Etablierung eines Teratommodells von murinen embryonalen Stammzellen zur Prüfung von Substanzen auf Embryotoxizität

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin der Biotechnologie
Maria Stecklum
geb. in Bergen auf Rügen

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

- Dr.-Ing. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Juri Rappsilber
Gutachter:	Prof. Dr. Roland Lauster
Gutachterin:	Dr. habil. Iduna Fichtner
Gutachter:	Prof. Dr. Jens Kurreck

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.12.2014

Berlin 2015

Den Wissenschaftlern geht es wie den Chaoten. Es ist alles da, man muss es nur suchen.

Franz Kern

Für meine Familie.

I. ZUSAMMENFASSUNG

Embryonale Stammzellen werden auf verschiedensten Gebieten der regenerativen Medizin als Hoffnungsträger für zellbasierte Therapien für eine Vielzahl von Krankheiten angesehen. Des Weiteren finden sie im Rahmen der medizinischen Forschung im Bereich der Entwicklungsbiologie, Embryotoxikologie und Pharmakologie vielseitig Anwendung und werden in diesem Zusammenhang als Modellsysteme eingesetzt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung eines Teratommodells aus murinen embryonalen Stammzellen, das einerseits zur Beurteilung der Qualität von Stammzellpräparaten dienen und andererseits für die Entwicklung eines neuen Embryotoxizitätstestsystem genutzt werden sollte. Verschiedene Parameter der Zellkultivierung bzw. der Teratombildung in der NOD/SCID-Maus (Zellzahl, Probenahmezeitpunkt, Markerprofil, Applikationsroute, Biolumineszenz) wurden untersucht. Durch die Analyse des Expressionsprofils auf RNA- und Proteinebene sowie histopathologische Bewertungen und Biolumineszenzanalysen wurden das *in vitro* und *in vivo* Verhalten der embryonalen Stammzelllen (7AC5) charakterisiert und die Einwirkung von Referenzsubstanzen mit embryotoxischem Potenzial bestimmt.

Es wurden folgende Ergebnisse generiert.

1. Murine embryonale 7AC5/EYFP-Stammzellen verhalten sich hinsichtlich Wachstumseigenschaften unter feeder- und serumfreien (7AC5/FF) Kultivierungsbedingungen vergleichbar zur Standardkultur auf Feederzellen (7AC5/MEF). Die 7AC5/FF- und 7AC5/MEF-Stammzellen sind durch eine hohe Expression der Pluripotenzmarker (Oct-3,4, Nanog, Sox2) gekennzeichnet. Nur der Pluripotenzmarker SSEA-1 ist auf 7AC5/FF-Stammzellen signifikant schwächer exprimiert. Jedoch hat die verminderte Expression von SSEA-1 keinen direkten Einfluss auf den pluripotenten Charakter der Zellen. *In vivo* sind 7AC5-Stammzellen durch ein vergleichbares Differenzierungspotenzial und Teratombildungsrate wie 7AC5/MEF-Stammzellen gekennzeichnet.

2. 7AC5/FF-Stammzellen wurden durch Nukleofektion mit einem Luciferaseplasmid als Reportergen stabil transfiziert. Die transfizierten Zellen

(7AC5/Luc) zeigen vergleichbare Wachstumseigenschaften zu nicht-transfizierten Zellen *in vitro* und *in vivo*. Durch die Integration des Luciferaseplasmids in das Zellgenom ist eine semiquantitative Charakterisierung des Engraftmentpotenzials möglich. Nach der Applikation über unterschiedliche systemische und organspezifische Transplantationsrouten in NOD/SCID-Mäuse wurde die Teratombildungsrate in Abhängigkeit von der Zellzahl detailliert untersucht. Es zeigte sich eine zeitlich verzögerte Teratombildungsrate mit abnehmender Zellzahl, die unter anderem durch die Transplantationsroute beeinflussbar war. Die 7AC5-abgeleiteten Teratome wiesen jedoch, unabhängig von den experimentell untersuchten Parametern und Transplantationsbedingungen, ein vergleichbares Differenzierungspotenzial *in vivo* sowie ein charakteristisches Expressionsprofil auf.
Durch die stabile Integration eines Luciferaseplasmids wurde eine duale Reportergen-tragende Stammzelllinie (EYFP- und Luc-Gen) etabliert, deren Zelleigenschaften *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* detektiert werden kann.

3. Zur Etablierung des Embryotoxizitätstestsystems wurde die embryotoxische Wirkung von verschiedenen Referenzsubstanzen aus drei Embryotoxizitätsklassen *in vitro* (zwei Substanzen je Klasse) und *in vivo* (eine Substanzen je Klasse) an 7AC5-Stammzellen untersucht. Die bestimmten IC_{50}-Werte ermöglichten eine erste *in vitro* Klassifizierung der untersuchten Substanzen nach ihrem embryotoxischen Potenzial, sodass Saccharose und Coffein als nicht embryotoxische, Dexamethason und Valproinsäure als schwache und 6-AN und 5-FU als stark embryotoxische Substanzen eingeordnet werden konnten. Zur weiteren Charakterisierung wurden *in vivo* Studien an NOD/SCID-Mäusen mit Saccharose, VPA und 5-FU durchgeführt. Durch die Substanzbehandlung wurde das Teratomwachstum entsprechend der Embryotoxizitätsklasse nicht, moderat bzw. stark gehemmt. Die Behandlung mit der stark embryotoxischen Substanz 5-FU verminderte signifikant die Teratomentwicklung. Außerdem wurde die Vielfältigkeit der Keimblattstruktur in den stammzellabgeleiteten Teratomen negativ beeinflusst. Im Expressionsprofil konnte mittels des untersuchten Markerpanels von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern nur bei der stark embryotoxischen Substanz 5-FU *in vitro* und *in vivo* partielle Unterschiede nachgewiesen werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Teratommodell von 7AC5-Stammzellen in der NOD/SCID-Maus kann unter Verwendung von *in vivo* live Imaging Methoden (Biolumineszenz) genutzt werden, um die Organverteilung, das Engraftment- und Differenzierungspotenzial von embryonalen Stammzellen zu untersuchen.

Des Weiteren ist eine Klassifizierung von neuen Substanzen nach ihrem embryotoxischen Potenzial möglich. Durch Verwendung von humanen embryonalen bzw. induziert pluripotenten Stammzellen zur Teratombildung ist die Etablierung eines humanisierten Testsystems zur Substanztestung in der Maus möglich.

II. ABSTRACT

Embryonic stem cells are a promising tool for cell-based therapies in many fields of regenerative medicine. Furthermore, they play an important role as a model system and research tool for developmental biology, embryotoxicology and pharmacology.

The present work is engaged in the establishment of a teratoma model with murine embryonic stem cells, which can be used on the one hand for the quality assessment of stem cell sources and on the other hand for the development of a new embryotoxicity test system. Different cultivation conditions and the teratoma model (cell number, time point of sample collection, marker profile, application routes, bioluminescence) were characterized. Analyzing the expression profile on RNA and proteine level, histopathological assessment of the samples and bioluminescene studies were used to determine the *in vitro* and *in vivo* behaviour of the murine embryonic 7AC5 stem cell line and the influence of reference drugs with embryotoxic potential on these characteristics.

Folllowing results were achieved:

1. Murine embryonic 7AC5/EYFP stem cells are characterized by a comparable morphology under feeder- and serum-free conditions (7AC5/FF) due to the standard cultivation on feeder cells (7AC5/MEF). 7AC5/FF and 7AC5/MEF stem cells express characteristic pluripotency markers (Oct-4, Nanog and Sox2) on a high level. In contrast, SSEA-1 as a distinctive marker for pluripotency of murine embryonic stem cells is significantly lower expressed in 7AC5/FF stem cells in comparison to 7AC5/MEF stem cells. However, the lower SSEA-1 expression in 7AC5/FF stem cells seems to have no influence on the pluripotent character of the stem cell line. *In vivo* 7AC5/FF and 7AC5/MEF stem cells are characterized by a comparable differentiation potential, teratoma growth and development.
2. 7AC5/FF stem cells were stable transfected with a Luciferase plasmid as a reporter gene. Transfected stem cells (7AC5/Luc) show a comparable *in vitro* and *in vivo* behaviour like non-transfected 7AC5 stem cells. A semiquantitative determination of the engraftment potential was possible after the integration of the luciferase plasmid in the genome of 7AC5 stem cells. After application of these cells through different systemic and organ specific transplantations routes teratoma

growth was investigated in dependent of the cell number. Teratoma development was delayed in time after application of decreasing cell numbers, which was influenced in addition by the transplantation route. However, stem cell derived teratomas are characterized by a comparable teratoma growth, differentiation potential and a distinctive expression profile independent from the investigated experimental parameters and transplantation routes.

By the integration of the luciferase plasmid a dual reporter gene stem cell line (EYFP and Luc gene) was established, whose *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* cell properties can be detected by the analysis of these two reporter genes.

3. For the establishment of the embryotoxic test system with 7AC5 stem cells were investigated *in vitro* (two drugs per group) and *in vivo* (one drug per group) concerning their sensitivity towards reference drugs with different embryotoxic potential (non, weak, strong). By the determination of the IC_{50} values of the investigated drugs *in vitro* a first classification could be conducted. Saccharose and Caffeine were disposed as non embryotoxic, VPA and Dexamethason as weak embryotoxic and 5-FU and 6-AN as strong embryotoxic. For further characterization *in vivo* studies with NOD/SCID mice were performed with Saccharose, VPA and 5-FU. Teratoma growth was not, weak or strong inhibited by the treatment with these three drugs according to their embryotoxic potential. Treatment with 5-FU as a strong embryotoxic drug significantly decreased teratoma growth. Furthermore, the differential variability of the germ layer structures of teratomas was negatively influenced by the treatment. Expression profile of 5-FU treated 7AC5 stem cells and derived teratomas identified partial differences of investigated pluripotency and differentiation markers.

In conclusion, the established teratoma model of 7AC5 stem cells in NOD/SCID mice and the application of live imaging methods (bioluminescence) can be used to determine the organ distribution, engraftment and differentiation potential of embryonic stem cells *in vivo*.

In addition, classification of the embryotoxic potential of new drugs is possible. Using human embryonic or induced pluripotent stem cells for the teratoma model the establishment of a humanized test system in the mouse for embryotoxic drug testing is possible.

III. INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG 3

II. ABSTRACT 6

III. INHALTSVERZEICHNIS 8

1. EINLEITUNG 10

1.1. Klassifizierung von Stammzellen 10

1.2. Eigenschaften muriner embryonaler Stammzellen (mESC) *in vitro* und *in vivo* 12
1.2.1. Kultivierung und Charakterisierung von mESC *in vitro* 12
1.2.2. *In vivo* Eigenschaften von ESC 18
1.2.3. Referenzmarker zur Bestimmung der Zelldifferenzierung 20

1.3. Nachweismethoden von ESC und den daraus abgeleiteten Teratomen *in vivo* 21
1.3.1. Reportergene und Biolumineszenz 23
1.3.2. Gentransfektion 25

1.4. Stammzellabgeleitete Teratome als Modell der Embryonalentwicklung 26

1.5. Embryotoxizität 29
1.5.1. Referenzsubstanzen der Embryotoxizität 32

2. ZIELE 38

3. MATERIAL UND METHODEN 40

3.1. Geräte 40

3.2. Verbrauchsmaterialien 41

3.3. Zellkultur- und Medienzusätze 41

3.4. Chemikalien 42

3.5. Zellbiologische Arbeiten 42
3.5.1. Kultivierung und Inaktivierung von fötalen Mausfibroblasten 42
3.5.2. Kultivierung der murinen embryonalen Stammzelllinie 7AC5/EYFP 42

3.6. Transfektion von 7AC5/EYFP-Stammzellen nach Amaxa (Nukleofektion®) 44
3.6.1. Luciferase-Assay zur Bestimmung der Transfektionseffizienz 46

3.7. Zytotoxizität von Substanzen *in vitro* 46
3.7.1. IC_{50}-Bestimmung *in vitro* 46

3.8. Tierexperimentelle Methoden 48
3.8.1. verwendete Mausstämme 48
3.8.2. Tierhaltung 48
3.8.3. Transplantation von 7AC5-Stammzellen in (immundefiziente) Mäuse 48
3.8.5. Zytotoxizität von Referenzsubstanzen *in vivo* 51

3.9. Histopathologische Untersuchungen der 7AC5-abgeleiteten Teratome 52

3.10. Molekularbiologische Arbeiten 53

3.10.1. Analyse des Expressionsprofils ... 53
3.10.2. Untersuchung der Expression von EYFP ... 55

3.11. Immunologische Methoden ... 56
3.11.1. Immunzytochemischer Nachweis von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern ... 56
3.11.2. Bestimmung von Pluripotenzmarkern mittels Durchflusszytometrie ... 58

3.12. Statistische Analysen ... 58

4. ERGEBNISSE ... 59

4.1. *In vitro* Charakterisierung der murinen embryonalen Stammzellline 7AC5/EYFP ... 59
4.1.1. Kulturbedingungen für die Langzeitkultur ... 59
4.1.2. Transfektion von 7AC5/FF-Stammzellen ... 65

4.2. *In vivo* Untersuchungen mit der Stammzelllinie 7AC5/EYFP ... 73
4.2.1. Etablierung des Teratommodells ... 73
4.2.2. *In vivo* Detektion von 7AC5-Stammzellen durch Biolumineszenz ... 87

4.3. Bestimmung der Embryotoxizität von Substanzen an 7AC5-Stammzellen *in vitro* und *in vivo* ... 104
4.3.1. Zytotoxizität von Referenzsubstanzen *in vitro* ... 104
4.3.2. Einfluss der Referenzsubstanzen auf die Bildung von 7AC5-abgeleitete Teratome ... 114

5. DISKUSSION ... 125

5.1. *In vitro* Verhalten von murinen embryonalen Stammzellen unter feederfreien Bedingungen ... 125
5.1.1. Etablierung einer feeder- und serumfreien Kultur der murinen embryonalen Stammzelllinie 7AC5/EYFP ... 125
5.1.2. Transfektion der 7AC5-Stammzelllinie mit einem Luciferasegen (pLuc) ... 128

5.2. Etablierung des Teratommodells ... 131
5.2.1. *In vivo* Detektion von transfizierten Stammzellen durch Biolumineszenz ... 136
5.2.2. Die NOD/SCID-Mausembryogenese ... 140

5.3. Das Teratommodell zur Testung von Substanzen mit embryotoxischem Potenzial ... 142
5.3.1. *In vitro* Wirkung von Referenzsubstanzen an 7AC5-Stammzellen ... 142
5.3.2. Wirkung von Referenzsubstanzen auf das *in vivo* Verhalten von 7AC5-Stammzellen ... 149

5.4. Ausblick ... 152

6. REFERENZEN ... 154

IV. ANHANG ... 163

V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ... 171

VI. PUBLIKATIONSLISTE ... 174

VII. DANKSAGUNG ... 176

VIII. ERKLÄRUNG ... 177

1. EINLEITUNG

Murine embryonale Stammzellen (mESC) wurden erstmals 1981 erfolgreich durch Evans et al. und Martin et al. aus frühen Mausembryonen isoliert und *in vitro* kultiviert[1,2]. Erst fast 20 Jahre später konnte dies auch für humane embryonale Stammzellen (hESC) durch Thomson et al. 1998 gezeigt und eine stabile Langzeitkultur aus humanen Blastozysten etabliert werden[3]. Damit war die Hoffnung geboren, embryonale Stammzellen in verschiedensten Gebieten der Medizin unter anderem in der Krebsforschung oder zur Regeneration von geschädigten Geweben und Organen einzusetzen. Politische und ethische Aspekte erschweren das Arbeiten jedoch mit hESC vor allem in Deutschland, eine kommerzielle Anwendung ist durch den Gesetzgeber verboten. Zur experimentellen Forschung werden daher bevorzugt ESC aus einer Vielzahl von Tierspezien isoliert. mESC sind ein standardisiertes und anerkanntes Modellsystem aus dem sich auch Eigenschaften von hESC ableiten lassen. Neben dem Einsatz in der Grundlagenforschung dienen mESC auch als Modell für pharmakologische und embryotoxische Studien und ersetzen teilweise durch *in vitro* generierte Daten Tierversuche. Damit sind embryonale Stammzellen im Allgemeinen und mESC im Speziellen ein wichtiges Werkzeug für die medizinische Forschung und das meistgenutzte Modellsystem für Studien zur Embryotoxikologie, Entwicklungsbiologie, Pharmakologie und im Bereich der regenerativen Medizin[4-7].

1.1. Klassifizierung von Stammzellen

Stammzellen sind durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Autoreproduktion, „selfrenewal“) und ihr Differenzierungspotenzial in verschiedene Zelltypen unterschiedlicher Gewebe gekennzeichnet. Grundlage hierfür ist die asymmetrische Zellteilung, wonach aus einer Stammzelle zwei nicht-identische Tochterzellen entstehen. Eine Tochterzelle besitzt weiterhin die pluripotenten Stammzelleigenschaften der Ausgangszelle und erhält damit den Stammzellpool aufrecht, die andere Tochterzelle bildet nach Zelldifferenzierung eine spezialisierte Zelle aus[8].

Nach ihrem Differenzierungspotenzial werden Stammzellen in verschiedene Typen eingeteilt und nehmen damit unterschiedliche Ebenen in der Stammzellhierarchie ein (Abb.1)[9]. Eine einzelne **totipotente** Stammzelle (befruchtete Eizelle) besitzt das Potenzial durch Teilung und Differenzierung einen kompletten Organismus zu bilden und kann sich somit auch zu allen anderen Stammzelltypen entwickeln. **Pluripotente** Stammzellen können nur noch in alle Zelltypen der drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) ausdifferenzieren. Ihnen fehlt im Gegensatz zur totipotenten Stammzelle das trophoektodermale Differenzierungspotenzial und damit die Fähigkeit zur Ausbildung von extraembryonalem Gewebe. Zu dieser Klasse zählen die natürlich isolierten embryonalen Stammzellen aus der Blastozyste (ESC, embryonic stem cells) und die künstlich erzeugten induziert, pluripotenten Stammzellen (iPSC, induced pluripotent stem cell). iPSC konnten erstmals 2006 durch Takahashi und Yamanaka aus nicht pluripotenten somatischen Zellen mittels eines Gencocktails aus vier Genen (c-Myc, Klf-4, Oct-3,4, Sox2) reprogrammiert werden und stellen aufgrund des nicht-embryonalen Ursprungs eine mögliche Alternative zu ESC dar[10].

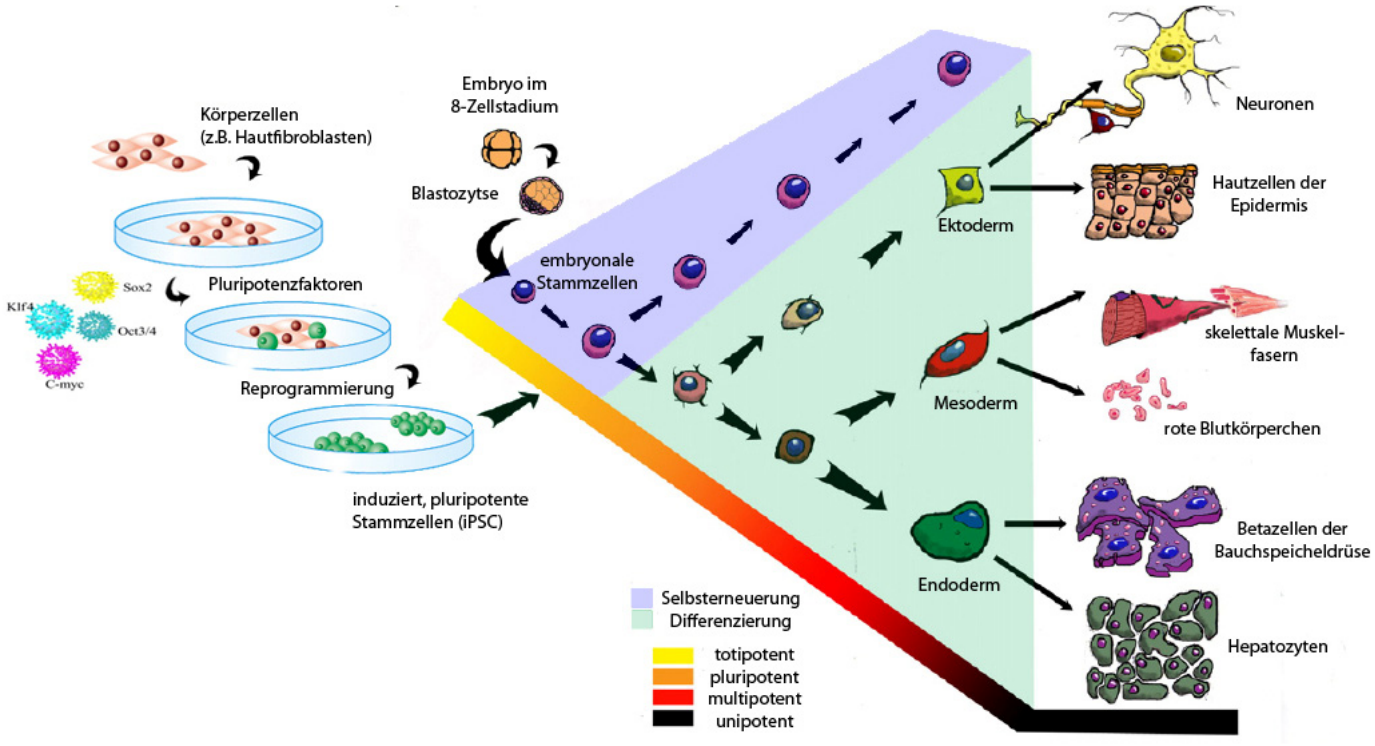


Abbildung 1 Ursprung und Hierarchie von verschiedenen Stammzelltypen
Differenzierungsprozess einer totipotenten Stammzelle über Pluri- und Multipotenz bis hin zu ausdifferenzierten Körperzellen (modifiziert nach Price et al.[9]).

iPSC sind nicht mit ethischen Bedenken behaftet und können andererseits genutzt werden, um patienten- und krankheitsspezifische Stammzelllinien herzustellen. Die iPSC-Generierung hat sich seitdem stetig weiterentwickelt, sodass optimierte Protokolle und Reprogrammierungssysteme zur Verfügung stehen[11]. Aus den pluripotenten Stammzellen (ESC, iPSC) bilden sich über Differenzierungsprozesse **multipotente** Stammzellen, die nur noch durch ein gewebespezifisches Differenzierungspotenzial gekennzeichnet sind. Hierzu zählen alle adulten Stammzellen, die in einer Vielzahl von Organen und Geweben vorkommen. Sie sind für deren Wachstum und gewebespezifische Organregeneration nach Verletzungen und Alterung verantwortlich. Sie konnten unter anderem im Knochenmark/Blut (hämatopoetische Stammzellen), im zentralen Nervensystem, Fett (mesenchymale Stammzellen), Muskel, Leber (Ovalzellen) oder in der Haut nachgewiesen und daraus isoliert werden. Ein weiteres System bilden die **unipotenten** Stammzellen, die nur zu einem Zelltyp ausdifferenzieren können und entsprechend dem keimblattspezifischen Ursprungs zum Beispiel nur Neuronen (Ektoderm), Muskelfaserzellen (Mesoderm) oder Hepatozyten (Endoderm) bilden (Abb.1).
Der Status von Stammzellen, das Überleben und deren Differenzierungspotenzial wird durch ein Netzwerk von Zellen und Zellsignalen gesteuert. Die **Stammzellnische** ist ein komplexes System aus biochemischen und biomechanischen Informationen von Zellen, wozu unter anderem die direkte Interaktion von organspezifischen Zellen mit Stromazellen oder deren Oberflächenmarkern, mit löslichen Faktoren oder auch Proteinen der Extrazellulären Matrix gehören[12].

1.2. Eigenschaften muriner embryonaler Stammzellen (mESC) *in vitro* und *in vivo*

1.2.1. Kultivierung und Charakterisierung von mESC *in vitro*

Murine embryonale Stammzellen (mESC – murine embryonic stem cells) werden aus der inneren Zellmasse der frühen Blastozysten gewonnen, den sogenannten Blastozystenstadium-Embryonen (blastocyste stage embryos). Dies entspricht dem Tag 3.5/4 der Mausembryogenese (Abb.2, 3). mESC sind kommerziell erhältlich und Basisprotokolle zur Kultivierung dieser Zellen *in vitro* sind etabliert.

Um den pluripotenten Charakter der isolierten Zellen aufrecht zu erhalten, werden ESC standardmäßig auf Feederzellen kultiviert. Diese werden durch Gammastrahlung oder chemische Behandlung mitotisch inaktiviert und weisen somit kein Proliferationspotenzial mehr auf[13]. Als Feederzellen für mESC werden murine embryonale Fibroblasten (MEF) genutzt. Diese gehen direkte und indirekte Zell-Zell-Wechselwirkungen mit Stammzellen ein. Durch sezernierende, differenzierungshemmende Faktoren unterdrücken sie zum Beispiel eine spontane Differenzierung der pluripotenten Stammzellen. Die Feederzellen bilden damit für mESC sozusagen eine *in vitro* Stammzellnische. Einerseits erhöhen sie das Anwachsen der Stammzellen durch die Produktion von Adhäsionsmolekülen und von extrazellulärer Matrix, andererseits unterstützen sie durch das Ausschütten von Wachstumsfaktoren die Vermehrung der embryonalen Stammzellen. Zu diesen sezernierten Faktoren zählen unter anderem FGF-2, TGFβ1, Activin A und BMP4, wobei FGF-2 nur auf mRNA- und nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte[14]. Bei MALDI-TOF-MS-Analysen von MEF-Zellkulturüberständen konnten eine Vielzahl von Proteinen bestimmt werden, wobei diese hauptsächlich dem Zellmetabolismus und Zytoskelett zuzuordnen sind, weiterhin Chaperone, Hitzeschockproteine, Proteine für die Degradation und Turnover, Elektronentransport, Proteinfaltung, Proteinsynthese, Ionentransport, Proteinanordnung, Proteintransport, Reparatur und Komponenten der extrazelluläre Matrix, Signaltransduktion sowie Zelladhäsion[15].

ESC zeigen in Abwesenheit vom Feederlayer oder unter suboptimalen Kultivierungsbedingungen ein **spontanes Differenzierungspotenzial** in die drei Keimblätter und verlieren damit ihren pluripotenten Stammzellcharakter. Die Grundlage zur Unterdrückung der spontanen Differenzierung und damit Etablierung einer feeder- und serumfreien Kultur wurde vor mehr als 20 Jahren mit der Entdeckung des Faktors DIA (Differentiation inhibitory activity) gelegt.

DIA, der später als **LIF** (leukaemia inhibitory factor) bekannt wurde, unterdrückt die spontane Zelldifferenzierung[5,16-18]. Das Polypeptid mit seiner vielseitigen biologischen Aktivität gehört zur Interleukin (IL-) 6 – Familie und reguliert unter anderem die Pluripotenz von mESC über den JAK/STAT3 (JAK – Januskinase; STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription) - Signalweg. Der LIF/STAT3-

Pathway ist für den Erhalt der Pluripotenz *in vitro* für mESC essentiell. *In vivo* zeigen LIF-Mutanten jedoch eine normale Entwicklung, aber die maternale Expression dieses Wachstums- und Differenzierungsfaktors ist essentiell bei der Implantation der Blastozyste[19]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass LIF-defiziente Fibroblasten ungeeignet als Feeder für die Selbsterneuerung von mESC *in vitro* sind[20].

Die LIF-Signalkaskade setzt sich über STAT-3-Dimere und die Induktion von Klf-4 und Klf-5 fort. Zusammen mit Klf-2 regulieren sie das Kernnetzwerk der Pluripotenz über die charakteristischen Pluripotenzmarker Oct4, Nanog und Sox2 (Abb. 2, 3)[21].

Das Signalnetzwerk der Pluripotenz von mESC setzt sich somit aus einem komplexen System an Signalkaskaden zusammen, in dem neben LIF auch Bmp4 eine essentielle Rolle einnimmt. Durch die Supplementation von **Bmp4** kann die Zugabe von Serum ersetzt werden und unterdrückt damit vor allem die neuronale Differenzierung von mESC und erhält deren Selbsterneuerung[22,23]. Kontroverser Weise agiert Bmp4 aber auch in der mesodermalen Differenzierungsinduktion von mESC, die jedoch durch LIF blockiert wird.

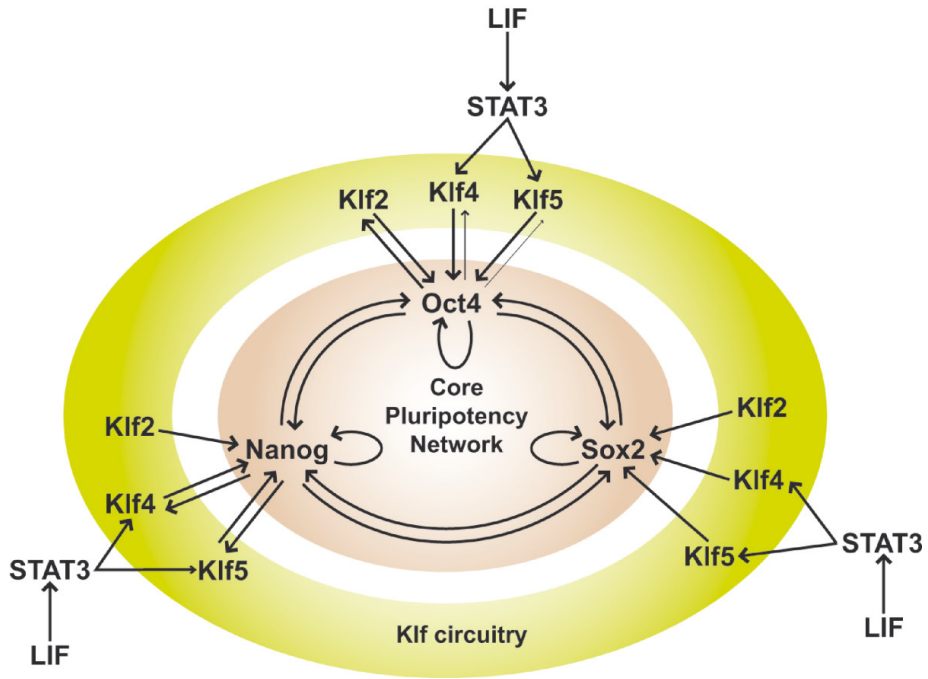


Abbildung 2 Zentrales Transkriptionsnetzwerk von pluripotenten mESC
Über die LIF/STAT3-Signalkaskade werden Klf-4/5 induziert, die im Zusammenspiel mit Klf-2 die zentralen Pluripotenzmarker Oct4, Nanog und Sox2 regulieren. Diese wiederum sind über ein Signalnetzwerk miteinander verbunden und regulieren sich gegenseitig, sodass ein komplexes System aus Signalkaskaden entsteht[24].

LIF und Bmp4 zeigen eine synergistische Funktion, die eine Differenzierung unterdrücken und den pluripotenten Charakter der murinen embryonalen

Stammzellen unterstützen[25]. Dies ist ein Charakteristikum von mESC, denn in hESC zeigt LIF keine Wirkung und BMPs fördert eine schnelle Differenzierung selbst in geringen Dosen in eine extraembryonale und/oder mesodermale Richtung[25].

In Abb.2 und 3 ist das komplexe System der wichtigsten Pluripotenzfaktoren und deren Regulation für mESC schematisch zusammengefasst. Die Kenntnisse über das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren war Grundlage für die Etablierung einer feeder- und serumfreien Stammzellkultur.

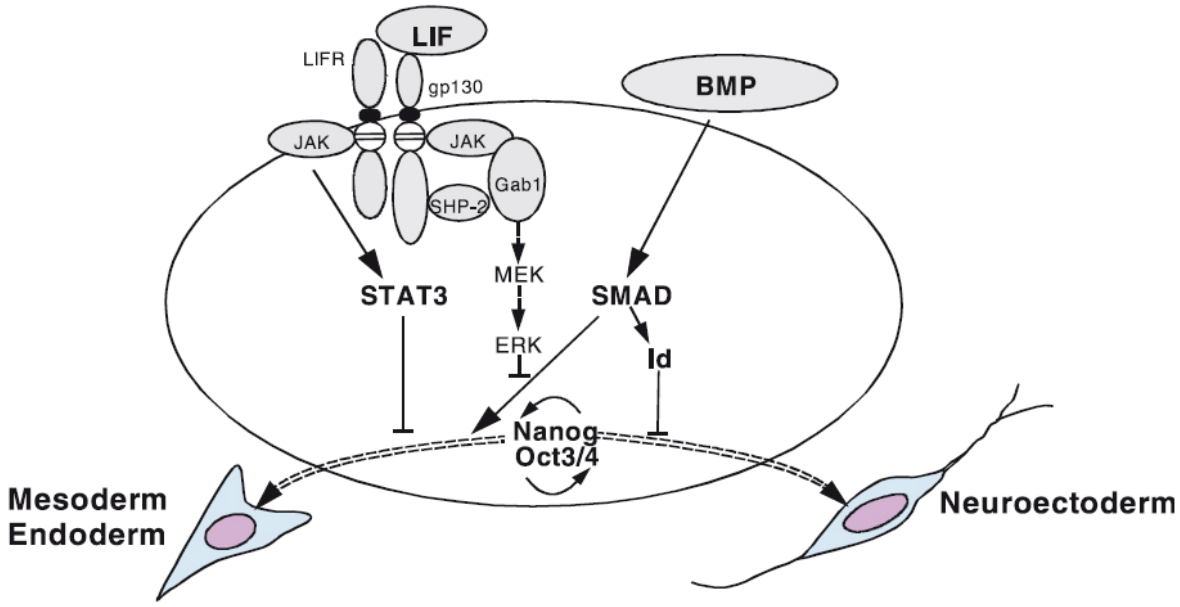


Abbildung 3 Regulation der Selbsterneuerung von mESC über LIF und Bmp4[26]
LIF reguliert die Pluripotenz über eine Signalkaskade, die im Zusammenspiel mit STAT3 vor allem die mesodermale und endodermale Differenzierung hemmt. Diese wird kontroverser Weise von BMP über SMAD induziert. Jedoch ist BMP ebenso essentiell für die Pluripotenz von mESC wie LIF, da durch die Induktion von Id-Genen die neuroektodermale Differenzierung unterdrückt wird.

Der Einsatz von (konditioniertem) Medium von Feederzellen für mESC ermöglicht eine einfachere Analyse der pluripotenten Zellen ohne direkte Ko-Kultur zwischen Feeder- und Stammzellen. Dadurch kann eine Kontamination mit Feederzellen ausgeschlossen werden.

In den letzten Jahren wurden unterschiedliche feeder- und serumfreie Kulturbedingungen etabliert, die den Einfluss dieser beiden Komponenten auf potenzielle Zelldifferenzierungen von mESC ausschließen. Jedoch muss die mESC-Kultivierung zum Erhalt der Pluripotenz für jede Zelllinie optimiert und der Einfluss auf das Expressionsprofil, das Differenzierungspotenzial und das *in vivo* Verhalten untersucht werden.

1.2.1.1 Expressionsprofil und Marker der Pluripotenz von mESC

Undifferenzierte mESC zeichnen sich durch ein charakteristisches morphologisches, phänotypisches sowie RNA- und Proteinexpressionsprofil aus. Das morphologische Erscheinungsbild ist durch eine kompakte, flache Kolonieform gekennzeichnet. Die mESC weisen eine hohe Proliferations- sowie Telomeraseaktivität auf ohne zelluläre Merkmale der Seneszenz. Eine Generationsphase dauert zwischen 9-12h[27]. Ein charakteristischer Oberflächenmarker von undifferenzierten mESC ist das Adhäsionsmolekül SSEA-1, des Weiteren werden die Transkriptionsfaktoren Sox2, Nanog und Oct-3,4 auf hohem RNA- als auch Proteinlevel exprimiert.

Als **Oberflächenmarker** werden spezialisierte Proteine auf der Zellmembran definiert. Diese sind durch unterschiedlichste Strukturen und biologische Aktivitäten gekennzeichnet und können an andere Signalmoleküle binden. Im Gegensatz dazu agieren **Transkriptionsfaktoren** in der Zelle, in dem sie spezifische DNA-Sequenzen erkennen und binden. Diese spezifischen DNA-Abschnitte befinden sich meistens vor einem Gen, dem sogenannten Promotorbereich, wo sie mit anderen Signalmolekülen/-faktoren eine komplexe Transkriptionsmechanerie bilden, die das Ablesen von Genen genau regulieren. Dabei können sie als Enhancer oder Repressor agieren[28].

Als analytisches Werkzeug kann das Expressionsprofil typischer Oberflächenmarker und Transkriptionsfaktoren genutzt werden, um den Differenzierungsgrad von Stammzellen zu bestimmen.

SSEA-1 (Stage specific embryonic antigen-1) als kohlenhydratassoziiertes Molekül kontrolliert unterschiedliche Zelloberflächeninteraktionen während der Entwicklung vor und während der Präimplantationsphase von Mäuseembryonen ab dem Acht-Zell-Stadium, in murinen Keimzellen und auf der Oberfläche von Teratokarzinom-Stammzellen. Im Gegensatz dazu zeigen daraus differenzierte Zellen diese Expression nicht mehr[29,30].

Smith et al. konnte dies auch für mESC zeigen, die in Kultur unter Zusatz von LIF zu 78% SSEA-1 positiv waren. Im Gegensatz zu hESC nimmt die SSEA-1-Expression während der Differenzierung auf mESC ab[31]. SSEA-1 gilt als besonders gut

geeigneter Marker, um die frühen Stadien der Mausembryogenese sowie die Stammzelldifferenzierung zu analysieren.

Oct-3,4 (Octamer binding transcription factor 3,4) als ein wichtiges Pluripotenzgen gehört zur POU-Familie der Transkriptionsfaktoren und spielt eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Stammzellpluripotenz. Dabei ist ein adäquates Level von diesem Faktor wichtig, denn zum Beispiel eine zweifache Erhöhung der Expression induziert wie das Fehlen von Oct-3,4 eine Differenzierung von mESC[32]. Der Faktor beeinflusst während der frühen Entwicklung eine Vielzahl wenn nicht tausende von Genen, die teilweise nicht/wenig bekannt sind. Es spielt dabei eine zentrale Rolle als Aktivator für FGF-4, UTF-1 oder auch Rex-1, reguliert als Repressor unter anderem α,β-HCG-Peptidhormone (humanes Choriongonadotropin) und übernimmt im Oct-4/Sox2-Komplex auch für Osteopontin eine zentrale Funktion[33].

Der Transkriptionsfaktor **Sox2** (sry-related High-mobility Group (HMG) Box-containing) interagiert mit Oct-3,4 im Komplex und spielt ebenfalls eine zentrale Rolle beim Erhalt der Pluripotenz, jedoch wird dieser Faktor auch von multi- und unipotenten SC exprimiert, wohingegen Oct-3,4 nur bei pluripotenten SC detektiert werden kann[31,32].

Nanog ist ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor für die Pluripotenz. Ein hohes Level an Nanog unterdrückt die Differenzierung von mESC sogar in Abwesenheit von LIF[32]. Es wird davon ausgegangen, das Nanog ein Downstreameffektor ist und hauptverantwortlich für den Erhalt des Epiblasten. Der Faktor spielt eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung (Zelldifferenzierungsrichtung in der ICM), Erhalt der Pluripotenz des Epiblasten und Unterdrückung der Differenzierung ins primitive Endoderm. Eine Studie konnte zeigen, das Nanog ein direktes Ziel des LIF-STAT3-Pathways ist. Nanog wird schon früh während der Differenzierung von ESC runterreguliert[31,34].

Pluripotenzmarker sind geeignet um während der Langzeitkultivierung auf RNA und Proteinebene den zellularen Status der Pluripotenz der verwendeten Stammzelllinie zu untersuchen.

Des Weiteren weisen humane und murine pluripotente Zellen eine hohe Alkaline Phosphataseaktivität auf. Diese Enzymeigenschaften konnten bei embryonalen

Stammzellen nach über zweijähriger Kultur mit hunderten von Teilungszyklen nachgewiesen werden[35].

Es sind weitere Faktoren im Zusammenhang der Pluripotenz und ESC beschrieben, deren Bedeutung und Funktionalität jedoch wenig eindeutig sind und daher bei der Stammzellcharakterisierung eine untergeordnete Rolle spielen[32].

1.2.2. *In vivo* Eigenschaften von ESC

In vitro kann der pluripotente Charakter von ESC durch den Nachweis von Pluripotenzmarkern und der gerichteten Differenzierung bestimmt werden, der *in vivo* Beweis für Pluripotenz wird jedoch nur durch den Blastozystentransfer gezeigt. Nach der Injektion von pluripotenten Zellen in eine Wirts-Blastozyste entwickelt sich nach der Implantation in eine scheinträchtige Maus ein vollständiger, lebensfähiger Mausembryo. Im Gegensatz zu Tumorzellen, die nach der Implantation unkontrolliert proliferieren und von außen nicht gezielt Differenzierungssignale zulassen, unterliegen pluripotente ESC dem Signaleinfluss ihrer Umgebung. Das Prinzip dieser Technik dient auch, nach entsprechender genetischer Manipulation der Zellen, als Grundlage der Knock-Out-Maus-Generierung[36].

Für die Transplantation von hESC, bei der chimäre Tiere entstehen, ist dieser Test aus ethischen Gründen unzulässig, hier gilt die Teratombildung *in vivo* als Beweis der Pluripotenz (functional hallmark of pluripotency)[37-39]. Nach der Zellapplikation in ein syngenes (mESC) oder immundefizientes (mESC, hESC, iPSC) Mausmodell wird die Teratombildungsrate quantitativ und qualitativ analysiert. Per Definition ist ein Teratom eine gutartige Geschwulst aus differenzierten Zellen und organoiden Zellverbänden mit variablen Anteilen an undifferenzierten Zellen im Wirtstier. Es können differenzierte Strukturen der drei Keimblätter nachgewiesen werden, beispielsweise neuronales Epithelium oder Plattenepithelschichten (Ektoderms - äußere Keimblatt), Schleimhaut (Endoderm - innere Keimblatt) sowie Knorpel, Knochen, glatte und gestreifte Muskulatur (Mesoderm - mittlere Keimblatt)[40]. In Abb.4 sind die Lage der drei Keimblätter in der Gastrula sowie typische Zellen, die aus dem Ekto-, Endo- oder Mesoderm entstehen, dargestellt.

Die Teratombildung von Stammzellen *in vivo* wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Neben dem Differenzierungsgrad und damit der Expression von Pluripotenzmarkern der Stammzellen sowie extrazellulären Komponenten, trägt die Transplantationsstelle, Hilfsstoffe wie zum Beispiel Matrigel und die Kotransplantation mit anderen Zellen wesentlich zur zellulären Zusammensetzung von Teratomen bei. Es konnte gezeigt werden, dass die Qualität der Stammzellen sowie der verwendete Mausstamm wichtige Faktoren für die Teratombildung darstellen und damit maßgeblich auf das Wachstum Einfluss nehmen[40-44].

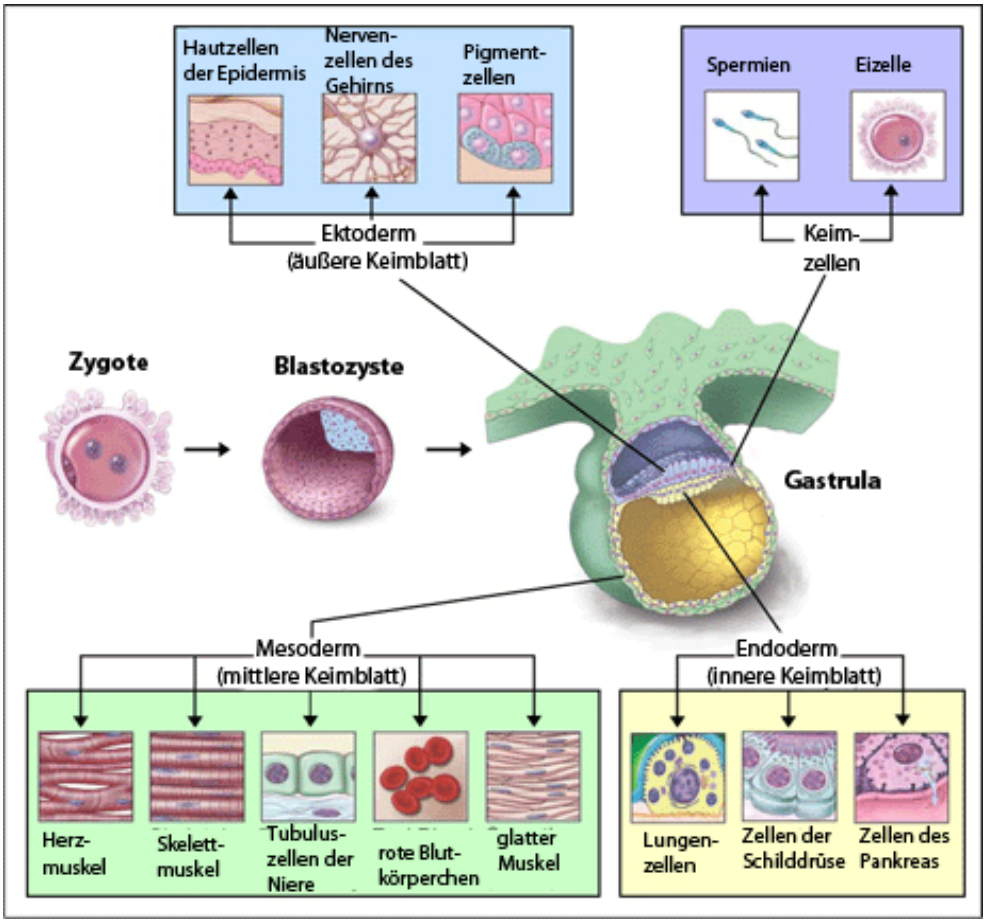


Abbildung 4 Ursprung und Lage der drei Keimblätter
Entwicklung der Blastozyste aus der befruchteten Eizelle bis hin zur Gastrula. Daraus lassen sich die drei Keimblätter nach ihrer Lage zuordnen. Es sind exemplarisch Zellen des Ekto-, Endo- und Mesoderms dargestellt (modifiziert nach www.ncbi.nlm.nih.gov).

Des Weiteren entscheidet die Applikationsstelle deutlich über die Teratomzusammensetzung, da die Mikroumgebung am Transplantationsort das Wachstum und die Differenzierung über Botenstoffe mitbestimmt. Subkutane (s.c. – unter die Haut) Applikation führt zu einem schnellen Wachstum des stammzellabgeleiteten Teratoms, hingegen zeigen experimentelle Transplantationen

ins Knie eine verzögerte Teratombildung mit einem ausgeprägteren Anteil an Knorpel. Der Einfluss der applizierten Zellzahl auf die Teratomentwicklung konnte noch nicht eindeutig belegt werden[45,46].

Zusammenfassend ist ein wesentliches Merkmal der Teratombildung ein verändertes Markerprofil im Vergleich zu undifferenzierten, pluripotenten ESC, das durch eine verminderte Expression von Pluripotenzgenen sowie eine erhöhte Expression an Differenzierungsgenen gekennzeichnet ist.

1.2.3. Referenzmarker zur Bestimmung der Zelldifferenzierung

Während der Differenzierung von pluripotenten Stammzellen über die Ausbildung von frühen Zelltypen der Keimblattstrukturen bis zu ausdifferenzierten Körperzellen, zeigen sich charakteristische Veränderungen im Gen– und Proteinexpressionsprofil. Dieser Prozess steht unter der Kontrolle von Genen mit unterschiedlichen zellulären Funktionen. Über die Analyse des Gen-/ Proteinexpressionsprofils der Zellen und Gewebe kann deren Differenzierungsstatus bestimmt werden. Für jeden Proliferations-, Zell- und Gewebedifferenzierungsstatus des Teratoms kann ein charakteristisches Expressionsprofil beschrieben werden. In Tab.1 sind exemplarisch einige typische Gene der Zelldifferenzierung aufgeführt, deren Expressionsanalyse auch für diese Arbeit verwendet wurde.

Diese zellulären Differenzierungsmarker werden qualitativ/quantitativ auf RNA- und/oder Proteinebene mittels PCR bzw. Immunhistologie nachgewiesen. Durch die Anwendung von Microarray-Analysemethoden ist es möglich, Expressionsprofile von ESC mit mehr als 20.000 Gene unterschiedlichster Funktion zu erstellen[45,47,48]. Diese können unter anderem mit Expressionsprofilen differenzierter Stammzellen (z.B. aus Embryoid-Bodies) verglichen und spezifische Marker für un-, vor- und ausdifferenzierte Zellen definiert werden[27,49].

Tabelle 1 Übersicht charakteristischer Marker der drei Keimblattstrukturen von mESC mit ihrer speziellen Funktion

	Marker	Funktion	Referenz
Ektoderm	Pax6	Schlüsselgen für die Entwicklung von Augen und anderen Sinnesorganen	27,49
	Nestin	Intermediärfilamentprotein Typ VI, das in Nervenzellen exprimiert wird und in der radialen Wachstumsphase involviert ist	50
	β-3-Tubulin	spezifischer Marker für Neuronen	51
	NF200	spezifischer Marker für Neuronen, Hauptbestandteil des Zytoskeletts	27
Mesoderm	Nodal	essentiell für meso-/endodermale Differenzierung, verantwortlich für die Ausbildung der rechts-links-Achse in der frühen Embryogenese → Nodal wird ausschließlich auf der linken Seite exprimiert, gehört zur TGF-β-Familie wird durch eine Vielzahl von Cofaktoren reguliert	27
	Bmp4	Muskelentwicklung, Knochenmineralisierung	49
	Desmin	Einer der ersten Marker während der Embryogenese für Muskelgwebe	50,51
	αSMA	Zellbeweglichkeit, Zellstruktur und Zellvollständigkeit	27,49,50
Endoderm	GATA 4	Transkriptionsfaktor der GATA-Familie, neben GATA-5 und GATA-6 während der Embryogenese verantwortlich für Herzmuskeldifferenzierung und – entwicklung	27
	HNF4α	für Expression verschiedener hepatischer Gene, ist in Entwicklung von Leber, Niere und Darm involviert	27,49-53
	AFP	fetales Plasmaprotein	53,54
	DLK	Reguliert verschiedenste Differenzierungsprozesse (Adipogenese, Osteogenese, neuronale und neuroendokrine Differenzierung)	55,56

1.3. Nachweismethoden von ESC und den daraus abgeleiteten Teratomen *in vivo*

Stammzellen unterschiedlichen Typs und Herkunft werden in der regenerativen Medizin in präklinischen Forschungsprojekten zur Behandlung verschiedensten Krankheiten wie unter anderem Parkinson, Diabetis Melitus Typ II oder auch Herzinfarkt eingesetzt. Weiterführend werden mit hämatopoetischen Stammzelltransplantation in der Klinik schon eine Vielzahl von Krankheiten des blutbildenden Systems sowie Autoimmunkrankheiten behandelt[57,58].

Aus mESC und hESC können durch Differenzierungsinduktion (Zytokincocktails, Ko-Kultursysteme) unterschiedliche Zelltypen (Chondrozyten, Osteoblasten, Hepatozyten) *in vitro* generiert werden, die auf ihr Migrationsverhalten, die Engraftmentrate, das Differenzierunsgpotenzial und die Funktionalität *in vivo* untersucht werden[59,60]. Wesentlicher einschränkender Aspekt der Anwendbarkeit von ESC für klinische Fragestellungen sind ihre Tumorigenität und andere Nebenwirkungen wie hervorgerufene Immunreaktionen. Daher sind präklinische, tierexperimentelle Testsysteme sowie Nachweismethoden für Stammzellpräparate

zu etablieren, die das *in vivo* Verhalten (Engraftment, Migration, Differenzierungspotenzial) der transplantierten Zellen beschreiben.

Nach subkutaner Transplantation von embryonalen Stammzellen kann das Wachstum von Teratomen im syngenen/immundefizienten tierexperimentellen Modell quantitativ durch Vermessung der Tumorgröße bestimmt werden. Für eine potenzielle klinische Anwendung der Stammzelltherapie sind jedoch andere Transplantationsrouten von Bedeutung. Bei akuten oder chronischen Erkrankungen wie zum Beispiel kardiovaskuläre Erkrankungen, Leberinsuffizienz, werden systemische oder organspezifische Applikationen von Zellen angewandt. *Ex vivo* können transplantierte Zellen bzw. ihr Engraftment, Expansion und Funktionalität im Gewebe über sensitive Nachweismethoden auf genetischer als auch Proteinebene mittels PCR, FACS, Immunhistochemie oder mittels pathologischer Untersuchungen in Tiermodellen bestimmt werden. Zur Detektion von humanen Zellen in tierexperimentellen Studien (Xenograftsystemen) werden humanspezifische Primer und Antikörper für PCR oder Immunhistochemie eingesetzt[61]. Neben dem Nachweis der Gewebeintegration und Funktionalität der Zellen sind Stabilität und Expansion der transplantierten Zellen von Bedeutung. Moderne, nicht-invasive Live-Imaging Methoden gewinnen zunehmend an Bedeutung. Größtenteils befinden sie sich aber bezüglich ihrer Auswertung und Anwendbarkeit noch in der präklinischen Testung. Zu nennen sind unter anderem SPIO-MRT (superparamagnetic iron oxide – Superparamagnetische – Eisenoxid - Magnetresonanztomographie), Fluoreszenz-Imaging, MRS (Magnetresonanzspektroskopie), SPECT (single photon emission computed tomography - Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie), PET (Positronen-Emissions-Tomographie) oder Ultraschall[61,62].

Im Allgemeinen zeichnen sich diese Methoden durch eine hohe biophysikalische Sensitivität und niedrige Nachweisgrenze von transplantierten Zellen aus. Als Nachteil sind unter anderem die physikalischen Belastung der Ausgangszellen und der hohe apparative Aufwand der Detektion von stammzellabgeleiteten Transplantationen zu nennen. Außerdem lassen sich die zu untersuchenden Zellen nicht permanent z.B. mit Eisenpartikeln markieren, die unter anderem für den Nachweis mittels MRT benötigt werden. Mit jeder weiteren Zellteilung reduziert sich

die Anzahl an Eisenpartikeln je Zelle und damit minimiert sich auch die Detektierbarkeit[63].

Neuere Arbeiten beschreiben alternative Methoden, die detektierbare **Reportergene** in die Zielzelle einschleusen. Das Gen wird stabil in das Genom der Zielzelle integriert und wird somit mit jeder Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben. Damit kann das Reportergen und somit die Zielzelle zeitlich unbegrenzt nachgewiesen werden[62,64].

1.3.1. Reportergene und Biolumineszenz

Reportergene sind Gene, die in einem Vektorsystem oft hinter einem Promotor oder Enhancer gekoppelt sind und dadurch eine regulierbar und/oder erhöhte Expression aufweisen. Klassische Reportergene sind das grünfluoreszierende Protein (GFP) oder das LacZ-Gen. Sie werden hauptsächlich für Expressionsstudien genutzt und können leicht *in vitro* und *ex vivo* fluorimetrisch oder kolorimetrisch mittels kommerziell erwerblicher Nachweissysteme selbst in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden[65].

EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) gehört ebenfalls zu den fluoreszierenden Proteinen und wurde in viele Zelllinien ähnlich wie GFP inkorporiert. Beide Proteine können direkt *in vitro* mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Der Extinktionspeak von EYFP liegt bei 514nm und der Emissionspeak bei 527nm (www.microscopyu.com).

