammzellen

Für den Nachweis des undifferenzierten Status embryonaler Stammzellen werden unterschiedliche Methoden beschrieben. Einige Autoren beurteilen die „phänotypischen“

Eigenschaften von undifferenzierten Stammzellen wie Zell- und Koloniemorphologie (Smith and Hooper, 1987). Andere weisen den undifferenzierten Status der ES Zellen durch sog. Stammzell-Marker, z.B. die Expression von SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1) oder eine hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität nach (Solter and Knowles, 1979; Ward et al., 2004; Wobus et al., 1984).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Morphologie der Zellen in den Zellkulturflaschen beurteilt und die Zellen auf die Stammzell-Marker SSEA-1 und Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) untersucht. Diese Marker wurden auf ihr Potential untersucht, die Eignung der Zellpopulation für die Durchführung des Embryonic Stem Cell Tests vorherzusagen. Dafür wurden die Ausprägungen der Marker verglichen mit der Differenzierungskapazität der Stammzellen zu Kardiomyozyten.

4.2.3.1 Morphologie der ES Zellen

Undifferenzierte embryonale Stammzellen sind kleine Zellen mit einem hohem Kern-Plasma-Verhältnis, die (unter Kulturbedingungen mit Differenzierungshemmung) typischerweise in kompakten Kolonien wachsen. Nach Differenzierung enthalten die Kolonien große, flache Zellen (Conover et al., 1993; Pease et al., 1990).

Veränderungen der Zell- und Koloniemorphologie ließen sich auch in der hier vorgestellten Studie beobachten. Bereits nach wenigen Tagen zeigten die Zellen der Positivkontrolle (ohne Differenzierungshemmung kultiviert) eine Abflachung der Kolonien und ein vermehrtes Auftreten großer, fibroblastenartiger Zellen. Die gleichen Veränderungen traten bei höheren Passagezahlen auch bei den mit LIF (1000 U/ml und 2000 U/ml) kultivierten ES Zellen auf. Bei den Zellen der Positivkontrolle und der Ansätze mit LIF traten die Veränderungen der Zell- und Koloniemorphologie vor oder etwa zeitgleich mit der reduzierten Fähigkeit der Zellen auf, zu kontrahierenden Herzmuskelzellen zu differenzieren.

Auffällig war, dass die mit Oncostatin M kultivierten Zellen ebenfalls nach einigen Passagen eine Abflachung der Kolonien zeigten, die jedoch nicht mit einer veränderten Zellmorphologie oder einem Abfall der Differenzierungsfähigkeit zu Herzmuskelzellen einherging.

Nach diesen Ergebnissen kann anhand der Koloniemorphologie keine Beurteilung der Zellpopulation erfolgen, jedoch gibt das Verhältnis von kleinen, runden Zellen zu großen, fibroblastenartigen Zellen in der Zellpopulation einen Hinweis auf die Eignung der ES Zellen

für die Durchführung des Differenzierungstests des EST. Zu bedenken bleibt, dass die morphologische Bewertung der Zellmorphologie eine subjektive und von der Erfahrung des Untersuchers abhängige Methode ist.

4.2.3.2 SSEA-1

Das Oberflächenantigen SSEA-1 ist spezifisch für undifferenzierte embryonale Stammzellen der Maus (Solter and Knowles, 1978) und wird nach Differenzierung der Zellen von diesen nicht mehr exprimiert (Ling and Neben, 1997). Als sog. Stammzell-Marker wird SSEA-1 daher von vielen Autoren für den Nachweis des undifferenzierten Status der Zellen herangezogen (Cui et al., 2004; Resnick et al., 1992).

In der hier vorgestellten Arbeit wurden die Zellen mit immunzytochemischen und durchflusszytometrischen Methoden auf die Expression von SSEA-1 untersucht.

Bei der immunzytochemischen Färbung gegen SSEA-1 zeigten sich mit zunehmender Passagezahl zwar bei den Zellen der Positivkontrolle Veränderungen der Zellpopulation anhand des zunehmenden Anteils ungefärbter Zellen. Allerdings waren die Intensitäten der Färbungen je nach Passage unterschiedlich stark.

