

## 5 Zusammenfassung

Der Embryonic Stem Cell Test (EST) ist ein *in vitro* Embryotoxizitätstest, mit dem Substanzen entsprechend ihrem embryotoxischen Potential klassifiziert werden können. Für die erfolgreiche Durchführung des EST ist die Verwendung undifferenzierter pluripotenter Stammzellen eine Grundvoraussetzung. Embryonalen Stammzellen (ES Zellen) wird eine nahezu unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit zugesprochen, wenn sie bei Hemmung ihrer Differenzierung kultiviert werden. Allerdings kann es durch suboptimale Kulturbedingungen auch unter Differenzierungshemmung zu einer Differenzierung von ES Zellen und damit zu einer Veränderung der Zellpopulation kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden der Differenzierungshemmung für ES Zellen untersucht. Eine Methode wurde als geeignet bewertet, wenn sie den undifferenzierten Zustand der ES Zellen und deren Differenzierungskapazität zu Herzmuskelzellen erhalten kann.

Dafür wurden die Stammzellen über einen Zeitraum von 50 Passagen unter dem Einfluss von 1000 U/ml bzw. 2000 U/ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF), 20 ng/ml humanem Oncostatin M oder in Co-Kultur mit *Feeder Layer* aus STO-Fibroblasten mit und ohne Supplementierung des Kulturmediums mit 1000 U/ml LIF kultiviert. Über den Versuchszeitraum wurden die Zellen mit verschiedenen Methoden auf ihren Differenzierungsstatus untersucht. Neben der morphologischen Beurteilung der Zellen wurde auch die Expression der Stammzell-Marker SSEA-1 und Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) überprüft. Diese Marker werden typischerweise von undifferenzierten Stammzellen exprimiert und nach Differenzierung der Zellen herunterreguliert. Für den Nachweis wurden sowohl immunzytochemische, zytochemische und durchflusszytometrische Verfahren als auch ein photometrisch ausgewerteter Enzym-Aktivitätstest durchgeführt.

Die Durchführung von an das Protokoll des EST angelehnten Proliferations- und Differenzierungstests ermöglichte die Untersuchung des Einflusses von Penicillin G und 5-Fluorouracil auf das Wachstums- und Differenzierungspotential der Stammzellen.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es zum einen, die verschiedenen Methoden der Differenzierungshemmung miteinander zu vergleichen und auf ihre Eignung für die Langzeitkultivierung von undifferenzierten ES Zellen zu überprüfen. Zum anderen sollten die verschiedenen Nachweismethoden für die SSEA-1-Expression bzw. die AP-Aktivität auf ihre Aussagekraft für die Beurteilung der Stammzellpopulation untersucht werden. Die Beurteilung erfolgte unter der Annahme, dass undifferenzierte embryonale Stammzellen in typischen Kolonien wachsen (bei Kultivierung in Zellkulturflaschen), das Oberflächenantigen SSEA-1 exprimieren und eine hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität aufweisen. Im Differenzierungstest des EST können diese Zellen zu kontrahierenden Kardiomyozyten differenzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Langzeitkultivierung die alleinige Supplementierung des Kulturmediums mit LIF eine Veränderung der Stammzellpopulationen mit zunehmendem Anteil differenzierter Zellen nicht verhindern konnte. Diese Zellpopulationen zeigten morphologische Veränderungen und wiesen einen verminderten Anteil SSEA-1-positiver Zellen, eine geringere AP-Aktivität und eine eingeschränkte Differenzierungskapazität zu Kardiomyozyten auf.

Demgegenüber konnte durch direkte Co-Kultur der ES Zellen mit inaktivierten STO-Fibroblasten bzw. die Supplementierung des Kulturmediums mit Oncostatin M die

Differenzierung der embryonalen Stammzellen über einen langen Zeitraum unterdrückt werden. Sowohl die Stammzell-Marker SSEA-1 und AP-Aktivität als auch die Differenzierungskapazität dieser Zellpopulationen blieben über den Untersuchungszeitraum auf einem hohen Niveau.

Die bisherige Beschränkung der für den EST verwendeten ES Zellen auf einen Zeitraum von 25 Passagen ließe sich mit auf *Feeder Layer* kultivierten ES Zellen auf 50 Passagen erweitern und würde so eine bessere Ausnutzung von geeigneten Zellpopulationen ermöglichen.

Für die Beurteilung der Zellpopulation im Hinblick auf ihre Eignung für die Durchführung des EST ist eine Quantifizierung der SSEA-1-positiven Zellen bzw. AP-Aktivität notwendig.

Die Zell- bzw. Koloniemorphologie und die immunzytochemischen bzw. zytochemischen Nachweise von SSEA-1-Expression und Alkalischer Phosphatase-Aktivität der ES Zellen sind unsichere Methoden, den Differenzierungsstatus von embryonalen Stammzellen im Zellverband zu beurteilen. Auch die durchflusszytometrische Bestimmung der AP-positiven Zellen ermöglichte keine Vorhersage der Eignung einer Zellpopulation für die Durchführung des EST.

Der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil SSEA-1-positiver Zellen, ebenso wie die im Enzym-Aktivitätstest photometrisch bestimmte AP-Aktivität der Zellen, korrelierte hingegen mit der Differenzierungskapazität dieser Zellpopulationen.

Die Untersuchungen der ES Zellen auf SSEA-1-Expression mittels Durchflusszytometrie oder auf Alkalische Phosphatase-Aktivität mit dem photometrisch ausgewerteten Enzym-Aktivitätstest bieten einfache und schnelle Methoden, über eine Quantifizierung dieser Stammzell-Marker eine Beurteilung der Stammzellpopulation vorzunehmen.

Damit könnte die im Protokoll des EST bisher vorgeschriebene zeitaufwendige Qualitätskontrolle der ES Zellen ersetzt werden bzw. eine Überprüfung der Stammzellpopulation zeitnah zum EST erfolgen.