Für Live-Imaging Methoden sind diese Reportergene jedoch nicht geeignet. Aufgrund der physiologischen Eigenschaften der Versuchstiere (Fell) und der Empfindlichkeit der meisten Geräte ist es schwer, fluoreszierende Proteine *in vivo* nachzuweisen. Geeignetere Methoden der Wahl für die *in vivo* Detektion von reportergen-markierten Zellen sind Biolumineszenz-Imaging-Methoden.

Als **Biolumineszenz** wird dabei die enzymatische Reaktion bezeichnet, bei der detektierbares Licht von einem lebenden Organismus produziert wird. Dieses Phänomen tritt in der Natur bei einigen Nicht-Säugern auf. Sea pansy (Renilla reniformis) und Firefly (Photinus pyralis) sind nur zwei Vertreter dieser Spezies[65].

Die Enzymreaktion dieser Reportergenklasse ist sehr genau quantifizierbar und sowohl *in vitro* als *in vivo* einfach zu detektieren. Die Luciferasereaktion ist zum

Beispiel im unteren Pikogrammbereich nachweisbar. Da Säugetiere bzw. ihre Organe natürlicherweise keine Biolumineszenzeigenschaften aufweisen, ist diese Methode durch einen geringen Hintergrund gekennzeichnet und dadurch auch sehr sensitiv[66]. Je nach biologischem System liegen die Nachweisgrenzen bei einigen Hundert bis tausend Zellen. Für das Live-Imaging in der Maus sind verschiedensten Applikationsrouten (bevorzugt i.p. bzw. i.v.) von D-Luciferin als Substrat der Reaktion möglich; es ist nach kürzester Zeit in den meisten Organen und Zellen verfügbar und durch eine hohe *in vivo* Stabilität gekennzeichnet[62]. Des Weiteren konnten keine toxischen Effekte nach mehrfacher Applikation dokumentiert werden[67].

Die Biolumineszenzeigenschaften von Photinus pyralis sind am detailliertesten untersucht. Die Expression des 61kDa Firefly Luciferasegens (Luc) führt zur Produktion des Enzyms Luciferase, dass D-Luciferin in die nicht-reaktive Form Oxyluciferin umsetzt, wobei grünes Licht der Wellenlänge 562nm emittiert wird. Die emittierten Lichtquanten können mittels einer CDD-(cool-charged couple device – gekühltes, ladungsgekoppeltes Bauteil) Kamera dokumentiert werden[66].

Durch das Einschleusen in die gewünschte Zielzelle können diese *in vivo* durch Biolumineszenzaufnahme im zu untersuchenden Tiermodell und z.B. deren Organverteilung nachgewiesen werden.

Die Anwendung der Biolumineszenz erlaubt longitudinales Monitoring und Analyse von Parametern des Krankheitsverlaufes oder der Therapiebehandlung im gleichen Tier über den gesamten Versuchszeitraum. Hierdurch kann die Tieranzahl und damit die biologische Varianz zwischen den Tieren bei einer Langzeitmessung reduziert werden. In der Literatur sind Tumormodelle beschrieben, die das Wachstum der Tumore, ihr Metastasierungsverhalten sowie einen möglichen Therapieeffekt/-effizienz durch Biolumineszenz-Imaging dokumentieren[68]. Im Vergleich zur Radiographie wurde mittels Biolumineszenz unter anderem bei Knochenmarkmetastasen eine deutlich höhere Sensitivität nachgewiesen[69,70].

Im Vergleich zu anderen *in vivo* Live-Imaging Methoden wie MRT oder CT sind die Kosten und die Messzeit für den Nachweis durch Biolumineszenz gering. Die Methode wird vielseitig im präklinischen Forschungsbereich eingesetzt. In Modellen mit hämatopoetischen Stammzellen wurden unter anderem CD34-Stammzellen

lentiviral mit Luciferase transfiziert und konnten im NOD/SCID Mausmodell im Knochenmark nachgewiesen werden[64]. Biolumineszenz-Imaging wird vor allem aber auch im Bereich der Tumor- und Stammzellforschung eingesetzt. Der Therapieeffekt im Kleintiermodell wurde bei verschiedensten Tumorentititäten (z.B. Gehirn, Lunge, Brust) mittels Biolumineszenz dokumentiert[62,71]. Aber auch im Bereich der regenerativen Medizin wird diese Methode verwendet, um das Regenerationspotenzial unterschiedlicher Stammzelltypen zu untersuchen (u.a. Knochenformation, Muskelstammzellen)[72].

Für jede dieser Anwendungen muss zuvor in die gewünschte Zielzelle das Luc-Reportergen durch Gentransfektion eingeschleust werden.

1.3.2. Gentransfektion

Als Transfektion wird der Prozess beschrieben, bei dem Fremd-DNA oder -RNA in eine eukaryotische Zielzelle transferiert wird. Je nach Stabilität der Integration wird zwischen einer zeitweiligen (transiente) oder dauerhaften (stabile) Transfektion ins Zielgenom unterschieden. Bei der viralen Transfektion werden verschiedene virale Systeme zum Gentransfer verwendet. Hauptsächlich finden in der präklinischen Forschung Vektorsysteme Anwendung. Dazu zählen Onkoretroviren, Lentiviren, Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren und Herpes simplex-1 Viren[70,73].

Bei der **chemischen** Transfektion werden Verbindungen wie Calcium-Phosphat, Liposomen, Polymere oder Nanopartikel genutzt, die DNA gut binden oder einlagern können. Diese DNA-Vehikel werden wiederum durch Endozytose (Calcium-Phosphat-Präzipitation) oder durch Fusion (Lipofektion) mit der Zellmembran in die Zelle geschleust. Ähnlich erfolgt die biologische Transfektion, wobei hier biologische Transportmechanismen wie Transferrin oder Antikörper genutzt werden.

Beim **physikalischen** Gentransfer wir die Zelle direkt mit Fremd-DNA „beschossen" (Particel Gun) bzw. injiziert (Mikroinjektion) oder es werden kurzzeitig Löcher in der Zellmembran geschaffen, wodurch der Gentransfer erfolgt. Dies kann durch Ultraschall (Sonooperation), elektrischen Strom (Elektroporation) oder durch Anlegen eines magnetischen Feldes (Magnetofektion) erfolgen.

1.3.2.1 Nukleofektion

Eine Weiterentwicklung der Elektroporation stellt die Nukleofektion der Firma Amaxa dar. Sie ist besonders für schwer zu transfizierende Zellen geeignet. Für eine Vielzahl von Zelllinien wurde der Transfektionsprozess durch zelllinienspezifische Parameter (elektrischer Impuls, Transfektionslösung) optimiert. So konnten hämatopoetische, mesenchymale und embryonale Stammzellen mit dieser Methode transfiziert werden (www. amaxa.com).

Durch die Kombination von Reportergenen und damit die Integration von zwei oder mehrerer dieser Gene in die gewünschte Zielzelle können Zelllinien generiert werden, die einfach *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* nachzuweisen sind.

Luc-Reportergene eignen sich vor allem für den *in vivo* Live-Nachweis (Verteilung, Engraftment und Migration) von Zellen. *Ex vivo* können Zellen mit fluoreszierenden Reportergenen wie GFP oder auch EYFP leicht mittels FACS oder PCR nachgewiesen werden. Somit sind duale Reportergensysteme einerseits für den einfachen Nachweis von Zellen mit unterschiedlichen Methoden gut geeignet, können aber unter anderem auch für kombinierte Expressionsstudien genutzt werden.

Somit müssen je nach Frage- bzw. Zielstellung die Reportergene gewählt und eine duale Reportergen-tragende Zelllinie generiert werden.

1.4. Stammzellabgeleitete Teratome als Modell der Embryonalentwicklung

Die Embryogenese der Maus beginnt mit der Befruchtung der Eizelle, die sich nach 24h im Zwei-Zellstadium befindet. Nach dem Vier- bis Acht-Zellstadium entwickelt sich aus der befruchtete Eizelle die Blastozyste, aus der pluripotente Stammzellen isoliert werden können. Im Zuge der weiteren Embryonalentwicklung stülpt sich die Blastozyste ein und bildet die Gastrula mit den drei Keimblättern aus. Nach der Implantation entwickeln sich hieraus zum Tag 7 die ersten Organanlagen unter anderem für das Herz. Am Tag 9 der Entwicklung werden erste Nervensystemkompartimente angelegt und zum Tag 10 bildet sich die Lunge aus. Mit dem Fortschreiten der Embryonalentwicklung kommt es vermehrt zur Ausdifferenzierung und weniger zum Wachstum des Organismuses. Der gesamte Prozess dauert in der Maus etwa 20 Tage (Abb.5)[74].

Beim Menschen laufen vergleichbare Prozesse ab, jedoch sind diese zeitlich verzögert und umfassen etwa 280 Tage. Aufgrund der Nichtverfügbarkeit von humanem Material nach der Postimplantationsphase werden für die Untersuchung der humanen Embryogenese Modellorganismen verwendet. Im Hinblick darauf stellt die Maus mit einem vergleichsweise kurzen Generationszyklus ein häufig genutztes Modell für die Säugetierentwicklung unter normalen Bedingungen bzw. während eines Krankheitsverlaufs dar[74-76].

Im Vergleich zu anderen Wirbeltierklassen, bei denen im Ei alle notwendigen Bestandteile dem sich entwickelnden Embryo für Entwicklung und Wachstum zur Verfügung stehen, sind Säugerembryonen auf die Versorgung durch die Plazenta der Mutter angewiesen. Deshalb können *in vitro* generierte Daten, die durch Analyse und Differenzierung von mESC und hESC gewonnen wurden, als Grundlage zum Verständnis der Embryogenese dienen, spiegeln jedoch nicht den tatsächlichen Zustand *in vivo* wider. Hierzu müssen bis dato Tiermodelle genutzt werden.

Neben dem heranwachsenden Embryo im Muttertier ist zu prüfen, ob das stammzellabgeleitete Teratom ein Modell der Embryogenese darstellt. Wie unter 1.3. beschrieben, bilden pluripotente Stammzellen nach *in vivo* Applikation gewebeartige Strukturen, die Parallelen zur Embryogenese aufweisen. Damit reflektieren ESC-abgeleitete Teratome möglicherweise Stadien der normalen Embryonalentwicklung. Es wurde daher postuliert, dass Teratome ein vielversprechendes Modell zur Untersuchung früher Stadien der Embryonalentwicklung sein können[75-78]. Mausmodelle der Embryonalentwicklung erscheinen daher prüfenswert und waren Gegenstand einiger Arbeiten, die Parallelen aufzeigen konnten[74,78,79]. Im murinen Modellorganismus konnten in humanen stammzellabgeleiteten Teratom Strukturen nachgewiesen werden, die morphologisch Ähnlichkeiten zu Keimblattstrukturen zeigten, die sich während der Gastrulationsphase entwickeln. Gertow et al. untersuchte detailliert hESC-abgeleitete Teratome und diskutiert mögliche Parallelen zur humanen Embryogenese[74-76]. Es konnten unter anderem solide Bereiche, die organisierte Zellverbände und Zellpolarisation aufwiesen, zystische Bereiche mit amorpher Substanz und komplexe, organartige Strukturen identifiziert werden. Diese Strukturen scheinen willkürlich organisiert, der organoide Aufbau entspricht aber teilweise normalem Gewebe. Ektodermale Bereiche mit Hautzellen,

Neuronalrosetten, Retinalepithelium, mesodermale Bereiche wie Knorpel, Knochen oder Muskel und endodermale Bereiche mit Darmepithel und Leberzellen sind hier exemplarische Strukturen, die in einem stammzellabgeleiteten Teratom nachgewiesen wurden[76].

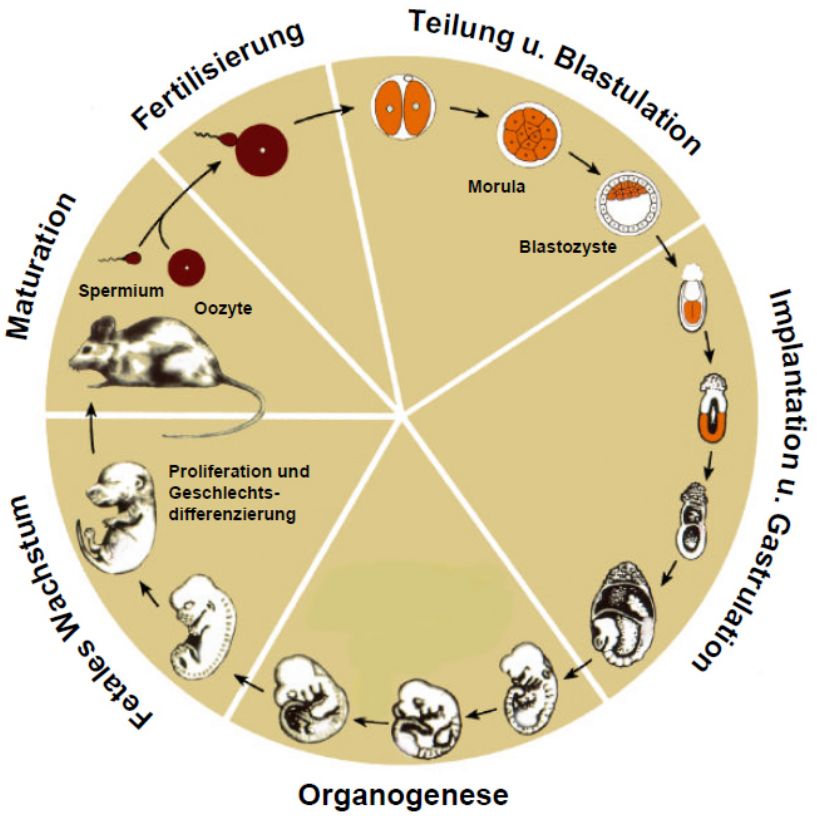


Abbildung 5 Embryonalentwicklung der Maus
Nach der Befruchtung der Oozyte durch das Spermium geht die Eizelle in das Teilungsstadium und Blastulation über. Anschließend folgt die Implantation in die Gebärmutter. Es bilden sich erste Organe aus, die während der Organogenese weiter ausdifferenzieren. In der letzten Phase der Embryonalentwicklung kommt es hauptsächlich zum fetalen Wachstum des Embryos (modifiziert nach Pesce et al.)[80].

Somit kann ein experimentelles Teratom als „manifestation of a failed progress of embryonic development“[78] bezeichnet werden, das normale embryonale Prozesse widerspiegelt, jedoch in einer desorganisierten Art und Weise[40]. Im Gegensatz zum heranwachsenden Embryo können Teratome keinen vollständigen Organismus ausbilden. Ihnen fehlen weitere Information für den „Körperplan“ und zur Faltung und/oder Position von anderen Geweben[77]. Die Bildung von kapselartigen Strukturen um das heranwachsende Teratom verhindert außerdem das Einwandern der stammzellabgeleiteten differenzierten Zellen in das umgebende Gewebe, sodass diese Zell-Zell-Wechselwirkungen unterbunden werden. Somit liegt die Ursache für

die diffuse und desorganisierte Zusammensetzung von Teratomen hauptsächlich in der fehlenden Zell-Zell-Kommunikation zur Entwicklung eines normalen Embryos, was im Gegensatz zu pluripotenten Stammzellen eine einzelne totipotente Stammzelle besitzt.

Neben dem strukturellen Aufbau zeigen Teratome auch Parallelen zum Entwicklungsprozess eines Embryos auf. Gerecht-Nir et al. zeigten, dass die Vaskulogenese im hESC-abgeleitetem Teratommodell einem ähnlichen Schema folgt, wie die humane Neovaskulogenese während der Embryonalentwicklung[27].

Aus den Literaturdaten kann geschlussfolgert werden, dass eine genauere Analyse der Teratomentwicklung von ESC in Mausmodellen Informationen über die Gewebebildung und Embryogenese liefern kann.

Die strukturelle Zusammensetzung und Entwicklung von mESC- und hESC-abgeleiteten Teratomen in Mausmodellen weisen viele Parallelen auf und ähneln der murinen bzw. humanen Embryogenese. Damit können mESC als Modell für die Generierung, Langzeitkultivierung, Differenzierung und genetische Manipulation von ESC eingesetzt und zum grundlegenden Verständnis der Embryogenese verwendet werden[81,82].

1.5. Embryotoxizität

Die Embryotoxikologie ist ein Teilgebiet der Reproduktionstoxikologie und untersucht den Einfluss von Substanzen auf die Entwicklung der Nachkommen vor und nach der Geburt. Je nach Grad der Embryotoxizität kann die Wirkung einer Substanz zu Letalität, Teratogenität oder Wachstumsverzögerungen beim Embryo, Fetus bzw. Neugeborenen führen. Dies ist maßgeblich vom Zeitpunkt der Exposition und der Toxizität des Wirkstoffes abhängig. Während der **frühen Embryogenese** (Fertilisation, Präimplantation, Entwicklung der Embryonalscheibe) führt eine teratogene Substanz zur Schädigung eines Großteil bzw. aller Zellen und damit zum Abort oder es werden nur wenige Zellen geschädigt und damit gelangt der Embryo zur vollständigen Regeneration. In der **Embryonalperiode** (Organogenese und Extremitätenbildung) kann es zu schweren, mannigfaltigen Missbildungen durch die Exposition mit einer toxischen Substanzen kommen, wohingegen in der Phase des

fetalen Wachstums meist funktionelle und kleinere morphologische Defekte auftreten (schematische Darstellung der Embryonalentwicklungsphasen in Abb.5)[81].
Dabei laufen komplexe Prozesse ab, die je nach Substanz unterschiedlichen Wirkmechanismen folgen: einerseits die direkten Wechselwirkungen zwischen Embryo/Fetus und Substanz (u.a. Bindung an endogene Moleküle wie DNA oder Proteine oder Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung), andererseits kinetische Parameter der Substanzwirkung wie Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion durch die Mutter (oder auch den Embryo/Fetus)[83-85].
In vitro Testsysteme dienen zur präklinischen Bewertung einer Substanz, um diese nach ihrem embryotoxischen Potenzial zu klassifizieren und erste Abschätzungen über mögliche Wirkmechanismen zu treffen. Vor allem im Vergleich chemisch eng verwandter Substanzen können mögliche Reaktionen mit *in vitro* Studien aufgeklärt werden. Die *in vitro* Charakterisierung basiert auf verschiedenen Endpunkten, um embryotoxische Parameter zu untersuchen. Zur Zeit werden hierfür die nachfolgenden Testsysteme verwendet (Tab.2).
Beim **Micromass-Test** werden Zellsuspensionen der Extremitätensprossen von Rattenembryonen mit der Testsubstanz kultiviert und Veränderungen auf Knorpelzellen mittels Alcian-Blau-Färbung dokumentiert. Der Embryokultur (Whole Embryo Culture Test - WEC-Test) basiert auf der Rollerkultur von Nager-Embryonen im Testmedium unter Zusatz der zu untersuchenden Substanz. Nach einer Inkubationsphase von 48h werden morphologische, funktionale, entwicklungs- und wachstumsspezifische Veränderungen dokumentiert. Der **Embryonale Stammzelltest** (EST) basiert auf der Kultivierung von mESC. Nach der Inkubation mit der Testsubstanz wird der Einfluss auf die spontane Ausdifferenzierung in Kardiomyozyten untersucht. In Tab.2 sind die Methoden und Parameter zusammenfassend dargestellt.
Alle drei ***in vitro* Systeme** mit Säugerzellen bieten eine Möglichkeit, die Embryotoxizität von Substanzen in größerem Umfang zu bestimmen, jedoch können sie nicht den maternalen Einfluss sowie komplexe Stoffwechselprozesse im Embryo/Fetus widerspiegeln. Für die *in vivo* Bewertung der Wirkung von Substanzen mit embryotoxischem Potenzial sind die Resultate von *in vitro* Versuchen nur eingeschränkt aussagekräftig.

Tabelle 2 ***In vitro*** **und** ***in vivo*** **Testsysteme zur Bestimmung der Embryotoxizität**

in vitro	
Test	**Testverfahren und Charakteristika**
Micromass-Test	• Isolation der Extremitätenknospeln von Rattenembryonen • dissoziieren der Zellen • Aussaat in hoher Zelldichte • Kultivierung mit Testsubstanz über 5 Tage • Anfärbung mit knorpelspezifischen Farbstoff Alcian Blau • Prüfung von Substanzen, die spezifisch auf Differenzierung der Extremitätenknospen in Knorpelzellen wirken
Embryokultur - Whole Embryo Culture Test	• Entnahme von Maus- oder Rattenembryonen zum Tag 9/10 der Trächtigkeit • Kultivierung in Rollerkultur mit Testsubstanz über 48h • Bestimmung von morphologischen, funktionalen, entwicklungs- und wachstumsspezifischen Parametern • Organogenese ohne maternale Einflüsse
Embryonaler Stammzelltest	• murine embryonale Stammzelllinie ES-D3 differenzieren spontan in kontrahierende Herzmuskelzellen • Kultivierung mit Testsubstanz • Auszählung der Anzahl spontan gebildeten, kontrahierenden Zellen
in vivo	
Test	Testverfahren
Pränatale Toxizitätsstudie	• OECD 414 • 100 Muttertiere, 800 – 1.500 Feten • Behandlungsdauer: Ratte (Tag 6 – 19 der Trächtigkeit) Kaninchen (Tag 6 – 28 der Trächtigkeit) • morphologische Bewertung der Embryonen • Studiendauer mit Auswertung: 6 – 12 Monate
Zwei-Generationsstudie	• OECD 416 • 400 Elterntiere, 3.000 – 4.500 Feten • Behandlungsdauer: ca. 10 – 11 Monate • Studiendauer mit Auswertung: 18 – 24 Monate
Screening-Studien	• OECD 421 + 422 • 80 Elterntiere, ca. 600 Jungtiere • Behandlungsdauer: 2 Monate • Studiendauer mit Auswertung: ca. 6 Monate
Ein-Generationsstudie	• OECD 415 • 200 Elterntiere, ca. 1.500 Feten • Behandlungsdauer: ca. 5 Monate • Morphologische Bewertung der Embryonen und Elterntiere • Studiendauer mit Auswertung: ca. 5 – 10 Monate
Verlängerte Ein-Generationsstudie	• OECD 443 • 200 Elterntiere, ca. 2.800 Feten • Behandlungsdauer: ca. 5 – 10 Monate • Studiendauer mit Auswertung: ca. 18 Monate

Zur Arzneimittelentwicklung und –zulassung sind Tierversuche laut Arzneimittelgesetz – AMG §§25-26 vorgeschrieben. Weitere Richtlinien sind bei der Europäische Arzneimittelagentur (European Medicines Agency - EMEA; CPMP/ICH/386/95), der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organisation for Economic Cooperation and Development - OECD;

Richtlinien, 414-416, 421, 422) festgehalten bzw. wurden auf der Internationalen Konferenz für Harmonisierung (International Conference on Harmonisation, ICH) festgelegt, je nachdem ob es sich um einen potentiellen Arzneistoff oder eine Chemikalie handelt. Bewertungskriterien der Substanzwirksamkeit sind hier sowohl die Fruchtbarkeit der Elterntiere sowie die Wirkung auf den sich entwickelnden Embryo/Fetus an Nagern und Nicht-Nagern.

In Tab.2 sind die wichtigsten *in vivo* Testsysteme und deren Charakteristika zusammengefasst.

1.5.1. Referenzsubstanzen der Embryotoxizität

Entsprechend der OECD-Richtlinien zur Etablierung neuer Embryotoxizitäts-Testsysteme wurden Referenzsubstanzen mit unterschiedlichem embryotoxischem Potenzial definiert. Grundlage sind Resultate von Smith et al., der die sogenannte „Smith-Liste" erstellte. Hier ist die embryotoxische Wirksamkeit von 47 Referenzsubstanzen aufgelistet, die durch weitere Charakterisierungen auf 309 Substanzen ergänzt wurden[86]. Nach diesen Substanzwirkungen auf die Embryonalentwicklung werden die Referenzsubstanzen in drei Klassen unterteilt und werden als stark, schwach oder nicht embryotoxisch definiert. In Tab.3 sind exemplarisch Substanzen für jede Klasse aufgelistet und deren Wirkung *in vivo* beschrieben.

1. <u>Stark embryotoxische Substanzen</u>

Stark embryotoxische Substanzen sind in allen getesteten Organismen toxisch, die verschiedenste Entwicklungsstörungen hervorrufen und sich durch einen hohen A/D-Wert auszeichnen.

$$A/D = \frac{adulteToxizität}{embryonalerToxizität}$$

Die niedrigste Dosis mit erkennbarer Wirkung wird zwischen maternaler/adulter und embryonaler Toxizität ins Verhältnis gesetzt, sodass sich der A/D-Wert ergibt. Für diese Arbeit wurden 5-Fluorouracil und 6-Aminonicotinamid als Referenzsubstanzen dieser Embryotoxizitätsklasse ausgewählt.

Tabelle 3 Referenzsubstanzen für jede Embryotoxizitätsklasse und ihre *in vivo* Aktivität[85]

	Substanz	*in vivo* Aktivität
stark embryotoxisch – Klasse 3	5-Brom-2-Deoxyuridine	eindeutig, stark entwicklungstoxische Substanz
	Methotrexat	Untersuchung in vielen Organismen, verursacht verschiedenste Effekte
	5-Fluorouracil	
	all-*trans*-Retinsäure	Untersuchung in vielen Organismen, hoher A/D
	6-Aminonicotinamid	
schwach embryotoxisch – Klasse 2	Dexamethason	entwicklungstoxisch in vielen Organismen, hoher A/D
	PCDD*	
	Borsäure	entwicklungstoxisch in vielen Organismen, induzierte verschiedenste Effekte, embryotoxische Konzentration liegt unter maternal toxischer Konzentration
	Lithiumchlorid	
	Valproinsäure	
	Natriumsalicylat	entwicklungstoxisch in vielen Organismen, induzierte Effekte sind klar von maternaler Toxizität zu unterscheiden, jedoch liegen sie dicht an dieser Konzentrationsgrenze
	Ethanol	
nicht embryotoxisch – Klasse 1	Acrylamid	nicht entwicklungsschädigend bei maternal maximal unschädlicher Konzentration, jedoch minimale embryonale/fetale Toxizität bei hoher maternal toxischer Konzentration, kann somit nicht von maternaler Toxizität unterschieden werden
	D-(+) Camphor	
	Penicillin G-Natriumsalz	
	Saccharin NatriumhHydrat	

* Polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane

5-Fluorouracil (5-FU)

5-FU ist ein Fluorpyrimidin. Aufgrund der Strukturanalogie zur Pyrimidinbase Uracil kann es in die RNA eingebaut werden und führt zur fehlerhaften Bildung von RNA, die damit ihre Funktion verliert. Außerdem hemmt 5-FU die Thymidilat-Synthase, ein Schlüsselenzym der Pyrimidin-Biosynthese. Dadurch kommt es nicht zur Umwandlung von dUMP in dTMP, dass als DNA-Baustein fungiert und die Duplikation der DNA wird inhibiert, wodurch die Replikation der Zelle gestoppt wird. Aufgrund dieser Eigenschaften wird 5-FU als Zytostatikum vor allem in der Chemotherapie maligner Tumore (kolorektale Karzinome, Brustkrebs) eingesetzt[87].

6-Aminonicotinamid (6-AN)

6-AN ist ein Antimetabolit der Nikotinsäure. Es inhibiert das $NADP^+$-abhängige Enzym 6-Phosphogluconatdehydrogenase und damit den Pentose-Phosphat-Weg. Dieser spielt eine zentrale Rolle in der Synthese von NADPH und Ribosemolekülen, die wiederum für die Biosynthese und die Reparatur von DNA benötigt werden. Durch diese biochemischen Eigenschaften wird 6-AN vor allem in der Krebstherapie eingesetzt und zeigt unter anderem in der Kombinationstherapie mit Strahlung oder auch Chemotherapeutikern vielversprechende Ergebnisse[88-92].

In Tierversuchen konnte nach der 6-AN-Behandlung jedoch auch embryotoxische Effekte beobachtet werden. Besonders der ektodermale Anteil des embryonalen Gewebes reagiert sensitiv auf die Substanzgabe von 6-AN[93]. Unter anderem wurden Zahnentwicklungsstörungen bei Rattenembryonen beobachtet[94].

2. Schwach embryotoxische Substanzen

Schwach embryotoxische Substanzen sind eine sehr heterogene Gruppe. Einige Vertreter verursachen embryonale Entwicklungsstörung in Konzentrationsbereichen, die klar von der maternalen Toxizität zu unterscheiden sind, gekennzeichnet durch einen großen A/D-Wert. Bei anderen Vertretern entspricht die embryotoxische Konzentration fast der maternal toxischen Konzentration, sodass ein geringer A/D-Wert zwischen >2 und ≥ 1 ermittelt wurde.

Als Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit Dexamethason und Valproinsäure ausgewählt.

Dexamethason (Dex)

Dex ist ein künstliches Glucocorticoid (Nebennierenrindenhormon), das sich durch seine antiinflammatorische, antiallergische und immunsupprimierende Wirkung auszeichnet. Zum körpereigenen Hormon zeigt es eine 25fach stärkere Wirkung. Deshalb wird es als Antiepilektikum, bei rheumatischen Erkrankungen, Arthrose, Autoimmunkrankheiten, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, schweren Hauterkrankungen oder auch Wassereinlagerung im Gehirn angewandt.

(http://medikamente.onmeda.de/Wirkstoffe/Dexamethason.html)

Jedoch ist auch seine teratogene Wirkung bekannt und wurde an verschiedensten Spezies (Kaninchen, Maus, Ratte, Hamster, nicht-humane Primaten) untersucht. Bei

erhöhten Dosen führt es unter anderem zur Ausbildung von Lippen- und Gaumenspalte, es wurden aber auch Wachstumsverzögerungen beobachtet[95].

Valproinsäure (VPA)

VPA ist eine synthetisch hergestellte Carbonsäure. Die Säure wirkt verstärkend auf den hemmenden Neurotransmitter GABA sowie als Blockade von erregenden Ionenkanälen. Darin begründet liegt der Einsatz bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen, unter anderem Migräne, bipolare Störungen oder Epilepsie. VPA zählt außerdem zu den Histon-Deacetylase-Inhibitoren, weshalb eine Anwendung in der Krebstherapie in Betracht gezogen wird. Unter anderem wurde es in der Therapie von Gehirntumoren bei Neugeborenen eingesetzt.

VPA ist durch seine Funktionsweise aber auch ein bekanntes Teratogen und verursacht vor allem im ersten Drittel der Schwangerschaft schwere Missbildungen die unter dem „Fetal Valproate Syndrome" zusammengefasst werden. Dazu zählen Spina bifida (offener Rücken) oder auch die Gaumenspalte. Es wurden auch eingeschränkte kognitive Fähigkeiten bei Kleinkindern beobachtet[96,97].

3. Nicht embryotoxische Substanzen

Nicht embryotoxische Substanzen verursachen bei einer toxischen Konzentration für das Muttertier keine embryologischen Missbildungen oder Fehlfunktionen bzw. können die toxischen Effekten auf den Embryo nicht von den maternalen Effekten getrennt werden. Hier ergibt sich ein $A/D < 1$ bzw. kann dieser Wert nicht bestimmt werden. Zu dieser Substanzklasse zählen unter anderem Saccharin und Coffein, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Saccharin (Sac)

Sac ist der erste synthetisch hergestellte Süßstoff und besitz eine 300- bis 700-fach erhöhte Süßkraft wie Zucker. Es wird zur Herstellung von Lightprodukten (Zuckerersatzstoff) und als Geschmacksverstärker genutzt. Studien zeigten ein erhöhtes Risiko für Blasenkrebs bei Ratten, jedoch konnten diese Ergebnisse zum Teil nicht bestätigt werden und die verabreichte Dosis übersteigt bis zum Hundertfachen den Normalverzehr beim Menschen. Des Weiteren schätzt eine Metastudie von 2004 das Krebsrisiko als unbedenklich ein[98].

Somit wird Sac standardmäßig als nicht embryotoxische Referenzsubstanz verwendet.

Coffein (Cof)

Cof ist ein Alkaloid und besitzt eine psychostimulierende, zentralanregende Wirkung. Es kommt natürlich unter anderem in Kaffee, Tee, Cola oder Energy-Drinks und in geringeren Mengen in Kakao vor. Während der Schwangerschaft wird eine maximale Dosis von 300mg/Tag empfohlen, ansonsten könnten Nebenwirkung wie Frühgeburt, intrauterine Wachstumsretardierung oder im schlimmsten Fall eine Fehlgeburt auftreten. Studien zeigten außerdem, dass ein erhöhter Konsum (>300mg/Tag) zur Fruchtbarkeitseinschränkung führen kann[99]. Es ist in der Literatur belegt, dass ein üblicher täglicher Konsum von 50 – 200mg keinen Einfluss auf die normale Embryogenese nimmt[100].

Limitierend sind bei allen *in vitro* und *in vivo* Testsystemen zur Embryotoxizität aber immer wieder die Übertragbarkeit der Resultate von Substanzwirkungen auf den menschlichen Organismus wie unter anderem der Konterganvorfall Anfang der 1960er tragisch zeigte. Während in der experimentellen präklinischen Untersuchung keine Substanzwirkung nachweisbar waren, bewirkte die Verabreichung beim Menschen während der frühen Schwangerschaftsmonate jedoch ein erhöhtes Auftreten von Dysmelien (schwere Missbildung von Gliedmaßen und Organen) und Aplasien (Fehlen von Gliedmaßen und Organen) bei Neugeboren, im Extremfall kam es zur Totgeburt (www.contergan.grunenthal.info).

Zur Prüfung von Substanzen mit embryotoxischem Potenzial sind deshalb Systeme mit unterschiedlichen Endpunkten notwendigen. Des Weiteren müssen sie möglichst genau und detailliert die *in vivo* Situation simulieren und die verschiedenen Entwicklungspunkte der (humanen) Embryogenese widerspiegeln. Als ein Modellsystem werden ESC *in vitro* und *in vivo* unter diesem Gesichtspunkt betrachtet. Mit der Etablierung des *in vitro* Embryonalen Stammzelltest wurde eine Grundlage geschaffen und es wird in einer Vielzahl von Studien die Anwendbarkeit von ESC in neuen *in vitro/in vivo* Testsystemen geprüft und etabliert.

Im Zuge dieser Arbeit sollte ein standardisiertes Teratommodell aus murinen embryonalen Stammzellen in immundefizienten Mäusen erarbeitet werden. Dieses sollte zur Qualitätsüberprüfung von Pluripotenz- und Differenzierungseigenschaften

von Stammzellpräparaten *in vitro* und *in vivo* dienen. Im Weiteren wurde die Eignung dieses Modells als Embryotoxizitäts-Testsystem geprüft.

Die generierten Daten sollen als Grundlage für die Übertragbarkeit auf humane embryonalen Stammzellen und den daraus abgeleiteten Teratomen in der Maus genutzt werden. Die Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit sind wie folgt gegliedert.

2. ZIELE

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Teratommodells aus murinen embryonalen Stammzellen (7AC5-Stammzelllinie) in der immundefizienten Maus, das zur Beurteilung der Qualität von Stammzellpräparaten dienen sollte. Es wurden hierzu verschiedene Parameter (Zellzahl, Engraftmentzeit, Differenzierungspotenzial, Markerprofil) untersucht, um das mESC-Maus-Modell detailliert zu charakterisieren. Des Weiteren sollten die mESC stabil mit dem Luciferase-Reportergen transfiziert werden, um das Engraftment und die Biodistribution der applizierten Zellen mit *in vivo* Live -Imaging zu verfolgen.
Hierzu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Welchen Einfluss haben die Kultivierungsbedingungen und die Reportergentransfektion von murinen embryonalen Stammzellen auf das *in vitro* und *in vivo* Verhalten der Zellen bezüglich der Expression von Markern der Pluripotenz und Differenzierung, Engraftmentrate und Distribution der transplantierten Zellen?
- Welche zellulären und Transplantationsparameter sind für die Charakterisierung und Etablierung des Teratommodells in der Maus wesentlich?
- Prüfung der Anwendbarkeit des Teratoms als Modell der Embryogenese – vergleichende Bewertung der Expressionsprofile von 7AC5-Stammzellen, deren abgeleitete Teratome und Embryonen zu verschiedenen Stadien der Mausembryogenese
- Inwieweit sind *in vivo* Imaging-Verfahren durch Biolumineszenz - neben einer Reduktion von Tierzahlen - zu einer quantifizierbaren Bewertung des biodynamischen Verhaltens der transplantierten Stammzellen im Mausmodell geeignet und welchen Vorteil bringen duale Reportergen-tragende Zelllinien?

Nach der Etablierung und Charakterisierung des Teratommodells sollte die Anwendbarkeit dieses Modells zur Beurteilung der Wirksamkeit von Referenzsubstanzen und deren embryotoxisches Potenzial untersucht werden.

Schwerpunkte der Untersuchung sind:

- Analyse der *in vitro* Wirkung von Referenzsubstanzen mit bekanntem embryotoxischen Potenzial (kein, schwach, stark) auf die murine 7AC5/EYFP-Stammzelllinie – Untersuchung der Zellproliferation und Expression von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern
- Bewertung des Teratommodells als Embryotoxizitätstest zur Klassifizierung von Referenzsubstanzen entsprechend ihrem embryotoxischen Potenzial

Die Ergebnisse der Arbeit sollen zum besseren Verständnis der *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften von Stammzellen dienen, der Charakterisierung der Kultivierungsbedingungen und der Transfektion von Reportergenen zum *in vivo* Monitoring von Zellen.

Des Weiteren wird geprüft, wie sich die embryotoxische Wirkungen von Referenzsubstanzen, Arzneistoffen und bioaktiven Substanzen auf die frühen Formen der Gewebebildung im Teratom mit molekularbiologisch-analytischen Methoden nachweisen lassen und ob eine Korrelation dieser Wirkungen zu denen des klassischen Embryotoxizitätstestes besteht.

Bei erfolgreicher Validierung und Anwendung des zu etablierenden *in vivo* Testmodells ist die Übertragbarkeit und die Verwendung von humanen embryonalen bzw. humanen induziert pluripotenten Stammzellen in weiterführenden Arbeiten zu prüfen. Damit könnte eine weitere Annäherung an die humane Embryogenese erfolgen und deren Beeinflussung durch Arzneistoffe und bioaktive Substanzen im Mausmodell untersucht werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Geräte

Begasungsbrutschrank ($C0_2$-Inkubator C200)	Labotect (Göttingen, Deutschland)
Sicherheitswerkbank Gelaire, BSB4A	ICN Biomedicals (Meckenheim, Deutschland)
Sicherheitswerkbank, Hera-safe, Typ KS-12	Kendro (Langeselbold, Deutschland)
Zentrifuge, AllegraX-22R	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Wasserbad, Typ 1013	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf (Engelsdorf, Deutschland)
Routine-Mikroskop	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Vortexer, V2, Janke & Kunkel	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
FACS Calibur®Durchflusszytometer	Becton & Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
MACSQuant®Analyzer	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Nucleofector® Gerät	Amaxa-Biosystems (Köln, Deutschland)
Glomax Microplate Luminometer	Turner Biosystems (Sunnyvale, USA)
Vakuumpumpe	Inotech (Puchheim, Deutschland)
Feinwaage Typ R200	Satorius (Göttingen, Deutschland)
Routine-Waage Scout Typ SC 6010	OHaus (Florham Park N.J., USA)
pH-Meter HI 9025	Hannah Instruments (USA)
Barnstead E-pure Anlage für Pyrogenfreies Wasser	Barnstead Thermolyne Corp. (Iowa, USA)
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Kamera Fluoreszenzmikroskop AxioCam	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop Leica DMIL	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Kamera Canon	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Stereomikroskop Nikon SMZ100	Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
Nanodrop	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik (Bad Blankenburg, Deutschland)
Pipette, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
realtime PCR-System (TaqMan™)	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
PCR-Kabinett	Baacklab (Schwerin, Deutschland)
Thermocycler	Perkin Elmer (Monza, Italien)
VisiLuxx Imager	Visitron Systems GmbH (Puchheim, Deutschland)

3.2. Verbrauchsmaterialien

Einmalhandschuhe	Sänger (Schrozberg, Deutschland)
Pipettenspitzen (1 ml, 100µl, 200µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Präzisionsspitzen (0,5-10µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einmalpipetten (2, 5, 10 und 25ml, steril)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
50 ml Blue Max (FALCON), steril	Becton/ Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Zellkulturflaschen 25cm², 75cm², 150cm²	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24- und 96-Well)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Centerwell	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
5 ml Round Bottom-Tube (FALCON)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Pasteurpipetten (230mm lang)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Probenröhrchen (0,5ml, 1,5ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Sterilfiltrationseinheit (150-200ml, 500ml)	Nalgene (Meckenheim, Deutschland)
Kryoröhrchen 2ml, steril	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
FACS-Probenröhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
96-Well, weiße Zellkulturplatten	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

3.3. Zellkultur- und Medienzusätze

PBS- Dulbecco (Phosphat- gepufferte Saline)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Glutamax (200mM)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin / Streptomycin (100x)	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
D-MEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) +4500mg/ml Glucose, L-Glutamin - Pyruvat	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypanblau (0,4% Lösung in 0.9% NaCl-Lösung)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Boehringer (Mannheim, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
DMEM HEPES	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
MNEAA	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Insulin/Transferrin/Selenium	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Knockout Serum Replacer	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

Heparin	Braun (Melsungen, Deutschland)
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25%, 0,05% in PBS)	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

3.4. Chemikalien

Ethanol	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Formaldehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

3.5. Zellbiologische Arbeiten

3.5.1. Kultivierung und Inaktivierung von fötalen Mausfibroblasten

Die Isolierung der fötalen Mausfibroblasten (MEF) wurde von Frau Dr. Annika Wulf-Goldenberg (MDC, Max-Delbrück-Centrum Berlin-Buch) durchgeführt. Die Zellen wurden in DMEM mit 10% definiertem FBS, 1% Glutamax, 1% MEM NEAA und 1% Penicillin/Streptomycin (CD1-Medium) bis zu einer Konfluenz von 95-100% herangezogen. Für die Kultivierung und Versuchsdurchführung wurden die Zellen bis zur fünften Passage eingesetzt und dann verworfen.

Die konfluenten MEFs wurden mit 0,05% Trypsin-EDTA abgelöst, in 50ml Röhrchen überführt und gewaschen. Danach erfolgte die Zellinaktivierung. Hiefür wurde das Pellet in 10ml CD1-Medium resuspendiert und mit 30Gy (Cs137-Anlage) bestrahlt. Für die Bestrahlung wurde maximal 1 x 10^6 Zellen pro ml eingesetzt.

In einer gelatinebeschichtete Flasche wurden anschließend 5,5x10^4 Zellen/cm^2 ausgesät und für die spätere Kultivierung der murinen embryonalen Stammzelllinie 7AC5/EYFP verwendet. Überschüssige inaktivierte MEFs wurden zu maximal 2x10^6 Zellen pro ml Einfriermedium eingefroren und konnten für eine weitere Kultivierung wieder aufgetaut werden, wobei eine Passage von p5 nicht überschritten werden sollte.

3.5.2. Kultivierung der murinen embryonalen Stammzelllinie 7AC5/EYFP

Die murine embryonale Stammzelllinie 7AC5/EYFP (ATCC-Nr.SCRC-1033) wurde käuflich von ATCC erworben.

Die 7AC5/EYFP-Stammzellen sind eine gelb fluoreszierende Variante von R1 embryonalen Stammzellen, die aus einer Kreuzung von 129X1 x 129S1 Mäusen gewonnen wurden. Das Enhanced Yellow Fluorescence Protein (EYFP – verstärkt gelb leuchtendes Protein) wurde durch Ko-Elektroporation in die Zellen stabil integriert (nähere Informationen unter www.atcc.org).
Die 7AC5/EYFP Stammzellen wurden für diese Arbeit unter zwei verschiedenen Bedingungen kultiviert.

3.5.2.1. 7AC5/EYFP-Stammzellkultivierung auf Feeder

Für die Kultivierung der 7AC5/EYFP-Stammzellen auf Feeder wurden MEF-Zellen wie zuvor beschrieben inaktiviert und in gelatinebeschichtete Zellkulturflaschen mit einer Konzentration von $6{,}5x10^4$ Zellen/cm^2 ausgesät. Nach zweitägiger Anwachsphase des Feeders wurden 7AC5/EYFP-Zellen aufgetaut.
Die 7AC5/EYFP-Zellen wurden im 37°C Wasserbad schnell erwärmt und nachdem nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen ist in 10ml vorgewärmtes Stammzellmedium (mESC-Medium: DMEM + Pyruvat, Knockout-Serumreplacer, MNEAA, Glutamin, 1% Penicillin/Streptamycin, 1% β-Mercaptoethanol, ESGRO) überführt. Nach dem Waschen wurden die Zellen gezählt und anschließend $1{,}25x10^5$ Zellen/cm^2 ausgesät.
Nach dem erreichen einer 90% Konfluenz der Stammzellkolonien wurden die Zellen passagiert. Zwei Tage vorher wurde der Feeder wie zuvor beschrieben ausgesät.

3.5.2.2. 7AC5/EYFP-Stammzellkultivierung unter feeder- und serumfreien Bedingungen

Für die feeder- und serumfreie Kultur wurde das ESGRO Complete Cell Culture Systeme von Millipore verwendet.

ESGRO Complete Clonal Grade Medium	Kulturmedium
ESGRO Complete Basal Medium	Waschmedium
ESGRO Complete Accutase Solution	Enzym zum Ablösen
ESGRO Complete Gelatine Solution	zum Beschichten der Kultivierungsgefäße
ESGRO Complete Freezing Medium	Einfriermedium

Hierzu wurden unter Standardbedingungen kultivierte 7AC5/EYFP-Stammzellen auf das neue System umgestellt. 24h vor der Passagierung wurde zunächst nur das Medium umgestellt. Es erfolgte ein Mediumwechsel von mESC-Standardmedium

auf Clonal Grade Medium. Nach 24h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 1ml Accutase (T25cm² Zellkulturflasche) im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig abgelöst und in 5ml Basal Medium aufgenommen. Nach der Zentrifugation bei 1000rpm für 3min wurde ein weiterer Waschschritt durchgeführt, die Zellen in Clonal Grade Medium aufgenommen und gezählt. $5x10^5$ 7AC5/EYFP-Stammzellen wurden in eine gelatinebeschichtete T25cm²-Zellkulturflasche ausgesät.

Die Zellen wurden alle zwei Tage mikroskopiert und es erfolgte ein Mediumwechsel. Nach erreichen einer 60-70%igen Konfluenz der Kolonien wurden die Zellen fotografiert und anschließend passagiert. Wie zuvor beschrieben werden die 7AC5/EYFP-Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit Accutase abgelöst, zweimal mit Basal Medium gewaschen und danach in Clonal Grade Medium ausgesät. Die einzelnen Bedingungen für verschiedene Flaschengrößen sind nachfolgend aufgeführt.

Flaschengröße [cm²]	Gelatine [ml]	Accutase [ml]	Medium [ml]	Einsaatzellzahl
T25	4	1	10	$5x10^5$
T75	8	3	15	$1,5x10^6$
T150	15	6	30	$3x10^6$

Zum **Einfrieren** der 7AC5/EYFP-Stammzellen wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit Accutase abgelöst und mit Basal Medium gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in Freezing Medium resuspendiert und eine maximale Konzentration von $2x10^6$ Zellen pro ml Einfriermedium eingestellt. Nach dem Überführen in Einfrierröhrchen wurden die Zellen über Nacht im Mr.Frosty auf -80°C runtergekühlt und für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Für das **Auftauen** wurden die Zellen im Wasserbad schnell erwärmt und in vorgewärmtes Basal Medium überführt. Nach dem Waschen wurden die Zellen gezählt und wie zuvor beschrieben ausgesät.

3.6. Transfektion von 7AC5/EYFP-Stammzellen nach Amaxa (Nukleofektion®)

Die murine embryonale Stammzelllinie 7AC5/EYFP wurde mittels der Nukleofektionstechnologie von Amaxa transfiziert. Diese Transfektionsmethode

beruht auf dem Prinzip der Elektroporation, wodurch kleine Poren in der Zellmembran entstehen und so die DNA direkt in den Zellkern geschleust werden kann. Durch optimierte Programme und Zelltyp-spezifische Lösungen kann eine hohe Effizienz sowie Stabilität erreicht werden.

Für diese Arbeit wurde das pGL4.51[luc2/CMV/Neo]-Vektorsystem verwendet. Der 6358bp große Vektor ist ein kommerziell erwerbliches Produkt der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) und ist in Abb.6 dargestellt.

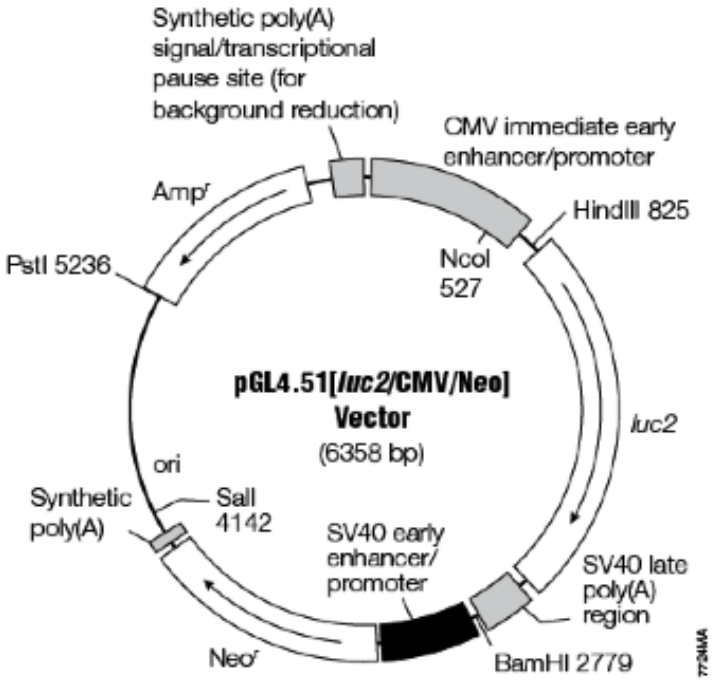


Abbildung 6 Vektorkarte des verwendeten Plasmids für die Nukleofektion: pGL4.51 (Promega)

Das Plasmid wurde mit Hilfe des Mouse ES Cell Nucleofector® Kit (Amaxa) in die feederfrei kultivierten 7AC5/EYFP-Zellen eingeschleust. Hierzu wurde das Kit nach Herstellerangaben verwendet (Abb.7). Zur Optimierung wurden parallel die Programmen A-13, A-23, A-24 bzw. A-30 verwendet. Nach der Nukleofektion wurden die Zellen in vorgewärmtem Clonal-Medium in 6well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf ihre Viabilität hin untersucht und es erfolgte ein Mediumwechsel. Zum Tag 1 wurde mit der Selektion über G418 bei 300µg/ml gestartet. Die Konzentration wurde mit jeder Passagierung erhöht bis ein Maximalwert von 1000µg/ml erreicht wurde. Mit jeder Passagierung wurden Proben zur Expressionsanalyse genommen sowie die Zellen auf ihre Luciferaseaktivität hin überprüft.

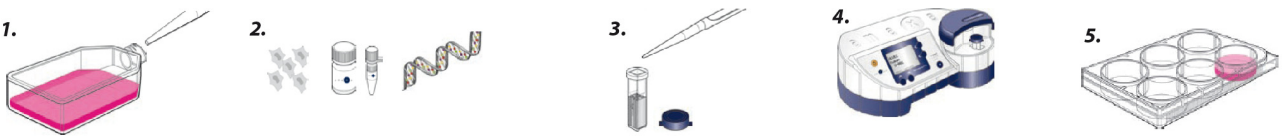


Abbildung 7 Nukleofektionsprozess nach Amaxa
Die Zellen werden abgelöst (1), in der Nukleofektionslösung mit DNA resuspendiert (2) und in eine Küvette überführt (3), anschließend das zellspezifische Programm ausgewählt (4) und wieder in ein Zellkulturgefäß überführt

3.6.1. Luciferase-Assay zur Bestimmung der Transfektionseffizienz

Während der Kultivierung wurden die Luciferaseaktivität der transfizierten 7AC5-Stammzellen nach jeder Passagierung bestimmt.

Hierzu wurden $2x10^5$ Zellen, sowohl nicht- sowie transfizierte Zellen, in 100µl PBS aufgenommen und in eine Lumineszenz-geeignete Platte überführt.

Für die Bestimmung wurde der Luciferase-Assay von Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden 5min in 80µl Lysis-Puffer aufgeschlossen, anschließend mit 100µl Luciferase-Assay-Reagenz inkubiert und sofort in ein Plattenluminometer überführt.

Die Proben wurden dreimal gemessen und ein Mittelwert der Luciferaseaktivität bestimmt. Für diese Arbeit wurden folgende Messparameter verwendet: Verzögerungszeit vor der Messung 0,5sec und Integrationszeit 10sec.

Das Prinzip des Luciferase-Assays basiert auf der Umwandlung von Luciferin in die nicht-reaktive Form Oxyluciferin durch das Enzym Luciferase. Diese Reaktion läuft unter Sauerstoff- und ATP-Verbrauch ab. Als Co-Faktoren werden Magnesiumionen vom Enzym benötigt. Bei dieser Oxidation wird CO_2 und Energie in Form von Lichtquanten freigesetzt, die bei einer Wellenlänge von 562nm detektiert werden können.

3.7. Zytotoxizität von Substanzen *in vitro*

3.7.1. IC_{50}-Bestimmung *in vitro*

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der eingesetzten Referenzsubstanzen wurde der Proliferationsassay Vialight ™ Plus Cell Proliferation der Firma Lonza eingesetzt.

Am Vortag wurden 7AC57EYFP Stammzellen mit einer Mehrkanalpipette in eine 96well-Zellkulturplatte überführt. Je Vertiefung (well) wurden 400 Zellen in 100µl

ESGRO Complete Plus Clonal-Medium ausgesät. Der Rand wurde mit 200µl PBS befüllt und diente als Verdunstungsschutz.

Tag 0

Die Referenzsubstanzen wurden kurz vor Einsatz in Medium in den entsprechenden Konzentrationen verdünnt, hierzu wurde für jede Substanze eine Stammlösung hergestellt. Das Medium auf den Zellen wurde vorsichtig abgesaugt und je nach Versuchsbedingungen mit den Referenzsubstanzen im zehnfach Ansatz behandelt.
Im fünffach Ansatz wurden unbehandelte Zellen sowie reines Medium mitgeführt, die als Kontrolle dienten.

Tag 2

Die Referenzsubstanzen wurden wie zu Tag 0 mit Medium auf die einzelnen Verdünnungen eingestellt, das Medium vorsichtig aus jedem well abgesaugt und frisches Medium (mit Substanz) hinzupipettiert.

Tag 4

Zur Bestimmung der IC_{50}-Werte der ausgewählten Referenzsubstanzen im verwendeten System (7AC5/EYFP-Zelllinie unter feeder- und serumfreien Bedingungen) wurde der Vialight-Assay nach den Herstellerangaben eingesetzt. Zunächst wurden die Zellen mittels eines Lysepuffers aufgeschlossen, um das zelleigene ATP freizusetzen. ATP dient bei diesem Test als Indikator für die Zellproliferation. Mit einer steigenden Zellzahl nimmt proportional auch das ATP zu, das über ein Biolumineszenzsignal detektiert wird. Das freigesetzte ATP dient als Cofaktor für die Luciferasereaktion, die unter 3.6. beschrieben wurde.
Nach der Bestimmung der Luciferaseaktivität jedes wells wurde aus dem zehnfach Ansatz ein Mittelwert gebildet, der ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gesetzt wurde. Diese IC_{50}-Bestimmung wurde mindestens dreimal für jede Referenzsubstanz wiederholt und der ermittelte IC_{50}-Wert mit Standardabweichung angegeben.