Eine Quantifizierung der SSEA-1-markierten bzw. unmarkierten Zellen mit Bewertung der Fluoreszenz und eine daran angelehnte Beurteilung der Eignung der Zellpopulation für die Durchführung des EST waren mit dieser Methode daher nicht möglich.

Die durchflusszytometrische Untersuchung hingegen ermöglichte die objektive und quantitative Bestimmung der SSEA-1-positiven ES Zellen in den Zellpopulationen. Bei den Zellen der Positivkontrolle nahm der Anteil der SSEA-1-positiven Stammzellen mit zunehmender Passagezahl ab, allerdings waren auch nach 24 Tagen in Kultur ohne Differenzierungshemmung noch 80 % der Zellen SSEA-1-positiv.

Toumadje (Toumadje et al., 2003) zeigte hingegen, dass SSEA-1, ebenso wie andere Stammzell-Marker (Oct-3/4 und EMA-1) nach 14 Tagen der Differenzierung von ES Zellen in Embryoid Bodies nur bei bis zu 50 % der Zellen nachweisbar sind.

Die Unterschiede zwischen den eigenen Ergebnissen und den Beobachtungen von Toumadje lassen sich mit den unterschiedlichen Kulturbedingungen der ES Zellen erklären. Die in der vorgelegten Studie untersuchten Zellpopulationen wurden bis zur Bestimmung des SSEA-1-positiven Anteils in Zellkulturflaschen kultiviert. Die bei Adhäsionskulturen von embryonalen

Stammzellen vorliegenden Bedingungen bieten nicht die für eine schnelle und effiziente Differenzierung günstige dreidimensionale Ausbreitung der Zellen und die entsprechenden Zell-Zell-Interaktionen. Die Differenzierungsprozesse laufen daher anders ab als im Embryoid Body, in dem die Entwicklungsbedingungen der Zellen denen innerhalb einer Blastozyste nachempfunden sind (Weiss and Orkin, 1996).

Im Hinblick auf die Durchführung des Embryonic Stem Cell Tests ist stets der Anteil der undifferenzierten, also SSEA-1-positiven Zellen in der Stammzellpopulation zu betrachten. Dafür bietet sich die durchflusszytometrische Untersuchung an.

Für die statistische Auswertung der einzelnen Ansätze im Verlauf der Hauptstudie wurden die absoluten Werte herangezogen (je Ansatz wurden 3 x 30000 Zellen untersucht und die Anzahlen der positiven bzw. negativen Zellen bestimmt). Dabei wurden im χ^2 -Test auch die bei den niedrigen Passagezahlen z.T. sehr geringen Schwankungen zwischen den Passagen bereits als signifikantes Ereignis bewertet. Dies kann auf die hohen Endzahlen zurückgeführt werden. Da in biologischen Systemen jedoch immer Schwankungen innerhalb eines gewissen Bereichs zu erwarten sind, konnte die statistische Auswertung der FACScan-Analysen nicht zur Beurteilung der Ergebnisse herangezogen werden.

Der für eine erfolgreiche Durchführung des Differenzierungstests benötigte Anteil SSEA-1-positiver Zellen wurde vielmehr durch die Korrelation der Anteile mit SSEA-1-positiven Zellen mit der Differenzierungskapazität dieser Zellen abgeschätzt. Nach den Ergebnissen der hier vorgelegten Arbeit korreliert ein Anteil von mindestens 70 % SSEA-1-positiver Zellen in einer Population mit einer guten Differenzierungskapazität dieser Population zu Herzmuskelzellen. Somit wäre die Eignung der Zellpopulation für die Durchführung des Differenzierungstests fraglich, wenn der Anteil der SSEA-1-positiven Zellen unter 70 % fällt. Es ist anzunehmen, dass ein gleichmäßig hoher Anteil SSEA-1-positiver Zellen in der für den EST verwendeten Zellpopulationen zu einer Standardisierung dieses *in vitro* Tests beitragen würde. 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. Vor Verwendung solcher selektierten Zellpopulationen im EST wäre allerdings zu überprüfen, ob die Antikörpermarkierung und Sortierung der Zellen einen negativen Einfluss auf die Stammzellen und damit die Ergebnisse des EST hat.