Tabelle 4 Referenzsubstanz für die in vitro Charakterisierung mit 7AC5-Stammzellen
Die für diese Arbeit verwendeten Referenzsubstanzen wurden in den aufgeführten maximalen Konzentrationen eingesetzt. Für alle Substanzen wurde eine Stocklösung mit Medium angesetzt, mit Ausnahme von Dexamethason, das zunächst in Ethanol gelöst wurde und anschließend mit Medium runterverdünnt wurde.

Referenzsubstanz	max. Konzentration	Lösungsmittel für Stammlösung
Saccharose	2500µg/ml	Medium
Coffein	1000µg/ml	Medium
Valproinsäure	200µg/ml	Medium
Dexamethason	100µg/ml	Ethanol
6-Aminonicotinamid	1000ng/ml	Medium
5-Fluoruracil	150ng/ml	Medium

3.8. Tierexperimentelle Methoden

3.8.1. verwendete Mausstämme

129S6 129S6/SvEvTac (Taconic, Dänemark)

NOD/SCID NOD.CB17-Prkdc^{scid} (Jackson Laboratories, USA)

3.8.2. Tierhaltung

Alle Experimente wurden unter Einhaltung der geltenden Richtlinien für die Haltung und Behandlung von Labortieren durchgeführt. Die Versuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin genehmigt (G0221/03; G0124/09). Die Tiere wurden unter konstantem 12-Stunden Hell-Dunkel-Zyklus und spezifischen pathogenfreien Bedingungen in klimatisierten Räumen in IVC-Belüftungssystemen gehalten (Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland). Es erfolgte eine ad libitum-Fütterung mit autoklavierten Pellets (ssniff, Soest, Deutschland) und autoklaviertem, angesäuerten Wasser (pH=4) zur freien Verfügung.

3.8.3. Transplantation von 7AC5-Stammzellen in (immundefiziente) Mäuse

Die Transplantation von embryonalen Stammzellen wurden durchgeführt, um die Qualität und Pluripotenz der Zellen zu überprüfen. Des Weiteren sollte durch verschiedene Applikationsrouten das Teratommodell etabliert und detailliert charakterisiert werden, um dieses zum Einsatz als Embryotoxizitätssystem zu

prüfen. Außerdem sollte die Funktionalität der Luc-transfizierten Stammmzellen *in vivo* untersucht und die Anwendbarkeit bei verschiedenen Transplantationsrouten bestimmt werden.

Zum Zeitpunkt der Zelltransplantation waren die Mäuse zwischen sechs und acht Wochen alt. Für diese Arbeiten wurden vier verschiedene Transplantationsrouten angewendet.

3.8.3.1. Subkutane Transplantation

Unterschiedliche 7AC5-Stammzellen (7AC5/MEF, 7AC5/FF und 7AC5/Luc) wurden wie zuvor beschrieben kultiviert. Zur subkutanen (s.c.) Transplantation wurde die gewünschte Zellzahl in 50µl PBS aufgenommen und mit 50µl Matrigel versetzt. Anschließend wurden die Zellen unter die Haut auf der linken Körperseite gespritzt.

3.8.3.2. Intrahepatische und intrasplenale Transplantation

Für die organspezifische Applikation der Zellen wurde die gewünschte Zellzahl in 20µl PBS aufgenommen.

Für die intrahepatische (i.hep.) Transplantation wurden die Versuchstiere mit 0,4ml Hypnomidate (Janssen-Cilag, Neuss)/20g Maus narkotisiert. Anschließend wurde das Abdomen mit einem medianen Längsschnitt geöffnet und die Zellen in den links-lateralen Leberlappen appliziert. Die Bauchdecke wurde mit einem sterilen Faden vernäht und die Felldecke geklammert.

Die intrasplenale (i.splen.) Transplantation wurde ebenfalls unter Narkose durchgeführt. Es erfolgte ein Schnitt auf Höhe der Milz, die zur besseren Applikation der Zellen etwas freigelegt wurde. Nach der Transplantation der Zellen in den unteren Milzbereich wurde die Bauchdecke ebenfalls vernäht und die Haut geklammert.

Während der Aufwachphase wurden die Tiere auf einer Wärmedecke gelegt. Nach Abheilen der Wunde wurden die Klammern entfernt.

3.8.3.3. Intravenöse Applikation

Für die intravenöse (i.v.) Applikation der Zellen wurde die gewünschte Zellzahl in 200µl PBS eingestellt. Bei einer sehr hohen Zellzahl wurde das Volumen auf maximal 400µl PBS erhöht. Dies wurde ganz langsam über die Schwanzvene appliziert.

3.8.4. *In vivo* Biolumineszenz Imaging

Für die *in vivo* Untersuchung der Biolumineszenz wurde das zuvor etablierte NOD/SCID-Mausmodell verwendet. Es wurden vier verschiedene Applikationsrouten (i.splen., i.hep., s.c. und i.v.) untersucht, um die Anwendbarkeit der transfizierten Zellen für spätere Modelle zu untersuchen und die Zelldistribution und das Engraftmentpotenzial zu charakterisieren. Die untersuchten Zellzahlen und Messzeitpunkte sind in der Tab.5 zusammengefasst.

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurde den Mäusen 5mg/kg Luciferin (30mg/ml dest.Wasser, AAT Bioquest) i.p. verabreicht. Vergleichend wurden Versuche mit i.v. Applikation des Luciferins durchgeführt, die jedoch keine Verbesserung der Luciferinverteilung zeigten. Das Signal war bei gleicher Intensität zu gleichen Messzeitpunkten nachweisbar. Nur die zeitliche Bioverfügbarkeit war durch die i.v. Applikation von Luciferin etwas verkürzt, spielte jedoch durch die begrenzte Narkosezeit keine Rolle bei den gewählten Versuchsbedingungen.

Nach der Verabreichung des Luciferins wurden die Mäuse mittels Isofluran-Inhalation narkotisiert. Anschließend wurden die Mäuse in die Messkammer eines VisiLuxx Imagers (Visitron Systems GmbH) gelegt, wo sie weiterhin mit der Inhalationsnarkose verbunden waren. Über die VisiView-Software wurde zunächst ein Hellfeldbild der zu vermessenen Tiere und anschließend ein Lumineszenzsignal über 30min aufgenommen. Dabei erfolgten 30 Messungen nach einminütiger Exposition. Nach der Etablierungsphase wurde die Messzeit auf 10min verkürzt. Die Auswertung erfolgte mit der MetaMorphOffice-Software. Hier wurde das aufgenommene Luciferasesignal nach der Intensität ausgewertet. Bei einem schwachen Signal wurden die Einzelsignale summiert, bei einem starken Signal wurde ein Mittelwert aus der Messreihe gebildet. Des Weiteren wurde das

Lumineszenzbild mittels Overlay mit dem aufgenommen Hellfeld zusammengefügt. Das Overlay wurde in der Arbeit dargestellt.

Tabelle 5 Zusammenfassung der Versuchsbedingungen für die Biolumineszenz
7AC5/Luc-Stammzellen wurden in unterschiedlichen Zellzahlen i.hep., i.splen., i.v. und s.c. appliziert. Die Luciferasemessung erfolgte täglich bis zum Nachweis eines Signals. Anschließend wurden die Tiere wöchentlich gemessen.

Applikationsroute	Zellzahl	Applikationsvolumen	Luciferasemessung
intrahepatisch	$1x10^6$ $1x10^5$ $1x10^4$ $1x10^3$ $1x10^2$	25µl in PBS	täglich bis zum Auftreten des ersten Signals, dann und in Folgeversuchen wöchentlich
intrasplenal	$1x10^6$ $1x10^5$ $1x10^4$ $1x10^3$ $1x10^2$	25µl in PBS	täglich bis zum Auftreten des ersten Signals, dann und in Folgeversuchen wöchentlich
intravenös	$1x10^6$ $5x10^6$ $1x10^7$	200µl in PBS 200µl in PBS 200µl in PBS 400µl in PBS 2x200µl in PBS	täglich bis zum Auftreten des ersten Signals, dann und in Folgeversuchen wöchentlich
subkutan	$1x10^6$ $1x10^5$ $1x10^4$ $1x10^3$ $1x10^2$	1:1 PBS:Matrigel	täglich bis zum Auftreten des ersten Signals, dann und in Folgeversuchen wöchentlich

3.8.5. Zytotoxizität von Referenzsubstanzen *in vivo*

Zur Charakterisierung der Zytotoxizität der ausgewählten Referenzsubstanzen auf die Teratombildungsrate wurden immundefizienten NOD/SCID-Mäusen $1x10^6$ 7AC5-Zellen s.c., i.splen. bzw. i.hep. transplantiert. Es wurden sowohl 7AC5/FF als auch 7AC5/Luc-Zellen verwendet, um das Teratomwachstums sowie den Therapieerfolg durch Behandlung live über den Versuchszeitraum zu dokumentieren.

Am Tag 1 nach der Zellapplikation wurde mit der Behandlung der Tiere begonnen. Dabei wurden folgende Versuchsbedingungen gewählt. Je Embryotoxizitätsklasse wurde eine Referenzsubstanz ausgewählt.

Tabelle 6 Versuchsbedingungen zur in vivo Charakterisierung der Embryotoxizität

Referenzsubstanz	Konzentration	Applikationsroute	Behandlung
NaCl	0,9%ige Lösung	i.p.	täglich
Saccharose	1500mg/kg/KG	oral	täglich
VPA	250mg/kg/KG	i.p.	2x täglich
5-FU	100mg/kg/KG 50 mg/kg/KG	i.p.	1x wöchentlich 2x wöchentlich

Das Tumorvolumen und die Gewichtsentwicklung wurden zweimal wöchentlich dokumentiert. Das Biolumineszenzsignal wurde ebenfalls zweimal wöchentlich erfasst. Nach spätestens vier Wochen wurde der Versuch beendet.

3.9. Histopathologische Untersuchungen der 7AC5-abgeleiteten Teratome

Zur Charakterisierung des pluripotenten Status der 7AC5/EYFP Stammzellen und des Einflusses von Substanzen auf die Teratombildung *in vivo* wurden histopathologische Untersuchen der 7AC5 abgeleiteten Teratome durchgeführt. Nach der H&E-Färbung wurde nach den Strukturen der drei Keimblätter Endo-, Ekto- und Mesoderm gesucht.

Die entnommenen Proben wurden in Formalin eingebettet. Am Mikrotom wurden Schnitte angefertigt und auf Objektträger überführt. Anschließend wurden die Schnitte entparaffinisiert (100%Xylol, 10min) und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2min 100%, 90%, 70%Ethanol) rehydriert. Durch eine 2min Inkubation in einer 0,1%igen Hämatoxylinlösung wurden die Zellkerne und in 0,1%igem Eosin das Zytoplasma angefärbt. Diese Arbeiten sowie die histopathologische Bewertung der Schnitte wurden am Institut für Tierpathologie Berlin (Prof. Haider) durchgeführt.

3.10. Molekularbiologische Arbeiten

3.10.1. Analyse des Expressionsprofils

Zur Charakterisierung des Expressionsprofils von undifferenzierten sowie differenzierten 7AC5/EYFP-Stammzellen und deren Teratomen wurde die RNA aus den Proben isoliert und mittels quantitativer real-time RT-PCR analysiert.

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

RNeasy Micro Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy Midi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
RNAse freies Wasser	Qiagen (Hilden, Deutschland)

3.10.1.1. RNA-Isolation aus Zellen

Je nach vorhandener Ausgangszellzahl wurde das RNeasy Micro Kit (wenige Zellen bis etwa $1x10^6$) oder Mini Kit (ab $1x10^6$ Zellen) verwendet.

Die zuvor gewonnenen Zellpellets wurden aufgetaut und mithilfe des Qiagen Kits die totale RNA isoliert. Nach Herstellerangaben (Qiagen) wurden die Zellen zunächst mit einem Lysepuffer behandelt und die RNA aus dem Zelllysat über chromatographische Säulen isoliert und aufgereinigt. Zur Entfernung noch vorhandener DNA wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt. Nach der Elution der Proben mit RNase-freiem Wasser betrug das Volumen der RNA-Lösung je nach Ausgangszellzahl zwischen 20µl und 50µl.

3.10.1.2. RNA-Isolation aus Geweben, Organen, Teratomen und Embryonen

Zur Aufarbeitung von Gewebe- bzw. Teratomstücken wurde vor der eigentlichen RNA-Isolation eine Gewebelyse (Tissuelyser, Qiagen) durchgeführt. Hierzu wurde ein kleines Stück (<25mg) in ein Probenröhrchen, in dem Lysispuffer und ein Metallkügelchen vorgelegt wurden, überführt und durch mechanische Behandlung aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben über QiagenShredder-Säulen weiter homogenisiert. Ansonsten erfolgte die RNA-Isolation wie zuvor beschrieben mit dem RNeasy Mini Kit.

Zur Aufarbeitung ganzer Organe, Embryonen bzw. Teratome wurden die Proben zunächst mit einem Skalpell zerkleinert und in Homogenisierungsröhrchen (M Tubes für die RNA-Isolation, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) überführt und nach Herstellerangaben mittels gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi) mechanisch aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung je nach Probenmenge mit dem RNeasy Midi bzw. Maxi Kit wie zuvor beschrieben. Die Quantifizierung und Reinheit wurde photometrisch mit Hilfe des Nanodrop-Gerätes (Peqlab, Erlangen) bestimmt.

3.10.1.3. Reverse PCR und Analyse der RT-Produkte durch quantitative real-time PCR

Alle PCR-Reagenzien, Verbrauchsmaterialien für RT- und real-time PCR sowie Primer wurden von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) bezogen (Tab.7).

TaqMan™ Reverse Transcription Reagenz
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix
Reaktionsgefäße
96-well Reaktionsplatte
Optische Adhäsionsfolie

Tabelle 7 Marker zur Expressionsanalyse

	Marker	Genname	Herstellercode
Pluripotenz	Sox-2	SRY-box containing gene 2	Mm00488369_s1
	Oct-3/4	POU domain, class 5, transcription factor 1	Mm00658129_gH
	Nanog	Nanog homeobox	Mm01617761_g1
Endoderm	DLK1	delta-like 1 homolog	Mm00494477_m1
	AFP	alpha-fetoprotein	Mm00431715_m1
	GATA4	GATA binding protein 4	Mm00484689_m1
Ektoderm	NF 200	neurofilament, heavy polypeptide	Mm01191456_m1
	Nestin	nestin	Mm00450205_m1*
	beta-3-Tubulin	tubulin, beta 3	Mm00727586_s1
	PAX6	paired box gene 6	Mm00443081_m1
Mesoderm	Nodal	nodal	Mm00443041_m1
	Bmp4	bone morphogenetic protein 4	Mm00432087_m1
	aSMA	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	Mm01546133_m1
	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4352932E

Die Methode der RT-PCR beruht auf der Umschreibung von mRNA in cDNA (copy oder komplementäre DNA) durch das Enzyme reverse Transkriptase. Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem Reverse Transkriptase (RT)-Kit nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt und bei –20°C gelagert. Das Expressionsprofil der cDNA wurde mit dem TaqMan™-Format (Life Technologie) untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der relativen Quantifizierung. Dazu wurde der ΔC_T-Wert für die untersuchten Marker bestimmt. Dieser kann mit der folgenden Formel berechnet werden.

$$\Delta C_T = C_{T(Marker)} - C_{T(GAPDH)}$$

Tabelle 8 Auswertungsmatrix der ermittelten ΔC_T zur Bestimmung des Expressionsniveaus der untersuchten Marker

ΔC_T	Bewertung	Expressionsniveau
0,0 – 4,0	++++	sehr hoch
4,1 – 8,0	+++	hoch
8,1 – 12,0	++	mittel
12,1 – 16,0	+	gering
> 16,0	-	negativ

3.10.2. Untersuchung der Expression von EYFP

3.10.2.1. DNA-Isolation

Die Gewinnung von genomischer DNA aus Zellen, Teratomen, Mausorganen sowie Embryonen erfolgte mittels DNA Blood&Tissue Kit (Qiagen, Hilden).

Nach Herstellerangaben wurden die Proben vollständig lysiert und anschließend über eine Silica-Membran die DNA aufgereinigt. Nach dem mehrmaligen Waschen wurden die DNA in AE Puffer eluiert. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte wie zuvor beschrieben mittels photometrischer Messungen am Nanodrop (Peqlab; Erlangen, Deutschland).

3.10.2.2. Nachweis von EYFP

Für die Bestimmung des Expressionsniveau von EYFP in Stammzellen und deren Teratomen wurde zunächst wie zuvor beschrieben RNA isoliert und anschließend cDNA hergestellt.

Zum Detektieren von EYFP-positiven Zellen im Teratom und Mausgeweben wurde die DNA aus den zu untersuchenden Proben gewonnen und eine Konzentration von 62,5ng/µl eingestellt.

Die Analyse des Expressionsniveau bzw. der Nachweis genomischer DNA erfolgte mittels real-time PCR mit nachfolgender Schmelzkurvenanalyse. Die Reagenzien wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) verwendet

PCR-Ansatz Endvolumen 20µl	
Wasser	5µl
Power SYBR® Green PCR Master Mix	10µl
Primermix	3µl
cDNA bzw. DNA	2µl

Die Primer wurden mit Hilfe einer Genkarte sowie dem Programm Primer3 Input (Version 0.4.0) http://frodo.wi.mit.edu/ entworfen.

Primer

EYFP-sense	5′ ACGTAAACGGCCACAAGTTC3′	BioTeZ (Berlin, Deutschland)
EYFP-antisense	5′ AAGTCGTGCTGCTTCATGTG3′	BioTeZ (Berlin, Deutschland)

PCR-Protokoll		
10min	95°C	
15 sec	95°C	} 40 Zyklen
1min	60°C	

3.11. Immunologische Methoden

3.11.1. Immunzytochemischer Nachweis von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern

Zur Charakterisierung des pluripotenten Charakters der undifferenzierten Ausgangszellen wurde das „Mouse Embryonic Stem Cell Marker Panel"-Kit von Abcam (Cambrige, Großbritannien) verwendet. Zusätzlich wurde die Expression von Keimblatt- bzw. Differenzierunsgmarker und EYFP untersucht (Tab.9).

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht in der feuchten Kammer im Kühlschrank. Anschließend wurden die Proben 1h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach jeder Inkubationsphase wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop von Leica ausgewertet. Neben den Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern wurde die Alkalische Phosphatase-Aktivität bestimmt. Dazu wurde das Kit von Vector nach Herstellerangaben verwendet.

Die *in vivo* gebildeten Teratome wurden nach der Entnahme für immunhistologischen Analysen schockgefroren und bei -80°C gelagert. Am Kryotom wurden Schnitte (3 - 5µm) angefertigt, die auf Glasobjektträger überführt und anschließend luftgetrocknet wurden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Teratomschnitte wurden mit 4% Formaldehyd fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch eine fünfminütige Peroxidasebehandlung sowie entsprechend dem Sekundärantikörper mit 10% Ziegen- bzw. Kaninchenserum 1h blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer. Es wurde eine Auswahl aus den oben aufgelisteten Antikörpern für die Immunhistochemie angewendet. Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und mit einem Streptavidin-Biotin-geeignetem Sekundärantikörper für 1h inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxilyn.

Tabelle 9 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Immunzyto- bzw. -histochemie

	Primärantikörper		Verdünnung	Hersteller
Pluripotenz	Oct4	rabbit polyclonal	1:200	Abcam (Cambrige, England)
	Sox2	rabbit polyclonal	1:50	Abcam (Cambrige, England)
	Nanog	rabbit polyclonal	1:50	Abcam (Cambrige, England)
	SSEA-1	mouse monoclonal	1:100	Abcam (Cambrige, England)
	Lin28	rabbit polyclonal	1:1000	Abcam (Cambrige, England)
Endoderm	DLK	rabbit polyclonal	1:100	Abcam (Cambrige, England)
	AFP	mouse monoclonal	1:100	R&D Systems (Abington, England)
Mesoderm	aSMA	rabbit polyclonal	1:400	Abcam (Cambrige, England)
	Bmp4	rabbit polyclonal	1:1000	Abcam (Cambrige, England)
Ektoderm	Nestin	rabbit polyclonal	1:400	Abcam (Cambrige, England)
	beta-3-Tubulin	rabbit polyclonal	1:200	Cell Signaling Technology (Frankfurt, Deutschland
	Pax6	mouse monoclonal	1:100	Abcam (Cambrige, England)

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Cy3-konjugiert goat anti-mouse IgM	1:400	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, England)
Cy3-konjugiert goat anti-rabbit IgG	1:400	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, England)
Dye549-konjugiert goat anti-mouse IgG	1:400	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, England)

3.11.2. Bestimmung von Pluripotenzmarkern mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung des pluripotenten, undifferenzierten Charakters vor Einsatz in Differenzierungsversuchen sowie Tierexperimenten wurden die verwendeten 7AC5/EYFP Stammzellen auf die Expression von Oct-3,4, SSEA-1, Sox2 sowie Nanog mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurde der „Mouse Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit“ (Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Nach einem Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt wurden die Zellen gefärbt und anschließend am FACS gemessen. Die Settings wurden zuvor mit Hilfe der mitgelieferten Beads eingestellt und optimiert.

3.12. Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism, Version 5.02 (GraphPad Software, San Diego California, USA).
Mittels der zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde der Zusammenhang zwischen der Expression eines Gens und der Behandlung mit Substanzen unterschiedlichen Potenzials untersucht und mögliche signifikante Expressionsunterschiede in den behandelten Stammzellen bzw. den daraus abgeleiteten Teratomen bestimmt.

4. ERGEBNISSE

4.1. *In vitro* Charakterisierung der murinen embryonalen Stammzellline 7AC5/EYFP

4.1.1. Kulturbedingungen für die Langzeitkultur

4.1.1.1. Morphologische Bewertung

Die 7AC5/EYFP-Stammzellen wurden sowohl auf murinem Feeder sowie unter feeder- und serumfreien Bedingungen mit dem ESGRO Complete Cell Culture System (MerkMillipore, Darmstadt, Deutschland) kultiviert. Hierzu werden im weiteren Teil der Arbeit die Abkürzung 7AC5/MEF (Standardkultur auf Feeder) und 7AC5/FF (feeder- und serumfreie Kultur) verwendet. Methodische Einzelheiten sind in Kapitel 3.5.2. zu finden.

Die Anwendung der unterschiedlichen Kulturbedingungen zeigte keinen Einfluss auf die Morphologie der 7AC5-Stammzellkolonien. Sie zeichnen sich durch einen scharf abgegrenzten Rand und eine kompakte Struktur von kleinen runden Einzelzellen aus. Nach einer Kultivierungszeit von zwei bis drei Tagen mit beiden Ansätzen ist ein 60-70%iger konfluenter Zellrasen mit Kolonien von einem Durchmesser von 200-300µm nachweisbar (Abb.8). Mittels Durchlichtmikroskopie konnten keine Unterschiede im Wachstum und Koloniemorphologie zwischen 7AC5/MEF und 7AC5/FF beobachtet werden. Sie weisen die beschriebenen charakteristischen morphologischen Merkmale einer undifferenzierten Stammzellkolonie auf.

Die strukturell/morphologischen Parameter 7AC5/FF-Zellen wurden mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Undifferenzierte Stammzellkolonien sind durch ein großes Kern-zu-Plasma-Verhältnis gekennzeichnet. Innerhalb der Kolonien liegen die Zellen teilweise kompakt nebeneinander. Lockere Zellverbände sind partiell sowohl im Inneren als auch am Rand der Kolonie nachweisbar. Die 7AC5/FF-Stammzellen bilden Zellaggregate mit mehreren Zellschichten aus. Das elektronendurchlässige Zytoplasma mit einigen Zellorganellen ist gut zu erkennen und im Kern ist der Nukleolus vom Euchromatin unterscheidbar (Abb.8)

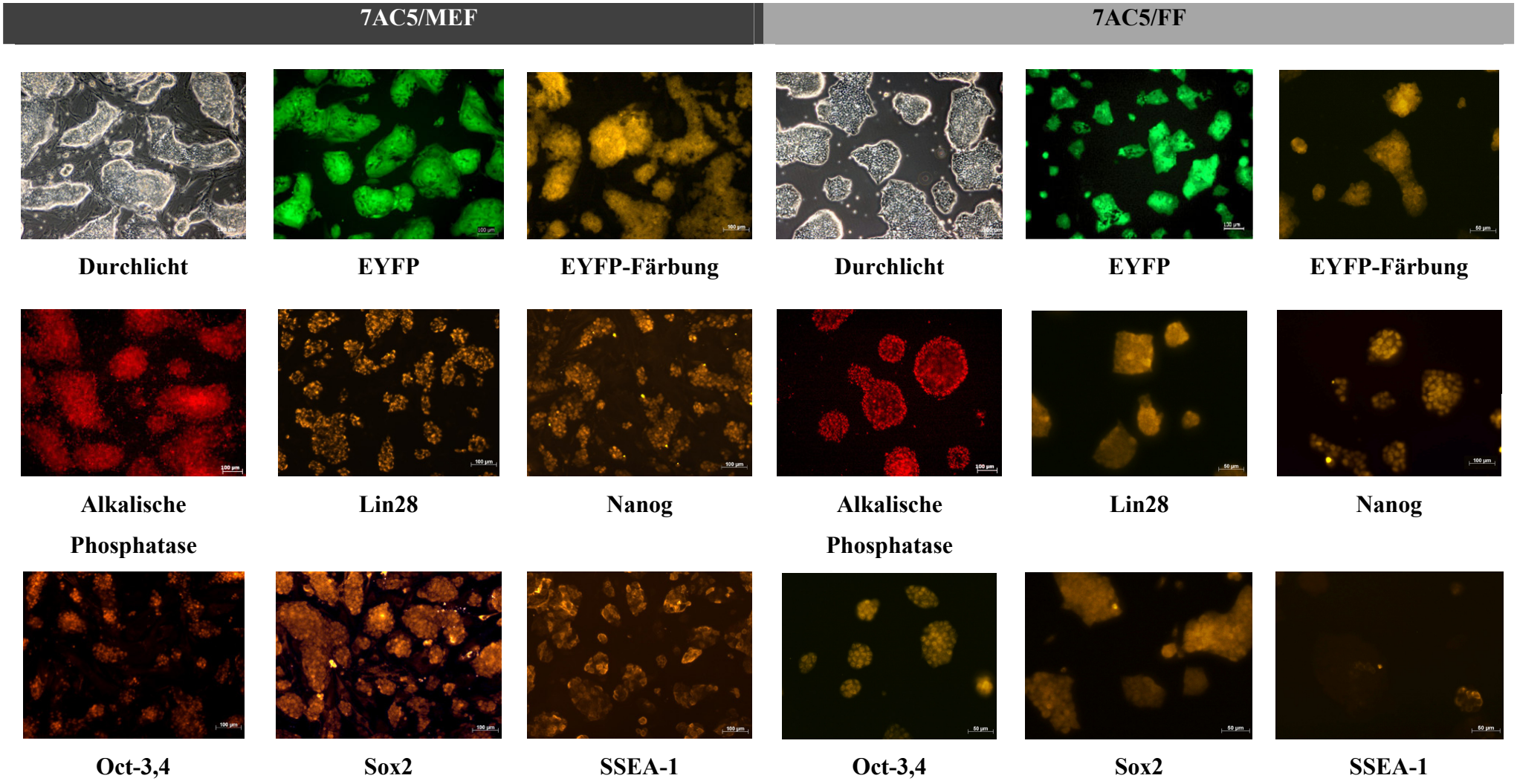


Abbildung 8 Vergleich von Morphologie und Expressionsprofil ausgewählter Marker zwischen 7AC5/MEF und 7AC5/FF
Unter beiden Kultivierungsbedingungen zeichnen sich 7AC5-Stammzellen durch eine vergleichbare Morphologie und Expression von ausgewählten Pluripotenzmarkern aus mit Ausnahme vom Oberflächenmarker SSEA-1, der nur schwach unter feeder- und serumfreien Bedingungen nachweisbar ist. Die Alkalische Phosphataseaktivität ist bei 7AC5/MEF und 7AC5/FF auf hohem Niveau.

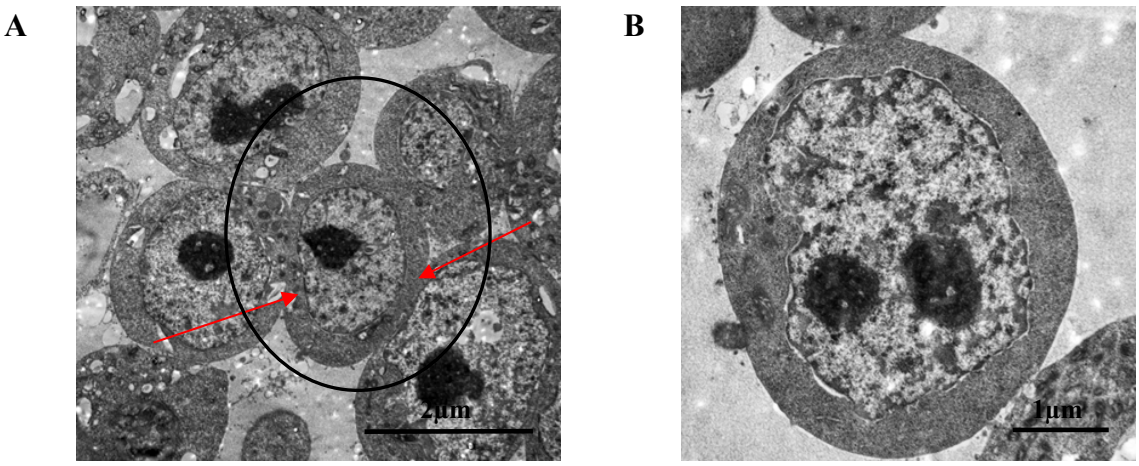


Abbildung 9 Ultrastrukturelle Analyse einer undifferenzierten 7AC5/FF-Stammzellkolonie
7AC5/FF-Stammzellen sind durch ein großes Kern-zu-Plasma-Verhältnis gekennzeichnet. Der Nukleolus (schwarzer Kreis) ist deutlich vom Euchromatin (roter Pfeil) unterscheidbar.

4.1.1.2. Nachweis von EYFP und Pluripotenzmarkern auf Proteinebene

Mittels Immunzytochemie und Durchflusszytometrie wurden die 7AC5-Stammzellen auf die Expression typischer Pluripotenzmarker (Nanog, Oct-3,4, SSEA-1, Sox2, Lin28 nur mittels Immunzytochemie) untersucht. Des Weiteren wurde die Expression von EYFP bestimmt. Dieses Reportergen wurde in die Zelllinie stabil integriert (siehe www.atcc.org) und kann zur Detektion der 7AC5-Stammzellen *in vitro* und *ex vivo* genutzt werden. Die EYFP-Expression der Zellen wurde mit Immunzytochmie, FACS-Analyse und PCR nachgewiesen (Abb.8, 10, 11). 7AC5-Stammzellen zeigen ein hohes EYFP-Expressionsniveau unabhängig von der Zellkultivierungsmethode.

Die Expression der Pluripotenzmarker von 7AC5/FF- und 7AC5/MEF-Zellen wurde vergleichend immunzytochemisch als auch mit Durchflusszytometrie untersucht (Abb.8, 10). 7AC5/MEF-Stammzellen zeigen eine hohe Expression aller untersuchten Pluripotenzmarker. Im Gegensatz dazu exprimieren 7AC5/FF nur schwach den Marker SSEA-1. Immunzytochemisch konnte das Protein nur in einigen Passagen in Teilbereichen der Stammzellkolonie bestimmt werden (Abb.8, SSEA-1). Mittels Durchflusszytometrie war die Expression deutlich reduziert im Vergleich zu 7AC5/MEF-Zellen und nur noch bei 17,8% (SD ± 11,4) der untersuchten 7AC5/FF-Zellen nachweisbar, wobei der Wert bei den einzelnen Passagen (Messungen) stark variierte (hohe SD).

Die anderen untersuchten Pluripotenzmarker sowie EYFP konnten bei 7AC5/FF-Zellen auf vergleichbar hohem Niveau bestimmt werden.

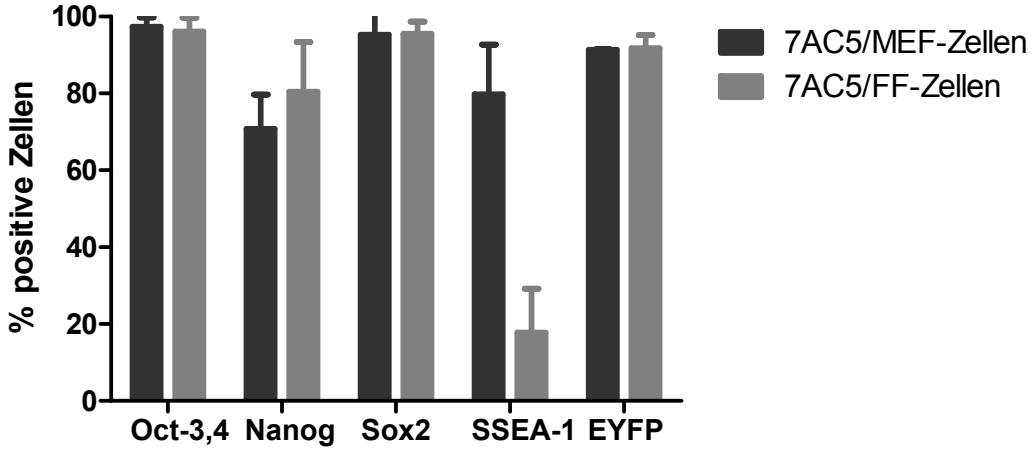


Abbildung 10 Expressionsanalyse der 7AC5-Stammzellen mittels Durchflusszytometrie
7AC5/MEF und 7AC5/FF weisen eine einheitlich hohe Expression der untersuchten Pluripotenzmarker Oct-3,4, Nanog und Sox2 auf. Die SSEA-1-Expression ist unter feeder- und serumfreien Bedingung deutlich reduziert. Das Reportergen EYFP wird einheitlich von nahezu allen Zellen innerhalb der Stammzellkultur exprimiert. Mittelwert ± SD, n= 5

Nahezu 100% der untersuchten 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-Zellen weisen eine Expression von Oct-3,4 und Sox2 sowie EYFP auf. Nanog wird nur von circa 70% der Zellen exprimiert, wobei der prozentuale Anteil an Nanog-positiven Zellen durch eine feeder- und serumfreie Kultur gesteigert werden konnte (Abb.10).

4.1.1.3. Nachweis von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern auf RNA-Ebene

Die 7AC5-Stammzellen wurden zusätzlich auf RNA-Ebene mittels real-time PCR auf die Expression der Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 untersucht. Das erstellte Genexpressionsprofil wurde durch die Analyse einer Auswahl keimblattspezifischer Marker (Ektoderm: beta-3-Tubulin, NF200, Pax6; Endoderm: AFP, FoxA2, GATA4; Mesoderm: Bmp4, Nodal, aSMA) erweitert, um eine mögliche spontane Differenzierung der kultivierten Zellen zu bewerten. In Abb.11 sind die Expressionsprofile von 7AC5-Stammzellen, die auf Feeder und unter feeder- und serumfreien Bedingungen kultiviert wurden, aus n=5 Passagen zusammengefasst und vergleichend dargestellt. Angegeben ist der ΔC_T-Wert, das heißt die Expression des untersuchten Gens wurde auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) bezogen (siehe Material und

Methoden 3.10.). Damit lassen sich die ermittelten Expressionsprofile der 7AC5-Stammzellen bzw. den daraus abgeleiteten Teratomen aus unterschiedlichen Versuchen unter verschiedensten Bedingungen besser miteinander vergleichen.

Unter beiden Kultivierungsbedingungen zeigen 7AC5-Stammzellen eine hohe Expression der drei ausgewählten Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 sowie EYFP, gekennzeichnet durch einen kleinen ΔC_T-Wert (Abb.11A).

Die Analyse der keimblattspezifischen Marker zeigt, dass beide Kultivierungsmethoden der 7AC5-Zellen eine leichte ektodermale und mesodermale Differenzierung induzieren (Abb.11B,11D). Beispielsweise konnte beta-3-Tubulin (b-3-Tub) als ektodermaler Marker und Nodal als mesodermaler Marker auf einem moderaten Expressionsniveau nachgewiesen werden. Endodermale Marker wie AFP und FoxA2 werden hingegen nicht oder nur schwach exprimiert (hoher ΔC_T-Wert; Abb.11C).

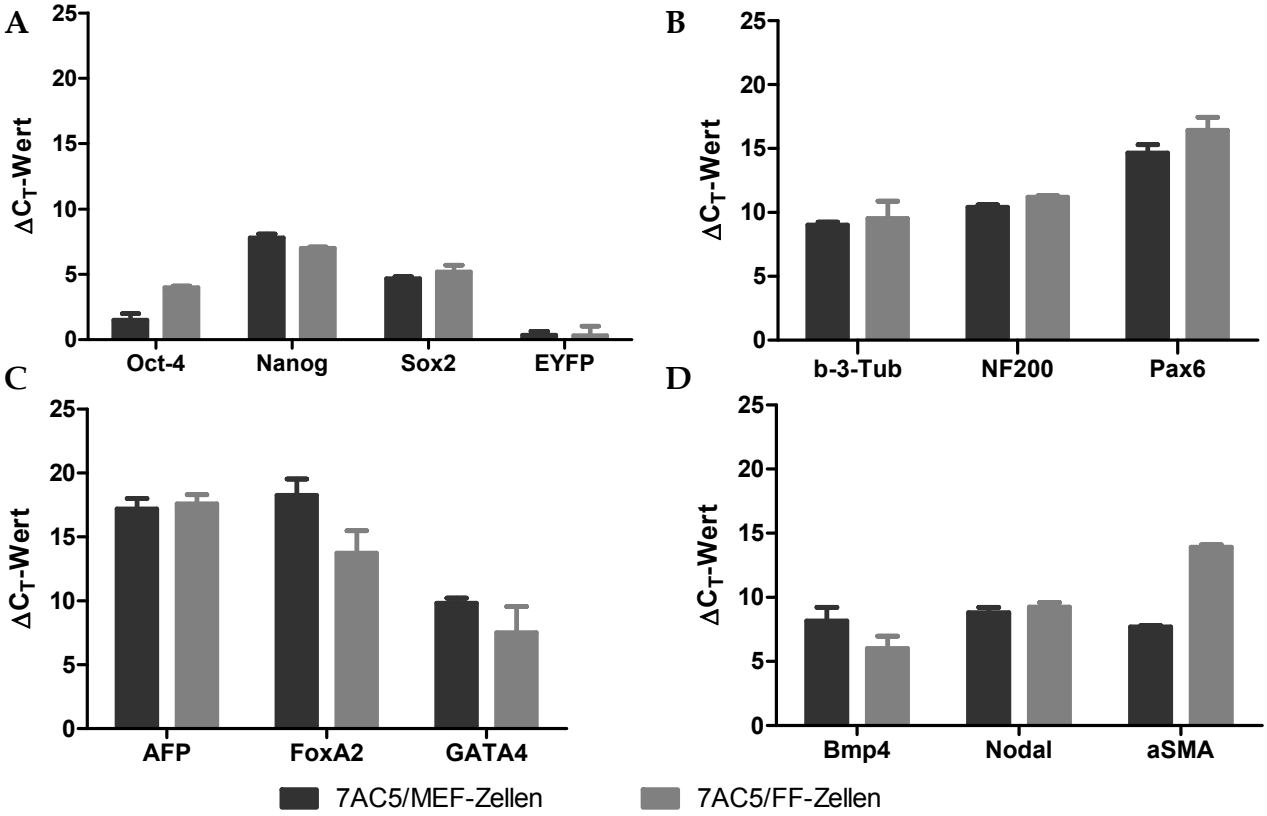


Abbildung 11 Expressionsprofil von 7AC5/FF- und 7AC5/MEF-Zellen im Vergleich
Zur Bewertung und Charakterisierung der verwendeten Kultivierungsmethoden für 7AC5-Stammzellen wurden vergleichende Expressionsprofile von 7AC5/FF- und 7AC5/MEF-Zellen erstellt und das Expressionsniveau von ausgewählten Pluripotenz- (A) und keimblattspezifischen Markern (B-Ektoderm, C-Endoderm, D-Mesoderm) bestimmt. Mittelwert ± SD, n= 5

Die Expressionsprofile von 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-Zellen zeigen im Vergleich zueinander keine Unterschiede. Eine Ausnahme stellt der mesodermalen Marker aSMA (alpha smooth muscle actin) dar, der unter feeder- und serumfreien Kulturbedingungen bei 7AC5/FF-Zellen geringer exprimiert wird (ΔC_T–$Wert_{7AC5/MEF}$ = 7,7 ± 0,1; ΔC_T–$Wert_{7AC5/FF}$ = 13,9 ± 0,2; Abb.11D).

Zur Bewertung der Resultate des Genexpressionsprofils von 7AC5-Stammzellen unter Verwendung zweier verschiedener Kultivierungsmethoden wurden zusätzlich die MEF-Feederzellen CD1 analysiert und damit deren möglichen Einfluss auf das Expressionsprofil von 7AC5/MEF-Stammzellen bestimmt.

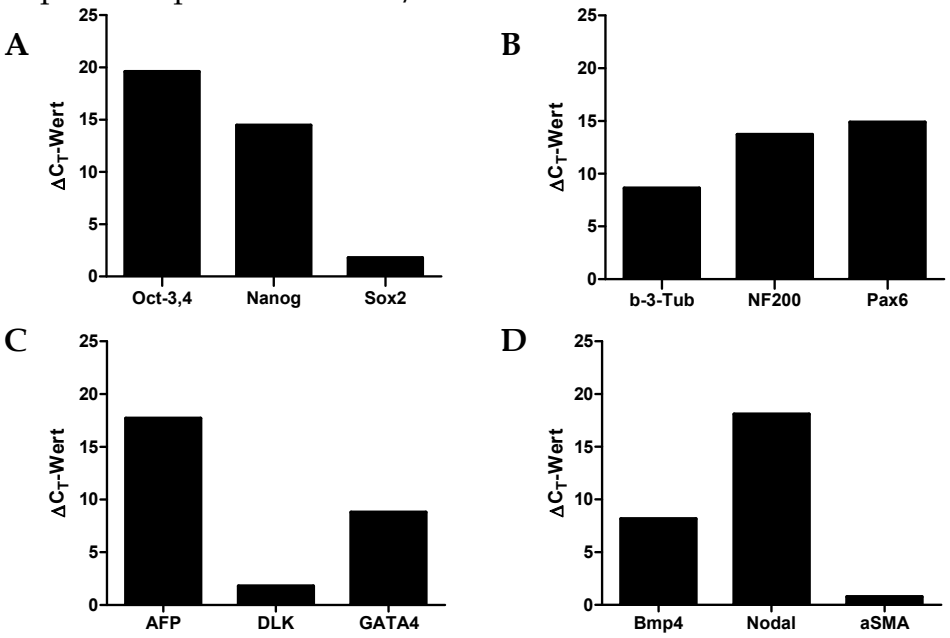


Abbildung 12 Expressionsprofil von CD1-Feederzellen
Exemplarisch wurde das Expressionsprofile von CD1-Feederzellen, die zur Kultivierung von 7AC5/MEF-Zellen genutzt wurden, erstellt und das Expressionsniveau von ausgewählten Pluripotenz- (A) und keimblattspezifischen Markern (B-Ektoderm, C-Endoderm, D-Mesoderm) bestimmt.

Wie in Abb.12 dargestellt, weisen die für die Standardkultivierung von 7AC5-Stammzellen genutzten Feederzellen eine starke Expression von aSMA, DLK und Sox2 auf. Weitere Marker der Keimblätter (GATA4, Bmp4 und b-3-Tub) werden auf einem moderaten Niveau exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich aus der Analyse der beiden Kultivierungsmethoden für 7AC5-Stammzellen festhalten, dass keine signifikanten Unterschiede in den Wachstumseigenschaften, Zellmorphologie und Expression auf RNA- und Proteinebene der Stammzellen *in vitro* mit Ausnahme von SSEA-1 und aSMA auftreten. Durch die ausgeprägte Expression von endo/mesodermalen Markern der

CD1-Feederzellen ist eine eindeutige Bewertung des Markerprofils von 7AC5/MEF-Zellen jedoch nicht eindeutig.

In den fortführenden Arbeiten wurden deshalb die 7AC5-Stammzellen ausschließlich unter feeder- und serumfreien Bedingungen kultiviert und für die folgenden Versuche verwendet.

4.1.2. Transfektion von 7AC5/FF-Stammzellen

Durch die Transfektion mit einem Luc-Reportergen können die 7AC5-Stammzellen live *in vivo* charakterisiert werden. Das bereits integrierte EYFP kann weiterhin zur *in vitro* und *ex vivo* Untersuchung der 7AC5-Zellen genutzt werden.

Für die stabile Transfektion der 7AC5/FF-Stammzellen wurde die Nukleofektion nach Amaxa verwendet. Hierbei handelt es sich um eine nichtvirale Transfektion. Für verschiedenste Zelltypen gibt es optimierte Lösungen und angepasste elektrische Parameter, die die Transfektionseffizienz und Überlebensrate erhöhen sollen. Für diese Arbeit wurde das Nucleofector-Kit für murine embryonale Stammzellen unter verschiedenen Bedingungen eingesetzt. Die 7AC5/FF-Zellen wurden mit dem Luciferase-tragenden Plasmid pGL4.51[*luc2*/CMV/Neo] (Amaxa) transfiziert (siehe Kap. 3.6.).

Das Transfektionsprotokoll für 7AC5/FF-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert/optimiert und der Einfluss auf das Expressionsprofil und das *in vivo* Verhalten der transfizierten Zellen im experimentellen Tiermodell untersucht. Entsprechend der Herstellerangaben wurden die Programme A13, A23, A24 und A30 angewendet und die Transfektionseffizienz und –stabilität der 7AC5/FF-Stammzellen untersucht. Nach der Transfektion der Zellen ($3x10^6$-Zellen je Ansatz) wurden die verschiedenen Ansätze über einen Zeitraum von vier Wochen die Luciferaseaktivität der 7AC5-Stammzellen am Glomax Microplate Luminometer bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte Zellen (7AC5/FF) mitgeführt und die transfizierten Zellen (7AC5/Luc) nach jeder Passage auf ihre Luciferase- (Luc-) Aktivität und Expressionsprofil untersucht. Eine ausgeprägte Luc-Aktivität der 7AC5/Luc-Zellen war zum Tag 2 nach der Transfektion bei allen Ansätzen nachweisbar (Abb.13), welche jedoch nach der Selektionierung mit G418 zunächst

erst wieder abnahm. Es war eine Reduktion auf etwa 1/10 der Luc-Aktivität im Vergleich zum Ausgangswert zu verzeichnen. Ab Tag 6 bis zum Versuchende (Tag 30) war eine deutliche Zunahme der Luc-Aktivität zu beobachten. Die mit Programm A-24 transfizierten 7AC5-Stammzellen wiesen am Tag 30 die höchste Luc-Aktivität mit 4,5x10^6 RLU (relative light unit – relative Lichteinheiten) auf, die am Plattenluminometer gemessen wurde (Abb.13).

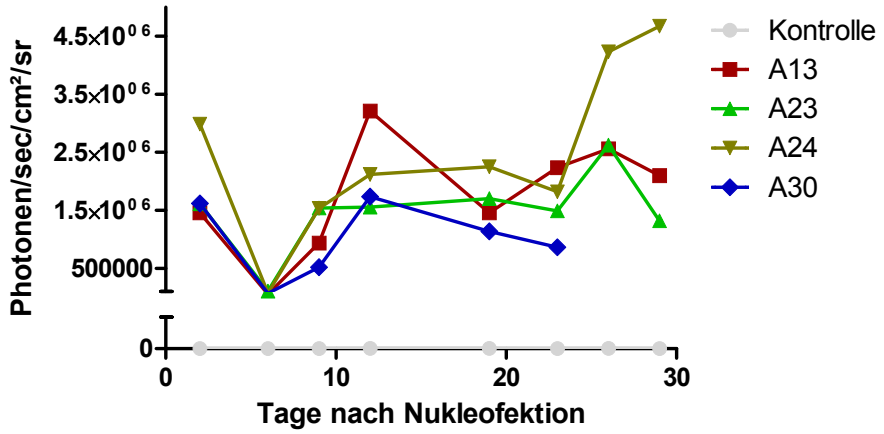


Abbildung 13 Zeitabhängige Luciferaseaktivität von unterschiedlich transfizierten 7AC5/FF-Stammzellen (7AC5/Luc)
Nach einer vierwöchigen Selektion mit G418 (bis 1000µg/ml) zeigt sich bei allen vier Nukleofektionsprozessen eine hohe Luc-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Mit dem Programm A24 konnte die höchste Luc-Aktivität von 7AC5-Stammzellen zum Tag 30 nachgewiesen werden.

Morphologisch zeigten sich keine Unterschiede in den gewählten Transfektionsansätzen der mESCs (Abb.14). Die 7AC5/Luc-Zellen wiesen eine vergleichbare Proliferationsrate wie die nicht-transfizierten Zellen (Kontrolle - 7AC5/FF) über einen Zeitraum von vier Wochen auf und wuchsen als kompakte, scharf abgegrenzte, flache Kolonien mit kleinen, runden Einzelzellen. Die Passagierung der Zellen erfolgte im Zwei- bis Drei-Tagerhythmus (Daten nicht gezeigt).

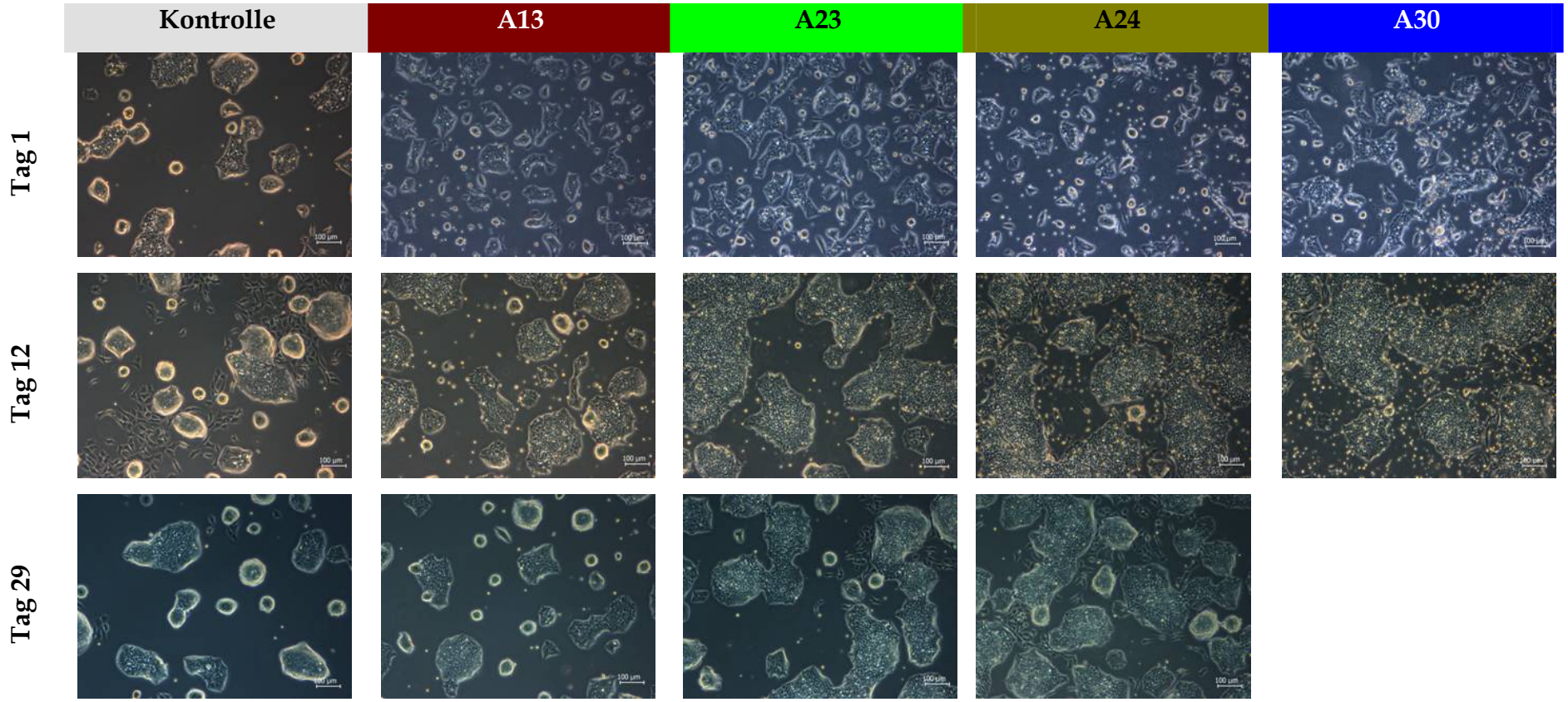


Abbildung 14 Langzeitkultivierung von transfizierten 7AC5-Stammzellen
Über einen Zeitraum von vier Wochen wurden vergleichend nicht-transfizierte (Kontrolle - 7AC5/FF) und mit unterschiedlichen Protokollen (A13, A23, A24, A30) transfizierte Zellen (7AC5/Luc) morphologisch bewertet. Alle Ansätze zeigten eine vergleichbare Proliferationsrate sowie das morphologische Erscheinungsbild undifferenzierter Kolonien (kompakte Form, scharf abgegrenzter Rand, kleine, runde Einzelzellen).

Zur weiteren Charakterisierung der Zelltransfektion wurden die Genexpressionsprofile der 7AC5/Luc-Zellen bestimmt. Exemplarisch sind die Ergebnisse für das Programm A24 zur Transfektion von mESCs dargstellt (Abb.15).

Die 7AC5/Luc-Zellen weisen ein vergleichbares Expressionsniveau der Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 wie 7AC5/FF-Zellen auf (Abb.15A). Außerdem sind die ausgewählten Differenzierungsmarker des Ekto-, Endo- und Mesoderms nur schwach oder gar nicht nachweisbar. Nodal (Mesoderm; Abb.15A), GATA4 (Endoderm, Abb.15C) und NF200, beta-3-Tubulin sowie Nestin (Ektoderm, Abb. 15B) werden von Luc-transfizierten Zellen sowie der Kontrolle 7AC5/FF auf moderatem Niveau exprimiert. Nur Bmp4 wird bei transfizierten und nicht-transfizierten 7AC5-Stammzellen auf einem vergleichbar hohen Niveau wie die untersuchten Pluripotenzmarker exprimiert.