4.2.3.3 Alkalische Phosphatase-Aktivität

Eine hohe AP-Aktivität gilt als typisch für undifferenzierte embryonale Stammzellen (Berstine et al., 1973; Pease et al., 1990). In Studien mit ES Zellen wird dieses Enzym daher oft mit zytochemischen Methoden oder in Enzymaktivitäts-Assays untersucht, um den undifferenzierten Zustand der Stammzellen nachzuweisen. Eine Bestimmung der „Höhe“ der AP-Aktivität wird allerdings nur vereinzelt beschrieben (Zandstra et al., 2000).

In der vorgelegten Arbeit wurde die Untersuchung der Zellen auf ihre Alkalische Phosphatase-Aktivität mit drei verschiedenen Methoden durchgeführt.

Die zytochemische Untersuchung auf AP-Aktivität zeigte zwar subjektiv einen Abfall des Anteils an AP-positiven Zellen der Positivkontrolle mit zunehmender Passagezahl, jedoch verhinderten, wie auch bei der immunzytochemischen Untersuchung auf SSEA-1-Expression beobachtet, die Schwankungen der Intensitäten der Färbung eine Bewertung der Fluoreszenz. Eine objektive Beurteilung des Differenzierungsstatus durch Quantifizierung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität der Zellen bzw. der Zellpopulation und eine daran angelehnte Beurteilung der Eignung der Zellpopulation für die Durchführung des EST war mit dieser Methode daher nicht möglich.

Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten die ohne differenzierungshemmende Substanz kultivierten Zellen der Positivkontrolle mit zunehmender Passagezahl zunächst eine abnehmende Tendenz der AP-Aktivität. Allerdings lagen die AP-positiven Anteile auch nach 46 Passagen noch bei etwa 60 %, obwohl in den Differenzierungstests der Positivkontrolle bereits nach 28 Passagen keine Differenzierung zu kontrahierenden Herzmuskelzellen mehr zu beobachten war.

Auch bei den mit LIF kultivierten Zellen fiel der Anteil der AP-positiven Zellen bis zum Ende der Studie nur auf etwa 80 %, während zu diesem Zeitpunkt die Zellen in den Differenzierungstests nicht mehr zu einer Differenzierung in kontrahierenden Herzmuskelzellen fähig waren.

Für die mit Oncostatin M bzw. auf *Feeder Layer* kultivierten Zellen wurden über den gesamten Untersuchungszeitraum Anteile der AP-positiven Zellen von mindestens 75 % bestimmt. Die Zellen dieser Ansätze waren bis zur 43. Passage auch fähig, zu Herzmuskelzellen zu differenzieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ansätze, deren AP-positiver Anteil der Zellen bei > 90 % lag, bei den Differenzierungstests eine gute Differenzierung zu Kardiomyozyten zeigten. Bei Anteilen von unter 60 % AP-positiven Zellen an der Gesamtpopulation zeigten die entsprechenden Ansätze auch eine verminderte Differenzierungsfähigkeit. Anteile der positiven Zellen in Bereichen von 60 - 90 % ließen sich nicht mit der Differenzierungsfähigkeit der Zellen korrelieren.

Bei der Durchführung des photometrisch ausgewerteten Enzym-Aktivitätstests wiesen die Zellpopulationen, deren Werte der optischen Dichte (gemessen nach 15 min) über 1,0 lagen, auch ein hohes Potential auf, im Differenzierungstest zu Herzmuskelzellen zu differenzieren. Bei den Zellen, die ohne Differenzierungshemmung oder nur unter dem Einfluss von LIF kultiviert worden waren, wurden mit zunehmender Passagezahl Abnahmen der AP-Aktivität beobachtet. Geringe AP-Aktivitäten korrelierten mit der verminderten Fähigkeit dieser Zellen, zu Kardiomyozyten zu differenzieren.