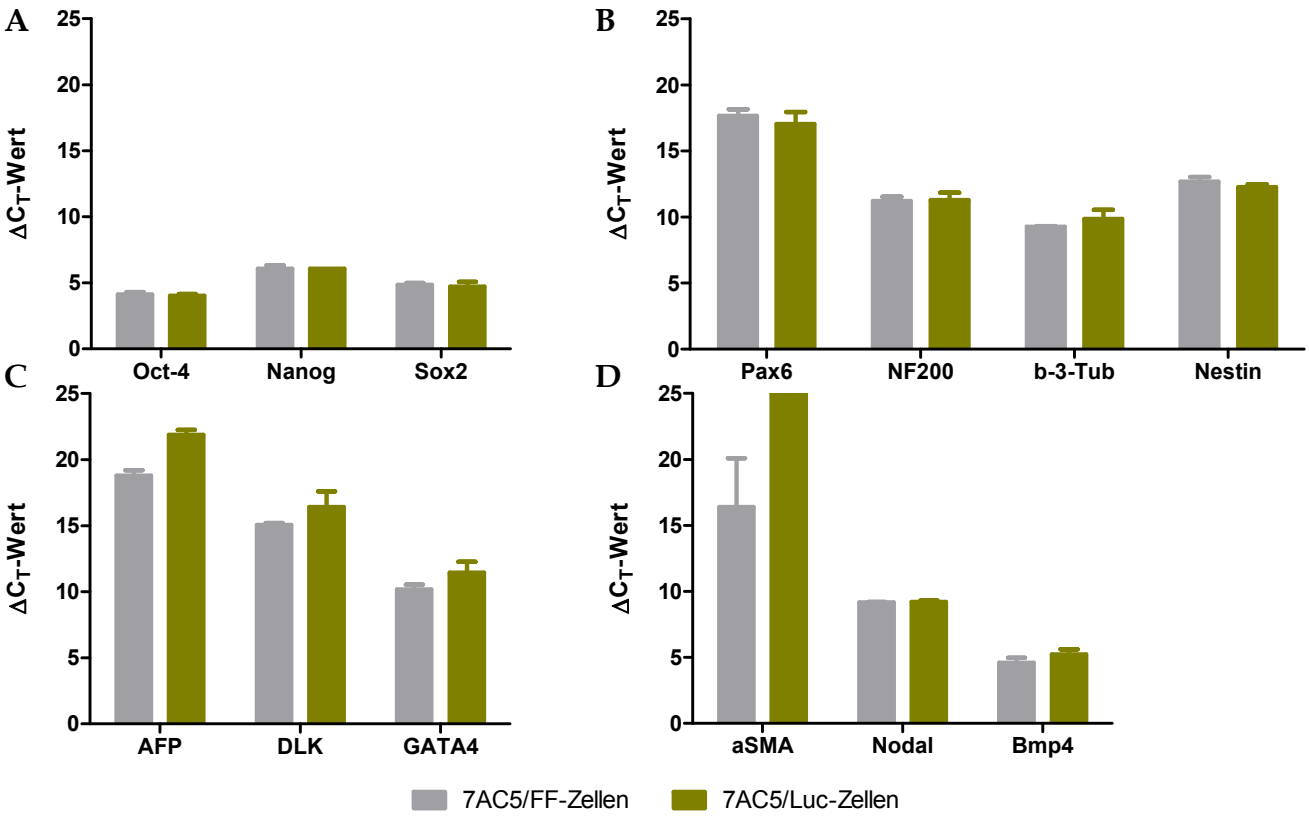


Abbildung 15 Vergleichendes Genexpressionsprofil von 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Stammzellen
Analyse der Expression von charakteristischen Pluripotenzmarkern (A) und ausgewählten Markern der drei Keimblätter (B-Ektoderm, C-Endoderm, D-Mesoderm) in transfizierten (7AC5/Luc) und nicht-transfizierten (7AC5/FF) Zellen. Exemplarisch sind die Ergebnisse für das Transfektionsprogramm A24 dargestellt. Vergleichbare qualitative Resultate wurden für die anderen Transfektionsprogramme erhalten (Daten nicht gezeigt).

Vergleichend wurden die Luc-transfizierten Stammzellen auf Proteinebene bezüglich der Expression von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern untersucht. Dies wurde im Rahmen einer betreuenden Projektarbeit in Zusammenarbeit mit Friedrich Kunze untersucht.

Exemplarisch sind die Ergebnisse für Stammzellen in der Passage p28 gezeigt.

Die FACS-Analysen belegen, dass nahezu 100% der untersuchten 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Zellen eine Expression von Oct-3,4 und Sox2 auf Proteinebene aufweisen (Abb.16). Mittels immunzytochemischer Analysen konnte die hohe, einheitliche Expression dieser beiden Pluripotenzmarker bestimmt werden (Abb.17). Nanog hingegen wird von 7AC5-Stammzellen auf einem geringeren Niveau exprimiert. Nur etwa 70% der Stammzellen konnten mittels FACS-Analyse als positiv detektiert werden.

Durch Immunzytochemie wurde die Expression von SSEA-1 und Lin28 bei den 7AC5-Zellen untersucht (Abb.17). Hier zeigte sich eine vergleichbare Expression zwischen 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Zellen. SSEA-1 wurde nur vereinzelt von einigen Zellen exprimiert, hingegen konnte der Marker Lin28 auf einem vergleichbar starken Niveau wie Oct-3,4 und Sox2 bei transfizierten und nicht-transfizierten Zellen nachgewiesen werden.

Mittels Durchflusszytometrie sowie durch Immunzytochemie konnte das Reportergen EYFP bei den 7AC5-Stammzellen nach der Luc-Transfektion auf einem vergleichbar hohen Proteinexpressionsniveau nachgewiesen werden.

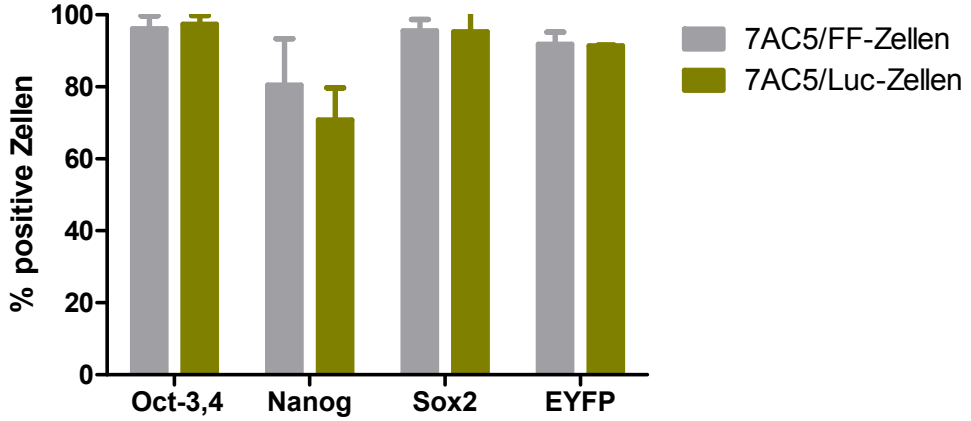


Abbildung 16 Expressionsanalyse ausgewählter Pluripotenzmarker mittels FACS-Analyse bei 7AC5/FF und 7AC5/Luc

7AC5/FF und 7AC5/Luc wurden auf Proteinebene mittels FACS-Analyse auf die Pluripotenzmarker Oct-3,4, Nanog und Sox2 sowie auf das Reportergen EYFP untersucht. Beide 7AC5-Stammzellen weisen eine hohe bis sehr hohe, einheitliche Expression der untersuchten Marker auf. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen transfizierten und nicht-transfizierten 7AC5-Stammzellen.

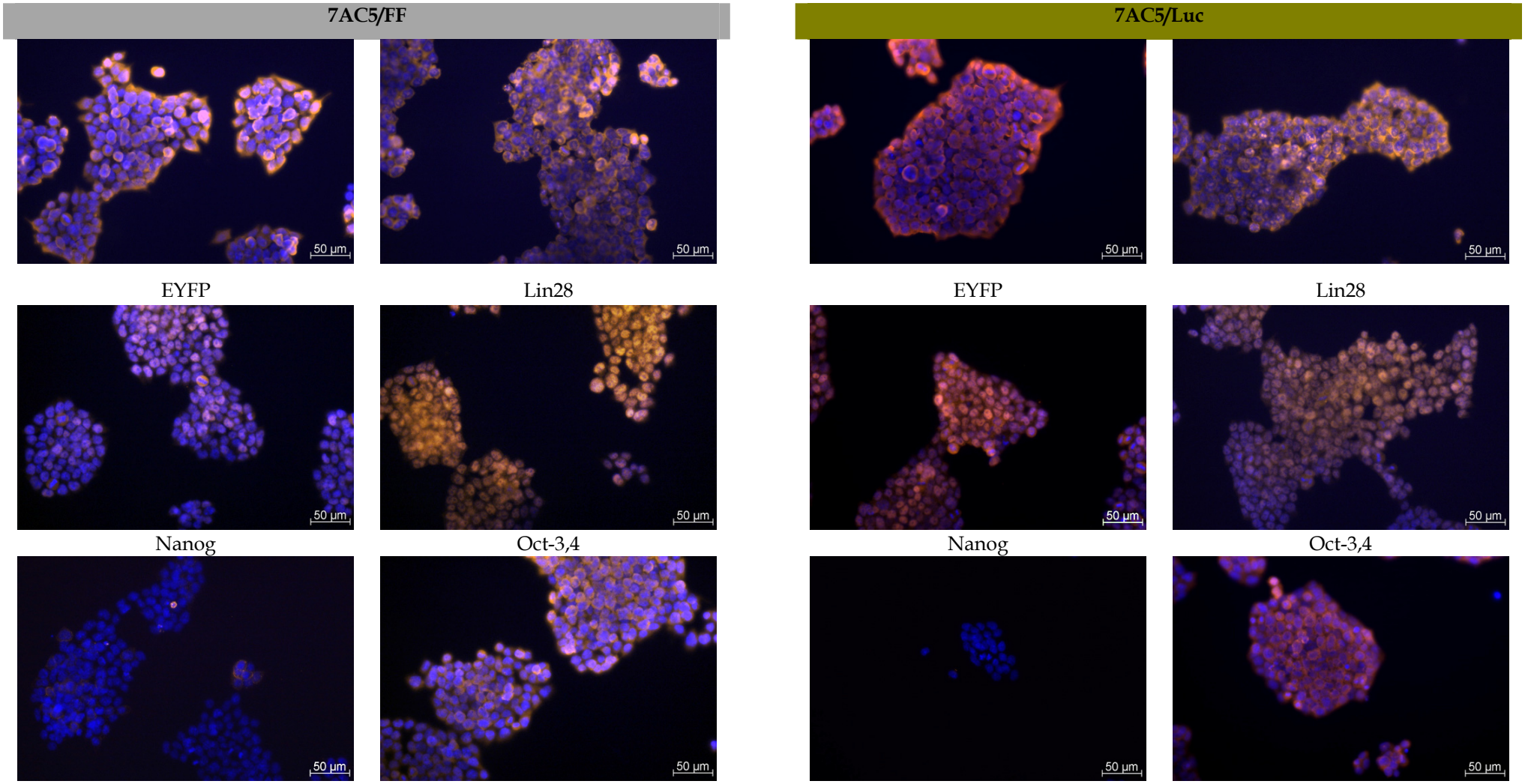


Abbildung 17 Immunzytochemische Analyse von Pluripotenzmarkern in 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Zellen

7AC5/FF und 7AC5/Luc (p28) wurden mittels Immunzytochemie auf die Expression der Pluripotenzmarker Oct-3,4, Nanog, Sox2, Lin28 und SSEA-1 untersucht. Alle untersuchten Pluripotenzmarker mit Ausnahme von SSEA-1 werden auf einem einheitlich, hohen Niveau von 7AC5-FF und 7AC5/Luc-Zellen exprimiert.

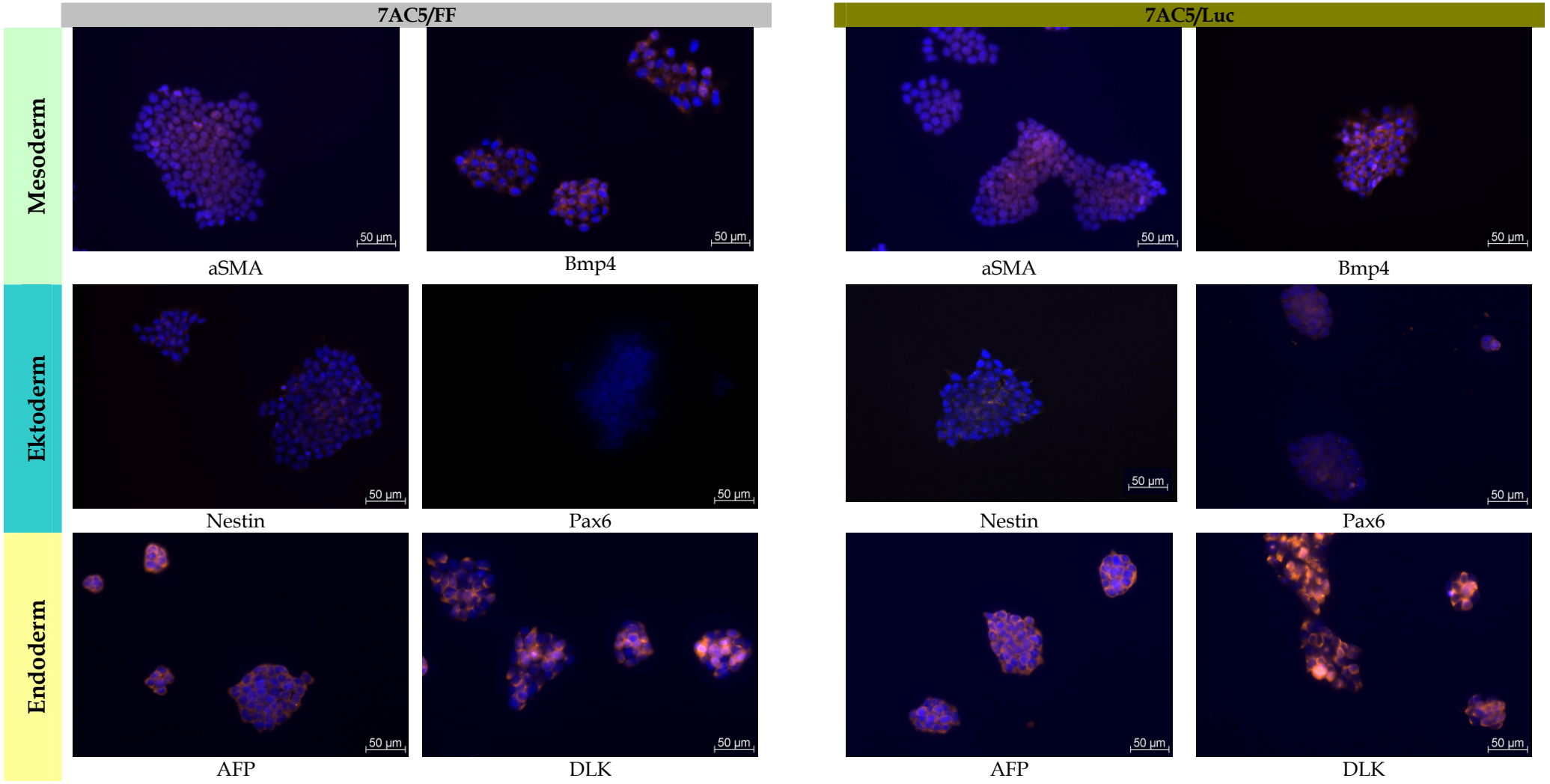


Abbildung 18 Immunzytochemische Analyse keimblattspezifischer Differenzierungsmarker in 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Stammzellen
7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Stammzellen (p28) wurden mittels Immunzytochemie auf die Expression von Differenzierungsmarkern untersucht. Bei transfizierten und nicht-transfizierten 7AC5-Stammzellen lässt sich eine schwache bis moderate Expression von ekto- und mesodermalen Markern nachweisen. Die untersuchten endodermalen Marker AFP und DLK werden von 7AC5/FF und 7AC5/Luc auf einem erhöhten Niveau exprimiert.

Immunzytochemisch wurden weiterführenden Analyse zur Expression ausgewählter Differenzierungsmarkern der drei Keimblätter durchgeführt (Abb.18). 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Zellen zeigen eine vereinzelte, moderate Expression der untersuchten Differenzierungsmarker innerhalb der Stammzellkolonien. Einzelne Zellen der Zellkolonie zeigten eine leichte Expression von Nestin (Ektoderm), aSMA und Bmp4 (Mesoderm). Für die endodermalen Marker konnte eine erhöhte Expression nachgewiesen werden. AFP und DLK wurden von nahezu allen Zellen innerhalb der Stammzellkolonien nachgewiesen (Abb.18).

Stabilität der Transfektion

Die kryokonservierten 7AC5/Luc-Stammzellen wurden in Abhängigkeit der Passage und während der *in vitro* Langzeitkultur auf ihre Luc-Aktivität untersucht (Abb.19). Über n = 10 Passagen konnte eine stabile Luc-Aktivität nachgewiesen werden. Durch das Einfrieren und anschließende Auftauen wurde diese Aktivität nicht reduziert.

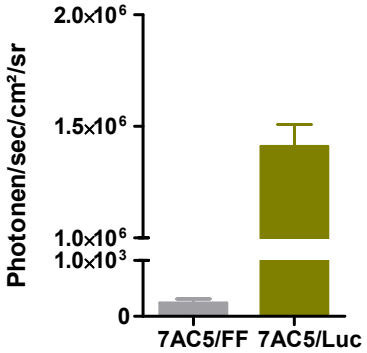


Abbildung 19 Luciferaseaktivität in transfizierten Stammzellen
Im Vergleich zur Kontrolle (7AC5/FF; nicht transfizierte mESC) zeigen 7AC5/Luc-Zellen eine deutlich signifikant erhöhte Luc-Aktivität, die über mehre Passagen und nach dem Auftauen stabil blieb. n=10

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass das Luc-Reportergen in der 7AC5-Zelllinie durch eine stabile, hohe Aktivität gekennzeichnet ist, die routinemäßig und einfach über den Luciferase-Assay am Plattenluminometer bestimmt werden kann. Des Weiteren nimmt der Transfektionsprozess und damit die Integration des Luc-Gens keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 sowie auf die ausgewählten keimblattspezifischen Differenzierungsmarker auf RNA- und Proteinebene. 7AC5/Luc-Stammzellen weisen ein vergleichbares Expressionsprofil wie nicht-transfizierte 7AC5/FF-Zellen auf, gekennzeichnet durch eine hohe Expression der Pluripotenzmarker und geringe bis moderate Expression der

Differenzierungsmarker. Des Weiteren wurde in die feeder- und serumfrei kultivierte die 7AC5/EYFP-Stammzelllinie ein zweites Reportergen stabil integriert. Damit wurde eine **duale Reportergen-tragende 7AC5-Stammzelllinie** etabliert.

4.2. *In vivo* Untersuchungen mit der Stammzelllinie 7AC5/EYFP

4.2.1. Etablierung des Teratommodells

Für den zu prüfenden Einsatz des Teratommodells ist neben der *in vitro* Charakterisierung der Qualität und Stammzelleigenschaften der eingesetzten Zelllinie 7AC5/EYFP auch eine Optimierung der Transplantationsbedingungen *in vivo* wichtig. Kritische Parameter für das Engraftment und die Zelldifferenzierung im experimentellen Tiermodell sind unter anderem die eingesetzte Zellzahl sowie der Transplantationszeitpunkt und -dauer. Im Allgemeinen stellen immundefiziente Mäuse ein geeignetes Modell für die Charakterisierung und Analyse von Stammzellen sowie deren Prüfung für Fragen im Rahmen der regenerativen Medizin dar.

4.2.1.1. Auswahl eines geeigneten Mausstamms und Analyse des Markerprofils

Zur Prüfung von Parametern der Teratombildung der 7AC5-Stammzellen wurden zwei Mausstämme *in vivo* untersucht, um das Teratombildungspotenzial in immunkompetenten und immundefizienten Stämmen zu bestimmen:

a) immunkompetente 129S6-Maus
b) immundefiziente NOD/SCID-Maus

Im 129S6-Mausstamm wurden vergleichend 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-Zellen bezüglich ihrer Teratombildungsrate über einen Zeitraum von 102 Tagen untersucht. Es konnte keine deutliche Gewebeneubildung und Gewebewachstum nach der Stammzelltransplantation beobachtet werden. Die exemplarisch dargestellten Gewebe, die nach der Transplantation von 7AC5/MEF entstanden sind, zeigen eine gallertartige Morphologie ohne Vaskularisierung (Abb.20). Durch eine histopathologische Analyse der gallertartigen Gewebe konnten nur zysten- und fettartige Strukturen (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden.

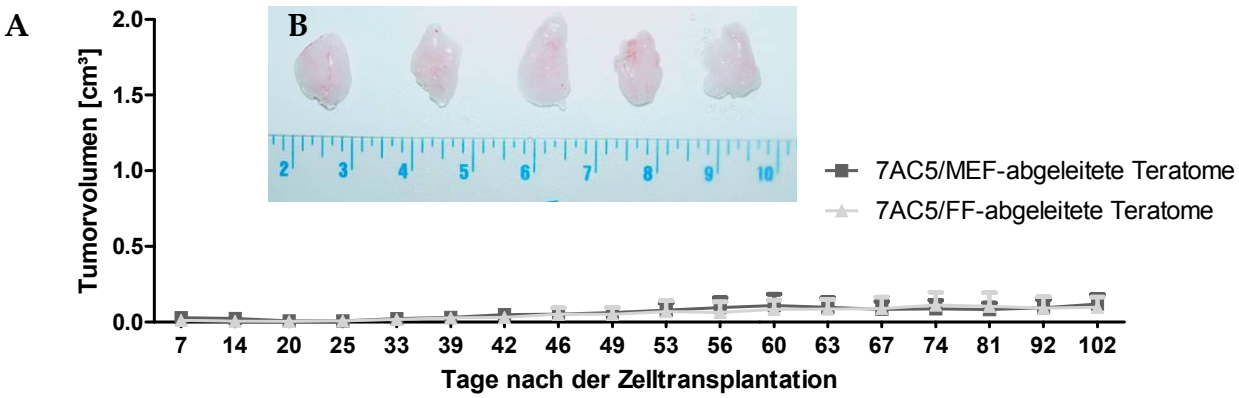


Abbildung 20 Wachstum von 7AC5/MEF und 7AC5/FF nach s.c. Applikation in 129S6-Mäuse
Über einen Zeitraum von 102 Tagen wurde die Gewebeentwicklung und das Wachstum von 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-Zellen *in vivo* dokumentiert (A). Exemplarisch sind 7AC5/MEF-abgeleitete Transplantate am Tag 102 dargestellt (B).

Im immundefizienten Transplantationsmodell (NOD/SCID-Mausmodell) konnte für beide Zelltypen eine deutliche Gewebeneubildung und -wachstum dokumentiert werden. Am Tag 21 wurde der Versuch beendet. Die *ex vivo* analysierten Proben zeichneten sich durch eine kompakte Struktur und starke Vaskularisierung aus (Abb.21C).

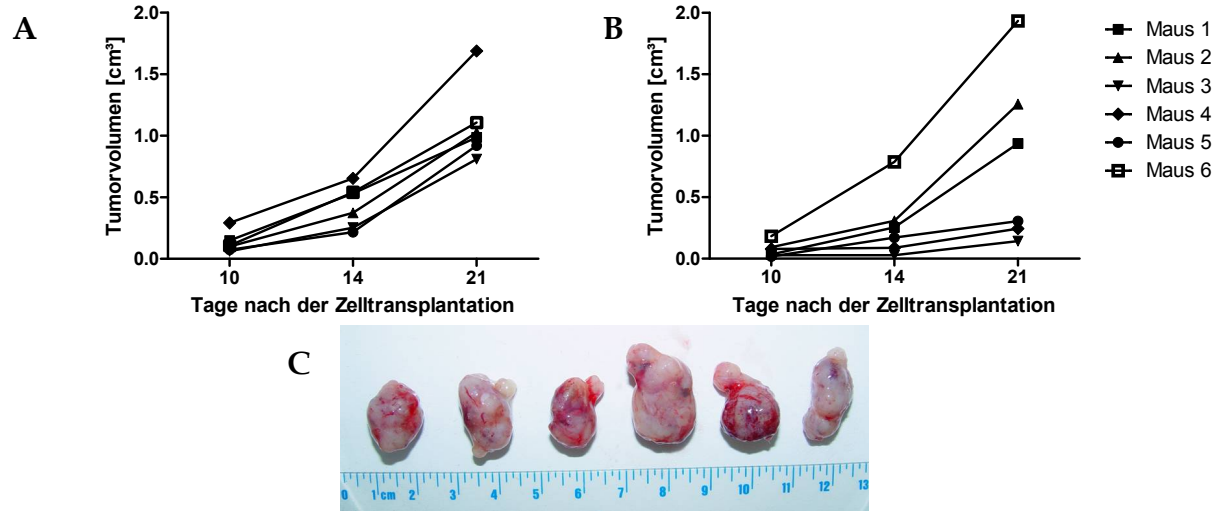


Abbildung 21 Transplantation von 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-Zellen nach s.c. Applikation im immundefizienten NOD/SCID-Mausmodell
1x10^7 7AC5/MEF- (A) und 7AC5/FF-Stammzellen (B) wurden mit Matrigel s.c. ins immundefiziente NOD/SCID-Mausmodell transplantiert. Über den Versuchszeitraum von 21 Tagen zeigte sich eine rapide Gewebeentwicklung und –wachstum. Es konnten kompakte, gut vaskularisierte und von der Umgebung abgekapselte Gewebe entnommen werden. Exemplarisch sind die 7AC5/FF-Teratome dargestellt (C).

In der Homogenität der Gewebebildung waren jedoch deutliche Unterschiede zu erkennen. 7AC5/MEF-abgeleitete zeigten über den Versuchszeitraum ein homogenes Wachstum (n = 5 Mäuse) (Abb.21A), wohingegen die 7AC5/FF-

abgeleiteten Gewebe zum Teil durch tierexperimentelle Schwankungen gekennzeichnet waren (Abb.21B).

Bei der histopathologischen Untersuchung der Gewebeproben konnten im NOD/SCID-Modell alle drei Strukturen der Keimblätter dokumentiert werden. Exemplarisch sind für jedes Keimblatt typische Strukturen (Ektoderm – Neuropil, Endoderm – Flimmerepithel, Mesoderm – quergestreifte Muskulatur) in Abb.22 dargestellt. Damit lassen sich die 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-stammzellabgeleiteten Gewebe eindeutig Teratomen zuordnen.

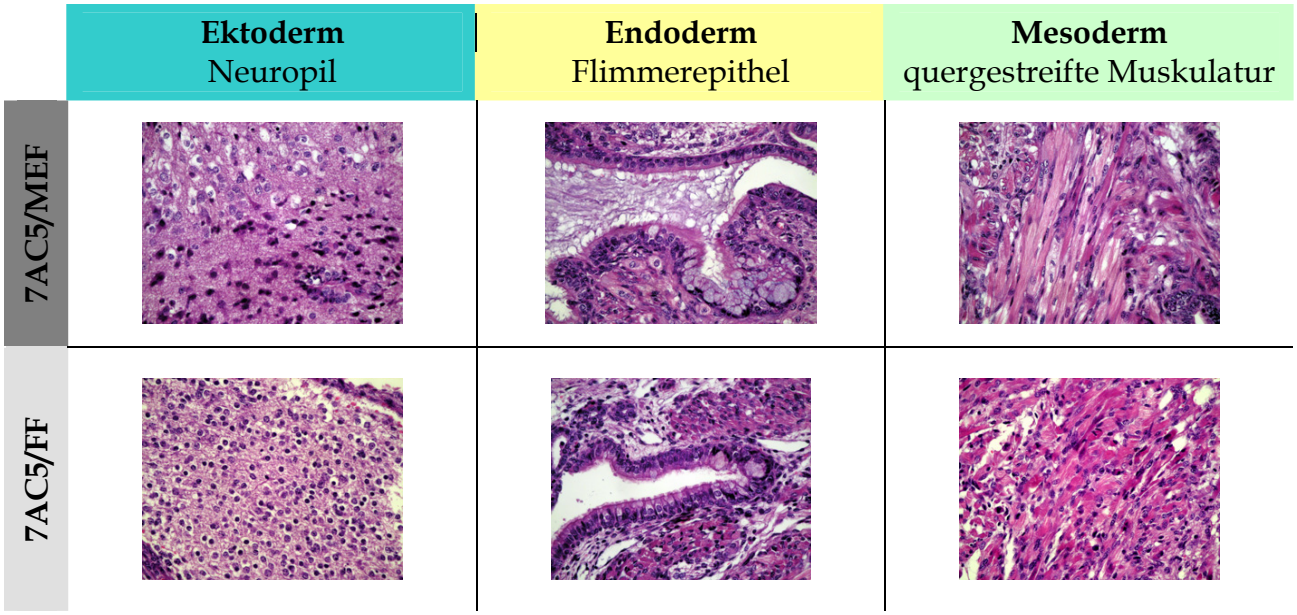


Abbildung 22 H&E-Färbung der 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-abgeleiteten Teratome im immundefizieten NOD/SCID-Mausmodell
21 Tage nach der Transplantation von 1xx10^7-7AC5-Stammzellen wurden gut vaskularisierte Gewebe mit keimblattspezifischen Strukturen nachgewiesen, die sowohl dem Ektoderm (Neuropil) als auch Endoderm (Flimmerepithel) sowie Mesoderm (quergestreifte Muskulatur) zugeordnet werden konnte. Histopathologisch konnten keine Unterschiede zwischen 7AC5/FF- und 7AC5/MEF-abgeleiteten Teratomen dokumentiert werden.

Zum Nachweis von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern der transplantierten Stammzellen wurden neben den Wachstumseigenschaften von 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-Zellen auch die Genexpressionsprofile vergleichend begutachtet.

Die gebildeten Teratome sind durch eine erhöhte Expression keimblattspezifischer Marker gekennzeichnet (Abb.23B-Ektoderm, 23C-Endoderm, 23D-Mesoderm). Vor allem endodermale Marker wie AFP wurden deutlich höher exprimiert im stammzellabgeleiteten Teratom im Vergleich zu den undifferenzierten Ausgangszellen.

Im Gegensatz dazu wurde die Expression der Pluripotenzmarker im Teratom runterreguliert (Abb.23A), vor allem Nanog wird nur noch moderat exprimiert. EYFP ist immer noch durch eine hohe Expression gekennzeichnet (Daten nicht gezeigt).

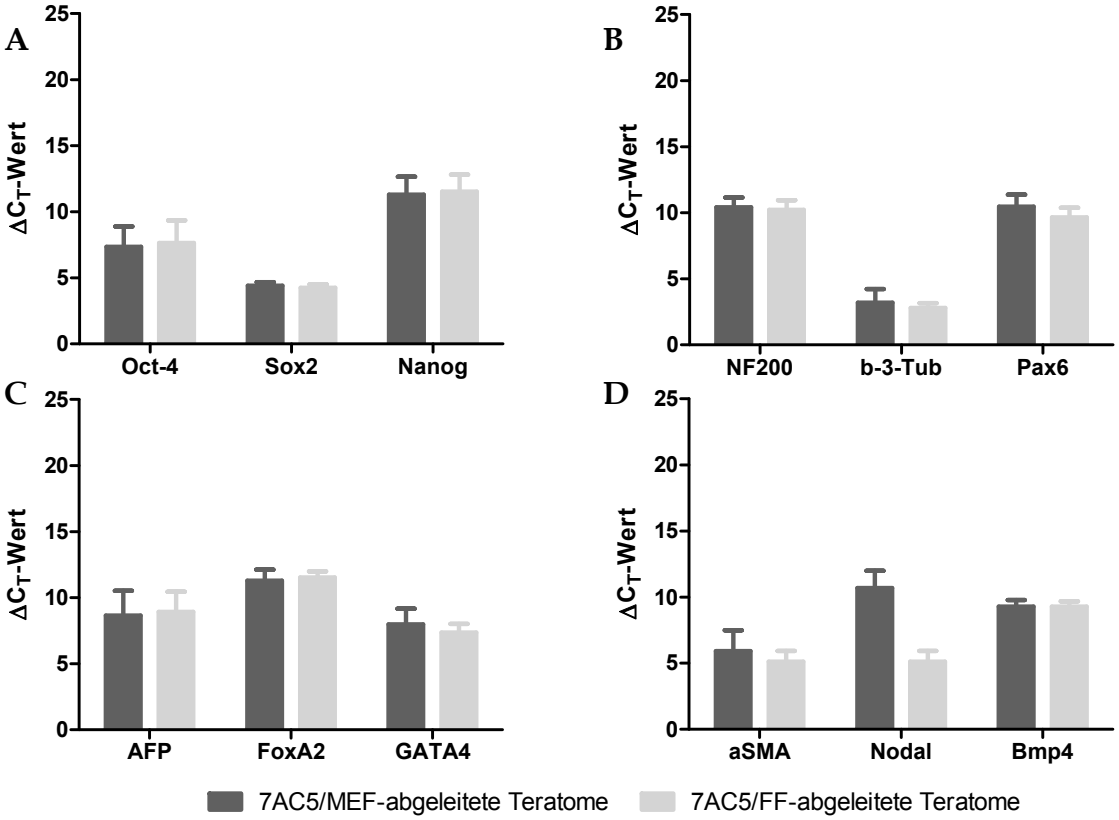


Abbildung 23 Vergleichendes Expressionsprofil von 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-abgeleiteten Teratomen
Die 7AC5-stammzellabgeleiteten Teratome wurden auf die Expression von Pluripotenzmarkern (A) und keimblattspezifischen Differenzierungsmarkern (B-Ektoderm, C-Endoderm, D-Mesoderm) untersucht. Zwischen 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-abgeleiteten Teratomen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau.

Die Genexpressionsprofile der unterschiedlich kultivierten 7AC5-stammzellabgeleiteten Teratome wiesen im NOD/SCID-Mausmodell keine Unterschiede auf. Nur die Expression von Nodal ist in den 7AC5/FF-abgeleiteten Teratomen deutlich höher exprimiert im Vergleich zu 7AC5/MEF-abgeleiteten Teratomen (ΔC_T–$Wert_{7AC5/FF} \approx 5$; ΔC_T–$Wert_{7AC5/MEF} \approx 10$; Abb.23D).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass nach der Transplantation von 7AC5-Stammzellen unabhängig von den Kultivierungsmethoden im immundefizienten NOD/SCID-Mausstamm eine schnelle und reproduzierbare Gewebeentwicklung induziert werden kann. Es kommt zu einer rapiden Progression von stammzellabgeleiteten Teratomen mit der Ausbildung charakteristischer

Strukturen der drei Keimblätter. Des Weiteren zeigen die gebildeten Teratome das typische Markerprofil mit einer verminderten Expression der untersuchten Pluripotenzmarker und einem gesteigerten Expressionslevel der Differenzierungsmarker im Vergleich zu den undifferenzierten Ausgangszellen.
Die partiell beobachteten Unterschiede in der Homogenität des Wachstums und in der Expression einzelner Marker weisen im untersuchten Modell keinen Einfluss auf die Entwicklung und Struktur der stammzellabgeleiteten Teratome hin.

4.2.1.2. Teratombildung in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl

Das Engraftment und damit die Gewebebildung nach der Transplantation von Stammzellen wird durch intrinsische und experimentelle Parameter beeinflusst. Dieser Teil der Arbeit untersucht den Einfluss der transplantierten **Zellzahl** auf das Teratomwachstum und Differenzierung (Bildungsrate, Expressionsprofil, Histopathologie). $1x10^3$ bis $1x10^7$ 7AC5-Zellen wurden s.c. in NOD/SCID-Mäuse transplantiert.
In Abb.24 ist die Teratombildungsrate in Abhängigkeit von der transplantierten Zellzahl (7AC5/FF: $1x10^3$ bis $1x10^7$) *in vivo* dargestellt. Mit steigender Zellzahl konnte ein schnelleres Teratomwachstum dokumentiert werden.

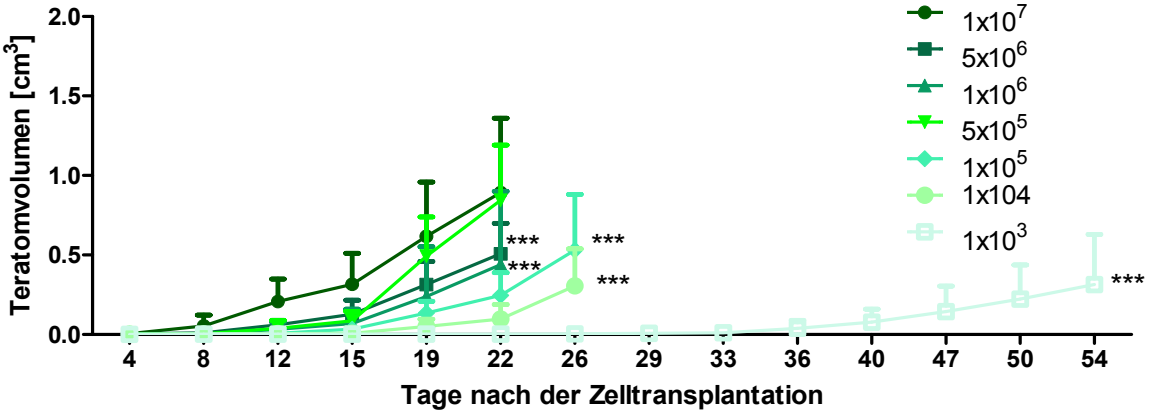


Abbildung 24 Zellzahlabhängige Wachstumskurve von 7AC5/FF-stammzellabgeleiteten Teratomen in NOD/SCID Mäusen
$1x10^3$ bis $1x10^7$ wurden s.c. (50µl Zellsuspension + 50µl MG) in immundefiziente NOD/SCID-Mäuse appliziert. Die Teratomentwicklung wurde zweimal wöchentlich dokumentiert. Mit sinkender Zellzahl war eine signifikante, zeitliche Verzögerung der Teratombildung und des Teratomwachstums zu beobachten mit Ausnahme von $5x10^5$ applizierten Zellen, die ab dem Tag 15 ein gesteigertes Teratomwachstum im Vergleich zur höheren Zellzahl zeigten. n = 5 Tiere je Gruppe; ***p< 0,001

Von den 7AC5-stammzellabgeleiteten Teratomen wurden mittels real-time RT-PCR Expressionsprofile erstellt (Abb.25). Im Vergleich zu den undifferenzierten Ausgangszellen zeigen die Teratome eine verminderte Expression der Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 (Abb.25A). Mit der sinkenden Zellzahl nimmt tendenziell auch das Expressionsniveau der drei Pluripotenzmarker ab. Im Vergleich zu $1x10^7$-abgeleiteten Teratomen mit einem $\Delta C_T \approx 7$ für den Marker Oct-4 exprimieren $1x10^3$-abgeleitete Teratome diesen Marker nur noch auf einem sehr schwachen Niveau ($\Delta C_T \approx 15$). Sox2 hingegen konnte weiterhin auf einem hohen Level detektiert werden. Die Probennahme für die $1x10^3$-abgeleitete Teratome erfolgte jedoch zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 54 im Vergleich zu $1x10^7$-abgeleitete Teratome an Tag 22).

Im Teratom zeigt sich bei den Differenzierungsmarker eine deutliche Expressionsinduktion in Bezug zu den undifferenzierten Ausgangszellen. Vor allem die endodermalen Marker AFP und DLK werden auf einem moderaten bis hohen Level transkribiert. Beta-3-Tubulin sowie aSMA zeigen auch eine starke Differenzierungsinduktion im Teratom. Eine zellzahlabhängige Expressionsänderung ist bei diesen Markern ebenfalls zu beobachten. Mit der abnehmenden Zahl an transplantierten Zellen zeigen die entwickelten Teratome eine stärkere Expression der Differenzierungsmarker (Abb.25B – Ektoderm: b-3-Tub; Abb.25C – Endoderm: AFP, GATA4) mit Ausnahme von $1x10^3$ applizierten Stammzellen.

Bei den anderen Differenzierungsmarkern wie NF200 oder Bmp4 konnten keine deutlichen Expressionsänderungen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist für Nodal erneut eine Expressionsabnahme zu verzeichnen.

Zusammenfassend lässt sich eine zellzahlabhängige Teratombildung von 7AC5/FF-Stammzellen *in vivo* beobachten, die sich durch eine zeitliche Verzögerung des Wachstums dokumentieren lässt. Jedoch hat die applizierte Zellzahl keinen Einfluss auf die Ausbildung der keimblattspezifischen Strukturen und auf das untersuchte Expressionsprofil.

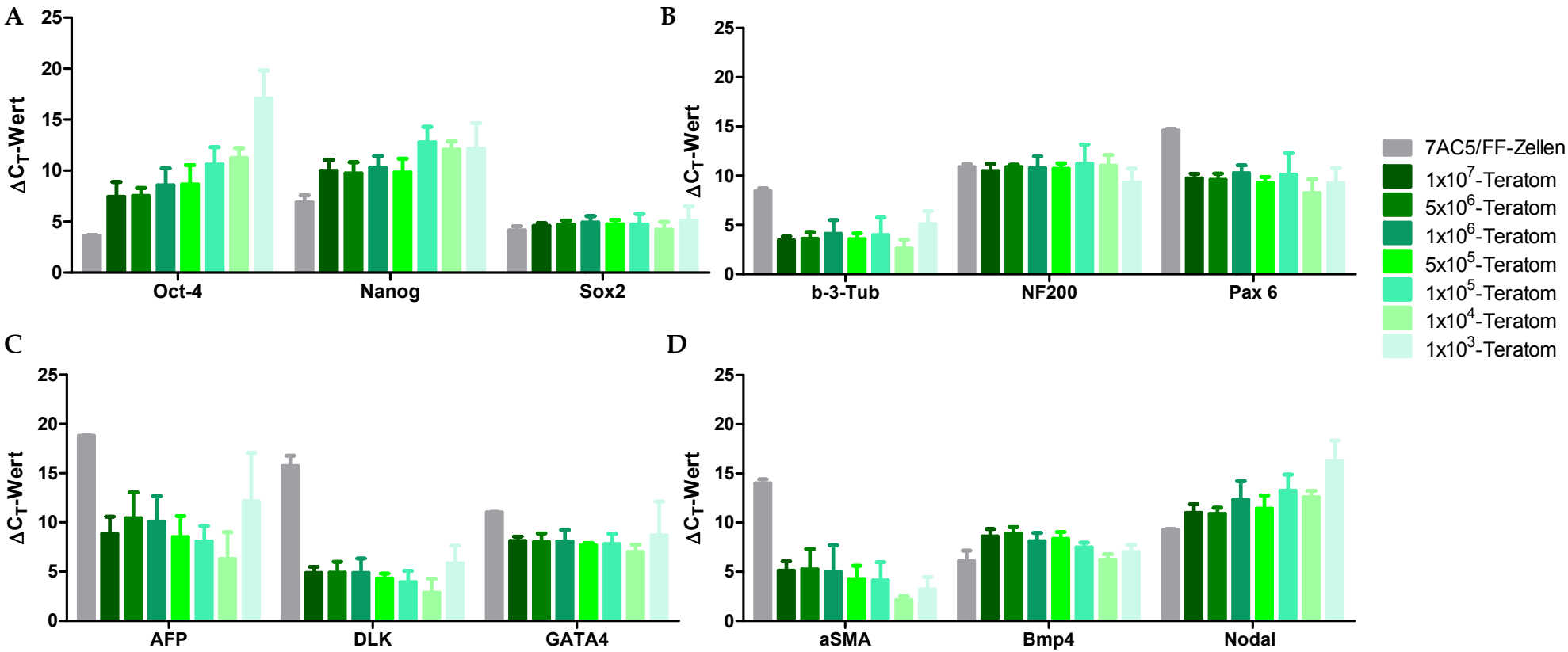


Abbildung 25 Vergleichendes Genexpressionsprofil von 7AC5/FF-stammzellabgeleiteten Teratomen in NOD/SCID-Mäusen in Abhängigkeit von der applizierten Zellzahl

Die 7AC5-stammzellabgeleiteten Teratome wurden auf die Expression von Pluripotenzmarkern (A) und keimblattspezifischen Differenzierungsmarkern (B-Ektoderm, C-Endoderm, D-Mesoderm) untersucht und vergleichend zu undifferenzierten 7AC5/FF-Stammzellen bewertet. Die Teratome zeigten ein geringes Expressionsniveau der untersuchten Pluripotenzmarker. Das Expressionslevel nahm mit der sinkenden Zellzahl ab. Die ausgewählten Differenzierungsmarker der drei Keimblätter wurden in den stammzellabgeleiteten Teratomen im Vergleich zu den Ausgangszellen (*in vitro* Daten von 7AC5-Stammzellen) höher exprimiert mit Ausnahme von Nodal.

4.2.1.2.1. Sekundärtransplantation

Nach der Transplantation von undifferenzierten Stammzellen in ein geeignetes Mausmodell entwickeln sich Teratome. Diese tumorartigen Strukturen setzen sich aus differenzierten Geweben der drei Keimblätter zusammen, weisen aber auch noch Anteile mit undifferenzierten, pluripotenten Zellen auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde geprüft, inwieweit eine Einzelzellsuspension aus stammzellabgeleiteten Teratomen immer noch tumorigenes Potenzial besitzt und ein vollständig ausgeprägtes Teratom bildet, um damit den Anteil an pluripotenten Zellen nachweisen zu können. Exemplarisch sind die Ergebnisse für $1x10^6$ transplantierte 7AC5/FF-Stammzellen gezeigt. Hierzu wurden die aus 4.2.1.2. gewonnenen Teratome mittels GentleMACS aufgearbeitet, eine Einzelzellsuspensionen hergestellt und erneut s.c. transplantiert. Es konnte bei allen Sekundärtransplantationen unabhängig von der Ursprungszellzahl eine Teratombildung dokumentiert werden.

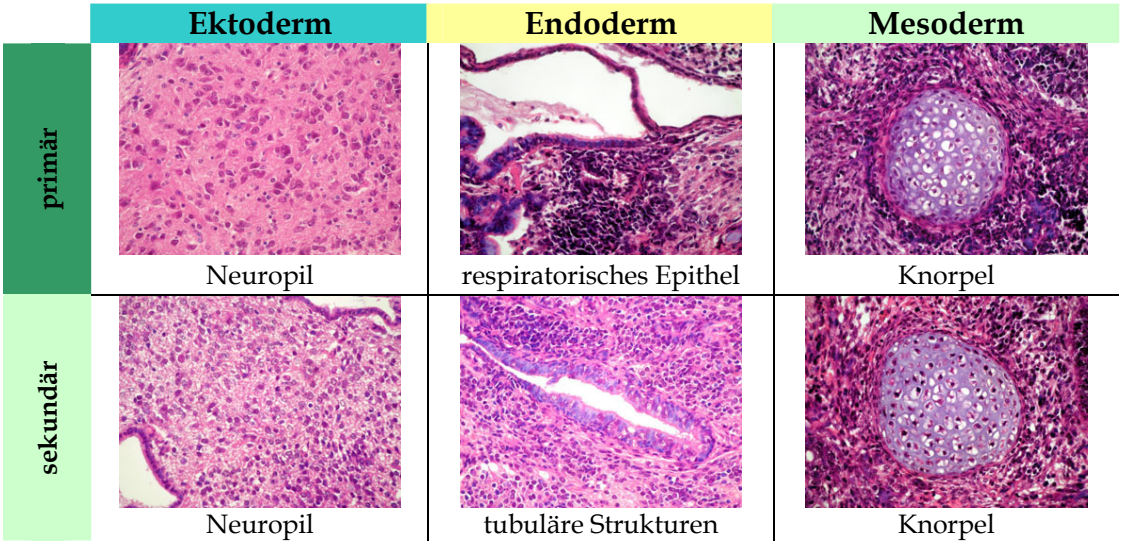


Abbildung 26 Histopathologie der 7AC5/FF abgeleiteten Teratome und deren Sekundärtransplantation
Exemplarisch sind die H&E-Färbungen von Primär- und Sekundärteratomen aus $1x10^6$ transplantierten Zellen dargestellt. Es wurden keimblattspezifische Strukturen identifiziert, die sowohl dem Ektoderm (Neuropil) als auch Endoderm (respiratorisches Epithel bzw. tubuläre Strukturen) sowie Mesoderm (Knorpel) zugeordnet werden konnten. Histopathologisch waren keine Unterschiede zwischen Primär- und Sekundärteratom nachweisbar.

Alle Gruppen zeigten eine schnelle Volumenzunahme des Gewebes innerhalb von etwa 25 Tagen. Die Sekundärteratome wurden histopathologisch bewertet und Expressionsprofile erstellt. Es konnten alle drei Keimblattstrukturen nachgewiesen werden. Für jedes Keimblatt ist in Abb.26 beispielhaft eine charakteristische Struktur

dargestellt. Zwischen Primär- und Sekundärteratom konnten sehr hohe Ähnlichkeiten dokumentiert werden.

Das Expressionsprofil der Primar- und Sekundärteratome von Pluripotenz- und Differenzierungsmarker wurde vergleichend bestimmt und es konnten keine signifikanten Unterschiede im Expressionsprofil nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den undifferenzierten Ausgangszellen zeigen die Sekundärteratome wie auch die Primärteratome eine verminderte Expression der Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 (Abb.27A). Die Differenzierungsmarker der drei Keimblätter werden im Teratom auf einem höheren Niveau exprimiert (Abb.27B-D).

Somit bestehen die stammzellabgeleiteten Teratome noch aus einer ausreichenden Anzahl an undifferenzierten Zellen, um nach einer Retransplantation (Sekundärtransplantation von Einzelzellen aus dem Primärteratom) ein vollständig ausgebildetes Teratom mit den drei Keimblattstrukturen zu bilden.

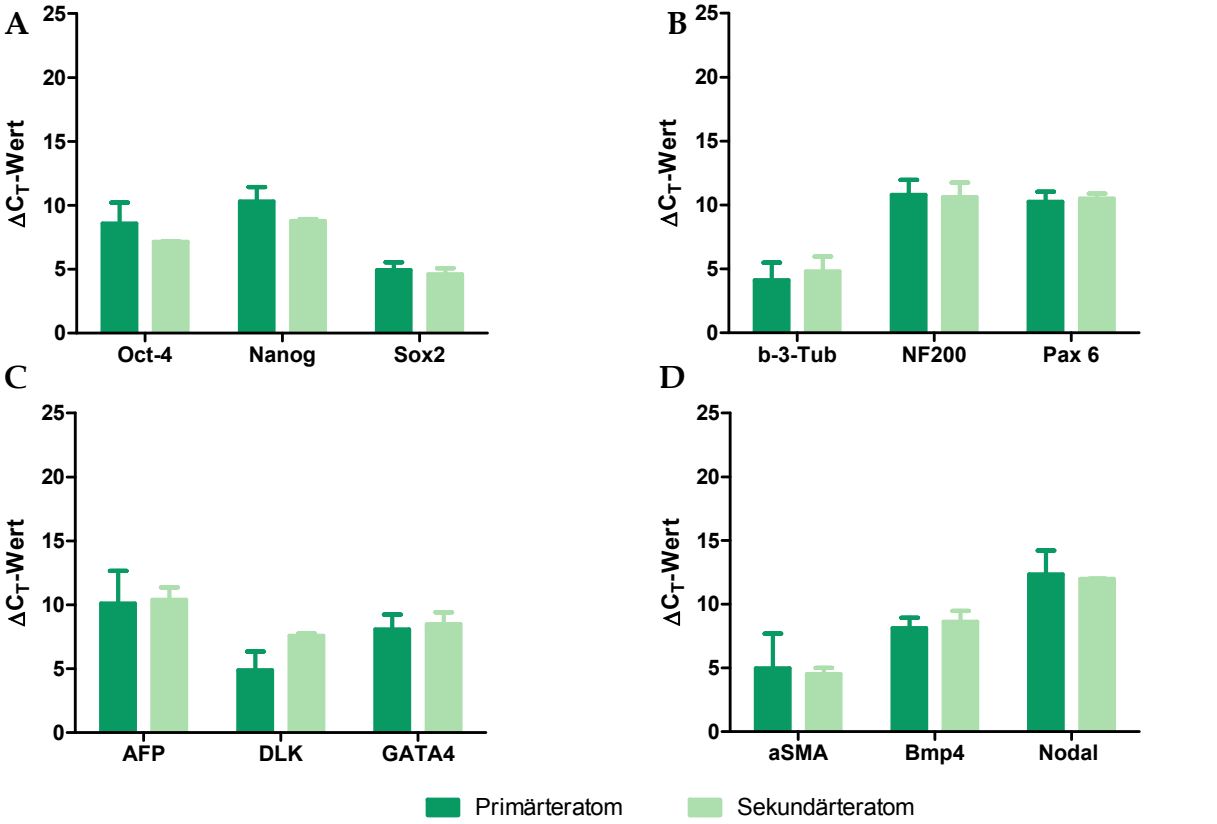


Abbildung 27 Vergleichendes Expressionsprofil von Primär- und Sekundärteratom von 1x10⁶ transplantierten 7AC5/FF Zellen in NOD/SCID-Mäuse

Die 7AC5-Stammzellabgeleiteten Primär- und Sekundärteratome wurden auf die Expression von Pluripotenzmarkern (A) und keimblattspezifischen Differenzierungsmarkern (B-Ektoderm, C-Endoderm, D-Mesoderm) untersucht. Zwischen Primär- und Sekundärteratom zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau. Differenzierungsmarker wurden im Vergleich zu den undifferenzierten Ausgangszellen höher exprimiert und die Pluripotenzmarker waren durch ein vermindertes Expressionslevel gekennzeichnet.

4.2.1.3. Teratomanalyse in Abhängigkeit von der Zeit

Als weiterer Parameter zur Charakterisierung der Teratombildung von Stammzellen wurde der Probenahmezeitpunkt untersucht. Ziel war die zeitabhängige Bestimmung der Ausbildung der drei Keimblattstrukturen und der Veränderung im Expressionsprofil im Vergleich zu den undifferenzierten Ausgangsstammzellen.
Die Kinetik der Teratombildung wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Tag 12 und 21) histopathologisch bewertet und die zugehörigen Expressionsprofile erstellt.

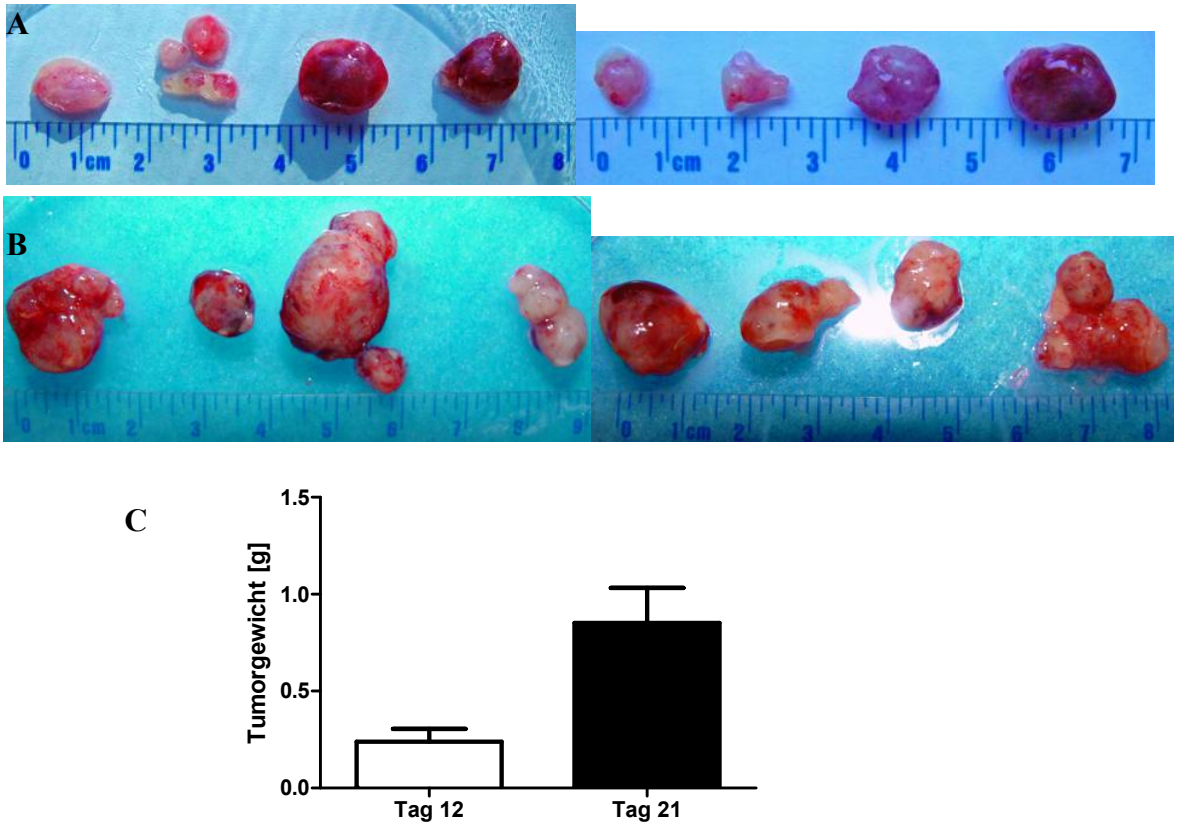


Abbildung 28 Teratomprogression in Abhängigkeit von der Zeit
1x10^6 7AC5/FF-Stammzellen wurden s.c. in NOD/SCID-Mäuse transplantiert. Der Versuch wurde zum Tag 12 (A) bzw. Tag 21 (B) beendet. Zu beiden Zeiten konnten gut durchblutete Teratome dokumentiert werden. Zwischen Tag 12 und 21 kam es zu einer deutlichen Gewichtszunahme (C). n = 8 Tiere

Am Tag 12 und Tag 21 konnten Teratome am Applikationsort entnommen werden, die eine gute Vaskularisierung aufwiesen. Wie aus Abb.28 ersichtlich ist, unterscheiden sich die Teratome lediglich in ihrer Größe bzw. Gewicht. Die histopathologische Begutachtung konnte alle drei Keimblattstrukturen sowohl am Tag 12 als auch 21 identifizieren (Daten nicht gezeigt).
Die Analyse der Expressionskinetik der stammzellabgeleiteten Teratome bestätigte das Ergebnis vorangegangener Versuche, dass die Expression der Pluripotenzmarker

(Abb.29A) im Teratom reduziert und die der Differenzierungsmarker (Abb.29B-D) erhöht wird. Zum Tag 12 sind die untersuchten Pluripotenzmarker niedriger exprimiert als zum Tag 21. Das Expressionslevel der Differenzierungsmarker nimmt mit der längeren Versuchsdauer stetig zu mit Ausnahme von Pax6. Somit ist bereits relativ früh nach der Applikation von pluripotenten Stammzellen eine Ausdifferenzierung und Ausbildung von Keimblattstrukturen zu beobachten, die mit der Versuchsdauer weiter fortschreitet.

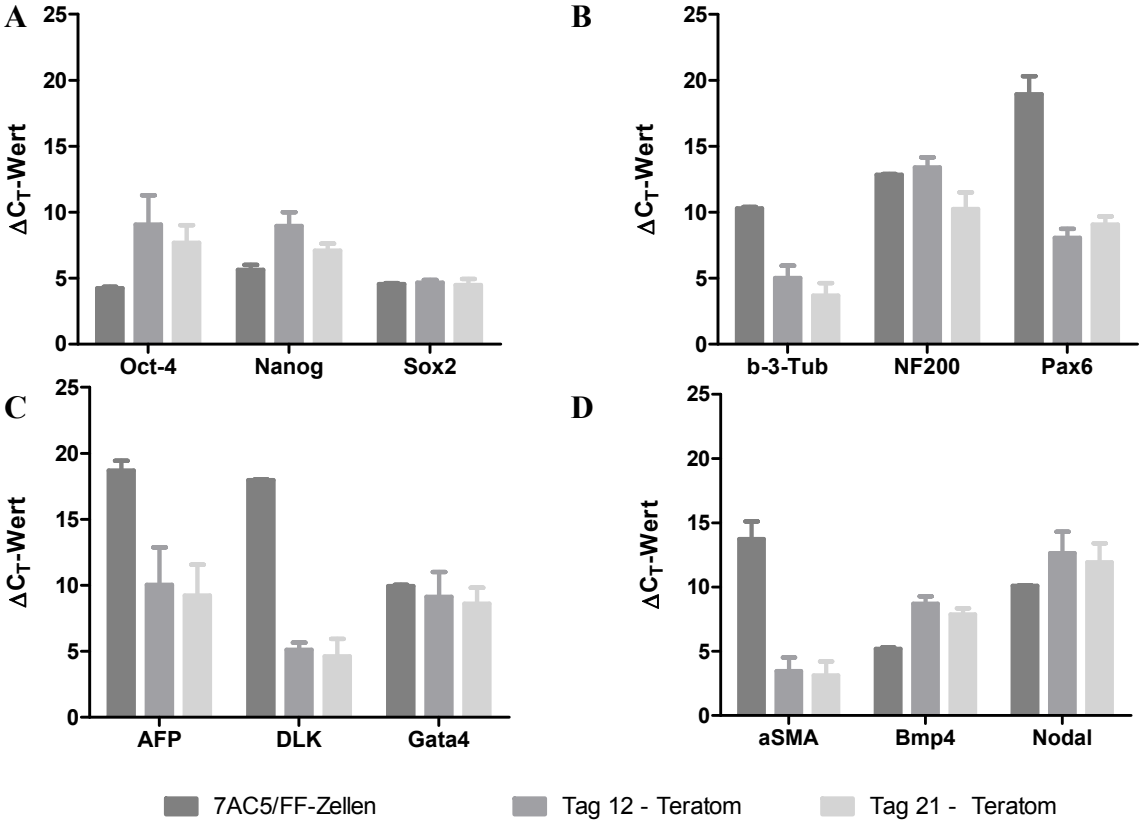


Abbildung 29 Expressionsprofil von 7AC5-abgeleiteten Teratomen in NOD/SCID-Mäusen in Abhängigkeit von der Zeit
Die 7AC5-abgeleiteten Teratome wurden auf die Expression von Pluripotenzmarkern (A) und keimblattspezifischen Differenzierungsmarkern (B-Ektoderm, C-Endoderm, D-Mesoderm) zum Tag 12 und Tag 21 untersucht und vergleichend bewertet zu den undifferenzierten Ausgangszellen. Zu beiden Zeitpunkten zeigen die Teratome im Vergleich zu 7AC5/FF-Stammzellen eine reduzierte Expression der Pluripotenzmarker und eine gesteigerte Expression der Differenzierungsmarker. Mittelwert ±SD, n= 8 Tiere

Daraus folgt, dass sowohl die eingesetzte Zellzahl sowie ein früher bzw. später Zeitpunkt die Teratomentwicklung und damit die Ausbildung der Keimblattstrukturen kaum beeinflusst. Es zeigt sich schon früh eine Ausdifferenzierung, obwohl die Teratomgröße noch relativ gering ist. Somit beginnt die Differenzierung parallel mit der Teratomprogression.

Im Rahmen der weiterführenden Arbeiten wurden deshalb 7AC5-Stammzellen unter feeder- und serumfreien Bedingungen mit dem ESGRO Complete Plus System kultiviert und für *in vivo* Versuche $1x10^6$ 7AC5-Stammzellen in NOD/SCID-Mäuse appliziert.

4.2.1.4. Das Expressionsprofil von NOD/SCID-Mausembryonen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryogenese

Für die vergleichende Bewertung und die Einordnung der Expressionsprofile von 7AC5-Stammzellen und den daraus abgeleiteten Teratomen wurden NOD/SCID-Mausembryonen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryogenese analysiert.

Zum Tag 5, 10, 15 und 20 der Trächtigkeit wurden die NOD/SCID-Muttertiere abgetötet und die Embryonen entnommen. Anschließend wurden die Embryonen mit dem RNeasy Maxi Kit aufgearbeitet und eine Expressionsanalyse von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle zusammenfassend dargestellt.

Embryonen (E4, E5) aus frühen Stadien der Embryonalentwicklung sind durch eine sehr schwache Expression des Pluripotenzmarkers Nanog gekennzeichnet. Oct-4 und Sox2 sind nicht nachweisbar. Die Differenzierungsmarker des Endoderms und Ektoderms sind auch nur sehr schwach exprimiert mit Ausnahme von DLK und Nestin. Die mesodermalen Marker aSMA und Bmp4 werden moderat bis stark exprimiert. Nodal ist nicht detektierbar.

Hingegen zeigen Embryonen aus späten Phasen (E10, E15 und E20) eine deutlich erhöhte Expression des Pluripotenzmarkers Sox2. Nanog und Oct-4 werden weiterhin nur sehr schwach exprimiert. Die Differenzierungsmarker des Endoderms weisen eine sehr hohe Expression auf. Bei den ektodermalen Markern werden NF200 und Pax6 moderat exprimiert, wohingegen Nestin und beta-3-Tubulin durch ein ähnliches Expressionslevel wie GATA4, AFP und DLK (Endoderm) gekennzeichnet sind. Bei den untersuchten mesodermalen Markern wird nur aSMA ebenfalls auf diesem sehr hohen Expressionslevel nachgewiesen. Bmp4 wird weiterhin wie im Stadion E4/E5 moderat exprimiert, Nodal ist weiterhin nur sehr schwach nachweisbar.

Im Folgenden wurden die Expressionsprofile der einzelnen Stadien der Embryonalentwicklung der NOD/SCID-Mausembryonen mit den Expressionsprofilen von 7AC5/FF-Stammzellen bzw. den daraus abgeleiteten Teratomen verglichen.

Die frühen Embryonen wiesen keine Expression der Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 auf, die in undifferenzierten 7AC5/FF-Stammzellen auf einem hohen Level detektierbar waren, sie zeigten aber eine sehr geringe Expression der Differenzierungsmarker NF200, beta-3-Tubulin, Pax6 (Ektoderm), GATA4, AFP (Endoderm) sowie Bmp4 (Mesoderm), die auf einem ähnlichen Level bei den Stammzellen nachweisbar waren.

Hingegen wiesen die stammzellabgeleiteten Teratome eine verminderte Expression der Pluripotenzmarker auf sowie eine erhöhte Expression der keimblattspezifischen Marker. Hier konnten ebenfalls Übereinstimmungen im Expressionslevel zwischen den Embryonen der späten Embryonalentwicklung und den abgeleiteten Teratomen gefunden werden. Die ektodermalen Marker Nestin, NF200 sowie beta-3-Tubulin werden wie die endodermalen Marker AFP, DLK und GATA4 auf einem vergleichbar moderaten bis hohen Level exprimiert. Ein vergleichbares Niveau ist für die mesodermalen Marker aSMA und Bmp4 nachweisbar.

Tabelle 10 Expressionsprofil von NOD/SCID-Mausembryonen, 7AC5-Stammzellen und 7AC5-stammzellabgeleiteten Teratomen
Zum Zeitpunkt E4/E5 (frühe Phase) sowie E10 (mittlere Phase) und E15, E20 (späte Phase) wurden NOD/SCID-Mausembryonen auf ihr Expressionsprofil analysiert. Neben typischen Pluripotenzmarkern wurden auch keimblattspezifische Marker des Ekto-, Endo- und Mesoderms untersucht. Vergleichend wurden Expressionsprofile von undifferenzierten murinen embryonalen Stammzellen (7AC5/FF)und den daraus abgeleiteten Teratomen ( ) herangezogen. Farblich hinterlegt sind die Übereinstimmungen zwischen Embryonen/7AC5-Stammzellen bzw. Embryonen/Teratomen.
–: keine Expression nachweisbar, +: schwache Expression, ++: moderate Expression; +++: starke Expression, ++++: sehr starke Expression

	Pluripotenz			Ektoderm				Endoderm			Mesoderm		
	Oct-4	Nanog	Sox2	Nestin	NF200	b-3-Tub	Pax6	GATA4	AFP	DLK	aSMA	Nodal	Bmp4
E 4	-	+	-	+++	+	+	-	+	-	++	++++	-	++
E 5	+	+	-	+++	+	+	-	+	-	+++	++++	-	++
E 10	+	+	+++	+++	++	++++	++	+++	++++	+++++	++++	+	++
E 15	+	+	+++	+++	++	++++	++	+++	++++	+++++	++++	+	++
E 20	+	+	+++	+++	++	++++	++	+++	++++	+++++	++++	-	++
7AC5/FF	++++	+++	++++	+	++	++	-	++	-	-	-	++	++
Teratom	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	++

4.2.2. *In vivo* Detektion von 7AC5-Stammzellen durch Biolumineszenz

7AC5/FF-Stammzellen wurden mittels Nukleofektion nach Amaxa mit einem Luc-Reportergen transfiziert (siehe 4.1.2.). Damit können die transfizierten 7AC5/FF-(7AC5/Luc-) Stammzellen mittels Biolumineszenz nachgewiesen werden. Durch geeignete Messsysteme können Luc-transfizierte Zellen *in vivo* live verfolgt und deren Distribution und Engraftment in der Maus durch Biolumineszenzanalysen dokumentiert werden. In einem ersten Schritt zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden $1x10^2$ bis $1x10^6$-Zellen s.c. in die Maus transplantiert. Die Biolumineszenzaufnahmen der 7AC5/Luc-Stammzellen sind im zeitlichen Verlauf in einer Übersicht dargestellt (Abb.30). Sofort nach Applikation waren nur **$1x10^5$ und $1x10^6$**-Zellen an der Applikationsstelle nachweisbar. Zum **Tag 1** konnte erneut nur bei $1x10^6$ und **$1x10^5$** applizierten Zellen eine messbare Biolumineszenzaktivität detektiert werden. Die niedrigeren Zellzahlen induzierten erst zeitversetzt ein messbares Biolumineszenzsignal. So konnten für **$1x10^4$** transplantierte 7AC5/Luc-Zellen zum **Tag 3** bei 7/10 Tieren und bei **$1x10^3$** zum **Tag 5** bei 6/10 Tieren ein Signal nachgewiesen werden, 24h später waren alle Tiere positiv. Erste Biolumineszenzaktivität bei **$1x10^2$** transplantierten Zellen war zum **Tag 13** detektierbar, wobei ein deutliches Signal erst beim Tag 25 bei 2/8 Tieren gemessen werden konnte. Bei $1x10^2$ Zellen konnten bis zum Versuchende keine weiteren biolumineszenzaktiven Tiere nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Nachweis der Zellen *in vivo* mittels Biolumineszenz wurde durch mechanische Vermessung nach s.c. Transplantation bei $1x10^6$ Zellen erst zum Tag 7 ein Wachstum dokumentiert. Für $1x10^5$ war dies zum Tag 13 möglich, bei $1x10^2$ sogar erst zum Tag 35 des Versuches (Abb.31). Damit lässt sich die Distribution, das Engraftment und das Wachstum von Luc-transfizierten Zellen bzw. Teratomen durch Biolumineszenz viel früher dokumentieren als durch die konventionelle mechanische Methode mit einem Messschieber. Exemplarisch sind die Ergebnisse der Teratomprogression für $1x10^6$ transplantierte Zellen im zeitlichen Verlauf vergleichend zwischen der Messung mit Biolumineszenz und durch Größenmessung dargestellt.

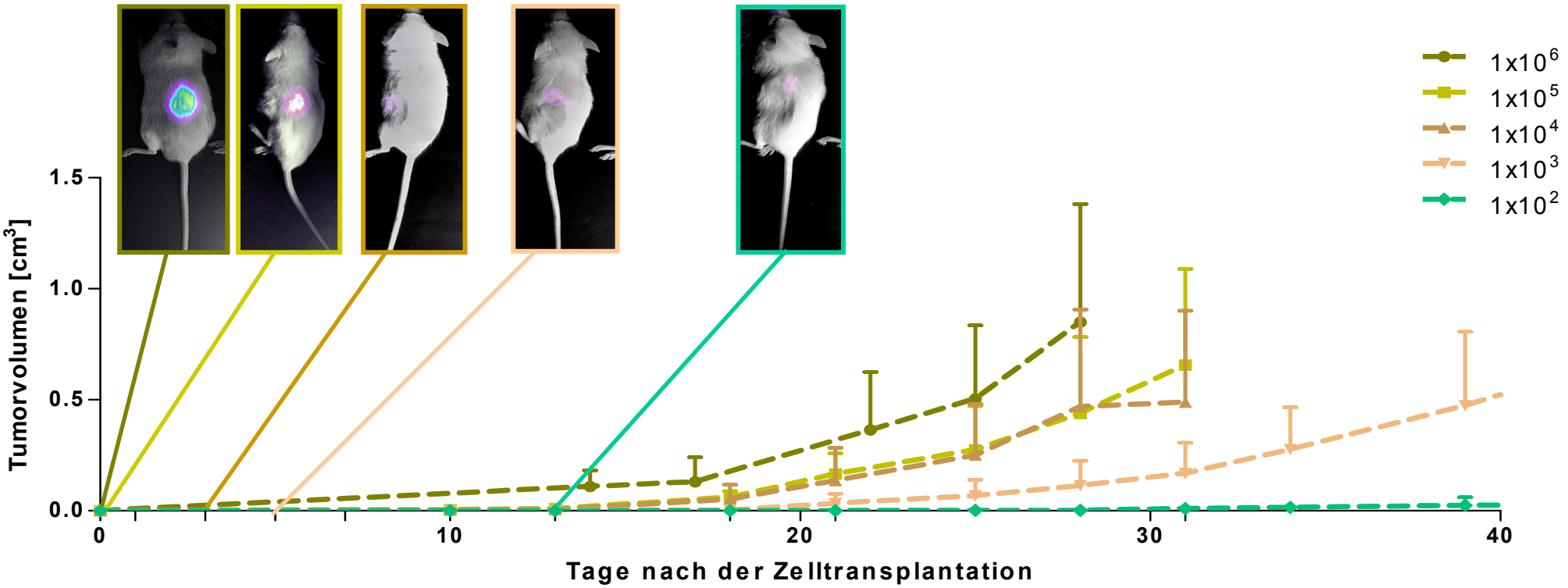


Abbildung 30 Wachstumskurve von 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratomen in Abhängigkeit von der Zellzahl
Nach der Applikation der unterschiedlichen Zellzahlen wurde täglich das Tumorwachstum mittels **Messschieber mechanisch** dokumentiert (- - - -; zellzahlabhängige Farbe). Zusätzlich wurden die Tiere mittels **Bioluminezenz** (———, zellzahlabhängige Farbe) auf Luc-positive Zellen untersucht. Es zeigte sich eine deutliche zeitliche Abhängigkeit des Biolumineszenzsignals sowie der Ertastbarkeit der Teratome im Zusammenhang mit der applizierten Zellzahl. Im Vergleich zueinander konnte mittels Biolumineszenz deutlich früher ein Engraftment der Luc-positiven Zellen nachgewiesen werden. Mittelwert ±SD, n = 10 Tiere

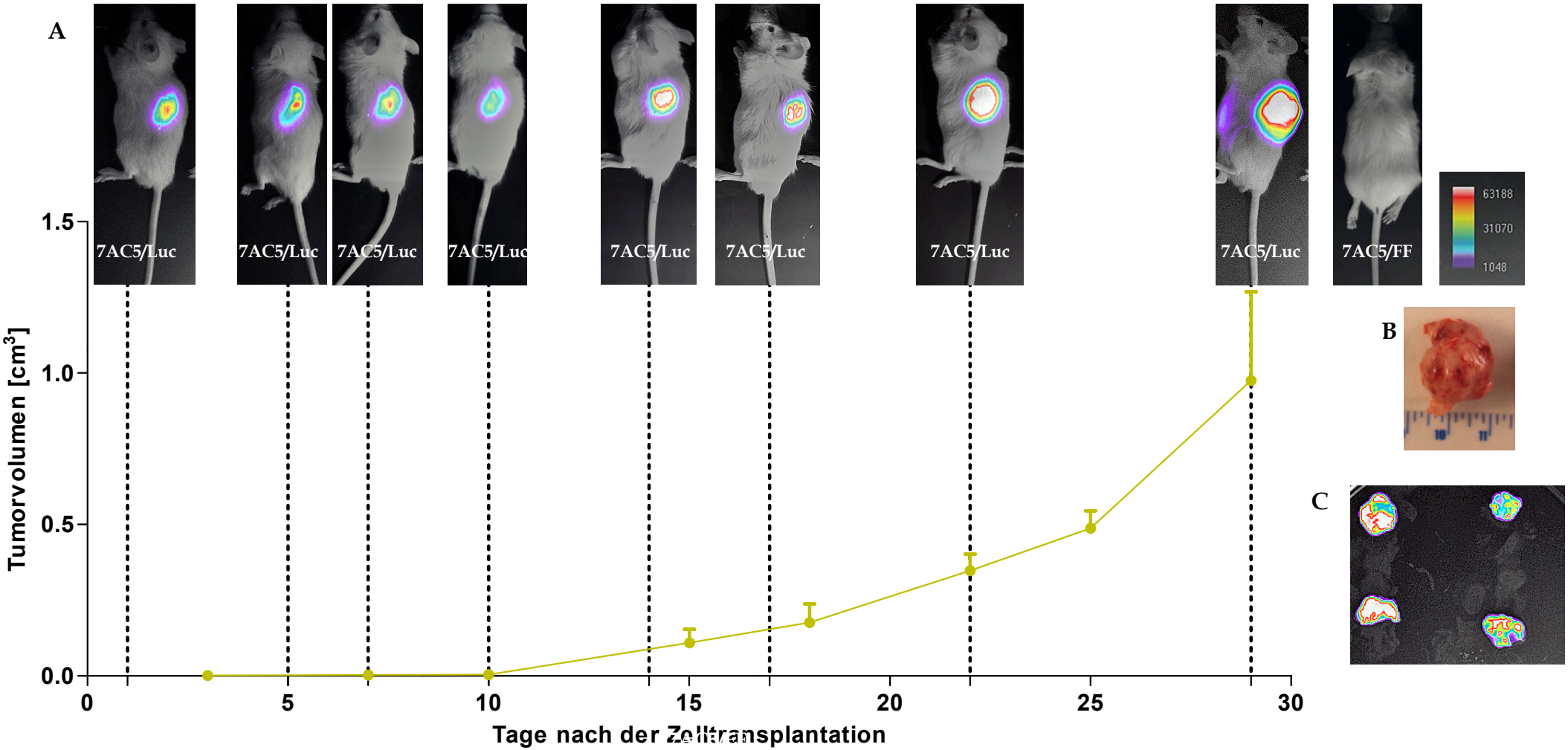


Abbildung 31 Nachweis der Teratombildung nach der Transplantation von 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Zellen in NOD/SCID-Mäuse mittels Biolumineszenz und mechanisch mit einem Messschieber

1x10⁶ 7AC5/Luc-Stammzellen wurden s.c. in NOD/SCID-Mäuse transplantiert und das Biolumineszenzsignal über einen Zeitraum von 29 Tagen dokumentiert (A). Nicht-transfizierte Zellen induzierten zwar eine Teratombildung, jedoch waren keine Biolumineszenzsignale zu dokumentieren (exemplarisch 7AC5/FF Tag 15 dargestellt). Im Gegensatz dazu konnte über den Versuchszeitraum nach der Transplantation von 7AC5/Luc-Zellen ein stetig wachsendes Biolumineszenzsignal (Intensität, Fläche) an der Transplantationsstelle dokumentiert werden. Nach der Autopsie wurde an dieser Stelle ein Teratom entnommen (B), die alle ein sehr hohes Biolumineszenzsignal aufwiesen (C).

In Abb.31 ist über den Versuchszeitraum von 29 Tagen die Teratom-(Tumor-) zunahme über das resultierende Biolumineszenzsignal dargestellt. Zunächst nimmt die Signalintensität der progredienten Teratombildung bis Tag 14 kontinuierlich zu. Im weiteren Versuchsverlauf wächst mit der Intensität auch die Fläche des Biolumineszenzsignals. Nicht-transfizierte 7AC5-Zellen zeigten ein Teratomwachstum, was mechanisch mit dem Messschieber dokumentiert wurde, jedoch kein Biolumineszenzsignal (Abb.31 exemplarisch 7AC5/FF-transplantierte Zellen am Tag 15). Zum Versuchsende wurde an der Transplantationsstelle ein Teratom entnommen (Abb. 31B). Die 7AC5/Luc-stammzellabgeleiteten Teratome wurden nach der Extransplantation auf ihre Luciferaseaktivität untersucht. Alle vermessenen Teratome wiesen *ex vivo* eine sehr hohe Biolumineszenzaktivität auf (Abb.31C).

Diese Resultate bestätigen, dass Luc-transfizierte Zellen sich sehr sensitiv in Abhängigkeit von der Zellzahl *in vivo* nachweisen lassen und schneller ein Engraftment der applizierten Zellen bestätigen im Vergleich zur konventionellen Größenmessung.

4.2.2.1. Untersuchung von verschiedenen Applikationsrouten der 7AC5-Zellen

Durch die subkutane Transplantation ist das Engraftment von Zellen auf den Transplantationsort limitiert. Das Teratom wird mechanisch durch einen Messschieber erfasst. Für verschiedenste Fragestellungen der regenerativen Medizin und zellspezifische Anwendungen sind orthotope als auch intravenöse Zellapplikationen von Bedeutung.

Vergleichend wurden 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Stammzellen intrahepatisch (i.hep.), intrasplenal (i.splen.) sowie intravenös (i.v.) in NOD/SCID-Mäuse transplantiert und die Zellen mittels Biolumineszenz über das Luciferasesignal detektiert. Zur Untersuchung der i.hep. und i.splen. Applikation wurden $1x10^2$ bis $1x10^6$ Zellen transplantiert und das Luciferasesignal über die Zeit dokumentiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse für $1x10^6$ 7AC5/Luc-Zellen dargestellt. Die vollständige Übersicht der Versuchsergebnisse ist im Anhang dargestellt.

4.2.2.1.1. Biolumineszenz nach intrahepatischer Applikation

Nach **i.hep.** Applikation von 7AC5/Luc-Zellen konnte zum Tag 0 der Zellapplikation bei 1x10^6 Zellen ein Biolumineszenzsignal bei 1/3 Tieren dokumentiert werden. Zum Tag 4 wurden bei 1x10^6 applizierten Zellen bei allen Tieren (3/3) und bei 1x10^5 bei 2/3 Tieren Luc-Aktivität am Applikationsort (Leber) nachgewiesen. Bis zum Tag 35 konnte bei keinen weiteren Tieren eine Biolumineszenzaktivität nachgewiesen werden. Bei den Luc$^+$-Tieren ist eine deutliche progrediente Signalzunahme (Intensität und Fläche) bis zum Versuchsende zu beobachten (Abb.32, Daten nur für 1x10^6 applizierte Zellen gezeigt).

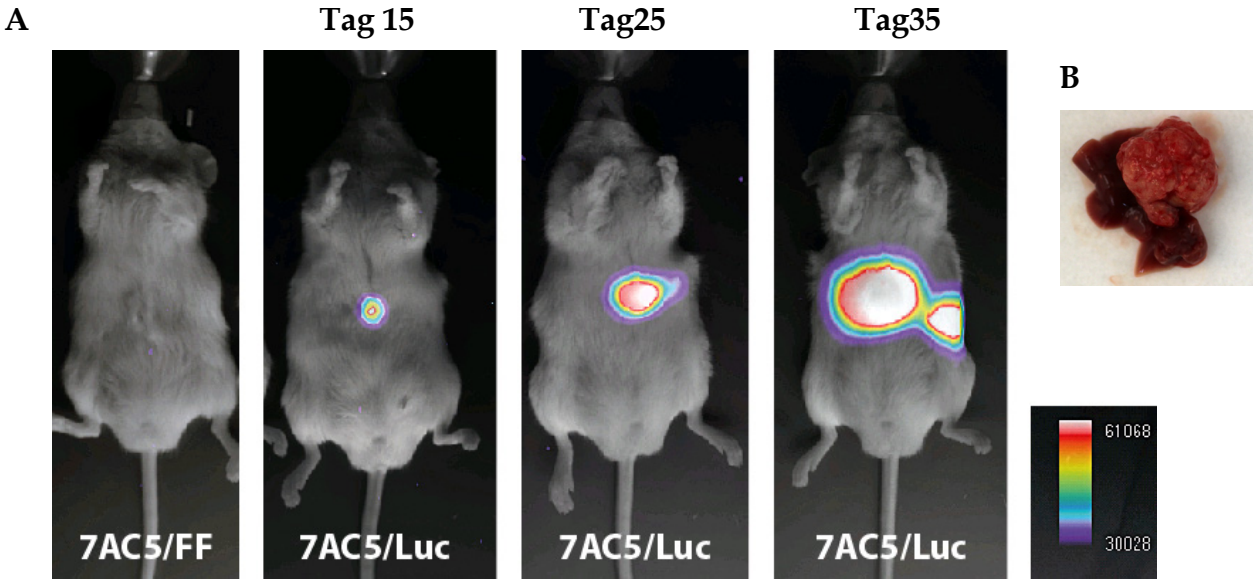


Abbildung 32 Luciferasemessung nach i.hep. Applikation von 1x10^6 7AC5/Luc-Stammzellen
Sofort nach der i.hep. Applikation von 1x10^6 7AC5/Luc-Zellen konnte bei einem Tier eine Luc-Aktivität nachgewiesen werden. Ab Tag 15 war ein deutliches Biolumineszenzsignal an der Transplantationsstelle zu beobachten. Die Intensität und Größe des Signals nahm über den Versuchszeitraum zu (A). Nach der Autopsie konnte in der Leber ein Teratom entnommen werden, das stark mit dem Organ verwachsen war. n = 3 Versuche mit jeweils 5 Tieren

4.2.2.1.2. Biolumineszenz nach intrasplenaler Applikation

Zum Tag 0 sofort nach der i.splen. Zellapplikation konnte zu den applizierten Zellzahlbereichen keine Luc-Aktivität *in vivo* dokumentiert werden.

Zum Tag 1 konnte bei 1x10^6 applizierten Zellen bei 3/3 Tieren ein Signal im Bereich der Milz (Applikationsstelle) beobachtet werden. Nach der Applikation von 1x10^5 Zellen wurde nur bei 1/3 Tieren ein messbares Luciferasesignal am Tag 1 dokumentiert. Diese Biolumineszenzsignale nahmen an Intensität und Größe im

zeitlichen Verlauf zu, bei den anderen Zellzahlen konnte bis zum Versuchende am Tag 77 kein Signal dokumentiert werden.

Exemplarisch ist für $1x10^6$ 7AC5/Luc-Zellen nach i.splen. Applikation die Biolumineszenzaktivität über die Zeit in Abb.33 dargestellt.

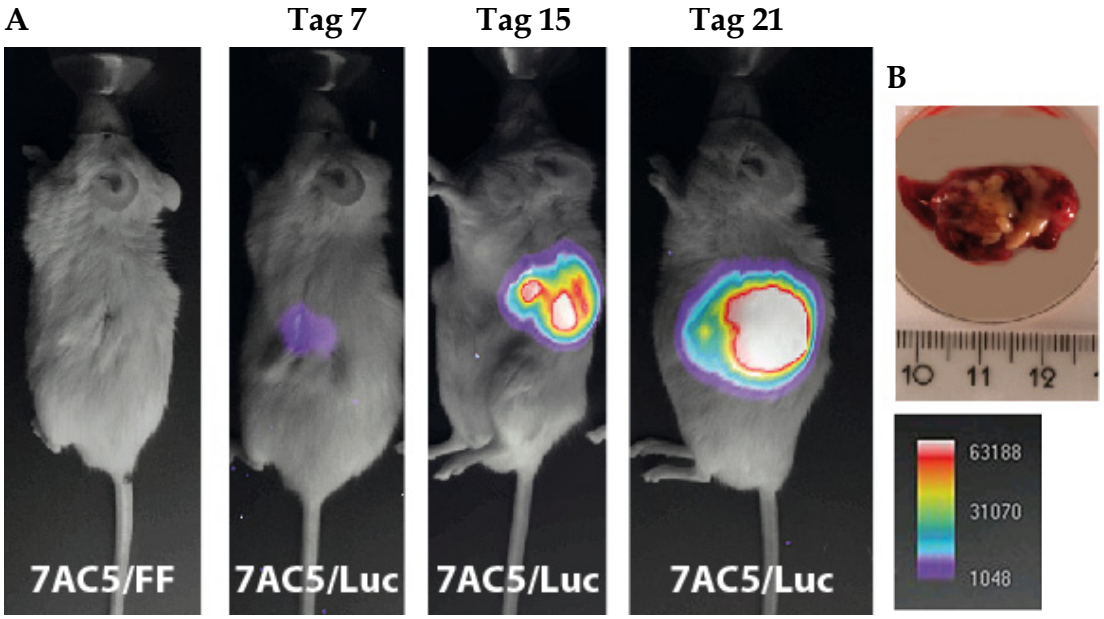


Abbildung 33 Luciferasesignal über den Versuchszeitraum von 21 Tagen nach der i.splen. Applikation von $1x10^6$ 7AC5/Luc-Stammzellen
Nach der i.splen. Applikation von $1x10^6$ 7AC5/Luc-Stammzellen wurde täglich die Luc-Aktivität *in vivo* dokumentiert. Zum Tag 7 war ein deutliches Signal an der Transplantationsstelle nachweisbar. Das Signal nahm an Fläche und Intensität (Helligkeit des Signals) über den Versuchszeitraum von 21 Tagen zu (A). Nach der Autopsie der Tiere konnte in der Milz ein Teratom entnommen werden, das stark mit dem Organ verwachsen war. n = 3 Versuche mit jeweils 5 Tieren

4.2.2.1.3. Biolumineszenz nach intravenöser Applikation

Bei der **i.v.** Applikation der 7AC5/Luc-Stammzellen wurden $1x10^6$, $5x10^6$ und $1x10^7$ 7AC5/Luc-Zellen auf ihre *in vivo* Distribution und Engraftmentpotenzial in NOD/SCID-Mäusen untersucht.

Nach der Applikation der Zellen wurde ein leichtes Biolumineszenzsignal im Lungenbereich für $1x10^7$ applizierte Zellen aufgenommen, wobei die Intensität zellzahlabhängig war. Nach 1h Stunde wurden die Tiere erneut vermessen, hier konnte nur noch bei $1x10^7$ 7AC5/Luc-Zellen ein Signal dokumentiert werden, dass jedoch durch eine geringere Intensität gekennzeichnet war. Dieses Signal war zum Tag 1 nicht mehr vorhanden (Abb.34).

Nach insgesamt 133 Tagen konnte nach der Transplantation von $1x10^6$ Zellen kein Signal mittels Biolumineszenz bei den 5 verwendeten Tieren dokumentiert werden.

Die Autopsie war ebenfalls ohne Befund und es konnte keine Anreicherung der Zellen in den Mausorganen in Form eines Tumors (Teratoms) bestimmt werden.

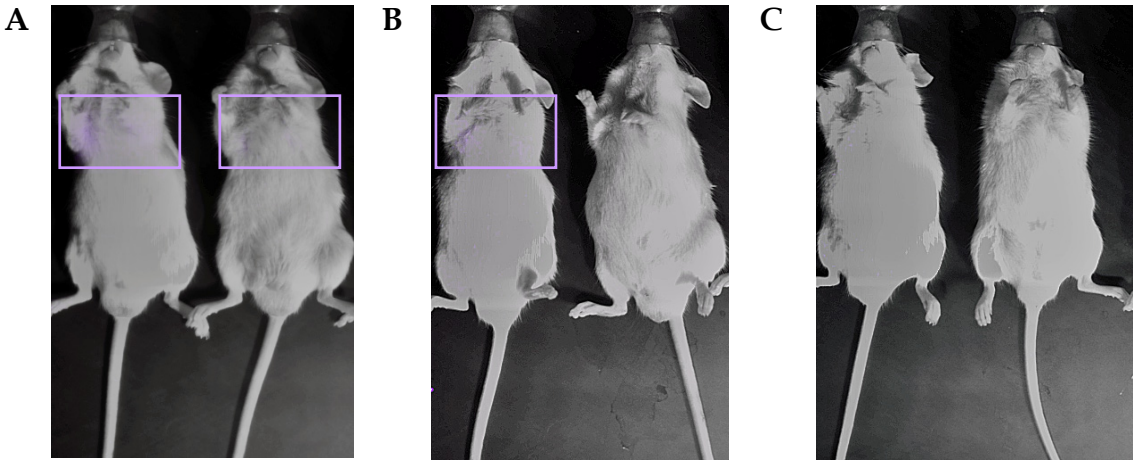


Abbildung 34 Luciferasesignal nach der i.v. Applikation von 1x10^7 7AC5/Luc-Stammzellen
Sofort nach der Applikation von 1x10^7 7AC5/Luc-Stammzellen konnte im Lungenbereich der NOD/SCID-Maus ein leichtes Luciferasesignal dokumentiert werden (A). Dies war 1h nach der Zellapplikation nur noch bei 1/3 Tieren nachweisbar (B). Zum Tag 1 verschwand das Signal vollständig (C).

Ein erstes stabiles Biolumineszenzsignal bei 5x10^6 und 1x10^7 applizierten 7AC5/Luc-Zellen zeigte sich zum Tag 14. Bei 5x10^6 applizierten Zellen konnte eine Anreicherung der Zellen in den Extremitäten bei 1/5 Tieren bestimmt werden (Abb.35A). Hingegen wurde bei der höchsten Zellzahl zusätzlich noch ein Signal im Brustbereich dokumentiert (Abb.35C). Diese Biolumineszenzsignale nahmen über die Zeit an Intensität und Fläche zu. Nach vier bis fünf Wochen traten körperliche Beschwerden (Atembeschwerden, eingeschränkte Funktion der Gliedmaßen) bei den Versuchstieren auf und der Versuch wurde sofort beendet. Nach der Autopsie zeigte sich, dass das Signal im Brustbereich von einem in der Lunge manifestierten Tumor stammt, der die Atembeschwerden höchstwahrscheinlich verursachte (Abb.35D). Die Signale in den Extremitäten konnten Knochentumoren zugeordnet werden, die zum Teil aus dem Knochen unter anderem im Kniegelenk rausgewachsen sind (Abb.35B). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mittels Biolumineszenz die Verteilung, die Migration und das Engraftment von transfizierten 7AC5/FF-Stammzellen *in vivo* live verfolgt werden kann. Die Teratomprogression ist nach organspezifischer Applikation mittels Biolumineszenz nachweisbar. Jedoch zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Nachweisgrenze mittels Biolumineszenz zwischen applizierter Zellzahl und dem organspezifischen Transplantationsort.

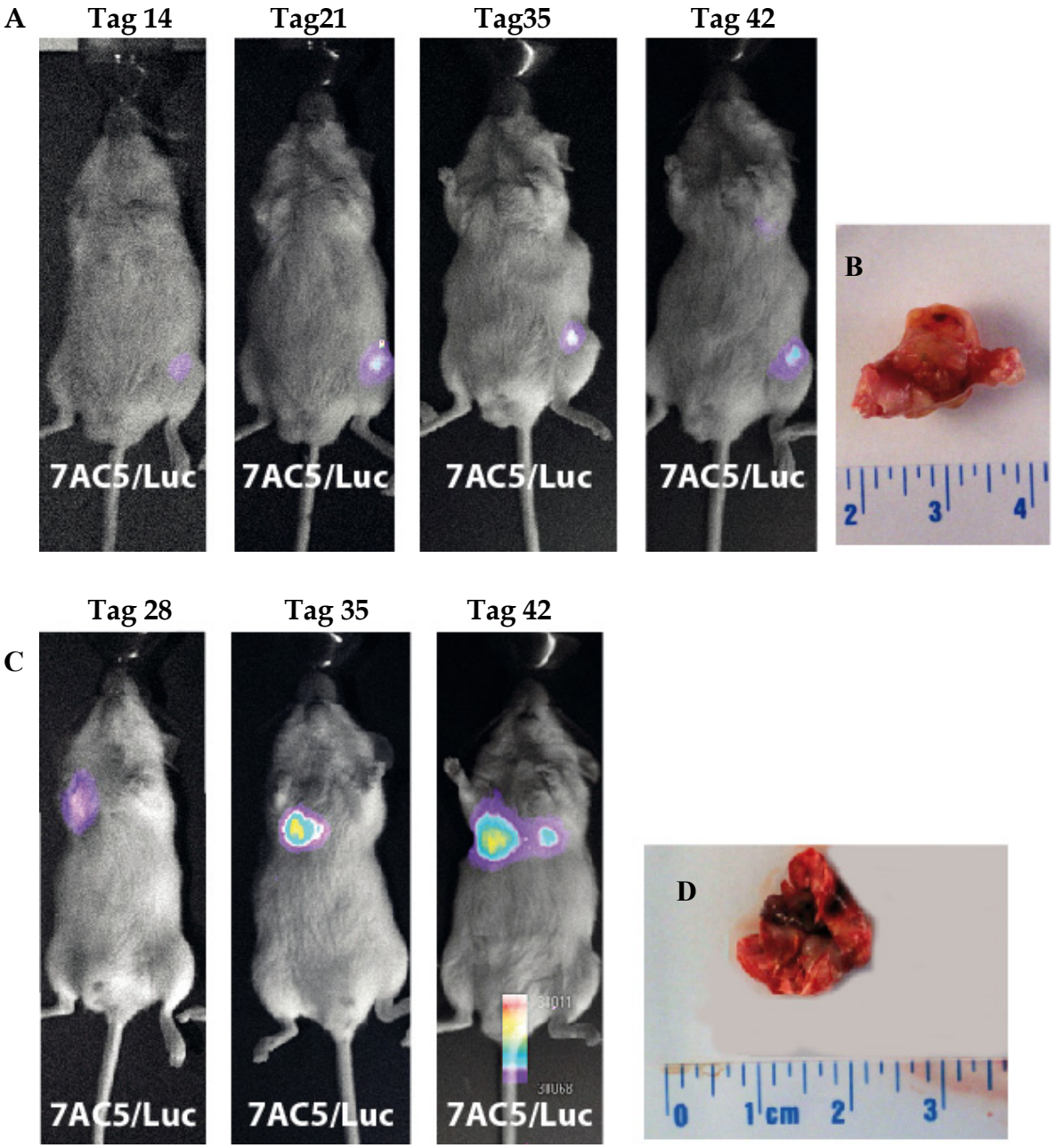


Abbildung 35 Bestimmung der Biolumineszenzaktivität in NOD/SCID-Mäusen nach der i.v. Applikation von 7AC/Luc-Stammzellen
$5x10^6$ (A,B) und $1x10^7$ (C,D) 7AC5/Luc-Stammzellen wurden i.v. appliziert und die Distribution und Engraftment der Zellen mittels Biolumineszenz über die Zeit dokumentiert. Bei $5x10^6$ applizierten 7AC5/Luc-Zellen war ab Tag 14 ein Biolumineszenzsignal im Oberschenkelknochen der Hinterläufe nachweisbar (A); n = 3/8 Tieren. Nach der Autopsie konnte ein Tumor/Teratom im Knochen dokumentiert werden (B). Bei der Applikation von $1x10^7$ Zellen wurde über die Zeit ein ansteigendes Biolumineszenzsignal im Brustbereich nachgewiesen (C); n = 3/14 Tieren. Nach der Autopsie wurde ein Tumor in der Lunge gefunden (D).

Die Ergebnisse und Nachweisgrenzen von Luc-transfizierten Zellen mittels Biolumineszenz in Abhängigkeit von der applizierten Zellzahl und dem Transplantationsort sind zusammenfassend in Tab.11 dargestellt.

Tabelle 11 Abhängigkeit des Engraftments und der Nachweis durch Biolumineszenz von der Transplantationsroute und der applizierten Zellzahl
Nach der s.c., i.hep., i.splen. oder i.v. Applikation von $1x10^2$ bis $1x10^7$ 7AC5/Luc-Zellen wurde das Engraftment mittels Biolumineszenz untersucht. Es sind zusammenfassend die Anzahl Luc-positiver Zellen im Vergleich zur Gesamttierzahl dargestellt.
n.b. – nicht bestimmt

	Zellzahl						
Transplantationsroute	$1x10^7$	$5x10^6$	$1x10^6$	$1x10^5$	$1x10^4$	$1x10^3$	$1x10^2$
subkutan	n.b.	n.b.	10/10	10/10	10/10	10/10	2/10
intrahepatisch	n.b.	n.b.	3/3	2/3	0/3	0/6	0/6
intrasplenal	n.b.	n.b.	3/3	1/3	0/3	0/6	0/6
intravenös	3/14	3/8	0/5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Aufgrund der beobachteten Zellzahlabhängigkeit und dem damit verbundenen Detektionslimit des Biolumineszenzsignals sind weiterführende Studien zum Verbleib der Zellen durchgeführt worden.

Die transfizierten 7AC5/FF-Stammzellen besitzen neben dem in dieser Arbeit integrierten Luc-Reportergen noch das EYFP-Reportergen. EYFP lässt sich schwer *in vivo* dokumentiert, *ex vivo* kann das Reportergen jedoch mittels PCR und auf Proteinebene unter anderem mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden.

Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit Primer entwickelt und eine PCR etabliert, um das zweite Reportergen als *ex vivo* Nachweis zu verwenden. Engraftete Zellen, die nicht durch Biolumineszenz aufgrund der geringeren Nachweisgrenze im Vergleich zur PCR detektiert werden konnten, sollten mittels EYFP in Organen und Geweben nachgewiesen werden.

4.2.2.2. Bestimmung der Nachweisgrenze von EYFP$^+$-Zellen

Um das Engraftment der Stammzellen in Mausorgane zu untersuchen, wo kein Luciferasesignal detektiert werden konnte, wurden die Organe der Mäuse (Leber, Lunge, Nieren, Milz, Herz, Knochenmark und Blut) entnommen und mittels PCR und FACS-Analyse auf EYFP$^+$-Zellen untersucht. Die Bestimmung des Detektionslimits (unter anderem in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration für die PCR) wurde im Rahmen einer betreuenden Projektarbeit von Friedrich Kunze untersucht.

Hieraus ergab sich eine untere Nachweisgrenze für eine Ausgangsmenge von 500ng DNA von einer EYFP$^+$-Zelle unter 10.000 EYFP$^-$-Zellen.

Bei der FACS-Analyse lag die Nachweisgrenze etwas niedriger. Es wurde eine $EYFP^+$-Zelle unter 5.000 $EYFP^-$-Zellen nachgewiesen.

Zur Anwendung und Prüfung des Nachweises von $EYFP^+$-Zellen nach der i.v. Applikation von $5x10^6$ bzw. $1x10^7$ 7AC5/Luc-Stammzellen wurde jeweils ein Tier zum Zeitpunkt 1h, 1d, 7d bzw. 14d nach Versuchsbeginn abgetötet und Leber, Blut, Milz, Nieren und Knochenmark für PCR und FACS-Analyse entnommen.

PCR

Sofort nach der Zellapplikation wurden die Tiere mittels Biolumineszenz auf die Verteilung und das Engraftment der transplantierten Zellen untersucht. Anschließend wurden 2 Tiere aus jeder Gruppe abgetötet und die Organe zur Untersuchung entnommen. Dies war etwa 1h nach der Zellapplikation. In beiden Gruppen ($5x10^6$ und $1x10^7$ Zellen) konnten $EYFP^+$-Zellen in den Versuchstieren nachgewiesen werden. Ein eindeutiges Signal war in der Lunge der Tiere zu dokumentieren. Ein deutlich schwächeres Signal war für Herz, Milz und Leber zu verzeichnen, gekennzeichnet durch einen großen C_T-Wert. Im Blut konnte in der Gruppe A ($5x10^6$ Zellen) in 1/2 Tieren $EYFP^+$-Zellen nachgewiesen werden. Bei der höheren Zellzahl waren es 2/2. Zum Tag 1 konnten keine Zellen mehr mittels PCR nachgewiesen werden. Auch zum Tag 7 bzw. 14 war dies nicht möglich.

Zum Versuchsende wurden für alle Zellzahlen die ausgewählten Organe untersucht. Auch hier konnten keine $EYFP^+$- Zellen detektiert werden.

FACS

Mittels FACS konnte 1h nach der Zellapplikation $EYFP^+$-Zellen in der Lunge, Herz, Milz, Nieren, KM und Blut nachgewiesen werden (≤ 0,1%).

Zum Tag 1 waren nur noch vereinzelt $EYFP^+$-Zellen (≤ 0,01%) in den Organen zu finden.

Nach einer Woche wurde das Signal noch im KM (≤ 0,01%), Niere und Herz (≤ 0,1%) bei einem Tier, das $1x10^7$ 7AC5/Luc-Zellen appliziert bekam, gefunden. Ein ähnliches Ergebnis wurde zum Tag 14 gefunden. Bis zum Versuchende am Tag 78 zeigte sich ein minimales Engraftment der $EYFP^+$-Zellen in KM, Niere und Lunge (≤ 0,03%).

Neben der Etablierung des *in vivo* Nachweises von Luc-transfizierten 7AC5-Stammzellen wurde durch die PCR der *ex vivo* Nachweis für die duale 7AC5/Luc/EYFP-Zelllinie etabliert.

In Kombination mit Biolumineszenz- und PCR-Analysen können damit transplantierte Zellen mit Reportergenen live und zum Teil sehr sensitiv nachgewiesen werden.

Es zeigte sich außerdem, dass EYFP durch PCR und FACS sehr sensitiv nachgewiesen werden kann, jedoch sind für systemische Applikationen hohe Zellzahlen notwendig. Für den Nachweis und das Engraftment mittels Biolumineszenz nach der Transplantation geringer Zellzahlen ist eine Proliferation der Zellen in den Organen notwendig.

4.2.2.3. Analyse des Expressionsprofils von 7AC5/Luc-stammzellabgeleiteten Teratomen

Um den Einfluss des Nukleofektionsprozesses auf die Eigenschaften von 7AC5/EYFP-Stammzellen sowie deren *in vivo* gebildeten Teratome detaillierter zu charakterisieren, wurde nach s.c. Transplantation mittels PCR ein Expressionsprofil der gebildeten Teratome erstellt. Die Entwicklung und die Wachstumsrate der 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome sind nach der s.c. Applikation in NOD/SCID-Mäuse vergleichbar (Abb. 36). Nach 22 Tagen wurde ein Teratomvolumen von 1,0 – 1,5 cm^3 in beiden Gruppen (n = 5 Tiere) erreicht.

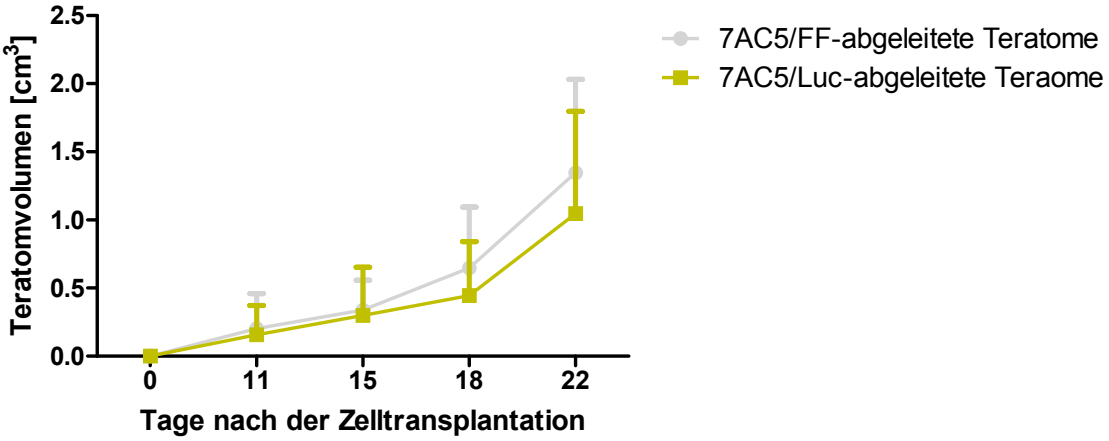


Abbildung 36 Teratomentwicklung und –wachstum von 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-abgeleitete Teratomen in NOD/SCID Mäusen
1x10⁶ 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Stammzellen wurden s.c. in NOD/SCID-Mäuse transplantiert. Die Luc-Reportergentransfektion in Stammzellen nahm keinen Einfluss auf die Teratomentwicklung.

Die in den NOD/SCID-Mäusen gewachsenen Teratome wurden histopathologisch auf ihre keimblattspezifische Zusammensetzung untersucht.

Es sind sowohl in den 7AC5/FF- als auch in den 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratomen die Strukturen des Ektoderms (verhornende Epidermis), Endoderms (Becherzellen mit tubulären Strukturen) und Mesoderms (quergestreifte Muskulatur) vorhanden. Es konnten keine auffälligen pathologischen Unterschiede bezüglich der keimblattspezifischen Ausprägung nachgewiesen werden (Abb.37)

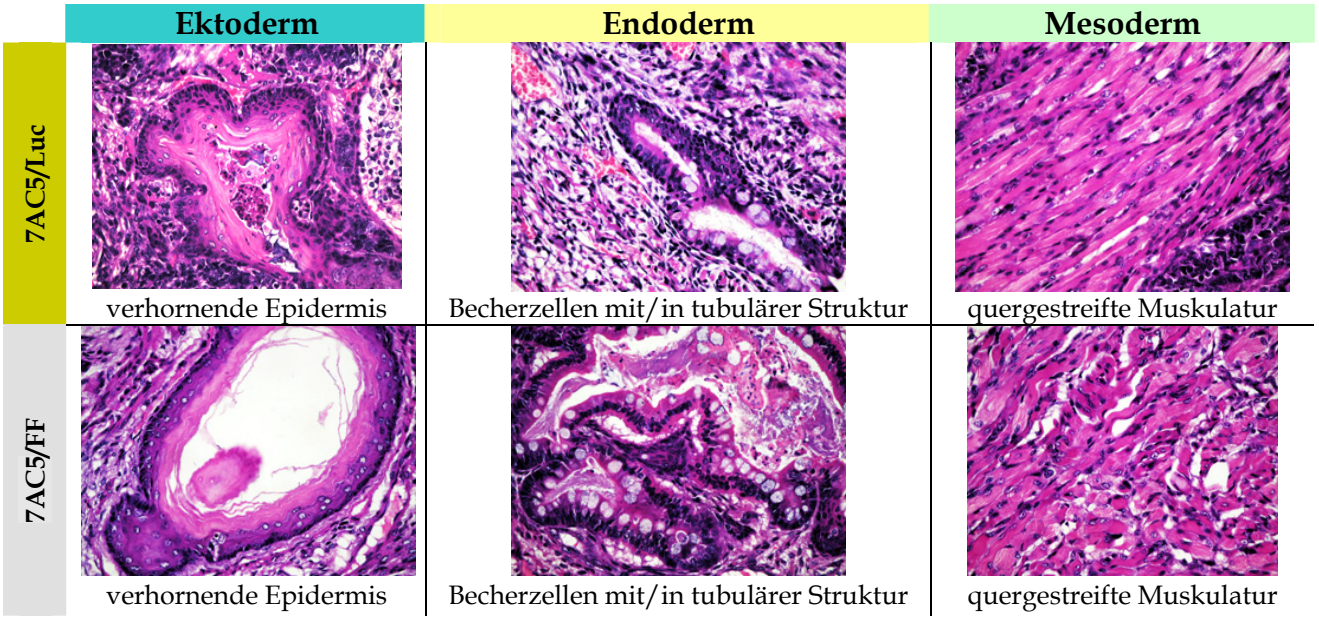


Abbildung 37 H&E-Färbung der 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome in NOD/SCID-Mäusen nach s.c. Applikation der Stammzellen
Nach der Formalinfixierung wurde eine H&E-Färbung der 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome durchgeführt. Es wurden alle drei Keimblattstrukturen identifiziert.

Immunhistochemisch konnten in den 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratomen noch undifferenzierte Zellen nachgewiesen werden (Nanog-positive Zellen, Abb.38). Hauptsächlich war das Teratom jedoch durch differenzierte Strukturen gekennzeichnet. Ektodermale Strukturen wurden exemplarisch durch Nestin, endodermale Strukturen durch DLK und mesodermale Strukturen durch aSMA dargestellt.