Nach diesen Ergebnissen lässt sich von einer im Enzym-Aktivitätstest gemessenen optischen Dichte von mindestens 1,0 auf einen hohen Anteil undifferenzierter Zellen mit hoher Alkalischer Phosphatase-Aktivität in der untersuchten Zellpopulation schließen und damit auf eine Eignung der Zellen für die Durchführung des EST.

Von den hier untersuchten Methoden zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität können nur mit dem photometrisch ausgewerteten Enzym-Aktivitätstest und der durchflusszytometrischen Untersuchung Grenzwerte festgesetzt werden, die mit einer guten bzw. schlechten Differenzierungskapazität der ES Zellen korrelieren. Bei beiden Methoden bleiben jedoch Bereiche, in denen die Korrelation nicht zuverlässig möglich ist.

Insgesamt bleibt die Eignung eines ubiquitär auftretenden Enzyms als Marker für den undifferenzierten Status von ES Zellen fraglich, zumal stets eine Quantifizierung der Enzym-Aktivität erforderlich wäre. Außerdem ist die Alkalische Phosphatase-Aktivität z.B. ebenfalls hoch in aus ES Zellen differenzierten Osteoblasten (zur Nieden et al., 2003).

4.2.4 Ausblick

Durch weiterführende Untersuchungen ließen sich möglicherweise die für die erfolgreiche Durchführung des EST nötigen Anteile der SSEA-1-positiven Zellen bzw. die erforderliche Höhe der Alkalischen Phosphatase-Aktivität weiter eingrenzen. Die in der hier vorgestellten Arbeit erhobenen Ergebnisse könnten durch weitere Qualitätskontrollen von Stammzellpopulationen und parallel durchgeführte durchflusszytometrische Analysen auf die Expression von SSEA-1 überprüft werden. Ebenso sollten die mit dem Enzym-Aktivitätstest ermittelten optischen Dichten als Maß für die Alkalische Phosphatase auf ihre Korrelation mit der Differenzierungskapazität der ES Zellen zu Kardiomyozyten bestätigt werden.

Diese beiden Methoden würden damit die schnelle und einfache Überprüfung der Zellpopulation/-charge kurz vor Testbeginn ermöglichen und somit eine Alternative für die im Protokoll des EST vorgeschriebene 10-tägige Qualitätskontrolle darstellen.

Als weitere Möglichkeit, die Stammzellpopulationen zu charakterisieren, könnten auch Marker, die die Differenzierung der Stammzellen anzeigen, genutzt werden.

Im Hinblick auf die Standardisierung der Kulturbedingungen ist die Verwendung einer chemischen rekombinanten Substanz wie LIF oder Oncostatin M zur Differenzierungshemmung von ES Zellen der Co-Kultur mit *Feeder Layer* vorzuziehen. Nach den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit können jedoch embryonale Stammzellen der Zelllinie D3 durch Kultivierung auf *Feeder Layer* über einen längeren Zeitraum im undifferenzierten Zustand kultiviert werden als unter dem Einfluss von LIF. Es ist bekannt, dass neben LIF auch andere Faktoren (z.B. BMP – bone morphogenetic protein) von den *Feeder*-Zellen freigesetzt werden, die für den Erhalt des undifferenzierten Zustandes erforderlich sind. Möglicherweise ließe sich durch die Supplementierung des Kulturmediums mit diesen Faktoren die Differenzierung von ES Zellen auch in Abwesenheit vom *Feeder Layer* besser unterdrücken.

Die in der hier vorgestellten Arbeit beobachtete höhere Empfindlichkeit der auf *Feeder Layer* kultivierten ES Zellen gegenüber Fluorouracil wäre in weiteren Versuchen, in denen auch eine Konzentrationsabhängigkeit untersucht wird, zu überprüfen.