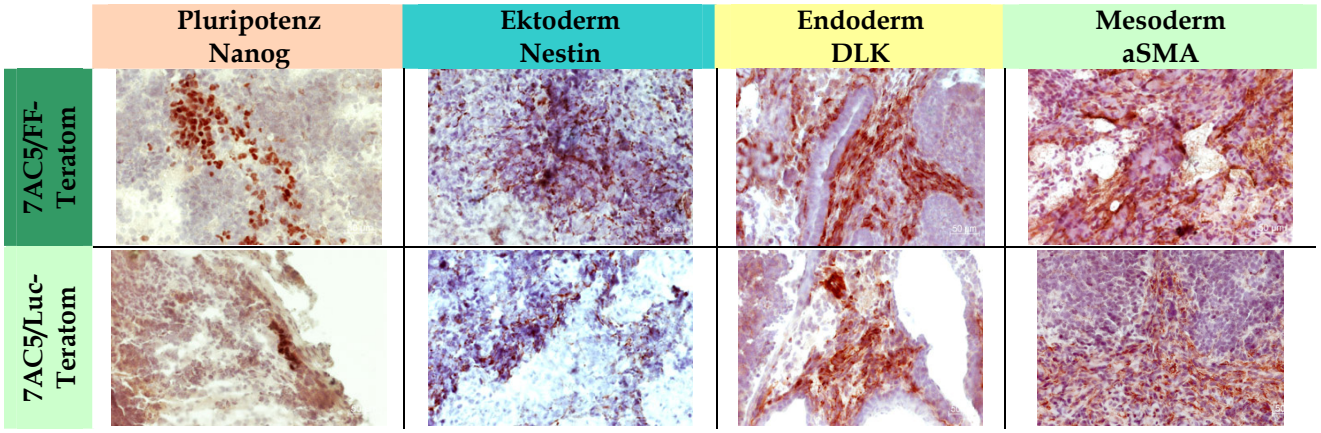


Abbildung 38 Immunhistochemische Färbung von Keimblattstrukturen durch spezifische Marker
Es wurden Kryoschnitte von 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome angefertigt. Mittels Immunhistochemie wurden undifferenzierte Zellen durch Nanog und keimblattspezifische Differenzierungen durch Nestin (Ektoderm), DLK (Endoderm) und aSMA (Mesoderm) angefärbt. Maßstab: 10fache Vergrößerung

Neben der histopathologischen Bewertung und keimblattspezifischen Zusammensetzung der 7AC5-abgeleiteten Teratome, wurde eine vergleichende Bewertung der Expressionsprofile durchgeführt. Teratome aus nicht-transfizierten und transfizierten Stammzellen zeichneten sich durch ein vergleichbares Expressionsprofil aus, das eine moderate Expression an Pluripotenzmarkern (Oct-4, Nanog und Sox2) und der keimblattspezifischen Differenzierungsmarkern aufwies (Abb.39).

Zusammenfassend ergeben sich somit auf morphologischer Ebene sowie im Protein- und RNA-Expressionsprofil keine signifikanten Veränderungen zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen und den daraus abgeleiteten Teratomen. Das Luc-Reportergen und der Transfektionsprozess haben keinen Einfluss auf die hier untersuchten Eigenschaften der Teratome.

In weiterführenden Untersuchungen wurden die 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome in Abhängigkeit vom Applikations- und Engraftmentort unter diesem Gesichtspunkt charakterisiert.

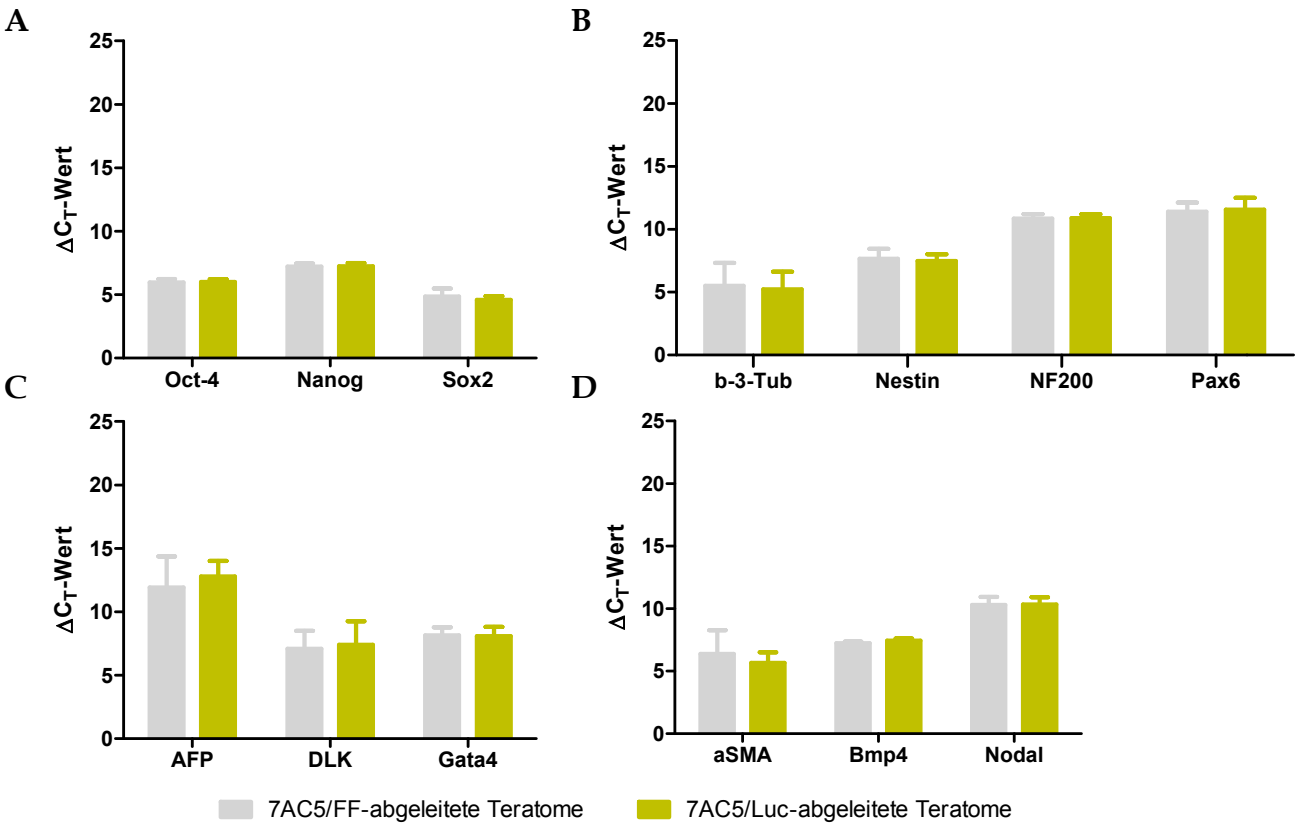


Abbildung 39 Expressionsprofil von 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratomen in NOD/SCID-Mäusen
7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Stammzellen wurden s.c. in NOD/SCID-Mäuse transplantiert. Die gewachsenen Teratome wurden mittels PCR auf die Expression von Pluripotenzmarkern (A) und keimblattspezifischen Differenzierungsmarker untersucht. Das Expressionsprofil von Luc-transfizierten und nicht-transfizierten abgeleiteten Teratomen war vergleichbar.

4.2.2.3.1. Analyse von 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratomen nach der Applikation über andere Transplantationsrouten

Die stammzellabgeleiteten Teratome, die nach i.hep., i.splen. und i.v. Applikation *in vivo* gewachsen sind, wurden auf ihr Expressionsprofil vergleichend zu s.c. gewachsenen Teratomen bewertet.

Nach i.hep. und i.splen. Applikation konnten nur Teratome am Applikationsort (Leber und Milz) nachgewiesen werden. Hingegen engrafteten die 7AC5/FF- bzw. 7AC5/Luc-Stammzellen nach i.v. Applikation unter anderem in der Lunge, aber hauptsächlich im Knochen(-mark). Unabhängig vom Applikations- bzw. Engraftmentort bildeten sowohl 7AC5/FF- als auch 7AC5/Luc-abgeleitete Teratome typische Strukturen der drei Keimblätter aus. In der Zusammensetzung und Muster konnten keine Unterschiede beobachtet werden (Daten siehe Anhang).

Zur weiteren Charakterisierung wurden von den stammzellabgeleiteten Teratomen Expressionsprofile erstellt, um einen möglichen Einfluss des Applikations- bzw.

Engraftmentorts sowie des Transfektionsprozesses auf das Expressionsniveau von Pluripotenz- (Abb.40A) und Differenzierungsmarkern (Abb.40B-D) zu untersuchen. Nach s.c., i.splen. und i.hep. Applikation zeichneten sich die stammzellabgeleiteten Teratome durch eine Expressionsabnahme der Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 (Abb. 40A) und eine gesteigerte Expression der Differenzierungsmarker der drei Keimblätter im Vergleich zu den undifferenzierten 7AC5/FF- bzw. 7AC5/Luc-Zellen aus. Zwischen 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-stammzellabgeleiteten Teratomen am selben Applikationsort zeigten sich keine Unterschiede im Expressionsprofil, jedoch waren Schwankungen zwischen den einzelnen Transplantations-/Engraftmentorten zu erkennen (nur Daten von 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratomen gezeigt).

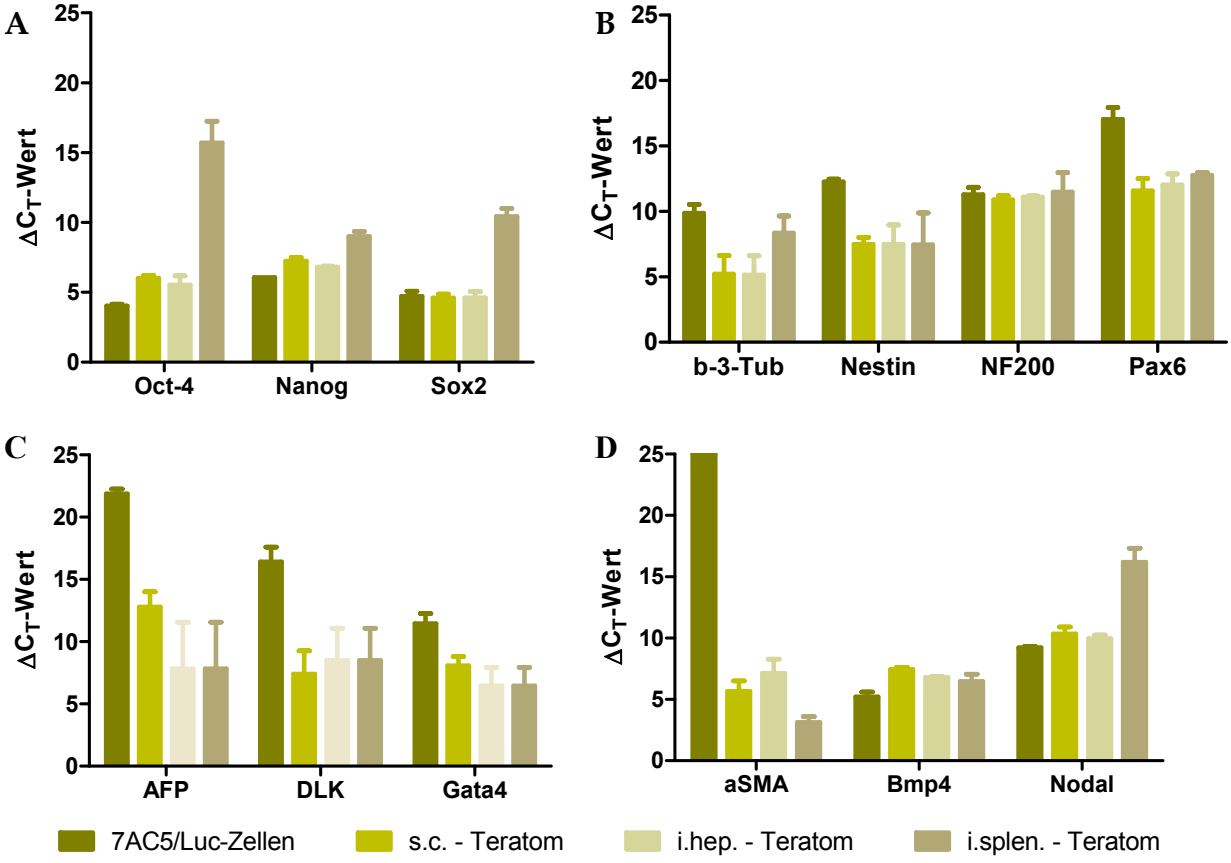


Abbildung 40 Vergleichendes Expressionsprofil von Teratomen nach s.c., i.splen., i.hep. und i.v. Applikation in NOD/SCID-Mäuse
7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome weisen unabhängig vom Engraftmentort eine verminderte Expression der Pluripotenzmarker (A) und eine erhöhte Expression der keimblattspezifischen Differenzierungsmarker (B – Ektoderm, C – Endoderm, D – Mesoderm) auf. Zwischen s.c., i.hep. und i.splen. Applikation gibt es Schwankungen im Expressionsmuster.

Die i.splen. gewachsenen Teratome exprimieren alle untersuchten Pluripotenzmarker sowie beta-3-Tubulin (Ektoderm) und Nodal (Mesoderm) auf einem deutlich geringen Niveau und aSMA auf einem höheren Level im Vergleich zu s.c. und i.hep. gewachsenen Teratomen. Des Weiteren weisen sowohl i.hep. sowie i.splen. gewachsene Teratome eine höhere Expression der endodermalen Marker AFP und GATA4 auf. Alle anderen Differenzierungsmarker werden auf etwa gleichem Niveau exprimiert wie die s.c. gewachsenen Teratome.

Weiterführend wurden auch die Teratome, die nach i.v. Applikation von 7AC5/Luc-Stammzellen gewachsen sind, auf ihr Expressionsprofil untersucht. Zunächst wurde die EYFP-Expression in den entnommenen Teratomen untersucht. Zu 7AC5/Luc-Stammzellen weisen die Teratome im Knochen sowie in der Lunge ein vergleichbar hohes Expressionsniveau von EYFP auf RNA-Ebene auf (Abb.41).

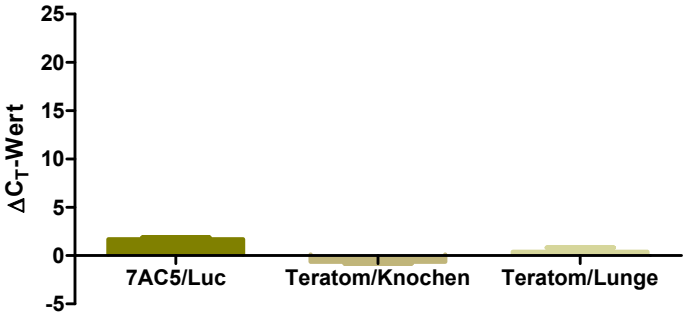


Abbildung 41 EYFP-Expression auf RNA-Ebene von 7AC5/Luc-Stammzellen und den daraus abgeleiteten Teratomen
7AC5/Luc-Stammzellen weisen wie die nach i.v. Applikation abgeleiteten Teratome im Knochen und in der Lunge eine sehr hohe Expression des Reportergens EYFP auf.

Die Analyse der 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome nach i.v. Applikation zeigte, dass sowohl das im Knochen ($5x10^6$ Zellen) sowie in der Lunge ($1x10^7$ Zellen) manifestierte Teratom eine verminderte Expression der Pluripotenzmarker Oct-4 und Nanog aufweisen (Abb.42A). Sox2 war unterschiedlich exprimiert. Im Knochenteratom war im Vergleich zu den Ausgangszellen und dem Lungenteratom eine erhöhte Expression nachweisbar. Die Differenzierungsmarker des Ektoderms wurden nicht deutlich erhöht exprimiert (Abb.42B). Hingegen wurde die endodermale Markerexpression von AFP und DLK deutlich gesteigert ähnlich wie aSMA (Abb.42C/D). Auffällig war außerdem die verminderte Expression von Nodal, das im Knochenteratom kaum noch nachweisbar war.

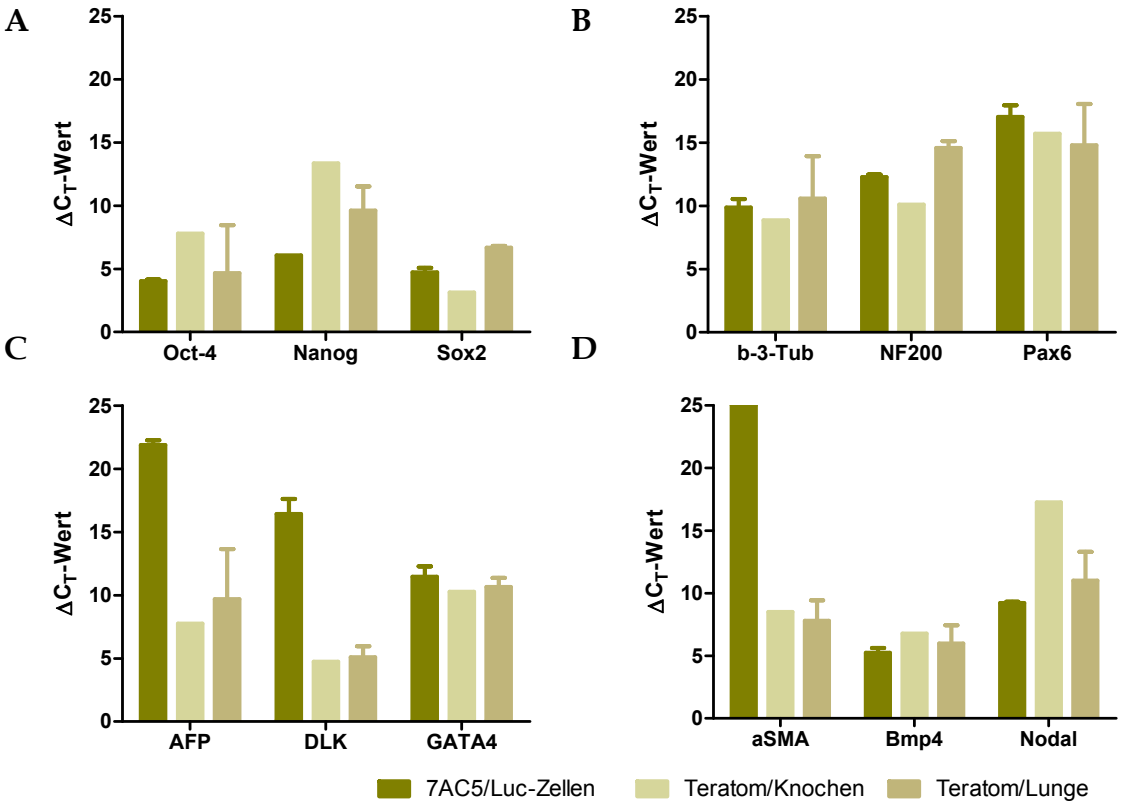


Abbildung 42 Expressionsprofil von 7A5/Luc-abgeleiteten Teratomen nach i.v. Applikation
Nach der Applikation von 5x10^6 7AC5/Luc-Zellen (Teratom Knochen) bzw. von 1x10^7 7AC5/Luc-Zellen (Teratom Lunge) wurde ein Expressionsprofil für ausgewählte Pluripotenzmarker (A) und keimblattspezifische Differenzierungsmarker (B – Ektoderm, C- Endoderm, D- Mesoderm) erstellt. Die Teratome wiesen eine zum Teil reduzierte Expression der Pluripotenzmarker und vor allem eine gesteigerte Expression der Differenzierungsmarker des Endoderms auf.

Zusammenfassend ergibt sich aus den generierten Daten, dass unabhängig von der Transfektion 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-abgeleitete Teratome unter den gleichen Versuchsbedingungen (Zellzahl, Applikationsort, Engraftmentort) kongruente *in vivo* Eigenschaften aufweisen. Sie zeigen eine parallele Teratombildungsraten am selben Applikationsort und die Teratome sind durch übereinstimmende Expressionsprofile gekennzeichnet.

Unter dem Gesichtspunkt der **Zellzahl** zeigen sich applikationsortabhängige Teratombildungsraten. Nach s.c. Applikation kann selbst mit einer sehr niedrigen Zellzahl (100 Zellen) das Teratomwachstum induziert werden, wohingegen nach i.hep. und i.splen. Applikation deutlich höhere Zellzahlen nötig sind. Bei der i.v. Transplantation von 7AC5/Luc-Zellen sind beispielsweise 5x10^6 Zellen nötig, um ein Engraftment mit Teratombildung nachzuweisen.

Die gebildeten Teratome weisen dann aber unabhängig von der Zellzahl, dem Applikations- und Engraftmentort ein charakteristisches Markerprofil aus einer

moderaten Expression von Pluripotenzmarkern und erhöhten Expression von Differenzierungsmarkern auf. Des Weiteren sind typische Keimblattstrukturen im Teratom ausgebildet, die eine hohe Ähnlichkeit untereinander aufweisen.

4.3. Bestimmung der Embryotoxizität von Substanzen an 7AC5-Stammzellen *in vitro* und *in vivo*

4.3.1. Zytotoxizität von Referenzsubstanzen *in vitro*

Zur IC_{50}-Bestimmung *in vitro* wurden 400 7AC5/FF-Stammzellen in gelatinebeschichtete Vertiefungen einer biolumineszenzgeeigneten 96well-Platte ausgesät. Nach einer Adhärenzphase über Nacht wurden die Zellen mit der jeweiligen zu untersuchenden Substanz inkubiert (siehe Kapitel 3.7.).
Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und zum Tag vier wurden mittels dem ViaLight™ Plus Cell Proliferation (Lonza) die Viabilität der Zellen bestimmt.
Im Folgenden sind die Ergebnisse die Wirkung von sechs untersuchten Referenzsubstanzen an 7AC5-Stammzellen aufgeführt. Morphologische Substanzwirkungen wurden im Mikroskop bewertet. Es wurden mindestens n = 3 unabhängige Versuche durchgeführt.

4.3.1.1. Nicht embryotoxische Substanzen: Saccharin und Coffein

Saccharose als eine nicht embryotoxische Substanz induzierte bei der maximal eingesetzten Konzentration von 2500µg/ml keine eindeutigen morphologischen Veränderungen an behandelten 7AC5/FF-Stammzellen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe konnten zum Tag zwei sowie zum Tag vier der Inkubation keine zellulären Veränderungen beobachtet werden (Abb.43A, exemplarisch zwei Substanzkonzentrationen gezeigt; 1,0mg/ml und 2,5mg/ml Saccharose). Die 7AC5/FF-Stammzellen wuchsen als kompakte Kolonien mit scharf abgegrenzten Rand. Es traten nur sporadisch differenzierte Zellen auf. Zum Versuchsende starben vermehrt Zellen ab, da der Zellrasen hyperkonfluent gewachsen war.
Die 7AC5/FF-Stammzellen weisen somit nach einer viertägigen Behandlung unter Saccharose immer noch einen pluripotenten Charakter auf, der durch

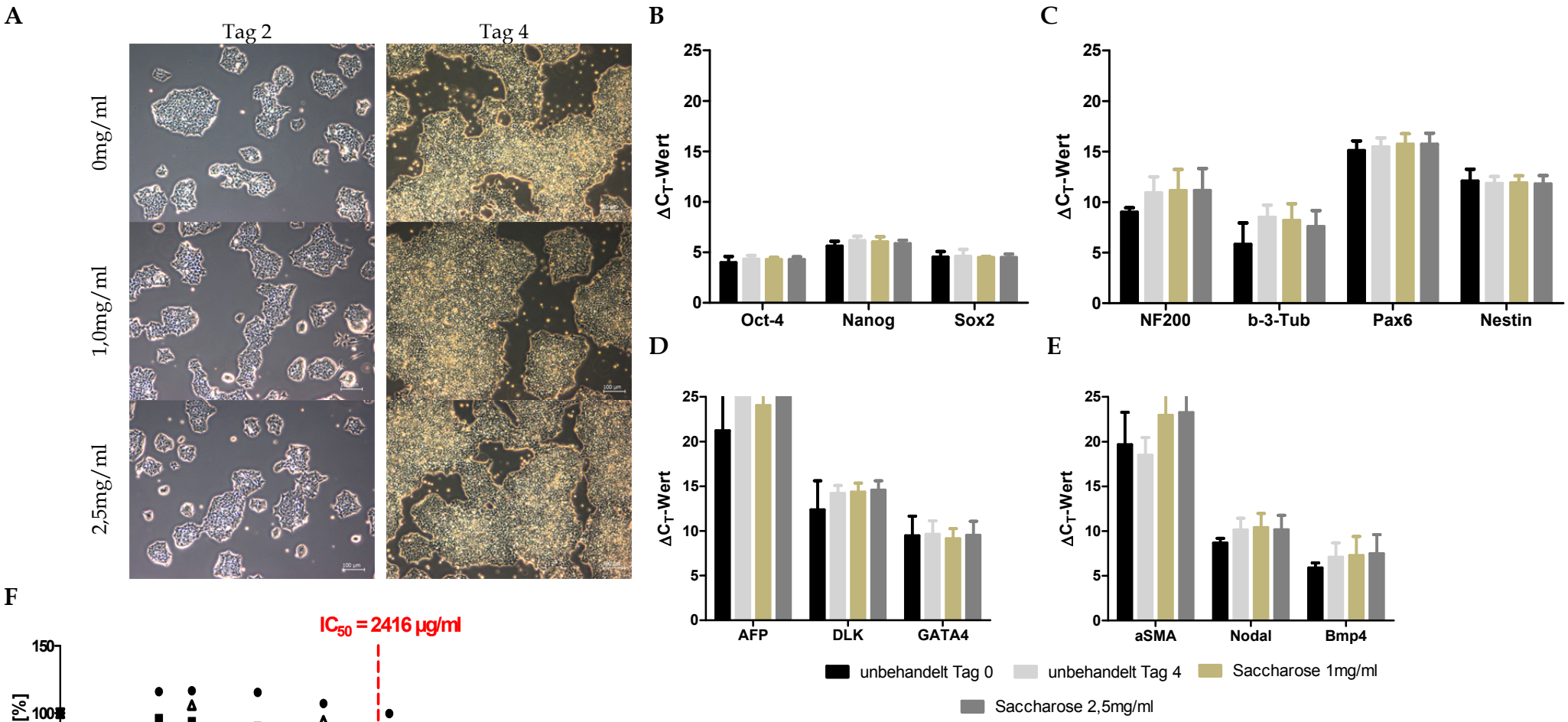


Abbildung 43 Bewertung der Substanzwirkung von Saccharose
7AC5/FF-Stammzellen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen mit Saccharose von 0,0 - 2,5 mg/ml behandelt. Es zeigten sich keine morphologischen Veränderungen. Die 7AC5/FF-Stammzellen wuchsen als kompakte Kolonien mit scharf abgegrenzten Rand (A). Im Expressionsprofil (B – Pluripotenz, C – Ektoderm, D – Endoderm, E – Mesoderm) zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen Saccharose-behandelten 7AC5/FF-Stammzellen und der Kontrollgruppe.
Mittels ViaLight-Assay (F) wurde ein $IC_{50(Saccharose)}$=2416 µg/ml bestimmt (Tag vier der Behandlung).

morphologische Eigenschaften (kompakte Kolonieform aus kleinen, runden Einzelzellen) und ein charakteristisches Expressionsprofil (hohes Expressionsniveau an Pluripotenzmarkern, geringe oder keine Expression an Differenzierungsmarkern) gekennzeichnet ist.

Am Tag 4 wurde die Viabilität bzw. die Proliferation der Zellen mit dem ViaLight-Assay untersucht (Abb.43F). Hierzu werden die Zellen lysiert und das freigesetzte zelluläre ATP bestimmt, dass in direktem Verhältnis zu viablen Zellen steht.

Nach der Saccharosebehandlung zeigte sich mit steigender Substanzkonzentration eine Viabilitätsabnahme der Zellen. Aus fünf unabhängigen Messungen konnte ein $IC_{50(Saccharose)}$=2416µg/ml (±18,94%) bestimmt werden.

Die Expressionsanalyse von Pluripotenzmarkern (Abb.43B) und Differenzierungsmarkern (Abb.43C-E) der Saccharose-behandelten 7AC5/FF-Stammzellen zeigte keine signifikanten Veränderungen im Markerprofil im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

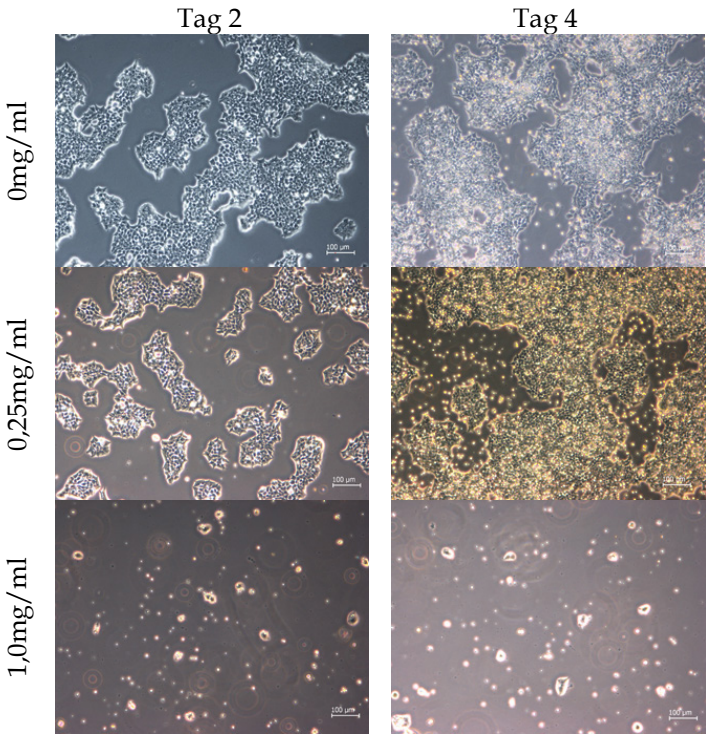
Die drei untersuchten Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 werden nach der viertägigen Behandlung mit Saccharose (bis max. 2500mg/ml) vergleichbar zur unbehandelten Kontrolle exprimiert. Die Expression der Differenzierungsmarker zeigen ebenfalls keine deutlichen Unterschiede nach der Behandlung. Sie werden moderat exprimiert oder sind wie AFP nicht nachweisbar.

Die 7AC5/FF-Stammzellen weisen somit nach einer viertägigen Behandlung unter Saccharose immer noch einen pluripotenten Charakter auf, der durch morphologische Eigenschaften (kompakte Kolonieform aus kleinen, runden Einzelzellen) und ein charakteristisches Expressionsprofil (hohes Expressionsniveau an Pluripotenzmarkern, geringe oder keine Expression an Differenzierungsmarkern) gekennzeichnet ist.

Ab einer **Coffein**-Konzentration von 500µg/ml trat im Vergleich zu den Saccharose-behandelten 7AC5/FF-Stammzellen eine Reduktion der Zellzahl auf. Unter 500µg/ml bildeten sich zwar noch Kolonien mit scharf abgegrenzten Rand aus, jedoch war eine deutlich verminderte Proliferationsrate zu beobachten (Abb.46A, exemplarisch zwei Substanzkonzentrationen; 0,5mg/ml und 1,0mg/ml Coffein). Am Tag 4 wurde auch hier die Viabilität der Zellen mittels ViaLight-Assay untersucht. Nach der Coffeinbehandlung zeigte sich mit steigender Substanzkonzentration eine

deutliche Viabilitätsabnahme bis zum völligen Absterben der 7AC5/FF-Stammzellen.

A



B

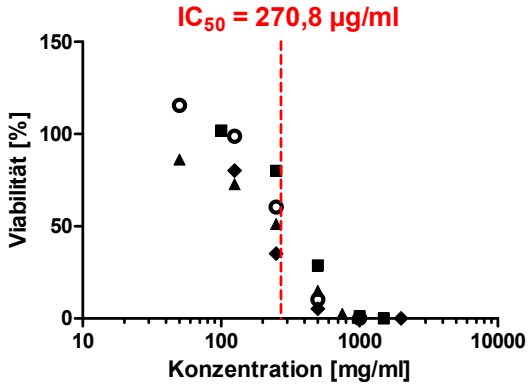


Abbildung 44 Morphologische Bewertung der Substanzwirkung von Coffein an 7AC5/FF-Stammzellen und Viabilitätsanalyse
7AC5/FF-Stammzellen wurden vier Tage mit unterschiedlichen Konzentration von Coffein behandelt (max.1,0mg/ml). Morphologisch zeigte sich bei der Maximalkonzentration schon zum Tag 2 eine zelltoxische Wirkung (A). Mittels ViaLight-Assay konnte ein $IC_{50(Coffein)}$ =270,8µg/ml bestimmt werden (Tag 4 der Behandlung).

Aus vier unabhängigen Messungen konnte für Coffein ein $IC_{50(Coffein)}$ =270,8µg/ml (±29,55%) bestimmt werden (Abb.44B).

Die Coffein-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Expression von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern und ist mit dem Expressionsprofil unbehandelter und Saccharose-behandelter 7AC5/FF-Stammzellen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

4.3.1.2. Valproinsäure und Dexamethason

Nach der *in vitro* Behandlung mit den schwach embryotoxischen Substanzen Valproinsäure (VPA) und Dexamethason konnte eine verminderte Proliferationsrate von 7AC5/FF mit steigender Substanzkonzentration im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Bei VPA ist dies bei etwa 50µg/ml morphologisch nachweisbar (Abb.45A). Dexamethason induziert selbst bei der geringsten untersuchten Konzentration von 10µg/ml eine Reduktion der Viabilität von 7AC5/FF-Stammzellen (Abb.46A). Die durch die Behandlung mit VPA bzw. Dexamethason reduzierte Zellzahl führte zu einer eingeschränkten Koloniebildung und -größe. Die viablen Zellen waren immer noch durch eine runde, undifferenzierte Morphologie gekennzeichnet, die in einer kompakten Kolonieform wuchsen

Mittels ViaLight-Assay wurden die Viabilitätsabnahme bei 7AC5/FF-Stammzellen mit steigender Konzentration der schwach embryotoxischen Substanzen bestätigt. Für **VPA** ergab sich aus fünf unabhängigen Messungen ein $\mathbf{IC_{50(VPA)}=74{,}09\mu g/ml}$ (±31,96%) und für **Dexamethason** von $\mathbf{IC_{50(Dexamethason)}=17{,}87\mu g/ml}$ (±36,8%) (n = 6).

Bei der Analyse des Expressionsprofils zeigte sich wie bei den schwach embryotoxischen Substanzen kein Einfluss auf das ausgewählte Markerprofil (Daten nur für VPA gezeigt, Abb.45B-E).

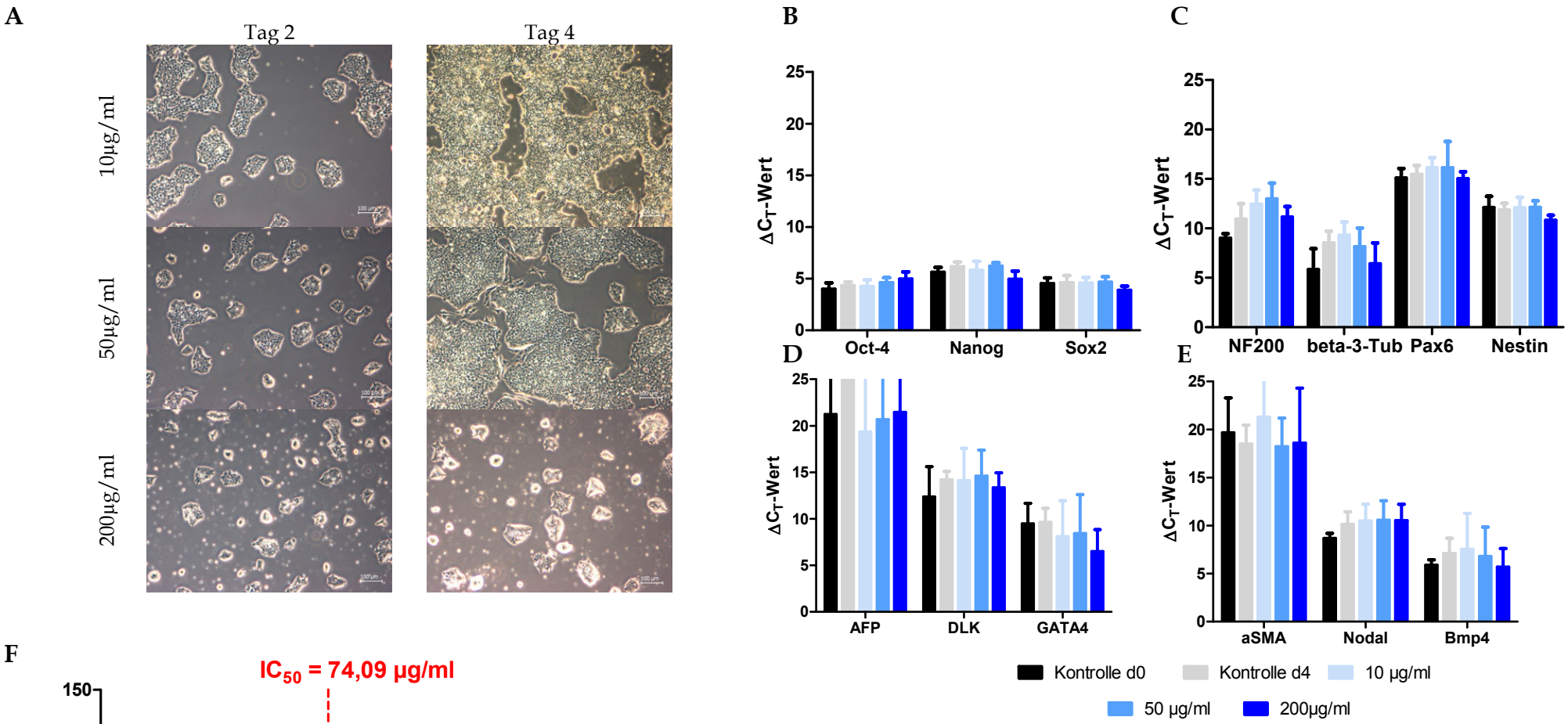
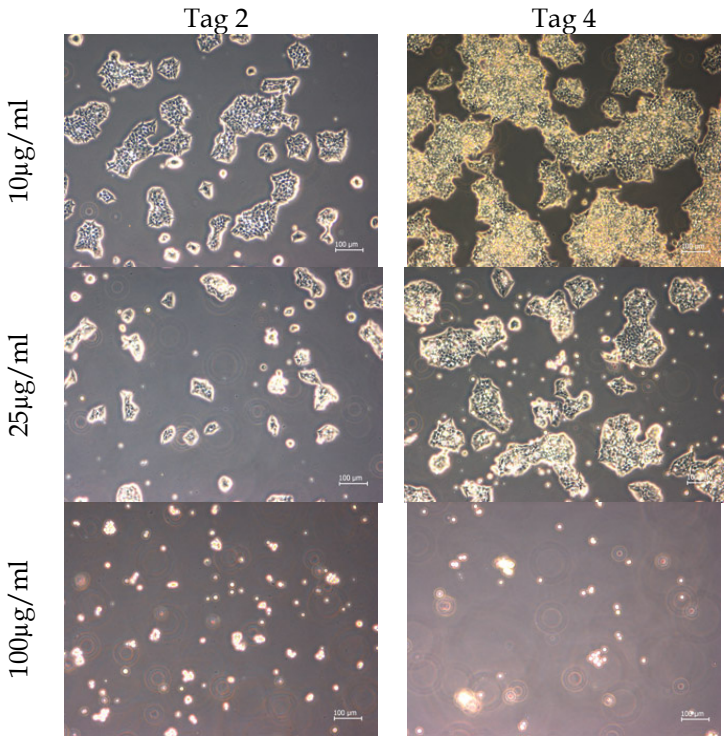


Abbildung 45 Bewertung der Substanzwirkung von VPA
7AC5/FF-Stammzellen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen mit VPA von 0,0 - 200µg/ml behandelt. Bei etwa 50µg/ml war eine leichte Viabilitätsabnahme der 7AC5-Zellen zu beobachten (A). Im Expressionsprofil (B – Pluripotenz, C – Ektoderm, D – Endoderm, E – Mesoderm) zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen VPA-behandelten 7AC5/FF-Stammzellen und der Kontrollgruppe.
Mittels ViaLight-Assay (F) wurde ein $IC_{50(VPA)}$= 74,09µg/ml bestimmt.

A



B

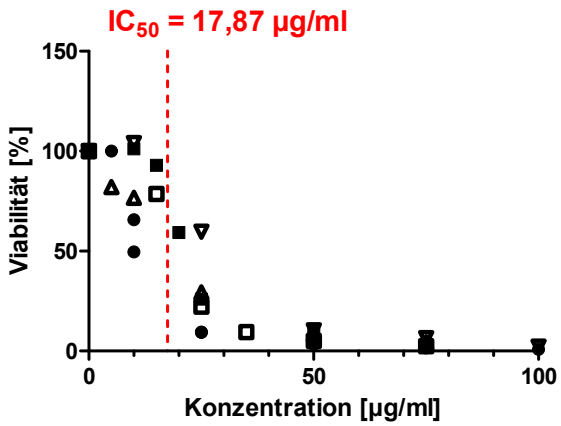


Abbildung 46 Wirkung von Dexamethason auf die Morphologie und Zellviabilität
7AC5/FF-Stammzellen wurden vier Tage mit verschiedenen Konzentrationen von Dexamethason behandelt und anschließend auf ihre Viabilität bezüglich unbehandelter Zellen untersucht. Schon bei 10µg/ml konnte eine Viabilitätsabnahme dokumentiert werden (A). Mittels ViaLight-Assay (B) wurde ein $IC_{50(Dexamethason)}$= 17,87µg/ml bestimmt (Tag 4 der Behandlung).

4.3.1.3. 5-Fluoruracil und 6-Aminonicotinamid

Die morphologische Analyse der Wirksamkeit der stark embryotoxischen Substanzen 5-FU sowie 6-AN wies eine Reduktion der Zellzahl von 7AC5-Stammzellen ab einer Dosis von 50ng/ml 5-FU bzw. 600ng/ml 6-AN nach (Abb.47 – 5-FU; Abb.48 – 6-AN). Eine Koloniebildung der Zellen war weiterhin nachweisbar und es konnte keine Veränderungen der Morphologie nachgewiesen werden. Die

überlebenden 7AC5/FF-Stammzellen wuchsen weiterhin als kompakte Kolonien mit scharf abgegrenzten Rand.

Zur weiteren Charakterisierung der Proliferationseigenschaften von 5-FU-behandelten 7AC5/FF-Stammzellen wurde ein ViaLight-Assay aus n = 5 Versuchen durchgeführt und damit ein $\mathbf{IC_{50\ (5\text{-}FU)}}$ **=65,93ng/ml** (±31,76%) bestimmt (Abb.47F).

Um den Einfluss der 5-FU-Behandlung auf der Expressionsebene detaillierter zu untersuchen, wurden PCR-Analysen von Pluripotenz- und keimblattspezifischen Markern bei 5-FU-behandelten 7AC5/FF-Stammzellen durchgeführt. Deutliche Änderungen des Expressionslevels waren für einige der untersuchten Marker nachweisbar.

Durch die 5-FU-Behandlung wurde eine leichte Expressionssteigerung des Pluripotenzmarkers Nanog induziert. Bei einer Dosis von 100ng/ml 5-FU wurde die Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrollgruppe) signifikant erhöht ($p \leq 0,05$) (Abb.47B). Bei der Expressionsanalyse der endodermalen Differenzierungsmarker Marker von 7AC5/FF-Stammzellen zeigte sich keine signifikante Änderung von AFP, DLK und GATA4 (Abb.47D). Im Gegensatz dazu wurde durch die Behandlung mit 50ng/ml ($p \leq 0,05$) bzw. 100ng/ml ($p \leq 0,001$) 5-FU eine signifikante Expressionserhöhung des ektodermalen Differenzierungsmarkers NF200 induziert, außerdem wurde die beta-3-Tubulin-Expression der 7AC5-Stammzellen bei der 100ng/ml-Gruppe signifikant erhöht ($p \leq 0,05$). Alle weiteren untersuchten ektodermalen und mesodermalen Marker zeigten keine signifikante Veränderungen im Expressionsniveau (Abb.47D/E).

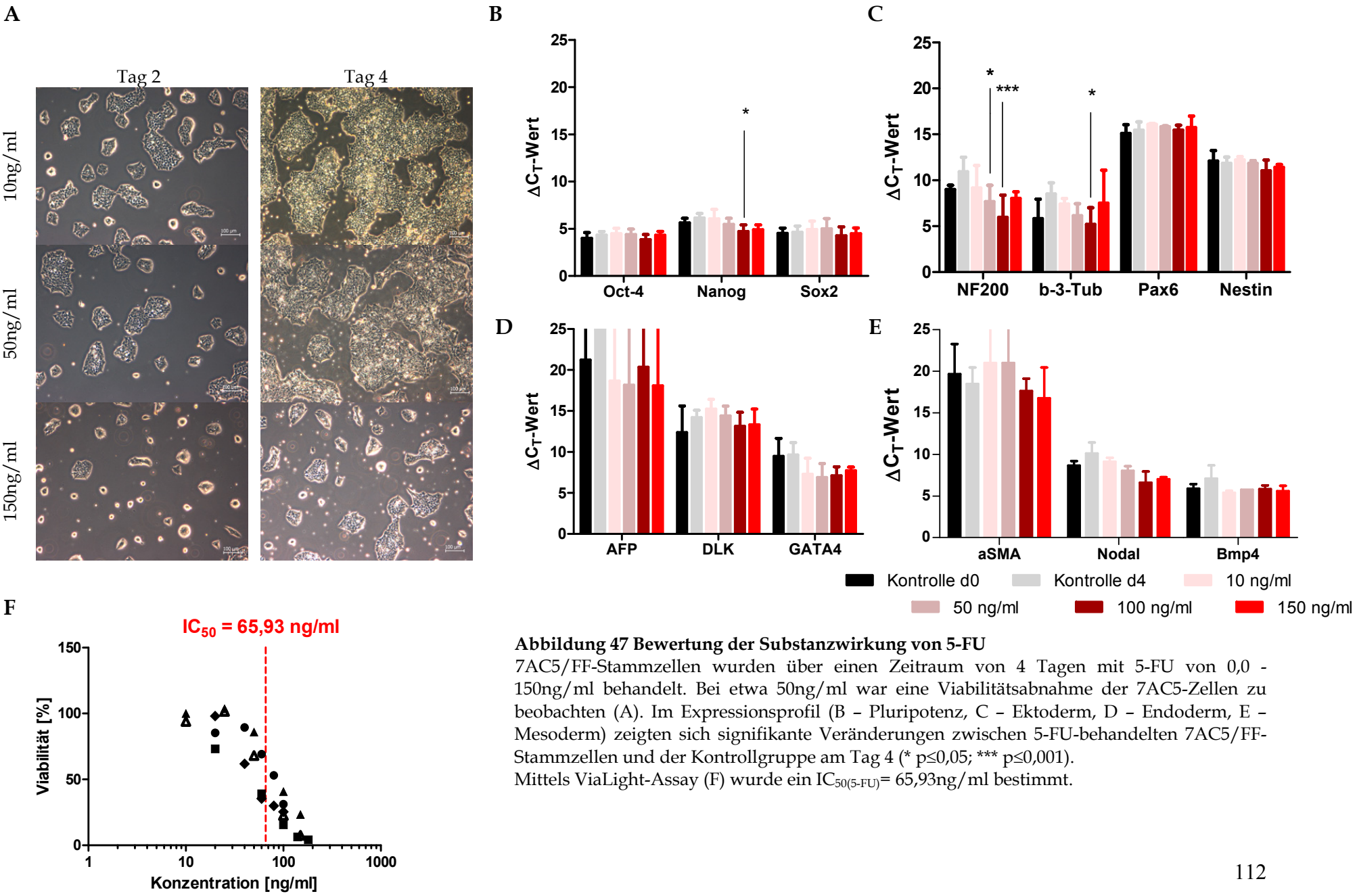


Abbildung 47 Bewertung der Substanzwirkung von 5-FU
7AC5/FF-Stammzellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen mit 5-FU von 0,0 - 150ng/ml behandelt. Bei etwa 50ng/ml war eine Viabilitätsabnahme der 7AC5-Zellen zu beobachten (A). Im Expressionsprofil (B – Pluripotenz, C – Ektoderm, D – Endoderm, E – Mesoderm) zeigten sich signifikante Veränderungen zwischen 5-FU-behandelten 7AC5/FF-Stammzellen und der Kontrollgruppe am Tag 4 (* $p \leq 0{,}05$; *** $p \leq 0{,}001$).
Mittels ViaLight-Assay (F) wurde ein $IC_{50(5\text{-}FU)} = 65{,}93$ng/ml bestimmt.

Im Weiteren wurden auch für die 6-AN-behandelten 7AC5/FF-Stammzellen Proliferationsanalysen mittels ViaLight-Assay durchgeführt. Hier konnte aus n=5 Versuchen ein **$IC_{50(6\text{-}AN)}$ =399,3ng/ml** (±20,5%) bestimmt werden (Abb.48B).

Die Wirkung der 6-AN-Behandlung auf die 7AC5/FF-Stammzellen und deren Expression von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern wurde mittels PCR untersucht. Es wurden keine signifikanten Veränderungen im Expressionsniveau der analysierten Marker nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

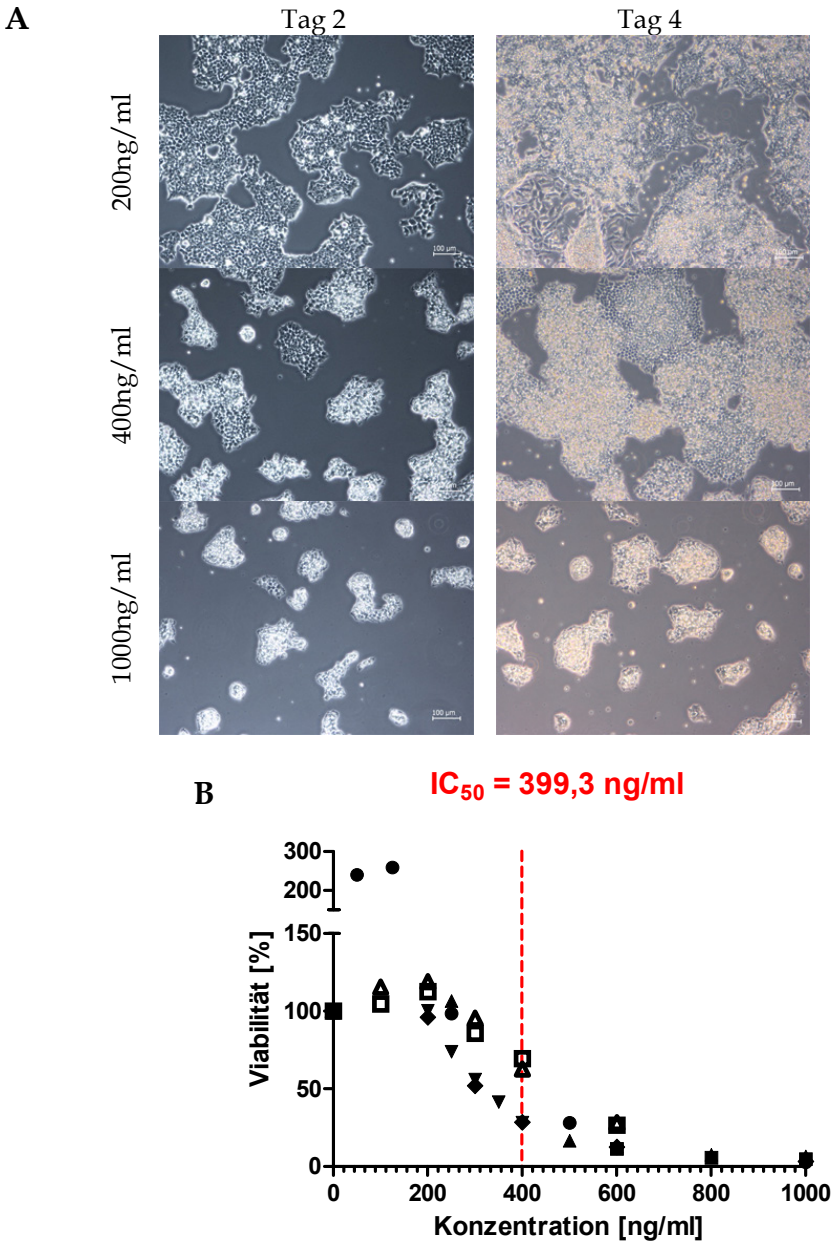


Abbildung 48 Wirkung von 6-AN auf die Zellmorphologie und Viabilität
7AC5/FF-Stammzellen wurden vier Tage mit 6-AN in verschiedenen Konzentrationen behandelt und ihre Morphologie dokumentiert (A). Anschließend wurde ihre Viabilität bezüglich unbehandelter Zellen mittels ViaLight-Assay bestimmt (B).

Zusammenfassend können aus den Daten der Wirkung von Referenzsubstanzen mit embryotoxischem Potenzial an 7AC5-Stammzellen bezüglich der Parameter Morphologie, Zellviabilität und Genexpression deutliche Unterschiede nachgewiesen werden. Die Klassifizierung der Substanzen (nicht, schwach, stark embryotoxisch) war bezüglich der Wirkung auf die 7AC5-Stammzellen deutlich nachweisbar. Für jede untersuchte Referenzsubstanz konnte ein IC_{50}-Wert mittels ViaLight-Assay bestimmt werden.

Die 5-FU-Wirkung als stärkste embryotoxische Substanz in dieser Arbeit zeigte auch die ausgeprägteste Wirkung auf die untersuchten *in vitro* Parameter der 7AC5-Stammzellen.

4.3.2. Einfluss der Referenzsubstanzen auf die Bildung von 7AC5-abgeleitete Teratome

Im immundefizienten NOD/SCID-Mausmodell wurde die embryotoxische Wirkung von Referenzsubstanzen aus den drei Embryotoxizitätsklassen untersucht: Saccharose – kein embryotoxisches Potenzial, VPA – schwach embryotoxisches Potenzial, 5-FU – stark embryotoxisches Potenzial. Hierfür wurden 7AC5/Luc-Stammzellen s.c., i.splen. oder i.hep. appliziert und die Teratomentwicklung dokumentiert. Zum Tag 1 nach der Transplantation wurden die NOD/SCID-Mäuse mit der jeweiligen Referenzsubstanz behandelt (Tab.12). Als Kontrolle wurden NaCl-behandelte Tiere mitgeführt. Mit Ausnahme von Saccharose (orale Applikation) wurden die Substanzen i.p. appliziert. Die Stammzellen wurden ohne *in vitro* Kultivierung/Vorbehandlung ins Tier gegeben. Die Substanzbehandlung wurde *in vivo* durchgeführt, um eine möglichst kliniknahe Situation zu simulieren und Parameter wie Pharmakokinetik und Pharmakodynamik im Tier zu berücksichtigen.

Zur Analyse der Kinetik der Teratomentwicklung unter dem Einfluss der Substanzwirkung wurden über den Behandlungszeitraum zusätzlich zur Größenmessung (nur bei s.c. applizierten Zellen möglich) Biolumineszenzmessung zweimal wöchentlich durchgeführt. Die Teratombildung wurde bezüglich des Wachstums, der Histopathologie und des Expressionsprofils für jede Embryotoxizitätsklasse charakterisiert.

Aus früheren Untersuchungen in der Arbeitsgruppe, die nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, waren die maximalen Verträglichkeiten von VPA

(täglich 2x 250mg/kg/KG) und 5-FU (wöchentlich, 100mg/kg/KG) für andere Mausmodelle bekannt.

Tabelle 12: Dosis und Applikation von Referenzsubstanzen zur Bestimmung des embryotoxischen Potenzials am 7AC5-stammzellabgeleiten Teratommodell in der NOD/SCID-Maus

Substanz / Applikation	NaCl	Saccharose	VPA	5-FU
subkutan intrasplenal intrahepatisch	1x tgl. 200µl 0,9%ige Lösung i.p.	1x tgl. 1500mg/kg/inj. oral	2x tgl. 250mg/kg/inj. i.p.	1xwöchentlich.; 100mg/kg/inj. i.p.

4.3.2.1. Substanzwirkung nach subkutaner Applikation der 7AC5/Luc-Stammzellen

7AC5/Luc-Stammzellen wurden s.c. appliziert und zum Tag 1 wurde die Substanzbehandlung wie in Tab.12 beschrieben begonnen. Zum *in vivo* Monitoring der Wirksamkeit der Referenzsubstanzen Saccharose, VPA und 5-FU wurden Biolumineszenzaufnahmen zweimal wöchentlich durchgeführt. Die Resultate sind in Abb.49 dargestellt.

Zum Tag 2 konnte bei allen Tieren zumindest ein sehr schwaches Signal der applizierten 7AC5/Luc-Stammzellen am Transplantationsort nachgewiesen werden. Nach 14-tägigen Behandlung der NOD/SCID-Mäuse mit Saccharose, VPA bzw. 5-FU konnten deutliche Unterschiede im Luciferasesignal mittels Biolumineszenz dokumentiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Signalunterschiede nahmen bis zum Versuchsende am Tag 27 weiter zu (Abb.49A). Sowohl die erkennbare Fläche des Signals sowie die Intensität war bei der 5-FU-behandelten Gruppe im Vergleich zur Saccharose und NaCl deutlich reduziert.

Nach der s.c. Applikation wurde das Teratomwachstum durch Vermessung mit einem Messschieber quantifiziert. Das Teratomvolumen wird durch die 5-FU-Behandlung signifikant reduziert ($p \leq 0{,}001$) (Abb.49C). Saccharose-behandelte Teratome wiesen ein Volumen (V) von 1,48cm³ auf (V_{NaCl} = 0,71cm³, V_{VPA} = 0,75cm³), wohingegen die 5-FU-behandelten Teratome nur noch ein $V_{5\text{-}FU}$ = 0,098cm³ besaßen. Dieses Ergebnis wird durch die Autopsie der Teratome bestätigt. Die Morphologie der Teratome unterscheidet sich außerdem deutlich. Die NaCl-, Saccharose- und

VPA-behandelten Teratome weisen eine kompakte, solide, gut vaskularisierte Struktur auf (Abb.49B).

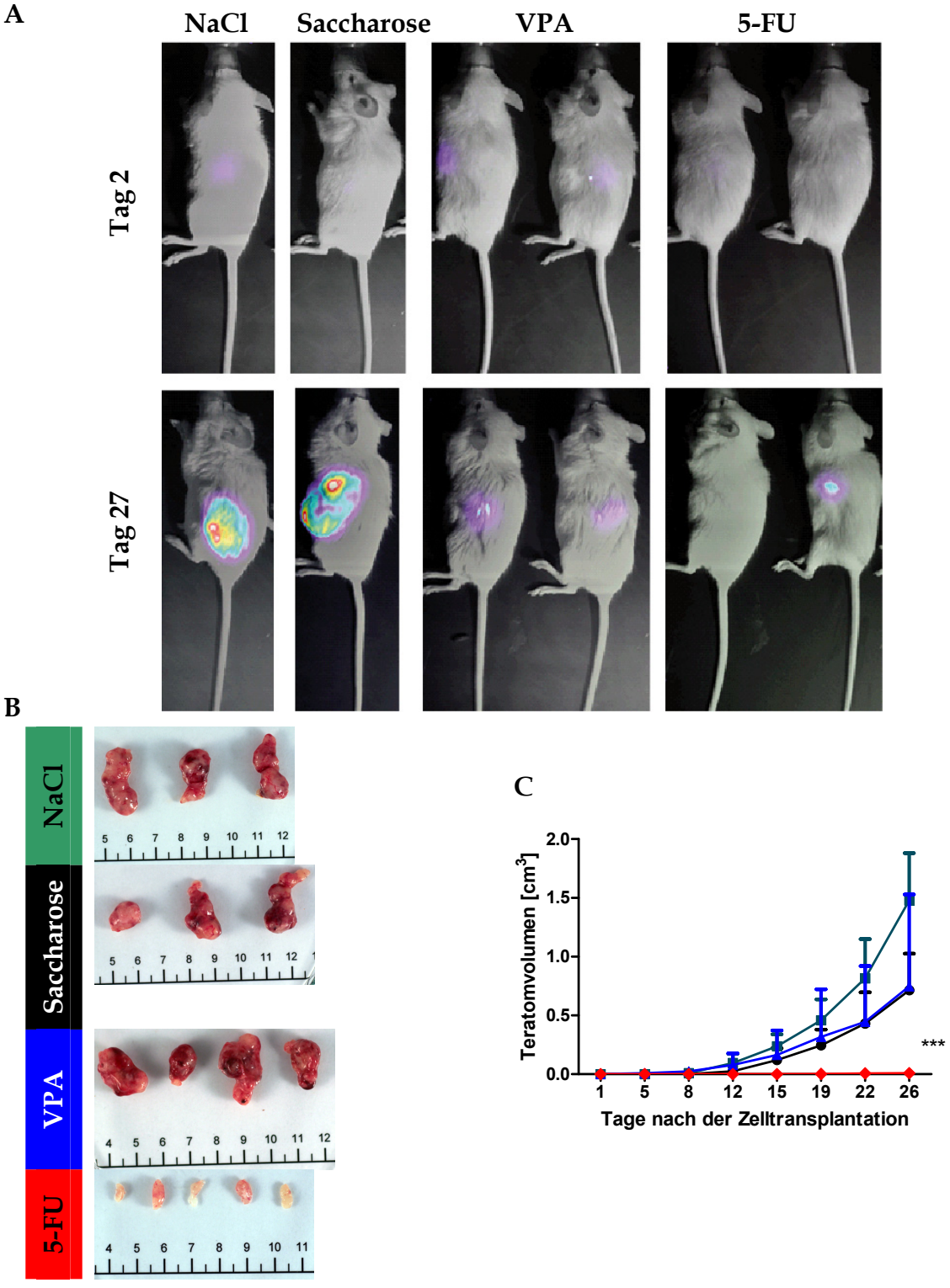


Abbildung 49 Behandlung von stammzellabgeleiteten Teratomen mit Substanzen unterschiedlichen embryotoxischen Potenzials nach s.c. Applikation der 7AC5/Luc Zellen
In vivo live Imaging der Teratome unter Behandlung von NaCl, Saccharose, VPA oder 5-FU (A). Das Teratomwachstum wurde zusätzlich durch Größenvermessung dokumentiert. Das Teratomvolumen wurde durch die 5-FU-Behandlung signifikant reduziert (***p≤0,001; C). Nach der Autopsie wurden in jeder Gruppe Teratome entnommen, die eine unterschiedliche Vaskularisierung und Größe aufwiesen (B).

Die 5-FU-behandelten kleineren Gewebe sind durch einen deutlich heller erscheinenden Phänotyp gekennzeichnet mit einer geringeren Vaskularisierung. Im Folgenden wurde die Substanzwirkung in Abhängigkeit von der organspezifischen Applikation der Zellen auf die Teratomprogression untersucht. Die 7AC5/Luc-Stammzellen wurden i.splen. bzw. i.hep. appliziert und die Teratomentwicklung *in vivo* mittels Biolumineszenz über den Versuchszeitraum verfolgt.

4.3.2.2. Substanzwirkung nach intrasplenaler Applikation der Zellen

Die 7AC5/Luc-Stammzellen wurden i.splen appliziert und zum Tag 1 nach der Zelltransplantation die NOD/SCID-Mäuse mit den Substanzen behandelt (Tab.10). Das Teratomwachstum wurde über den Versuchszeitraum *in vivo* mit Biolumineszenz verfolgt.

Zum Tag 2 konnte bei der Kontrollgruppe (NaCl-, Saccharose-Behandlung) und den VPA-behandelten NOD/SCID-Mäusen ein erstes Biolumineszenzsignal dokumentiert werden (Abb.50A). Hingegen zeigte sich bei der 5-FU-behandelten Gruppe nur ein sehr schwaches Signal. Die Unterschiede im Signal (Intensität und Fläche) wurden zum Tag 17 der Behandlung noch deutlicher. Die Behandlung mit den nicht und schwach embryotoxischen Substanzen führen zu etwa gleich starken Biolumineszenzsignalen. In den 5-FU-behandelten Mäusen war kein Teratomwachstum von außen durch Biolumineszenz nachweisbar. Nach der Autopsie wurden an der Transplantationsstelle (Milz) Teratome bei 4/5 Mäusen in der 5-FU-behandelten Gruppe nachgewiesen (Abb. 50B). Die Teratome konnten leicht von der Milz getrennt werden und besaßen etwa einen Durchmesser von 0,4cm. In den NaCl-, Saccharose- bzw. VPA-behandelten Gruppen sind die Teratome hingegen stark mit der Milz verwachsen. Die Teratome zeichneten sich durch einen Durchmesser >1,0cm aus.

Beim Vergleich der Teratomgewichte ergibt sich eine signifikante Reduktion nach der 5-FU-Behandlung (Teratomgewicht: $p \leq 0,05$; Abb.50C). Es ist eine tendenzielle Gewichtsabnahme der Teratome mit dem steigenden embryotoxischen Potenzial der Substanzen nachweisbar:

$Teratom_{NaCl} = 2,4g > Teratom_{Sac} = 2,1g > Teratom_{VPA} = 1,3g > Teratom_{5\text{-}FU} = 0,14g$

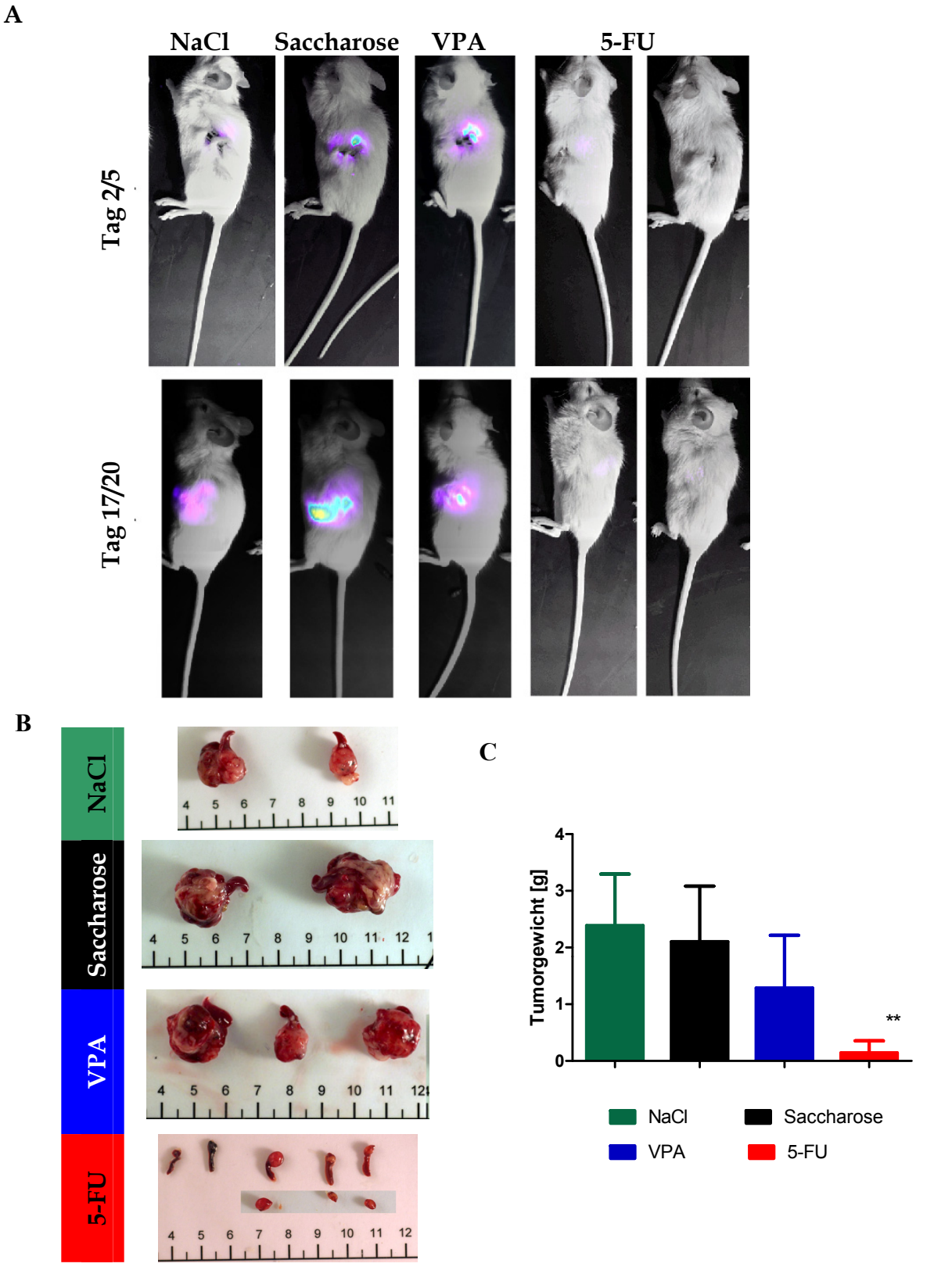


Abbildung 50 Behandlung von stammzellabgeleiteten Teratomen mit Substanzen nach i.splen. Applikation der 7AC5/Luc Zellen

In vivo live Imaging der heranwachsenden Teratome unter Behandlung von NaCl, Saccahrose, VPA oder 5-FU (A). Nach der Autopsie konnten in jeder Gruppe an der Transplantationsstelle in der Milz Teratome entnommen werden, die eine unterschiedliche Vaskularisierung und Größe aufwiesen (B, Tag 20). Das Teratomgewicht wurde durch die 5-FU-Behandlung signifikant reduziert (C; ** p≤0,005, Tag 20).

Die stammzellabgeleiteten Teratome nach i.splen. Applikation wiesen eine vergleichbare Morphologie zu den s.c. abgeleiteten Teratomen auf. Die NaCl-, Saccharose- bzw. VPA-behandelten Teratome zeichnen sich durch eine kompakte, solide, gut vaskularisierte Struktur auf. Im Gegensatz dazu zeigen die 5-FU-behandelten Teratome nach der Autopsie aus der Milz auch eine hellere Struktur (Abb.53B).

4.3.2.3. Substanzwirkung nach intrahepatischer Applikation der Zellen

Die Wirkung der Substanzen mit unterschiedlichem embryotoxischem Potenzial wurde auf die Teratombildung nach i.hep. Applikation der 7AC5/Luc-Stammzellen in NOD/SCID-Mäusen untersucht. Zum Tag 1 wurden die Tiere wie zuvor bei der i.splen. und s.c. Applikation mit NaCl, Saccharose, VPA oder 5-FU behandelt. Die Mäuse wurden zweimal wöchentlich auf die Teratomprogression *in vivo* mittels Biolumineszenz untersucht. Zum Tag 5 bis 7 konnten erste Unterschiede im Biolumineszenzsignal dokumentiert werden. Bei den NaCl- und Saccharose-behandelten NOD/SCID-Mäusen zeigte sich ein stärkeres Biolumineszenzsignal (Fläche und Intensität) im Vergleich zu den VPA- und 5-FU-behandelten Tieren. Bis zum Versuchsende am Tag 29 konnte bei den 5-FU-behandelten Mäusen kein Signal nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich bei den anderen drei Gruppen eine deutliche Zunahme des Biolumineszenzsignals im Bauchbereich der Tiere. Es waren keine deutlichen Unterschiede zwischen NaCl-, Saccharose- und VPA-behandelten Tieren zu sehen. Nach der Autopsie konnte eine teratomartige Struktur in der Leber bei den ersten drei Gruppen dokumentiert werden (Abb.51B). Die gebildeten

Teratomen waren stark mit der Leber verwachsen. Sie wiesen einen Durchmesser ≥1,0cm auf. Im Gegensatz dazu wurde bei den 5-FU-behandelten Tieren nur bei 3/5 Tieren ein Teratomwachstum nachgewiesen. Die entnommenen Teratome besaßen einen Durchmesser <0,5cm (Abb.51B). Die bestimmten Teratomgewichte sind in Abb.54C dargestellt. Durch die 5-FU-Behandlung wurde das Teratomgewicht in dieser Gruppe signifikant reduziert ($p<0,01$) im Vergleich zu den Saccharose-behandelten Tieren. In den ersten drei Gruppen zeigten sich jedoch starke tierexperimentelle Schwankungen im Gewicht. Diese differenziellen Anwachsraten

der transplantierten 7AC5-Stammzellen traten auch nach i.splen. Applikation der Zellen auf.

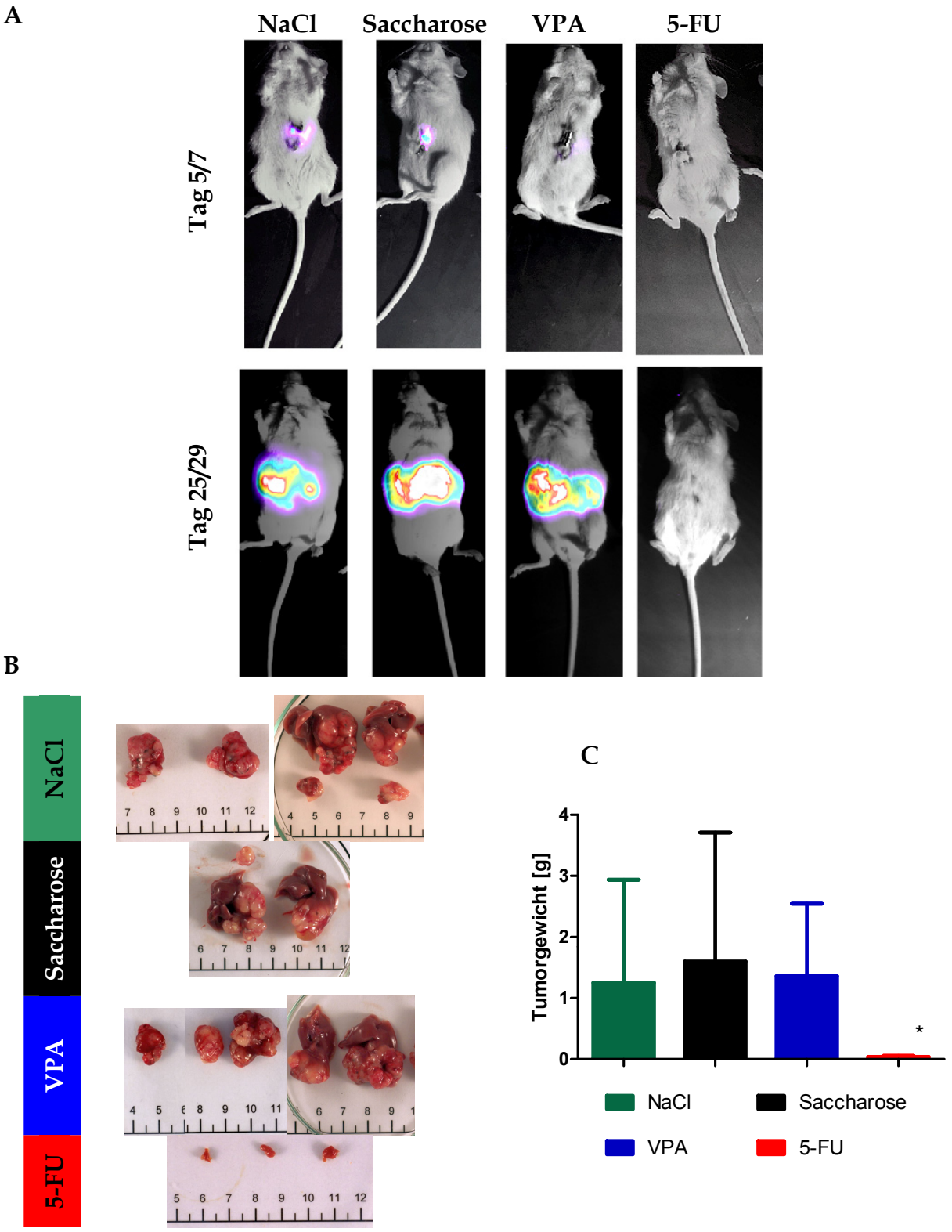


Abbildung 51 Behandlung von stammzellabgeleiteten Teratomen mit Substanzen nach i.hep. Applikation der 7AC5/Luc Zellen

In vivo live Imaging der heranwachsenden Teratome unter Behandlung von NaCl, Saccahrose, VPA oder 5-FU (A). Nach der Autopsie konnten an der Transplantationsstelle in der Leber Teratome entnommen werden, die eine unterschiedliche Vaskularisierung und Größe aufwiesen (B, d29). Das Teratomgewicht wurde durch die 5-FU-Behandlung signifikant reduziert (C; * $p \leq 0{,}05$, d29).

Somit lässt sich aus den Daten zusammenfassend festhalten, das nach s.c., i.splen. bzw. i.hep. Applikation der Zellen eine Teratomprogression unter der Substanzwirkung in vivo mittels Biolumineszenz dokumentiert werden kann. Nach i.splen. und i.hep. Applikation der Zellen wurden Schwankungen der Anwachsrate beobachtet. Die embryotoxische Wirkung von 5-FU konnte mittels Biolumineszenz deutlich nachgewiesen werden und korreliert mit morphologischen Daten sowie dem Teratomgewicht/-volumen.

In vivo Biolumineszenz stellt damit ein geeignetes Verfahren da, um die Kinetik der Teratomprogression und die Wirkung von Substanzen zu dokumentieren.

Zur weiteren Charakterisierung der stammzellabgeleiteten Teratome wurden histopathologische Analyse der entnommenen Teratome durchgeführt und deren Expression von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern untersucht.

4.3.2.4. Histopathologische Bewertung der 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome nach der Behandlung mit den Referenzsubstanzen

Durch die Analyse des Genexpressionsprofils ausgewählter Pluripotenz- und Differenzierungsmarker sowie eine feinhistopathologische Bewertung der Teratome sollte eine Substanzwirkung auf die Gewebedifferenzierung der Teratome untersucht werden.

Zwischen den einzelnen behandelten Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Histologie. Neben der Teratomgröße war die Anzahl und der Anteil an ausdifferenzierten Arealen in 5-FU-behandelten Teratomen im Vergleich zu Saccharose- und NaCl-Gruppe geringer. Substanzunabhängig traten aber in allen untersuchten Teratomen typische Strukturen der drei Keimblätter auf (Abb.52). Neuropil-ähnliche Strukturen, Talgdrüsen und verhornende Epidermis sind typische Merkmale des Ektoderms, Flimmerepithel mit Becherzellen sowie tubuläre Strukturen mit hochprismatischen Epithel sind charakteristisch für das Endoderm und quergestreifte Muskulatur sowie die Knorpellinse sind häufig auftretende Strukturen, die dem Mesoderm zuzuordnen sind. Exemplarisch sind die Ergebnisse für die s.c. Transplantation in Abb.52 gezeigt.

Die Histopathologie der 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome nach i.hep. und i.splen. Applikation befindet sich Anhang. Diese weisen wie die s.c. Teratome unabhängig

von der Substanzbehandlung die Struktur der drei Keimblätter auf, jedoch ist eine geringere Ausdifferenzierung und Vielfältigkeit der Strukturen in der 5-FU-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar.

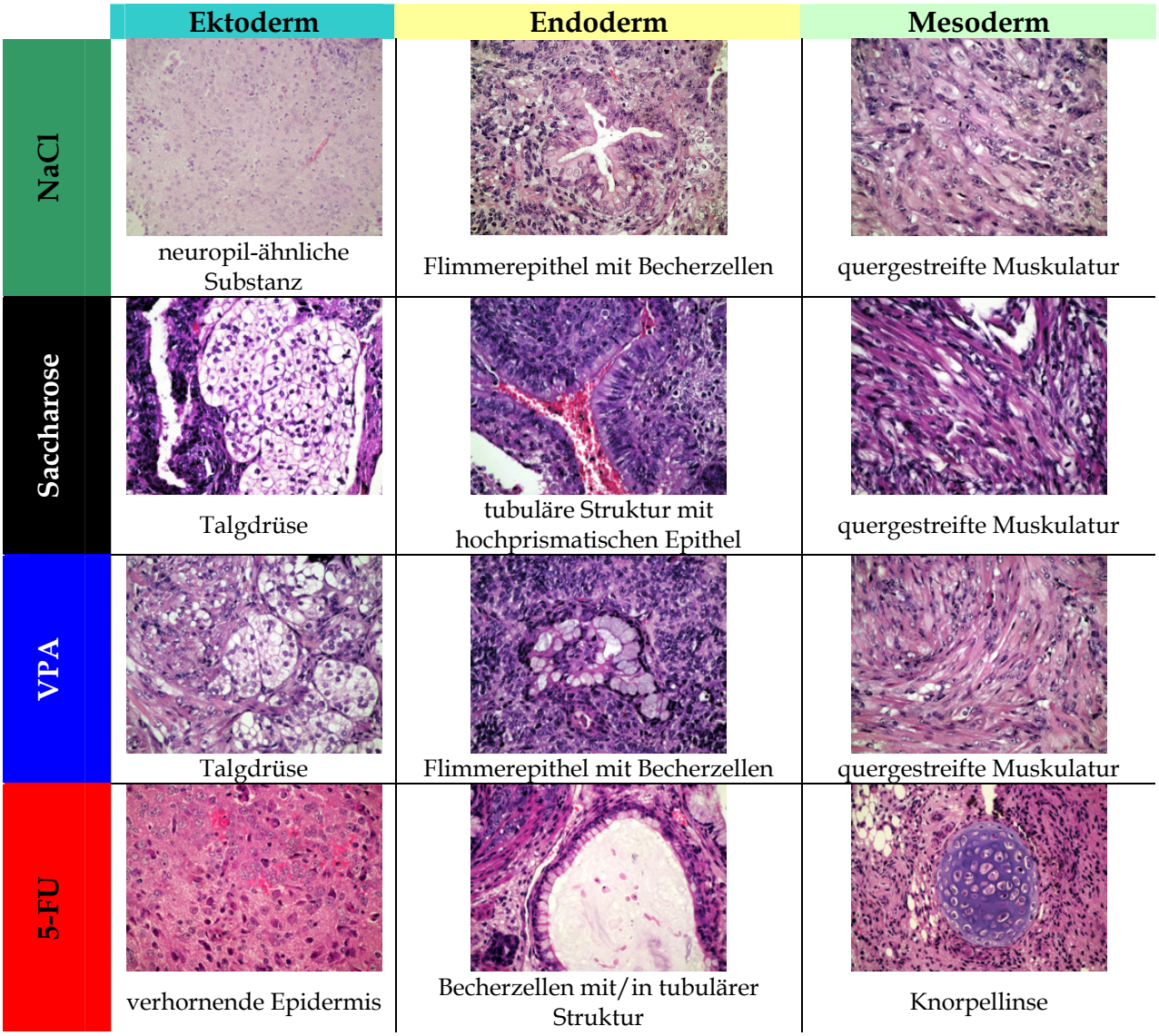


Abbildung 52 Histopathologische Begutachtung der s.c. abgeleiteten Teratome nach der Behandlung mit den Referenzsubstanzen
Alle Teratome wiesen unabhängig von der Substanzbehandlung die Strukturen der drei Keimblätter auf.

4.3.2.5. Wirkung der Referenzsubstanzen auf das Expressionsprofil der 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome

Zur spezifischen Analyse der Substanzwirkung *in vivo* auf ausgewählte Pluripotenz- und Differenzierungsmarker wurde mittels RT-PCR eine Expressionsanalyse der verschiedenen Teratome durchgeführt. In Abb.53 sind die Ergebnisse der Expressionsprofile s.c. abgeleiteter 7AC5/Luc-Teratome nach der Behandlung mit

NaCl, Saccharose, VPA oder 5-FU zusammenfassend aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

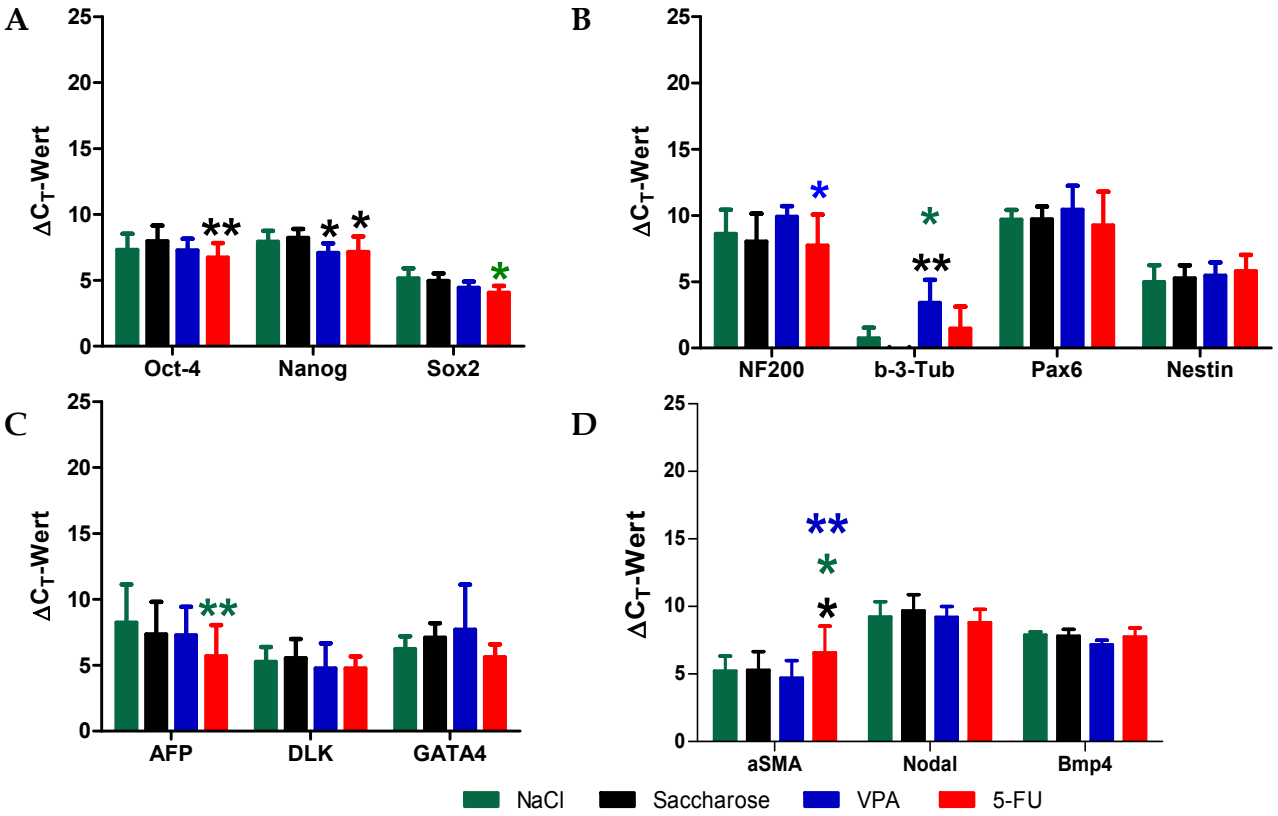


Abbildung 53 Expressionsprofil 7AC5/Luc-abgeleiteter Teratome unter der Behandlung der Referenzsubstanzen

Nach der s.c. Applikation von 1x10^6 7AC5/Luc-Zellen wurden die NOD/SCID-Mäuse über einen Versuchszeitraum von 28 Tagen behandelt und von den gebildeten Teratomen ein Expressionsprofil für ausgewählte Pluripotenzmarker (A) und keimblattspezifische Differenzierungsmarker (B – Ektoderm, C- Endoderm, D- Mesoderm) erstellt. n = 3 Versuche; n= 5 Tiere je Gruppe
*p≤0,05; **p≤0,005 zur NaCl-Behandlung; *p≤0,05, **p≤0,005 zur Saccharose-Behandlung; *p≤0,05, **p≤0,005 zur VPA-Behandlung

In allen Teratomen, unabhängig von der Behandlung mit den Substanzen der drei Embryotoxizitätsklassen, ist eine Ausdifferenzierung in die drei Keimblätter zu beobachten. Die Teratome weisen ein charakteristisches Markerprofil aus einer moderaten Expression der Pluripotenzmarker und einer erhöhten Expression der Differenzierungsmarker auf (Abb.53). Oct-4, Nanog und Sox2 werden geringer exprimiert und beta-3-Tubulin (Ektoderm), DLK (Endoderm) und aSMA (Mesoderm) zum Beispiel im Vergleich zu den 7AC5/Luc-Stammzellen deutlich höher exprimiert in den abgeleiteten Teratomen (Daten 7AC5/Luc-Stammzellen siehe Kap. 4.1.2 ff.).

Im nächsten Schritt wurde das Expressionsprofil der einzelnen Substanzgruppen miteinander verglichen. Durch die 5-FU-Behandlung nimmt die Expression der

Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 nicht so stark ab, wie in den anderen Gruppen. Zur Saccharose-Behandlung werden Oct-4 (**p≤0,005) und Nanog (*p≤0,05) in den 5-FU-behandelten Teratomen signifikant höher exprimiert. Das Sox2-Level hingegen wird nur im Vergleich zur NaCl-Behandlung signifikant erhöht in den 5-FU-behandelten Teratomen (* p≤0,05). Des Weiteren ist beim ektodermalen Marker NF200 eine leichte Steigerung der Expression in der 5-FU-Gruppe zu beobachten (im Vergleich zu VPA signifikant (*p≤0,05)). Die beta-3-Tubulin-Expression hingegen wird durch die 5-FU-Behandlung unterdrückt im Vergleich zur Kontrolle (NaCl, Saccharose). Die untersuchten endodermalen Marker (AFP, DLK und GATA4) werden in den 5-FU-behandelten Teratomen am höchsten exprimiert. AFP ist im Vergleich zur NaCl-Gruppe sogar signifikant erhöht (**p≤0,05). Mit Ausnahme von aSMA werden alle mesodermalen Marker in den einzelnen Behandlungsgruppen auf etwa gleichem Niveau exprimiert. Durch die 5-Behandlung wird im Vergleich zu den anderen drei Gruppen eine signifikante Expressionsreduktion beobachtet (*p≤0,05, *p≤0,05, **p≤0,005).

Durch die VPA-Behandlung wird bei den untersuchten Pluripotenzmarkern nur eine signifikante Steigerung beim Marker Nanog beobachtet (*p≤0,05). Bei den ektodermalen Markern ist eine signifikant niedrigere Expression von beta-3-Tubulin durch die VPA-Behandlung zu beobachten (*p≤0,05 zur Saccharose-Behandlung, **p≤0,005 zur NaCl-Behandlung). Alle anderen untersuchten Marker zeigten keine signifikanten Veränderungen im Expressionsprofil durch die Behandlung mit der schwach embryotoxischen Substanz.

Insgesamt gibt es Veränderungen im Expressionsprofil der untersuchten Marker der drei Keimblätter, eine Ausdifferenzierung in das Ekto-, Endo- oder Mesoderm bleibt durch die 5-FU-Behandlung jedoch nicht aus.

Für die Teratome nach i.hep. und i.splen. Applikation wurde die Probenauswertung erschwert, da die Teratomproben zum Teil durch das einwachsende Normalgewebe kontaminiert wurden. Dadurch gibt sich ein verfälschtes Expressionsprofil, das demzufolge nicht in die Auswertung einbezogen wurde (Daten nicht gezeigt).

5. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung eines Teratommodells von murinen embryonalen Stammzellen in der NOD/SCID-Maus. Als embryonale Mausstammzellen wurden die mit dem EYFP-Reportergen markierten 7AC5-Zellen eingesetzt. Es wurden feeder- und serumfreie Zellkulturbedingungen und das Expressionsprofil von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern vergleichend zur Kultur auf CD-1-Feederzellen qualitativ und quantitativ bewertet.

Zur *in vivo* Detektion der mESCs wurde eine Reportergentransfektion mit einem Luc-Plasmid mittels Nukleofektion durchgeführt und deren Einfluss auf das Gen- und Proteinexpressionsprofil der 7AC5-Stammzellen untersucht. Anschließend wurden unterschiedliche Routen der Transplantation von Luc-reportergentransfizierten Stammzellen in der NOD/SCID Maus, deren Teratombildung und Organverteilung der Zellen *in vivo* mittels Biolumineszenz bestimmt.

Das Genexpressionsprofil von mESC-abgeleiteten Teratomen und NOD/SCID-Maus-Embryonen wurde vergleichend bewertet. Die Funktionalität des Teratommodells als Embryotoxizitätssystem wurde durch Prüfung der Wirkung von Substanzen mit bekanntem embryotoxischen Potenzial bestimmt.

5.1. *In vitro* Verhalten von murinen embryonalen Stammzellen unter feederfreien Bedingungen

5.1.1. Etablierung einer feeder- und serumfreien Kultur der murinen embryonalen Stammzelllinie 7AC5/EYFP

Die 7AC5/EYFP-Stammzelllinie (7AC5-) wurde käuflich von ATCC erworben. Die Zellen sind mit dem Reportergen EYFP markiert. Nach Herstellerangaben werden die 7AC5-Stammzellen standardmäßig auf Feederzellen (murinen embryonalen Mausfibroblasten) unter Zugabe von LIF kultiviert. Unter diesen Kulturbedingungen weisen die 7AC5-Stammzellen eine kompakte Koloniebildung mit einem stabilen undifferenzierten Phänotyp auf. Für Genexpressionsstudien der Stammzellen kontaminieren CD1-Feederzellen jedoch die DNA- und RNA-Proben, so dass sie das Expressionsprofil verfälschen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine feeder-

und serumfreie Kultur etabliert. Es wurde geprüft, inwieweit die feeder- und serumfreien 7AC5-Stammzellen (7AC5/FF) mit dem ESGRO Complete Plus System (Millipore) sich *in vitro* sowie *in vivo* wie auf CD1-Feeder kultivierte 7AC5-Zellen (7AC5/MEF) verhalten. Zur vergleichenden Bewertung des Einflusses der Kulturbedingungen wurden die Zellmorphologie sowie die Expression von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern auf RNA- und Proteinebene analysiert. *In vivo* wurde nach der Transplantation in NOD/SCID-Mäuse die Teratombildung und das Differenzierungsverhalten untersucht.

Es wurde nachgewiesen, dass sich die 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-Stammzellen *in vitro* durch eine kompakte Kolonieform mit einer hohen Proliferationsrate auszeichnen. Die Zellen wurden im Zwei-bis-Drei-Tage-Rhythmus kultiviert. Elektronenmikroskopische Analysen der 7AC5/FF-Stammzellen bestätigten ein hohes Kern-zu-Plasma-Verhältnis, ein Charakteristikum für undifferenzierte embryonale Stammzellen. Dies konnte auch für D3-Stammzellen auf Feeder gezeigt werden[101]. Sie bildeten ähnlich wie die hier untersuchten 7AC5/FF-Zellen Aggregate aus vier bis zehn Zellschichten auf dem Feeder[102].

Auf RNA- und Proteinebene konnte weiterhin für beide Kultivierungsbedingungen der 7AC5-Stammzellen eine vergleichbar hohe Expression an Pluripotenzmarkern (Oct-3,4, Nanog, Sox2, Lin28) bestimmt werden, nur der Oberflächenmarker SSEA-1 zeigte einen Unterschied im Expressionsniveau. Sowohl mittels FACS-Analyse sowie Immunzytochemie konnte bei 7AC5/FF-Stammzellen eine verminderte Expression von SSEA-1 nachgewiesen werden. 80% der 7AC5/MEF-Zellen zeigten während der Kultivierung eine SSEA-1-Expression, hingegen nur etwa 18% der 7AC5/FF-Zellen.

Literaturdaten bestätigen die hohe Expression der Pluripotenzmarker Oct-4 und Nanog mittels FACS-Analyse unter feeder- und serumfreien Kultivierungsbedingungen mit dem ESGRO Complete Plus System von Millipore. Jedoch wies die murine embryonale Stammzelllinie 46 C zusätzlich eine hohe SSEA-1-Expression unter diesen Bedingungen auf[103]. Dies konnte auch für die murine embryonale Stammzelllinie D3 gezeigt werden. Hier wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen mit ESF7-Medium unter Zugabe von LIF *in vitro* kultiviert und zeigten eine stabile Expression von Oct-3,4, SSEA-1 und Alkaliner Phosphatase[104]. In weiteren Studien wurden vergleichend fünf embryonale

Mausstammzelllinien mit normalen Karyotyp unter anderem auf die SSEA-1 Expression mittels FACS und Immunzytochemie untersucht. Hier konnten nur ca. 50% der Zellen als SSEA-1-positiv dokumentiert werden und mittels Immunzytochemie konnten sowohl negative sowie positive Kolonien erfasst werden. Diese Zellen wurden auf Feeder kultiviert[105]. Furusawa et al. beschreibt eine sehr unterschiedliche SSEA-1-Expression in drei untersuchten murinen embryonalen Stammzelllinien (ES Rosa, TT2 und ZHNTc4)[101].

Zusammenfassend ist aus den Ergebnissen dieser Arbeit und den Literaturdaten ein heterogenes Expressionsniveau von SSEA-1 auf murinen Stammzelllinien zu beobachten. Inwieweit die SSEA-1-Expression direkt funktionell für die Pluripotenz der murinen embryonalen Stammzellen verantwortlich ist, müssen jedoch weitere Untersuchungen zeigen.

Im Gegensatz zu mESC weisen hESC ein verändertes Markerprofil der Glykolipide, und Glykoproteine auf. Während mESC SSEA-1-positv sind, zeigen undifferenzierte humane embryonale Stammzellen keine SSEA-1-Expression. Die SSEA-1-Expression wird erst mit einer beginnenden Differenzierung der humanen Zellen induziert. Umgekehrt zeigen mESC keine SSEA-4-Expression, wobei dies neben SSEA-3, TRA-1-60 und TRA-1-81 ein charakteristisches Glykoprotein auf hESC ist. Außerdem benötigen hESC im Gegensatz zu mESC kein LIF um den pluripotenten, undifferenzierten Charakter *in vitro* aufrecht zu erhalten[101].

Mittels RT-PCR wurden die 7AC5/MEF und 7AC5/FF-Stammzellen auf das Expressionsprofil von weiteren Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern untersucht. Für die Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 konnte unter beiden Kultivierungsbedingungen ein vergleichbares ΔC_T-Profil mit hohen Expressionsleveln bestimmt werden. Typische Marker für die Keimblätter des Ekto- und Endoderms konnten auf einem mittleren bis schwachen Expressionsniveau nachgewiesen werden, signifikante Unterschiede zwischen beiden Kultivierungsbedingungen waren nicht nachweisbar. In der Literatur sind ähnliche Ergebnisse für das Expressionsprofil von Differenzierungsmarkern für die murine D3-Stammzelllinie beschrieben, die auf Feeder kultiviert wurde. Hier zeigte sich ebenfalls eine moderate Expression von beta-3-Tubulin (Ektoderm) und GATA4. Es konnte nachgewiesen werden, dass die beta-3-Tubulin-Expression mit der SSEA-1-

Expression kolokalisiert ist. Wie in den hier generierten Daten von 7AC5-Stammzellen konnte der endodermale Marker AFP auch in D3-Stammzellen nicht nachgewiesen werden[106].

Die bestimmten Marker des Mesoderms wurden im Gegensatz dazu mittel bis stark exprimiert. 7AC5/MEF zeigten eine hohe Expression von aSMA (alpha smooth muscle actin), diese war deutlich unter feeder- und serumfreien Bedingungen reduziert. Eine mögliche Ursache liegt in einer potentiellen Kontamination der 7AC5/MEF-Proben durch Feederzellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CD1-Zellen unter anderem eine sehr hohe Expression von DLK, Sox2 und aSMA aufweisen. In der Literatur ist eine vergleichende Proteomanalyse zwischen hESC und CD1-Feedern beschrieben, in der unter anderem mehrere Isoformen vom „smooth muscle"-Peptid für den CD1-Feeder nachgewiesen werden konnten[22,23].

Die moderate Expression von Bmp4 kann auf der Tatsache beruhen, da dieser Marker nicht nur als Differenzierungsmarker des Mesoderms bekannt ist, sondern auch eine Schlüsselfunktion in der Signalkaskade der Pluripotenz bei mESC einnimmt[107].

Die Resultate der Etablierung der feeder- und serumfreien Kultur der 7AC5/FF-Stammzellen wurde in einer SOP (standard operating procedure) dokumentiert und und waren die Grundlage für die Kultivierung der 7AC5-Stammzellen für weiterführende Arbeiten.

5.1.2. Transfektion der 7AC5-Stammzelllinie mit einem Luciferasegen (pLuc)

Zur *in vivo* Detektion von transplantierten 7AC5-Stammzellen mittels Biolumineszenz wurde die feeder- und serumfrei etablierte 7AC5-Stammzelllinie mit einem Luciferaseplasmid (pGL4.51[luc2/CMV/Neo]) unter Verwendung der Methode der Nukleofektion nach Amaxa transfiziert. Es ist eine nicht virale Transfektionsmethode durch Verwendung zellspezifischer Transfektionslösungen und elektrischer Parameter, die optimierte Protokolle für eine Vielzahl von Zelllinien und Zelltypen anbietet. Basierend auf dem Prinzip der Elektroporation können auch schwer zu transfizierende Zellen mit einer hohen Effizienz und Stabilität mit einem Plasmid markiert werden. In „Stem Cell Assays" wird die Nukleofektion für embryonale und adulte Stammzellen im Vergleich zu den Standardmethoden wie

Lipofektion empfohlen, da diese Methode mit ihren zellspezifischen Kits die Toxizität reduziert und dadurch die Effizienz und Viabilität der Zellen erhöht[108].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine SOP für die Transfektion von 7AC5/FF-Stammzellen erarbeitet und der Einfluss auf das Expressionsprofil von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern untersucht.

Aufgrund der vorhandenen EYFP-Integration in die 7AC5/FF-Stammzelllinie konnte keine Bestimmung der Transfektionseffizienz mit dem GFP-Kontrollplasmid für die Nukleofektion durchgeführt werden. Für die humanen embryonalen Stammzelllinien H9, HS306 und RNJ8 konnten jedoch in Transfektionsversuchen nach dem Nukleofektionsprinzip von Amaxa gezeigt werden, dass diese Methode durch eine hohe Reproduzierbarkeit und ausgeprägte Effizienz (bis ca.55%) gekennzeichnet ist, was im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden (Transfektionseffizienz oft unter 1%) eine deutliche Verbesserung darstellt[109]. Des Weiteren untersuchten Maurisse et al. eine Vielzahl von verschiedenen Zelllinien mit den optimierten Transfektionskits von Amaxa. Unter anderem wurde für eine Sichelzellanämie-tragende mESC-Zelllinie eine Transfektionseffizienz von 62% und Viabilität von 66% erreicht. Dafür wurde das Mouse ES Cell Nucleofector® Kit (Amaxa) mit dem Programm A-24 verwendet wie es auch für diese Arbeit genutzt wurde[110]. Mit der Magnetofektion konnte für D3-Stammzelllinien z.B. nur eine Effizienz von etwa 15% gezeigt werden[109].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Prüfung der Transfektionseffizienz und Stabilität der Plasmidintegration mit jeder Passagierung der Zellen das Luciferasesignal mittels Biolumineszenz-Assay bestimmt. Dabei konnte zum Tag 1 zunächst eine sehr hohe Aktivität bei den vier verwendeten Protokollen ermittelt werden, die nach der Selektion zunächst wieder bei allen sank, jedoch bis zum Kultivierungsende der Zellen nach 29 Tage stetig anstieg. Beim verwendeten Programm A-24 zeigte sich zum Versuchsende die höchste Luciferaseaktivität. Dies bestätigt die Resultate von Maurisse et al.[111]. Die Luc-Reportergen-markierten Zellen wiesen unter allen verwendeten Protokollen eine vergleichbare Proliferationsrate zur unmarkierten Kontrollgruppe auf und waren morphologisch durch ein kompaktes Koloniewachstum gekennzeichnet.

Während der *in vitro* Langzeitkultivierung über vier Wochen, in denen die 7AC5/Luc-Stammzellen etwa 100 Zellteilungen durchführen, konnte eine stabile Luciferaseaktivität nachgewiesen werden, sodass von einer stabilen Integration des Luc-Plasmids in den Zellen ausgegangen werden kann.

Die vergleichende Bewertung der Expressionsprofile von Luc-markierten 7AC5-Stammzellen zur Kontrolle (nicht-transfizierte Zellen) wurde auf RNA- und Proteinebene durchgeführte. Die Expressionsanalyse von ausgewählten Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern wiesen keine Unterschiede der Zelltypen auf. Sowohl 7AC5/Luc- sowie 7AC5/FF-Zellen zeigen eine hohe Expression der untersuchten Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog, Sox2 und Lin28. Mittels FACS-Analyse konnten nahezu 100% der untersuchten Luc-tragenden Zellen als Oct-3,4 und Sox2 positiv bestimmt werden. Nanog wird von etwa 70% der Zellen exprimiert. Die vorhandene Reportergen-Expression von EYFP wurde durch die weitere Integration des Luc-Plasmides nicht verändert. Bei den feederfrei kultivierten 7AC5/Luc-Zellen ist wie bei den 7AC5/FF-Zellen zuvor beschrieben auf Proteinebene mittels Immunzytochemie nur vereinzelt SSEA-1-positive Zellen nachweisbar, im Gegensatz zu den 7AC5/MEF-Stammzellen.

Außerdem wurde der Einfluss der Luc-Reportergen-Markierung auf die Proteinexpression ausgewählter Marker der drei Keimblätter untersucht. Es zeigten sich auch hier keine deutlichen Unterschiede zwischen 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Stammzellen. Die Proteinmarker des Ekto- und Mesoderms werden nur schwach von beiden Zelllinien exprimiert, wohingegen die endodermalen Marker AFP und DLK stärker exprimiert werden. Diese beiden Marker sind auf RNA-Ebene aber nicht nachweisbar.

Es ist beschrieben, dass eine murine Stammzellkultur selbst unter Zugabe von LIF eine leichte endodermale Differenzierung aufweist. Shen et al. untersuchte die Embryo-Body-Bildung von D3-Stammzellen in Zusammenhang mit LIF *in vitro*. Dieses unterbindet zwar die Ausbildung von Strukturen des primitiven Ektoderms und auch die Expression typsicher Marker des Mesoderms, jedoch wiesen die Embryo-Bodies typische Strukturen und Marker des Endoderms auf[112].

Des Weiteren weisen die 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Stammzellen ein vergleichbare Proliferationsrate und Expressionsprofil auf. Daraus kann geschlussfolgert werden,

dass das Luc-Plasmid im Genom in einer Stelle eingebaut wurde, die zumindest keinen Einfluss auf die in dieser Arbeit untersuchten Eigenschaften der 7AC5-Stammzellen nehmen, dazu zählen die untersuchten Pluripotenz- und ausgewählten Differenzierungsmarker auf Protein- und RNA-Ebene sowie die Morphologie. Diese generierten Daten sind in Übereinstimmung mit Literaturdaten zu anderen untersuchten Zelllinien. So wurde an Tumorzelllinien MCF-7 (humane Brustkrebszelllinie) und B16-F10 (murinen Melanomzelllinie) der Einfluss der Transfektion mit Luciferase *in vitro* und *in vivo* untersucht. An beiden Zelllinien konnten keine Veränderungen in der Viabilität dokumentiert werden, noch zeigte sich durch die Biolumineszenz eine photodynamische Toxizität während der *in vitro* Kultur[113].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in dieser Arbeit ein weiteres Reportergen in die schon EYFP-markierte 7AC5-Stammzelllinie stabil integriert wurde. Damit steht für weiterführende *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen eine duale Reportergen-tragende Stammzelllinie zur Verfügung, die unter feeder- und serumfreien Bedingungen kultiviert werden kann. Durch das EYFP-Reportergen ist ein *in vitro* und *ex vivo* Nachweis der 7AC5-Stammzellen möglich, mittels Luc-Reportergen können die Zellen live *in vivo* durch Biolumineszenz detektiert werden. Damit können das Organengraftment und die Ausdifferenzierung der 7AC5-Stammzellen sensitiv dokumentiert werden.

5.2. Etablierung des Teratommodells

Ein Teratom wird definiert als ein verkapselter, nicht maligner Tumor, der sich aus der diffusen Anordnung von Zellen und kleinen Gewebestrukturen der drei Keimblätter zusammensetzt[113]. Pluripotente Stammzellen besitzen die Eigenschaften, *in vitro* und *in vivo* in alle Zellen der drei Keimblätter zu differenzieren. Mit dem Teratomassay kann diese Eigenschaft der Stammzellen *in vivo* überprüft werden. Nach der Transplantation in ein geeignetes Mausmodell sind ESC einer komplexen Mischung an Wachstumsfaktoren und extrazellulärer Matrix ausgesetzt, die das Teratomwachstum und deren Differenzierungspotenzial beeinflussen. Die ESC

differenzieren und bilden unterschiedlichste Zellen und Strukturen der drei Keimblätter aus[114].

In dieser Arbeit wurde nach der erfolgreichen Etablierung einer feeder- und serumfreien Kultur der 7AC5-Stammzellen und deren stabilen Transfektion mit pLuc das *in vivo* Verhalten der 7AC5/MEF-, 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Stammzellen untersucht und verschiedene Parameter der Transplantation (Tiermodell, Zellzahl, Inokulationszeit, Applikationsroute) des Teratommodells bewertet.

Zunächst wurde vergleichend ein immunkompetentes und immundefizientes Mausmodell bewertet. Immundefiziente Mäuse haben im Gegensatz zu immunkompetenten Tieren ein zum Teil stark abgeschwächtes Immunsystem (z. B. NOD/SCID-Mutation (engl. Non-Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficiency, - Nicht-fettleibig-diabetisch, mit schwerer kombinierter Immundefizienz)). Dadurch wird nach der Transplantation von xenogenen Zellen oder Geweben keine Immun- und damit Abstoßungsreaktion in der Maus hervorgerufen. Deshalb eignen sich immundefiziente Mausmodelle besonders zur Untersuchung von ESC, unabhängig von der Spezies[106,113].

In dieser Arbeit wurde als immunkompetentes Mausmodell 129S6-Mäuse, die zur Kreuzung der 7AC5-Stammzellgenerierung eingesetzt wurden, gewählt und als immundefizientes Modell NOD/SCID-Mäuse. $1x10^7$-Zellen wurden s.c. appliziert und die Teratombildungsrate über die Zeit dokumentiert. Bis zum Tag 102 nach der Zellapplikation von 7AC5-Stammzellen konnte im immunkompetenten 129S6-Mausmodell kein Tumorwachstum dokumentiert werden. Hingegen war im immundefizienten Mausmodell bereits am Tag 21 nach der Applikation ein progredientes Tumorwachstum zu beobachten. Die Tumor-/Teratom-Entwicklung war zwischen 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-Stammzellen in beiden Mausstämmen vergleichbar.