Embryonalen Stammzellen werden über ihre Pluripotenz und die unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit charakterisiert. Aufgrund ihrer besonderen Empfindlichkeit gegenüber

Kulturbedingungen hat die Kultivierung von ES Zellen besonders sorgfältig zu erfolgen. Darüber hinaus unterscheiden sich die verschiedenen Stammzelllinien jedoch in ihren Ansprüchen an die Kulturbedingungen, wie z.B. die Differenzierungshemmung, und in ihrem Differenzierungspotential und damit in ihrer Eignung für die verschiedenen Fragestellungen. Die Auswahl einer geeigneten Stammzelllinie ist daher für die erfolgreiche Untersuchung bestimmter Fragestellungen von großer Bedeutung. Bei gleichem Versuchsaufbau können die Ergebnisse von mit verschiedenen Stammzelllinien durchgeführten Versuchen stark variieren (Shen and Leder, 1992). Viele Autoren führen daher ihre Untersuchungen mit verschiedenen voneinander unabhängigen Stammzelllinien durch, um die Übertragbarkeit ihrer Ergebnisse zu überprüfen (Ling and Neben, 1997; Rathjen et al., 1990a; Rohwedel et al., 1998). Dabei ist zu beachten, dass auch sog. permanente Stammzelllinien Veränderungen unterliegen (Gardner and Brook, 1997).

Veränderungen einer Zelllinie können u.a. durch suboptimale Kulturbedingungen oder mangelhafte Hemmung der Differenzierung der Zellen begünstigt werden. Die Karyotypisierung bietet die Möglichkeit, Chromosomenzahlen von Stammzellpopulationen zu bestimmen und Veränderungen zu erkennen (Doetschman et al., 1985; Gossler et al., 1986). Die durch Akkumulation von Mutationen ausgebildeten Subpopulationen können andere Eigenschaften aufweisen als die ursprüngliche Zelllinie, wie z.B. verändertes Wachstumsverhalten, veränderte Empfindlichkeit gegenüber Substanzen oder eingeschränkte Differenzierungskapazität.

Die Stammzelllinie D3 wurde Mitte der 80er Jahre etabliert und wird bis heute in vielen Studien verwendet. Über die Fähigkeit dieser Zellen, nach Reintegration in Blastozysten auch an der Keimzellbildung teilzunehmen, werden in der Literatur unterschiedliche Aussagen gemacht. Nach Toumadje (Toumadje et al., 2003) sind Zellen dieser Zelllinie nicht mehr kompetent, nach Reintegration in eine Blastozyste an der Keimzellbildung teilzunehmen. Andere Autoren beschreiben hingegen die Beteiligung der Stammzellen D3 an der Keimzellbildung (Ward et al., 2004; Williams et al., 1988).

Die Stammzelllinie D3 ist für die Durchführung des Embryonic Stem Cell Tests vorgeschrieben und wurde daher auch für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit verwendet. Unterschiede im Wachstumsverhalten von Subpopulationen der Zelllinie D3 werden im Protokoll des EST bereits berücksichtigt, indem je nach Zellbank, bei der die

Stammzellen bezogen wurden, unterschiedliche Referenzbereiche für die Ergebnisse der Proliferationstests gelten.

Für die Durchführung des Differenzierungstests wird die Pluripotenz der embryonalen Stammzellen vorausgesetzt. Die Bedeutung, die eine eingeschränkte Differenzierungskapazität für die Verwendung der ES Zellen D3 für den EST haben könnte, ist schwer abzuschätzen. Da im Differenzierungstest des EST bisher nur die Entwicklung der Stammzellen zu Herzmuskelzellen untersucht wird, sind Veränderungen der Zellpopulation, die mit eingeschränkter Differenzierungskapazität in anderen Differenzierungsrichtungen einhergehen, möglicherweise nicht entscheidend für die erfolgreiche Durchführung des Tests. Im Hinblick auf die Weiterentwicklung des EST mit Einführung weiterer Differenzierungsrichtungen als Endpunkte der Differenzierungstests ist diese Problematik allerdings von Bedeutung. Ausserdem verhindert die Ausbildung von Subpopulationen mit Veränderungen der Zelleigenschaften die erforderliche Standardisierung und Reproduzierbarkeit des Embryoic Stem Cell Tests.

Für die erfolgreiche und auch standardisierte Durchführung eines Embryotoxizitätstests ist die Verwendung einer Zelllinie erwünscht, deren Eigenschaften definiert sind und die gegenüber Veränderungen der Kulturbedingungen unempfindlicher ist.