Die histopathologische Bewertung der am Tag 102 entnommenen Proben aus dem 129S6-Mausmodell konnte ebenfalls kein Teratomwachstum nachweisen. Die maximal 0,12cm^3 großen, tumorartigen Geschwülste wiesen nur Fettstrukturen auf. Im immundefizienten NOD/SCID-Mausmodell setzten sich die entnommenen Teratome aus eindeutigen Strukturen der drei Keimblätter zusammen. Bei der Analyse des Expressionsprofils der 7AC5/MEF- und 7AC5/FF-abgeleiteten

Gewebeproben im NOD/SCID-Modell konnte im Vergleich zu den Ausgangsstammzellen eine erhöhte Expression der Differenzierungsmarker (z.B. beta-3-Tubulin (Ektoderm), AFP (Endoderm) und aSMA (Mesoderm)) nachgewiesen werden, die mit einem verminderten Transkriptionsniveau der Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 einhergingen.

Wie für humane embryonale Stammzellen beschrieben, eignen sich besonders immundefiziente Modelle (NOD/SCID, NSG) zur Charakterisierung des *in vivo* Verhaltens und der Teratombildung[42,115]. Im immunkompetenten 129S6-Mausmodell ist kein Tumor-/Teratomwachstum nachweisbar. Eine Erklärung hierfür ist eine mögliche Immunreaktion und damit der Abbau der transplantierten Zellen. Publikationen beschreiben aber auch das Teratomwachstum von mESC in immunkompetenten Mausmodellen[42]. Nach syngener als auch allogener Transplantation von drei verschiedenen mESC-Linien (129Sv W9.5, BALB/c und C57BL76) in BALB/c-Mäuse konnte ein Teratomwachstum dokumentiert werden, das jedoch deutlich zelllinienabhängig war. Es wurde diskutiert, dass Unterschiede in der Stabilität bezüglich der Pluripotenz und der Keimbahnlinienkompetenz bei mESC-Zelllinien bestehen und damit auch eine zelllinienabhängige Teratombildungsrate besteht[44]. Es kann impliziert werden, dass die 7AC5/EYFP-Zelllinie wie unter anderem auch die BALB/c-Zelllinie eine geringere Teratombildungsrate in immunkompetenten Mausmodellen besitzt. Gordeeva und Nikonova konnten jedoch für die murine R1-Linie (nicht fluoreszierende Variante von 7AC5/EYFP) zeigen, dass zumindest in etwa 50% der Fälle bei der s.c. Applikation von $3x10^6$ Zellen ein Teratom in immunkompetenten C57Bl/6 –Mäusen nachweisbar ist[116].

Aufgrund der besseren Teratombildung verwendeten wir in weiteren Versuchen ausschließlich NOD/SCID-Mäuse und es wurden weitere Parameter (Zellzahl, Probenahmezeitpunkt) des Teratommodells bewertet. Nach der s.c. Applikation von 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-Stammzellen zeigte sich eine zellzahlabhängige Teratombildungsrate. Die exponentielle Wachstumsphase setzte in Abhängigkeit von der Zellzahl zeitverzögert ein, sodass diese bei $1x10^7$ applizierten Zellen ab Tag 12 zu beobachten war und im Gegensatz dazu bei $1x10^4$ Zellen erst etwa ab Tag 22. Jedoch bildete sich unabhängig davon bei allen untersuchten Zellzahlen ein Teratom mit

den drei Keimblattstrukturen aus, es konnten keine histopathologischen Unterschiede festgestellt werden, lediglich das Gesamtvolumen des Teratoms war bei den niedrigen Zellzahlen reduziert. Im Vergleich zu den undifferenzierten Ausgangszellen *in vitro* weisen die stammzellabgeleiteten Teratomen eine verminderte Expression der Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 auf. Dagegen wird die Expression der Differenzierungsmarker in den Teratomen induziert. Es zeigt sich keine deutlichen Veränderungen im Expressionsprofil der Differenzierungsmarker in Abhängigkeit von der Zellzahl. Nur die Teratome aus $1x10^3$ transplantierten Zellen weisen unter anderem eine verminderte Expression von Oct-4 sowie der endodermalen Markern AFP, DLK und GATA4 auf. Einerseits spricht die verminderte Expression des Pluripotenzmarkers Oct-4 für eine stärkere Ausdifferenzierung des Teratoms, hingegen zeigt die verminderte Expression der endodermalen Marker, dass zumindest dieses Keimblatt nicht so stark ausgeprägt ist wie bei den anderen transplantierten Zellzahlen. Zusammenfassend implizieren die Ergebnisse, dass bei einer sehr geringen Zellzahl eine defekte Teratomprogression und Markerexpression auftritt. So zeigte Lee et al. das Engraftment von hESC in Abhängigkeit von der Zellzahl ($1x10^2$ bis $1x10^6$) nach intramuskulärer und intrakardialer Zellapplikation. Die zeitliche Teratomentwicklung war mit abnehmender Zellzahl verzögert. Die gebildeten Teratome wiesen die drei Keimblattstrukturen auf. Für die geringeren Zellzahlen konnten keine Tumorentwicklungen dokumentiert werden[116].

Aus jeder Gruppe ($1x10^4$ bis $1x10^7$) wurde eine Einzelzellsuspension aus einem Teratom für eine Sekundärtransplantation hergestellt. Nach der Applikation von $5x10^6$ Zellen kam es erneut zur Teratombildung. Dies belegt die Anwesenheit von undifferenzierte Stammzellen im Primärteratom, die das Potenzial zur Teratombildung und Ausdifferenzierung in die drei Keimblattstrukturen besitzen. Das Teratomwachstum innerhalb der einzelnen Gruppen war jedoch deutlich inhomogener als bei der Primärtransplantation. Offensichtlich bewirkt die Inhomogenität der Zellsuspension von undifferenzierten und differenzierten Zellen Schwankungen in den Ergebnissen der tierexperimentellen Resultate.

Bei der histopathologischen Begutachtung der entnommenen Primär- und Sekundärteratome konnten sehr hohe Ähnlichkeiten in den drei Keimblattstrukturen

festgehalten werden. Im Expressionsprofil der Sekundärteratome konnten keine signifikanten Steigerungen der Differenzierungsmarker im Vergleich zum Primärteratom beobachtet werden und die Expressionslevel von Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern waren zwischen Primär- und Sekundärteratom vergleichbar.

Aus der Literatur sind nur wenige Resultate zur Primär- und Sekundärtransplantation von stammzellabgeleiteten Teratomen bekannt. Insgesamt kann aus den Daten dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach der s.c. Applikation von 7AC5-Stammzellen unabhängig von der Zellzahl ein Teratomwachstum in NOD/SCID-Mäusen induziert werden kann. Diese stammzellabgeleiteten Teratome besitzen die wesentlichen charakteristischen Typen der Keimblattzellen und damit die Struktur der drei Keimblätter sowie das dazugehörige keimblattspezifische Markerprofil. Außerdem kann eine Sekundärtransplantation der Teratome zum Nachweis von pluripotenten Zellen in der Probe dienen.

Ein weiterer untersuchter Parameter in dieser Arbeit war die Teratomzusammensetzung in Abhängigkeit von der Zeit. Zu frühen und späten Tagen (Tag 12, Tag 21) wurden Teratomproben nach der Applikation von 7AC5/FF-Stammzellen im NOD/SCID-Mausmodell untersucht. Zu beiden Zeitpunkten wiesen die entnommenen Teratome typische Zellen und Strukturen der drei Keimblätter auf. Oct-4, Nanog und Sox2 wurden am Tag 12 und 21 nicht signifikant unterschiedlich exprimiert. Es zeigte sich eine leichte tendenzielle Zunahme der Pluripotenzmarker zum Tag 21. Bei den Differenzierungsmarkern des Ekto-, Endo- und Mesoderms war eine moderate Expression nachweisbar. Das Expressionslevel der Keimblattmarker nahm vom Tag 12 zu Tag 21 in den untersuchten Teratomen zu. Dies deutet auf eine „stärkere“ Ausdifferenzierung zu einem späteren Zeitpunkt des Versuchsendes hin. Auch hier sind wenige Literaturdaten vorhanden, die zur detaillierten Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit herangezogen werden können.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Zellkultivierungsmethoden an der 7AC5/EYFP-Stammzelllinie (7AC5/MEF und 7AC5/FF) in zwei Mausmodellen (129S6 und NOD/SCID) charakterisiert. Das immundefiziente NOD/SCID-Mausmodell ist für stammzellabgeleitete Teratombildungsstudien am Besten geeignet.

Der Luc-Transfektionsprozess hatte keinen Einfluss auf die Markerexpression der untersuchten Pluripotenz- und Differenzierungsgene der 7AC5-Zelllinie.

5.2.1. *In vivo* Detektion von transfizierten Stammzellen durch Biolumineszenz

Biolumineszenz stellt eine sensitive Methode dar, um das *in vivo* Verhalten und Engraftment von reportertransfizierten (Stamm-) Zellen zu verfolgen. Basierend auf einer enzymatischen Reaktion, bei der Licht freigesetzt wird, können transfizierte Zellen *in vivo* leicht detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *in vivo* Verhalten von 7AC5-Stammzellen mittels Biolumineszenz unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet. Hierzu wurde die 7AC5-Stammzelllinie mit einem Luc-Reportergen transfiziert. Im nächsten Schritt wurde die *in vivo* Anwendbarkeit dieser Zelllinie überprüft. Im Zusammenhang mit der Applikationsroute (s.c., i.splen., i.hep., i.v.) wurde die Nachweisgrenze in Abhängigkeit von der Zellzahl untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass mindestens $1x10^5$ 7AC5/Luc-Zellen s.c. ins NOD/SCID-Mäuse appliziert werden müssen, um diese mittels Biolumineszenz direkt nach der Zellapplikation im Tier zu dokumentieren. *Ex vivo* wurden die applizierten Zellzahlen in ein Reaktionsgefäß überführt und gemessen. Die verwendete CCD-Kamera kann minimal $1x10^5$ Zellen detektieren.

Ähnliche Studien zur Nachweisgrenze der Biolumineszenz in Abhängigkeit von der Zellzahl wurden auch mit humanen embryonalen Stammzellen durchgeführt[44]. Die hESCs wurden im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit intramyokardial (i.myo.) bzw. intramuskulär (i.mus.) appliziert, aber auch hier konnte eine Zellzahlabhängigkeit nachgewiesen werden. Direkt nach der i.myo. und i.mus. Transplantation von 1000 Zellen wurde ein Biolumineszenzsignal an der Applikationsstelle detektiert. Am Tag 7 war dieses nicht mehr nachweisbar. Zum Versuchsende nach 365 Tagen konnte nach der Applikation von 1000 Zellen kein Tumorwachstum dokumentiert werden. Bei 5/7 Tieren traten bei $1x10^4$-Zellen i.mus. Teratome auf. Bei der i.myo. Applikation der hESCs entwickelten nur bei 2/7 Tieren bei $1x10^5$ applizierten Zellen ein Tumor.

Unter Verwendung von Luc-transfizierten mESC konnte im NOD/SCID-Mausmodell in dieser Arbeit nach der s.c. Applikation von $1x10^2$ 7AC5/Luc-

Stammzellen bei 2/8 Tieren ein Luciferasesignal mittels Biolumineszenz dokumentiert werden. Nach der Autopsie wurde bei 5/8 Tieren ein Teratom entnommen. Das Reportergen EYFP der 7AC5-Stammzellen wurde mittels PCR in den stammzellabgeleiteten Teratomen aus $1x10^2$ Zellen nachgewiesen und bestätigt den zellulären Ursprung des Teratoms aus 7AC5/EYFP-Zellen.

Gordeeva und Nikonova untersuchten das Teratomwachstum von der murinen R1-Linie (nicht fluoreszierende Variante von 7AC5/EYFP) ebenfalls zellzahlabhängig. Nach 15 Wochen konnte ein Wachstum bei 83% der Tiere nach intraperitonaler Applikation von 1000 Zellen festgestellt werden, jedoch war nach der s.c. Applikation von 100 bzw. 1000 Zellen selbst nach einem Zeitraum von 12 Monaten noch kein Teratomwachstum zu beobachten[61].

Aus den Untersuchungen zum zellabhängigen Engraftment nach i.splen. und i.hep. Applikation der 7AC5/Luc-Stammzellen wurde eine Mindestzellzahl von $1x10^5$ transplantierten Zellen bestimmt, um eine Teratombildung sowie ein Biolumineszenzsignal zu dokumentieren. Bei der i.v. Applikation der 7AC5-Stammzellen war die Nachweisgrenze noch geringer. Hier mussten mindestens $5x10^6$ Zellen applizierten werden, um das Engraftment durch ein Biolumineszenzsignal bzw. eine Teratombildung nachzuweisen.

Es ist in der Literatur beschrieben, dass metastasierende Tumorzellen nach i.v. Applikation schwer zu detektieren sind[61]. Sofort nach der i.myo. Zellapplikation konnten z.B. $2x10^5$ MDA-MB-435 Brustkrebszellen im Blutkreislauf detektiert werden. Nach der i.v. Applikation von 7AC5/Luc-Stammzellen wurde dies nur teilweise für $5x10^6$ Zellen bzw. bei $1x10^7$ Zellen beobachtet. Es war in den Lungen der Tiere eine Zellanreicherung mittels Biolumineszenz nachweisbar.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Daten der Biolumineszenzanalyse nach der Transplantation von 7AC5/Luc-Stammzellen eine deutliche Zellzahlabhängigkeit der Teratombildungsrate der Zellen in NOD/SCID-Mäusen. Außerdem beeinflussen der Applikationsort und damit das organspezifische Milieu die Verteilung bzw. das Engraftment der 7AC5/Luc-Stammzellen und damit die Nachweisgrenze mittels Biolumineszenz.

Durch die s.c. Applikation wird ein Abwandern und Verteilen und/oder Engraften von Zellen verhindert. Unter diesen Bedingungen kann eine standardisierte und

reproduzierbare Teratombildungsrate garantiert werden. Sie ist somit ein geeignetes Modell zur Etablierung eines Embryotoxizitätstestsystem.

Außerdem konnte Zinn et al. eine eindeutige Korrelation zwischen zunehmender Tumorgröße und dem wachsenden Biolumineszenzsignal für die subkutane Transplantation von Luciferase-positiven 2LMP-Zellen ins Mammafett zeigen[61]. Dies wurde teilweise im Rahmen dieser Arbeiten für die 7AC5/Luc-Stammzelle im NOD/SCID-Mausmodell durchgeführt. Die grafische und mathematische Optimierung der Auswertung des Biolumineszenzsignals dient zur weiteren Standardisierung dieses Modells. Insgesamt ist die Biolumineszenzmethode geeignet, um eine transiente oder permanente Organanreicherung von Luc-transfizierten Zellen nachzuweisen. Neben dem *in vivo* Monitoring stellt die Biolumineszenz damit eine Möglichkeit dar, den Therapieverlauf studienbegleitend zu verfolgen und damit auch langfristig Tierzahlen zu reduzieren.

Zur weiterführenden zelltypspezifischen Analyse wurden die 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratome mittels Histopathologie charakterisiert. Unabhängig von der Zellzahl wiesen alle Teratome nach der s.c. Applikation von 7AC5/Luc-Stammzellen typische Strukturen der drei Keimblätter wie verhornende Epidermis (Ektoderm), Becherzellen mit/in tubulärer Struktur (Endoderm) und quergestreifte Muskulatur (Mesoderm) auf. Jedoch war mit abnehmender Zellzahl ein geringeres Tumorvolumen (ab $1x10^4$ Zellen) zu verzeichnen, die mit einer Zunahme an zystischen Strukturen einherging. Stammzellabgeleitete Teratome nach der Applikation von $1x10^5$ und mehr 7AC5/Luc-Zellen wiesen vielfältigere Strukturen der Keimblätter auf. Bei niedrigeren Zellzahlen zeigten die Teratome eine geringere „Vielfältigkeit" der Keimblattstrukturen und neuroektodermale bzw. neuropilähnliche Strukturen waren seltener zu verzeichnen. Bei $1x10^2$-Zellen war der mesodermale Anteil von differenzierten Zellen nur noch gering ausgeprägt.

Nach i.hep., i.splen. und i.v. Applikation der 7AC5/Luc-Stammzellen war nur bei einer hohen Zellzahl (>$1x10^5$ Zellen) ein Teratomwachstum in NOD/SCID-Mäusen nachzuweisen. Diese Teratome setzten sich unabhängig vom Applikations- und Engraftmentorts aus vielfältigen Strukturen der drei Keimblätter zusammen. I.hep. und i.splen. applizierte 7AC5-Stammzellen engrafteten nur am Transplantationsort und bildeten Teratome aus. Nach der i.v. Applikation der mESC war ein

Engraftment mit Teratombildung in den Knochen der Gliedmaßen sowie in der Lunge nachweisbar.

In der Literatur sind vergleichbare Resultate beschrieben. Aldahmash et al. beobachtete eine zeitliche Abhängigkeit der Teratombildung im Zusammenhang mit dem Applikationsort, die Teratome bildeten aber alle drei Keimblattstrukturen aus. Es wurde eine Korrelationen zwischen Teratomgröße und der zunehmenden Komplexizität der Keimblattstrukturen gefunden[42]. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen für das NOD/SCID-Mausmodell mit 7AC5-Stammzellen war eine ausgeprägte Korrelation dieser Parameter nur tendenziell nachweisbar.

Prokhorova et al. untersuchten unterschiedliche Applikationsrouten von hESC (subkutan, intramuskulär, intratestinal, in die Nierenkapsel der Tiere). Unter diesen Bedingungen wurden mit Ausnahme der subkutanen Applikation, wo eine kompakte Gewebestruktur in den stammzellabgeleiteten Teratomen zu beobachten war, hohe zystischen Anteil in den Teratomen nachgewiesen und sie waren sehr oft mit dem umgebenden Gewebe stark verwachsen[117]. Dies konnte in dieser Arbeit nach der i.hep. und i.splen. Transplantation von 7AC5-Stammzellen am Applikationsort und nach der i.v. Transplantation an der Engraftmentstelle (Knochen, Lunge) beobachtet werden. Jedoch war bei hohen Zellzahlen kein ausgeprägter zystischer Anteil in den stammzellabgeleiteten Teratomen zu beobachten.

Zusammenfassend ist das Teratomwachstum von 7AC5-Stammzellen unabhängig vom Applikationsort im NOD/SCID-Mausmodell nachweisbar. Das Engraftment und die Teratomprogression kann mittels Biolumineszenz *in vivo* dokumentiert werden. Das Engraftment- und Teratombildungspotenzial der 7AC5-Stammzellen ist durch eine starke Zellzahlabhängigkeit im Zusammenhang mit dem Applikationsort geprägt.

Zusätzlich zur Funktionalität des Biolumineszenzmodells wurde der Einfluss des Transfektionsprozesses auf das *in vivo* Verhalten der 7AC5/Luc-Zellen und der daraus abgeleiteten Teratome im Vergleich zu 7AC5/FF-Zellen im NOD/SCID-Mausmodell untersucht. Die Teratomanwachstums- und -bildungsrate beider Zelltypen war über den Versuchszeitraum vergleichbar, die histopathologische Untersuchung zeigte in allen Teratomen die Ausbildung von typischen Zellen der

drei Keimblattstrukturen. Auf RNA-Ebene konnten keine Veränderungen im Expressionsprofil von Markern der Pluripotenz und Differenzierung durch den Transfektionsprozess zwischen 7AC5/FF- und 7AC5/Luc-abgeleiteten Teratomen nachgewiesen werden.

Somit ergibt sich aus den *in vitro* und *in vivo* Daten zur Kultivierungsmethode und der Transfektion der 7AC5-Stammzelllinie, dass die Standardkultur auf Feeder vergleichbar mit der feeder- und serumfreien Kultur ist. Es konnte kein Einfluss auf die untersuchten *in vivo* Parameter (u.a. Engraftment, Differenzierung) nachgewiesen werden. Durch die erneute Transfektion der 7AC5/EYFP-Stammzellen mit einem Luc-Plasmid blieben die *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften der Zelllinie erhalten. Als Resultat konnte eine duale Reportergen-tragende Zelllinie etabliert und charakterisiert werden, die mit einem EYFP- und Luc-Plasmid transfiziert wurde. Über diese beiden Reportergene können die 7AC5-Stammzellen mit sensitiven Methoden leicht *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* nachgewiesen werden.

Durch die Bestimmung ausgewählter Pluripotenz- und Differenzierungsmarker auf RNA- und Proteinebene sowie die histopathologische Bewertung der 7AC5-abgeleiteten Gewebe ist ein Charakterisierungstool für die Teratome etabliert worden. Anhand ausgewählter Marker der Pluripotenz und keimblattspezifischen Differenzierung kann der Differenzierungsstatus der stammzellabgeleiteten Teratome untersucht werden. Die Validität einiger Marker wie z.B. Bmp4 muss weiterführend überprüft werden, da sie sowohl im Pluripotenz- sowie Differenzierungsprozess eine Rolle spielen und somit keine eindeutige, keimblattspezifische Zuordnung erlauben. Zur umfassenden Charakterisierung des Teratomexpressionsprofils und deren Anwendbarkeit zur Etablierung des Embryotoxizitätstest sollte die Erstellung eines Whole Genome Expressionsprofils genutzt werden.

5.2.2. Die NOD/SCID-Mausembryogenese

Im Rahmen der Arbeit wurden zu verschiedenen Zeiten der Embryogenese Genexpressionsanalysen von Markern der Pluripotenz und Differenzierung sowie histopathologischen Analysen von NOD/SCID-Mausembryonen durchgeführt. Die

Expressionsprofile der Mausembryonen wurden mit denen der 7AC5-Stammzellen und den daraus abgeleiteten Teratomen verglichen. Zur weiteren Einordnung der generierten Expressionsprofile wurden Literaturdaten herangezogen. Die Informationen zur Markerexpression während der Mausembryogenese sind in verschiedenen Datenbanken zu finden. Der „Edinburgh Mouse Atlas of Gene Expression"(www.emouseatlas.org) führt morphologische Daten für die einzelnen Stadien im Anatomieatlas sowie deren Markerprofil in einer Genexpressions-Datenbank detailliert auf[75,76,78,79].

In der vorliegenden Arbeit konnte für das frühe Stadium der Embryogenese in der NOD/SCID-Maus (E4 und E5) eine sehr geringe bis moderate Expression der untersuchten Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 sowie der Differenzierungsmarker der drei Keimblätter bestimmt werden, mit Ausnahme von der sehr starken Expression von Nestin (Ektoderm) und aSMA (Mesoderm). AFP, DLK und GATA4 waren bis zum Tag 10 (E10) gar nicht oder schwach nachweisbar. Dies steht in Übereinstimmung mit den Angaben der Datenbank zum Tag 8 der Mausembryogenese.

Die schwache Expression der Differenzierungsmarker bei E4/E5 in frühen Stadien der Mausembryogenese ist auch bei undifferenzierten 7AC5-Stammzellen zu beobachten, jedoch nicht die hohe Expression von aSMA und Nestin, die in frühen Stadien der NOD/SCID-Embryogenese (E4) zu beobachten ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Proben zum Zeitpunkt E4 und E5 durch extraembryonales Gewebe kontaminiert wurden und so eine erhöhte Expression dieser beiden Marker artifiziell verursacht wurde.

Die Embryonen der späten Phase der Embryogenese (E10, E15, E20) weisen eine geringe Expression der Pluripotenzmarker Oct-4 und Nanog auf, hingegen wird Sox2 sehr hoch exprimiert. Alle untersuchten Differenzierungsmarker des Ekto-, Endo- und Mesoderms sind durch eine moderate bis hohe Expression gekennzeichnet. Die 7AC5-stammzellabgeleiteten Teratome exprimieren die Differenzierungsmarker auf einem vergleichbaren Level wie die Mausembryonen E10, E15 bzw. E20. Nur Oct-4 und Nanog, was nur noch schwach in den Embryonen nachweisbar ist, wird in den Teratomen noch auf einem moderaten Level exprimiert. Die erstellten Expressionsprofile der Embryonen E10, E15 und E20 stehen in

Übereinstimmung mit der Datenbank „Edinburgh Mouse Atlas of Gene Expression“ (www.emouseatlas.org).

Als Schlussfolgerung kann aus der Analyse der NOD/SCID-Mausembryogenese gezogen werden, dass das stammzellabgeleitete Teratom unter den gewählten Versuchsbedingungen und den bestimmten Messparametern Stadien der Embryogenese widerspiegelt und damit die Ergebnisse von Gertow et al. bzw. von Blum und Benvenisty bestätigt[84]. Hier wurden detaillierte Analysen, besonders auf histopathologischer Ebene, durchgeführt und die Teratomentwicklung mit der humanen Embryogenese verglichen.

Die Limitierung der Anwendung von „Gesamtmausembryonen“ zur vergleichenden Bewertung der Expressionsprofile mit den undifferenzierten Stammzellen und den daraus abgeleiteten Teratomen besteht in der Kontamination durch extraembryonales Gewebe/Gebärmutter, die das Expressionsprofil der frühen Mausembryonen „verfälschen“. Zum detaillierteren Vergleich zwischen embryonaler Stammzelle – Embryonen zu verschiedenen Stadien der Embryogenese – Teratom müssen weitere experimentelle Daten generiert werden, die durch ein erweitertes Expressionsprofil untersucht werden kann (Whole Genome Analyse).

5.3. Das Teratommodell zur Testung von Substanzen mit embryotoxischem Potenzial

5.3.1. *In vitro* Wirkung von Referenzsubstanzen an 7AC5-Stammzellen

Entsprechend des OECDs werden Referenzsubstanzen für Embryotoxizitätsstudien vorgeschrieben, die in der sogenannten Smith-Liste zusammengestellt wurden[85,118]. Die Referenzsubstanzen sollen zur Etablierung neuer Testsysteme *in vitro* und *in vivo* genutzt werden, um deren Funktionalität und Anwendbarkeit als neue Modelle zur Embryotoxizitätsprüfung zu zeigen[119,120].

Basierend auf dieser Grundlage wurden für diese Arbeit sechs Referenzsubstanzen ausgewählt. Jeweils zwei Substanzen können einer der drei Embryotoxizitätsklassen zugeordnet werden. Für die Substanzklasse mit einem nicht-embryotoxischen Potenzial wurden Saccharose und Coffein ausgewählt, für schwach embryotoxisch

Valproinsäure und Dexamethason und für stark embryotoxisch 5-Fluoruracil und 6-Aminonicotinamid[121].

Zur *in vitro* Charakterisierung der Wirkung von ausgewählten Referenzsubstanzen an kultivierten 7AC5-Stammzellen wurden sowohl morphologische Veränderungen und Zytotoxizität dokumentiert sowie ein Genexpressionsprofil mit ausgewählten Markern für Pluripotenz und Differenzierung erstellt.

Ein etabliertes Modell zur Testung von embryotoxischen Substanzen *in vitro* ist der EST (embryonic stem cell test – Embryonaler Stammzelltest), bei dem embryonale Stammzellen nicht wie in der vorliegenden Arbeit in Monolayer-Kultur sondern nach der Hanging-drop Methode kultiviert werden[121,122]. Es bilden sich Embryoid-Bodies aus, an denen die Wirkung von Substanzen getestet werden. Die Zellen im Embryoid-Bodies differenzieren spontan in Kardiomyozten (Herzmuskelzellen). Dieses spontane Differenzierungspotenzial wird je nach Embryotoxizität der zu untersuchenden Substanz beeinflusst und bestimmt. Das toxische Potenzial auf embryonalen Stammzellen wird im Vergleich zu adulten Fibroblasten bestimmt, das die maternale Toxizität widerspiegelt. Aus dem Verhältnis von embryonaler zu adulter Toxizität erfolgte die Klassifizierung in die drei embryotoxischen Substanzklassen[120].

In den Resultaten dieser Arbeit wurde die Funktionalität und damit das toxische Potenzial der ausgewählten Referenzsubstanzen an der hier verwendeten murinem embryonalen Stammzelllinie 7AC5/EYFP unter feeder- und serumfreien Bedingungen untersucht.

5.3.1.1. Nicht-embryotoxische Substanzen Saccharose und Coffein

Bei der Kultivierung der 7AC5/FF-Zellen in Anwesenheit von **Saccharose** zeigte sich nach viertägiger Behandlung bis zu einer maximalen Konzentration von 2,5mg/ml keine morphologische Veränderung der Zellen. Es konnte eine vergleichbare Proliferationsrate der Zellen im Konzentrationsbereich von 0 - 2,5mg/ml Saccharose bestimmt werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen anderer *in vitro* Studien zur Embryotoxizität an embryonalen Stammzellen *in vitro*[123]. Buesen et al. untersuchte die Wirkung von zehn Testsubstanzen auf ihre *in vitro* Toxizität auf

murine embryonale D3-Stammzellen. Er konnte hier zum Tag 7 einen IC_{50}-Wert von 2932µg/ml für Saccharose bestimmen[124]. Nach vier Tagen der Substanzinkubation wurde an 7AC5/FF-Zellen ein IC_{50} = 2416µg/ml für Saccharose bestimmt.

Als zweite nicht-embryotoxische Referenzsubstanz wurde **Coffein** und dessen Wirkung auf 7AC5-Zellen untersucht. Morphologisch konnte ab einer Dosis von 0,5mg/ml Coffein eine Abnahme der Viabilität dokumentiert werden. Es wurde ein IC_{50} = 270,8µg/ml bestimmt. Aikawa et al. untersuchte die Wirkung von embryotoxischen Substanzen an hiPSC und deren potenzielle Bedeutung als Embryotoxizitätstestsystem. Als Referenzsubstanzen wurden unter anderem Coffein, Dexamethason, VPA und 5-FU verwendet, die auch von der ECVAM mittels mEST charakterisiert wurden. Für Coffein wurde mit hiPSC ein IC_{50} = 165µg/ml bestimmt[125,126]. Für die murine D3-Stammzelllinie wurde in ältere Studien hingegen ein deutlich höheren IC_{50}-Wert angegeben (IC_{50}= 285 - 434,8µg/ml[81,123]). In dieser Arbeit wurde mit der murinen 7AC5-Stammzelllinie ein vergleichbar hoher IC_{50}-Wert im verwendeten Testsystem bestimmt.

5.3.1.2. Schwach embryotoxische Substanzen VPA und Dexamethason

Durch die **VPA**-Behandlung wurde mit steigender Konzentration (10 - 200µg/ml) eine verminderte Viabilität der 7AC5/FF-Stammzellen induziert, dies konnte morphologisch ab 50µg/ml durch ein erhöhtes Absterben der Zellen beobachtet werden. Mittels ViaLight-Assay wurde ein IC_{50}=74,09µg/ml bestimmt. In der Literatur ist für D3-Stammzellen durch den EST ein IC_{50}-Wert zwischen 116µg/ml und 220µg/ml beschrieben[124-126].

Dexamethason wurde an 7AC5-Stammzellen in einem Bereich von 10 - 100µg/ml untersucht und induzierte bei sehr geringer Konzentration eine Viabilitätsabnahme der Zellen (IC_{50}=17,87µg/ml). Diese dosisabhängige Wirkung steht in Übereinstimmung mit den Literaturangaben (IC_{50}=18,3 - 67,9µg/ml)[81,123-128].

5.3.1.3. Stark embryotoxische Substanzen 5-FU und 6-AN

Die Behandlung mit **5-FU** induziert bei 7AC5/FF-Stammzellen eine deutliche Viabilitätsminderung ab 50ng/ml. Bis zur untersuchten Maximalkonzentration von

150ng/ml ist jedoch ein Koloniewachstum der Zellen nachweisbar. Aus den einzelnen Werten ergab sich damit ein IC_{50}=65,93ng/ml. Dieser liegt im Bereich, der in der Literatur mit dem EST-Test bestimmten Werten (IC_{50}=0,047 – 0,149µg/ml)[123,125,127].

6-AN zeigt im Vergleich zu 5-FU eine nicht ganz so hohe Abnahme der Viabilität. Hier konnte erst ab eine Behandlungskonzentration von 600ng/ml eine deutliche Viabilitätsabnahme im Zellkulturansatz morphologisch beobachtet werden. Mittels ViaLight-Assay wurde ein IC_{50}=399,3ng/ml bestimmt. Dieser liegt deutlich unter den in der Literatur beschriebenen Werten an D3-Stammzellen (IC_{50}=0,945 - 3,2µg/ml)[120,125,126,129]. Damit weisen die 7AC5-Stammzellen im Vergleich zu D3-Stammzellen eine höhere Sensitivität für diese Substanz auf.

An 7AC5-Stammmzellen konnten damit in dieser Arbeit IC_{50}-Werte für alle ausgewählten Referenzsubstanzen der drei Embryotoxizitätsklassen bestimmt werden. Die Werte weisen eine qualitative/quantitative Übereinstimmung im unteren bis mittleren Bereich der Literaturangaben auf. Geringe Unterschiede können in den experimentellen Testbedingungen und dem Stammzelltyp begründet sein. Zum einen wurden andere murine bzw. humane embryonale Stammzelllinien verwendet und zum Teil sind die gewählten Kultivierungsparameter (Dauer, spontane Andifferenzierung der Stammzellen) verschieden.

Aus den murinen 7AC5-Stammzellen bestimmten IC_{50}-Werten für die sechs Referenzsubstanzen ergibt sich damit folgende Reihenfolge für das embryotoxische Potenzial. Dieses ist mit der Klassifizierung in die drei embryotoxischen Substanzklassen in der Literatur vergleichbar:

$IC_{50(Saccharose)} > IC_{50(Coffein)} > IC_{50(VPA)} > IC_{50(Dexamethason)} > IC_{50(6\text{-}AN)} > IC_{50(5\text{-}FU)}$

Somit erscheinen die gewählten *in vitro* Kulturbedingungen für die 7AC5-Stammzellen sowie der ViaLight-Assay zur Klassifizierung der Substanzen nach ihrem embryotoxischen Potenzial geeignet.

Eine Erweiterung des EST-Testes besteht in der Optimierung der Untersuchungsparameter zur Quantifizierung des embryotoxischen Potenzials. Neben der visuellen Inhibierung der Kardiomyozytenentwicklung wurden auch immer mehr Marker in Betracht gezogen, die als sogenannte „end points of

differentiation“ untersucht wurden. Veränderungen im Expressionsprofil können Rückschlüsse auf das embryotoxische Potenzial einer Substanz und ihre Wirkmechanismen ermöglichen [130,131]. Daher wurden die toxischen Effekte der untersuchten Referenzsubstanzen auch in dieser Arbeit weiterführend auf Genexpressionsebene der 7AC5-Stammzellen untersuchte. Das zuvor etablierte Panel aus Pluripotenz- und Differenzierungsmarkern wurde genutzt, um die Substanzwirkung der sechs verwendeten Referenzsubstanzen auf RNA-Ebene zu untersuchen.

Mit Ausnahme von 5-FU konnten mit diesem Panel keine signifikanten Veränderungen im Expressionsprofil durch die Substanzbehandlungen mit nicht und schwach embryotoxischen Substanzen sowie 6-AN dokumentiert werden. Die 7AC5-Stammzellen zeichneten sich durch eine hohe Expression der Pluripotenzmarker Oct-4, Nanog und Sox2 aus, wohingegen die Differenzierungsmarker der drei Keimblätter gering/moderat oder gar nicht nachweisbar waren unabhängig von der Substanzbehandlung mit Saccharose, Coffein, VPA, Dexamethason oder 6-AN.

Im Gegensatz dazu wurden durch die 5-FU-Behandlungen signifikante Veränderungen im Expressionsprofil der 7AC5-Stammzellen nachgewiesen. Nach der viertägigen Anwendung von 100ng/ml 5-FU der Pluripotenzmarker Nanog signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen). Für Oct-4 und Sox2 konnte eine leichte Expressionssteigerung mit einer steigenden 5-FU-Konzentration nachgewiesen werden. Die Wirkung von 5-FU wurde ebenfalls im EST-Test untersucht und es ist eine inhibierende Wirkung auf die Kardiomyozytendifferenzierung beschrieben[131]. Es kann also schlussfolgernd angenommen werden, dass eine spontane Differenzierung durch die 5-FU-Behandlung inhibiert wird und die Pluripotenzmarker im Vergleich zur Kontrolle höher exprimiert werden. Gestützt wird diese These durch das Expressionsprofil Saccharose-behandelter 7AC5-Stammzellen, die keine Veränderungen in der Expression der untersuchten Pluripotenzmarker zur Kontrolle zeigen. Saccharose als nicht-embryotoxische Substanz sollte das spontane Differenzierungspotenzial der Stammzellen nicht beeinflussen. Des Weiteren zeigen 7AC5-Stammzellen bei

Behandlung mit höheren Konzentrationen von VPA (schwach embryotoxisch) eine erhöhte Nanog- und Sox2-Expression.

Weitere Literaturdaten zur Wirkung zur Embryotoxizität von 5-FU wurden anhand der Expression von Differenzierungsmarkern beschrieben. Pamies et al. untersuchte unter anderem die Expression von AFP in der Monolayer-Kultur von ESC und nach der Embryoid-Body-Bildung. Undifferenzierte ESC sprechen demnach nicht so stark auf die 5-FU-Behandlung an wie vordifferenzierte ESC. Dies erklärt womöglich die nicht vorhanden Veränderungen im Expressionsprofil der Pluripotenz- und Differenzierungsmarker der 7AC5-Stammzellen unter anderem durch die Behandlung mit den nicht und schwach embryotoxischen Substanzen. Zur Untersuchung der Substanzwirkung wurden in der vorliegenden Arbeit undifferenzierte, pluripotente 7AC5-Stammzellen verwendet. Die Versuche wurden unter optimalen Bedingungen zum Erhalt des pluripotenten Charakters der 7AC5-Zellen durchgeführt, sodass nur die Substanzzugabe eine Veränderung im Expressionsprofil hätte hervorrufen können. Jedoch sollte das Ansprechen auf die Substanzbehandlung nach Pamies et al. deutlich geringer sein als mit vordifferenzierten Stammzellen, was unter anderem für Coffein, VPA und Dexamethason als nicht- und schwach embryotoxische Substanzen gezeigt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch das Expressionsniveau mesodermaler Marker unter 5-FU-Behandlung untersucht. Bei einer 5-FU-Konzentration von 100ng/ml wurde eine signifikante Expressionssteigerung von NF200 und beta-3-Tubulin nachgewiesen. Pax6 und Nestin zeigten ebenfalls ein erhöhtes Expressionslevel im Vergleich zur Kontrolle. In der Literatur sind Expressionsdaten zu spontan differenzierten murinen D3-Stammzellen zu finden, die jedoch im Widerspruch zu den hier generierten Daten an undifferenzierten 7AC5-Stammzellen stehen:

An spontan differenzierenden murinen D3-Stammzellen wurde nach fünftägige Behandlung von 50ng/ml 5-FU eine reduzierte Expression von unter anderem AFP (74%) und Nestin (46%) induziert[129]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die drei Keimblattstrukturen unterschiedlich sensitiv auf eine 5-FU-Behandlung reagieren.

Mesodermale Marker zeigen eine deutlich höhere Toleranz im Vergleich zu endodermalen Markern wie AFP[101].

AFP konnte bei den 7AC5-behandelten Zellen nicht nachgewiesen werden (ΔC_T>15). Der endodermale Marker GATA4 wurde durch die 5-FU-Behandlung zunächst induziert. Ebenso ist eine leichte Expressionssteigerung der mesodermalen Marker Nodal und Bmp4 im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

Nach der 5-FU-Behandlung der 7AC5-Stammzellen bleibt der pluripotente Charakter der Zellen erhalten. Dem gegenüber setzt auch eine erhöhte Expression der Differenzierungsmarker des Ektoderms und zu Teilen des Endo- und Mesoderms ein. Dies muss aber nicht im Widerspruch zueinander stehen. Denn wie zuvor beschrieben, gibt es Untersuchungen an D3-Stammzellen, die eine erhöhte Expression von beta-3-Tubulin und GATA4 in undifferenzierten mESC nachgewiesen haben[13,25,26]. Außerdem spielt Bmp4 eine zentrale Rolle im Pluripotenznetzwerk von mESC. Womöglich sollte durch eine erhöhte Expression dieses Markers einerseits die einsetzende neuroektodermale Differenzierung (erhöhte Expression von NF200) inhibiert werden (siehe Abb.3), dass durch Bmp4 über Id-Gene reguliert wird. Andererseits fördert jedoch ein erhöhtes Bmp4-Level die endo-/mesodermale Differenzierung und begründet damit womöglich die erhöhte Expression von GATA4, Nodal und Bmp4 selbst. Diese Differenzierung wird natürlicherweise durch LIF reguliert. Dieses wurde jedoch nicht zusätzlich/unterstützend zum Kultivierungsmedium hinzugegeben und kann demzufolge nicht die Überproduktion und differenzierende Wirkung Richtung Endoderm/Mesoderm durch Bmp4 abfangen[121,132].

Insgesamt ist es jedoch ein komplexer Prozess, dessen Bedeutung und Funktionalität der einzelnen untersuchten Marker nicht klar verstanden wird und weitere Untersuchungen fordert.

Die zuvor beschriebenen Veränderungen im Expressionsprofil sind nicht mehr ab einer Konzentration von 150ng/ml 5-FU zu beobachten. Hier scheinen die zytotoxischen Effekte der Substanzwirkung zu überwiegen.

5.3.2. Wirkung von Referenzsubstanzen auf das *in vivo* Verhalten von 7AC5-Stammzellen

Zur Etablierung und Bestimmung der Funktionalität des Teratommodells als Embryotoxizitätstestsystem wurde aus jeder Substanzklasse eine Referenzsubstanz ausgewählt und deren *in vivo* Verhalten auf die Teratombildungsrate von 7AC5-Stammzellen im NOD/SCID-Mausmodell untersucht. Saccharose (nicht embryotoxisch), VPA (schwach embryotoxisch) und 5-FU (stark embryotoxisch) wurden für die detaillierten *in vivo* Analysen verwendet. Durch die Etablierung eines *in vivo* Testsystems können komplexere Prozesse (z.B. Metabolismus von Prodrugs) untersucht werden, die *in vitro* nicht durch eine Zellkultur widergespiegelt werden können. Mittels Biolumineszenz wurde die Teratomentwicklung über den Behandlungszeitraum live verfolgt. Somit konnte die Dynamik der Substanzwirkung *in vivo* unabhängig von der Applikationsstelle live dokumentiert werden. Die substanzbehandelten Teratome wurden auf Größe, Morphologie und ihr Expressionsprofil von Pluripotenz- und Differenzierungsmarker untersucht.

Nach s.c., i.hep. und i.splen. Applikation der Stammzellen konnte *in vivo* ein Teratomwachstum mittels Biolumineszenz nachgewiesen werden. Mit steigendem embryotoxischem Potenzial der verwendeten Substanz wurde ein vermindertes Teratomwachstum beobachtet. Zum Versuchsende konnte für die NaCl- und Saccharose-behandelten Tiere ein sehr starkes/intensives Biolumineszenzsignal an der Applikationsstelle nachgewiesen werden. Die Behandlung mit NaCl und Saccharose führte über den Behandlungszeitraum zu keinem Einfluss auf die Teratombildungsrate, das Signal unterlag wie das am Versuchsende bestimmte Teratomgewicht tierexperimentellen Schwankungen.

Bei den VPA-behandelten Tieren wurde für die s.c. Applikation ein deutlich geringes Signal gemessen. Hingegen konnte nach i.splen. und i.hep. Transplantation der Zellen unter Einwirkung von VPA ein leicht vermindertes/vergleichbares Signal bestimmt werden. Durch die VPA-Behandlung konnte nach i.splen. Applikation eine Abnahme des Teratomgewichts dokumentiert werden. Nach i.hep. und i.splen. Applikation war im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl und Saccharose) keine eindeutige Gewichtsabnahme zu verzeichnen.

Bei der 5-FU-Behandlung konnte von Tag 2 der Behandlung bis zum Versuchsende nur eine schwache/keine Zunahme des Signals dokumentiert werden. Im Vergleich zu den anderen drei Gruppen war die Signalstärke und -intensität deutlich reduziert.

Nach der Autopsie der Tiere wurde dieses Ergebnis durch die gemessenen Teratomgewichte bestätigt. Es kam unter der 5-FU-Behandlung zu einer signifikanten Gewichtsabnahme der Teratome unabhängig vom Applikationsort der 7AC5/Luc-Zellen. Die Teratomentwicklung konnte nach s.c. Applikation mittels Standardmethode (Messschieber) parallel zur Biolumineszenz dokumentiert werden. Mit dieser Methode wurde eine inhibierende Wirkung von 5-FU auf die Teratombildung bestätigt. Mittels Biolumineszenz konnte jedoch deutlich früher die Teratombildung und vor allem das Engraftment der Zellen nachgewiesen werden. Bei i.hep. und i.splen. Applikation der Stammzellen war die Bestimmung der Teratomprogression nur mit Biolumineszenz möglich.

Die Wirkung der Substanzen auf die Teratombildung/-differenzierung wurde im Weiteren histopathologisch bewertet. Unabhängig von der Applikationsroute und der Substanzapplikation wiesen die untersuchten Teratome alle drei Keimblattstrukturen auf. Auch die 5-FU-behandelten Teratome setzten sich aus typischen Strukturen des Ekto-, Endo- und Mesoderms zusammen, jedoch war die „Vielfältigkeit“ und Ausdifferenzierung im Vergleich zur Kontrolle weniger ausgeprägt. Vergleichende Literaturdaten sind nicht vorhanden.

Die Substanzwirkung auf die stammzellabgeleitete Teratombildung wurde des Weiteren auf RNA-Ebene untersucht. Nach der s.c. Applikation der 7AC5-Stammzellen wiesen unabhängig von der Substanzbehandlung alle Teratome typische Expressionsprofile auf, die durch eine moderate Expression der Pluripotenz und einer induzierten Expression der keimblattspezifischen Differenzierungsmarker gekennzeichnet war.

Zwischen NaCl- und Saccharose-behandelten Teratomen konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden. Einzelne Markerexpressionen wurden durch die VPA-Behandlung verändert, signifikantere Änderungen traten im Expressionsprofil der 5-FU-behandelten Teratome auf.

Die Expression der **Pluripotenzmarker** Oct-4, Nanog und Sox2 wurde im 5-FU behandelten Teratom im Vergleich zu den Behandlungen mit nicht embryotoxischen Substanzen (NaCl, Saccharose) nicht so stark runterreguliert. Das könnte darauf hindeuten, dass eine spontane Differenzierung in die drei Keimblätter des Teratoms durch die 5-FU-Behandlung inhibiert wird. Eine ähnliche Wirkung ist bei VPA für Nanog zu beobachten.

Des Weiteren konnte eine leicht erhöhte Expression der **endodermalen Marker** (DLK und GATA4) nachgewiesen werden. Das Expressionslevel von AFP war signifikant erhöht in den 5-FU-behandelten Teratomen im Vergleich zur Kontrolle (NaCl). Für die VPA-behandelten Teratome konnten keine signifikanten Expressionsänderungen dieser Marker nachgewiesen werden.

Die **ektodermalen Marker** wurden sehr heterogen innerhalb einer Behandlungsgruppe exprimiert, sodass keine eindeutigen Schlussfolgerungen hinsichtlich der Substanzwirkung gezogen werden können. Tendenziell ist eine Inhibierung der Nestin-Expression durch VPA- und 5-FU-Behandlung zu erkennen. Das gleiche ist für beta-3-Tubulin nachgewiesen worden, wobei dieser Marker immer noch auf einem sehr hohen Niveau in allen Behandlungsgruppen exprimiert wird. Im Vergleich zur Kontrolle (Saccharose bzw. NaCl) weisen die VPA-behandelten Teratome eine signifikante Expressionsreduktion dieses Markers auf. NF200 wird durch die 5-FU-Behandlung im Vergleich zur VPA-Gruppe induziert, im Vergleich zu den Kontrollgruppen lassen sich keine signifikanten Änderungen im Expressionsniveau nachweisen.

Bei den untersuchten **mesodermalen Markern** lässt sich ein ähnliches Expressionsprofil für Nodal und Bmp4 für die unterschiedlichen Behandlungsgruppen nachweisen. Es konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Die aSMA-Expression hingegen wird durch die 5-FU-Behandlung inhibiert.

In der Literatur sind keine spezifischen *in vivo* Daten beschrieben, die eine Wirkung der verwendeten Referenzsubstanz auf stammzellabgeleitete Teratome untersuchen. Entweder wurde die Wirkung auf Stammzellen *in vitro* mit dem EST-Test bestimmt oder es sind Fallstudien zu natürlich vorkommenden Teratomen (Keimbahntumoren) und deren chirurgische und/oder chemotherapeutische

Behandlung dargestellt. Somit lassen sich die hier generierten *in vivo* Daten nicht durch Literaturergebnisse bewerten.

Zusammenfassend kann jedoch aus den Ergebnissen zur *in vivo* Wirkung von Substanzen mit embryotoxischen Potenzial am stammzellabgeleiteten Teratommodell anhand der untersuchten Parameter (Wachstum, Teratomvolumen/-gewicht) eine Klassifizierung der drei Referenzsubstanzen Saccharose, VPA und 5-FU nach nicht, schwach und stark embryotoxisch bestätigt werden.

Des Weiteren konnten histopathologische Bewertungen und die Analyse des Expressionsprofils zusätzliche Hinweise auf die Wirkstoffklassifizierung liefern. Die nicht und schwach embryotoxischen Substanzen induzierten keine bzw. geringe Änderung im Expressionsprofil, wohingegen die 5-FU-Behandlung signifikant das Expressionslevel der untersuchten Pluripotenz- und Differenzierungsmarker veränderte. Es traten jedoch keine inhibierenden Wirkungen von ganzen Keimblattstrukturen auf.

Für weiterführende *in vivo* Untersuchungen zur Wirkung von embryotoxischen Substanzen im Teratommodell sollten Whole Genome Expressionsanalysen durchgeführt und damit das Markerpanel erweitert werden.

5.4. Ausblick

Für die verwendete murine embryonale 7AC5/EYFP-Stammzelllinie konnte ein gut charakterisiertes Teratommodell beschrieben werden, das durch eine Transfektion mit einem Luc-Plasmid detailliert *in vivo* untersucht werden konnte. Die Daten können genutzt werden, um die Teratommodelle von humanen embryonalen Stammzelllinien zu optimieren und zu standardisieren. Weiterführende mathematische Auswertung könnten eine genauere Quantifizierung der *in vivo* generierten Daten ermöglichen und damit die Anwendbarkeit für schwer zu detektierende Zellen verbessern.

Außerdem konnte *in vitro* und *in vivo* eine Klassifizierung der untersuchten Referenzsubstanzen nach ihrem embryotoxischen Potenzial mit dem etablierten Modell vorgenommen werden. Jedoch sind weiterführende Untersuchungen und eine Erweiterung des Markerprofils nötig, um dies auch auf Genexpressionsebene durchzuführen und Marker als „endpoints of differentiation“ für jedes Keimblatt zu

definieren. Des Weiteren ermöglicht die Etablierung des Teratommodells mit humanen Stammzellen ein humanisiertes Embryotoxizitätstestsystem in der Maus, dass vielseitig verwendet werden kann. Die funktionelle Überprüfung kann unter anderem mit Thalidomid durchgeführt werden, das als embryotoxische Substanz im menschlichen Organismus bekannt ist, jedoch im murinen Modellorganismus keine Wirkung zeigt.

Somit bildet die hier vorliegende Arbeit eine Grundlage für die Erweiterung und womöglich Verbesserung von Testsystemen zur Überprüfung der Teratogenität von Zellen unterschiedlichsten Ursprungs und zur Testung der Embryotoxizität von Medikamenten und anderen biologisch aktiven Substanzen.

6. REFERENZEN

1 Martin,G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells 19. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 7634-7638

2 Evans,M.J. and Kaufman,M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156

3 Thomson,J.A. *et al.* (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts 1. *Science* 282, 1145-1147

4 Pouton,C.W. and Haynes,J.M. (2005) Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1918-1934

5 Nakanishi,M. *et al.* (2007) Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro. *Differentiation* 75, 1-11

6 Pouton,C.W. and Haynes,J.M. (2007) Embryonic stem cells as a source of models for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 605-616

7 Scholz,G. *et al.* (1999) Embryotoxicity screening using embryonic stem cells in vitro: correlation to in vivo teratogenicity. *Cells Tissues. Organs* 165, 203-211

8 Knoblich,J.A. (2008) Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 132, 583-597

9 Price,F.D. *et al.* (2007) Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy 1. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 272-283

10 Takahashi,K. and Yamanaka,S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676

11 Yamanaka,S. (2009) A fresh look at iPS cells. *Cell* 137, 13-17

12 Jones,D.L. and Wagers,A.J. (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 11-21

13 Wobus,A.M. *et al.* (1984) Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo 3. *Exp. Cell Res.* 152, 212-219

14 Eiselleova,L. *et al.* (2008) Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 353-363

15 Buhr,N. *et al.* (2007) Proteome analysis of the culture environment supporting undifferentiated mouse embryonic stem and germ cell growth. *Electrophoresis* 28, 1615-1623

16 Gough,N.M. and Williams,R.L. (1989) The pleiotropic actions of leukemia inhibitory factor. *Cancer Cells* 1, 77-80

17 Gough,N.M. *et al.* (1989) LIF: a molecule with divergent actions on myeloid leukaemic cells and embryonic stem cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 1, 281-288

18 Ogawa,K. *et al.* (2006) Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 159-166

19 Nichols,J. *et al.* (2001) Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* 128, 2333-2339

20 Stewart,C.L. *et al.* (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359, 76-79

21 Hall,J. *et al.* (2009) Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 5, 597-609

22 Ying,Q.L. *et al.* (2003) Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* 21, 183-186

23 Ying,Q.L. *et al.* (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292

24 Bourillot,P.Y. and Savatier,P. (2010) Kruppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC. Biol.* 8, 125

25 Warmflash,A. *et al.* (2012) The molecular circuitry underlying pluripotency in embryonic stem cells. *Wiley. Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4, 443-456

26 Wobus,A.M. and Boheler,K.R. (2005) Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev.* 85, 635-678

27 Schroeder,I.S. *et al.* (2009) Differentiation analysis of pluripotent mouse embryonic stem (ES) cells in vitro
2. *Methods Mol. Biol.* 530, 219-250

28 Young,J.C. *et al.* (2011) Distinct effects of importin alpha2 and alpha4 on Oct3/4 localization and expression in mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* 25, 3958-3965

29 Solter,D. and Knowles,B.B. (1978) Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 5565-5569

30 Solter,D. and Knowles,B.B. (1979) Developmental stage-specific antigens during mouse embryogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 13 Pt 1, 139-165

31 Zhao,W. *et al.* (2012) Embryonic stem cell markers
1. *Molecules.* 17, 6196-6236

32 Yamanaka,S. *et al.* (2008) Pluripotency of embryonic stem cells. *Cell Tissue Res.* 331, 5-22

33 Pesce,M. and Scholer,H.R. (2000) Oct-4: control of totipotency and germline determination
4. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 452-457

34 Pan,G. and Thomson,J.A. (2007) Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 17, 42-49

35 Rodewald, H.-R. and Wobus, A. M. Embryonale Stammzellen der Maus. Bundesgesundheitsblatt . 2002.
Ref Type: Magazine Article

36 Longenecker,G. and Kulkarni,A.B. (2009) Generation of gene knockout mice by ES cell microinjection. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 19, Unit-36

37 Herberts,C.A. *et al.* (2011) Risk factors in the development of stem cell therapy. *J. Transl. Med.* 9, 29

38 Ben-David,U. and Benvenisty,N. (2011) The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 11, 268-277

39 Zhang,W.Y. *et al.* (2008) Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research

40 Aleckovic,M. and Simon,C. (2008) Is teratoma formation in stem cell research a characterization tool or a window to developmental biology? *Reprod. Biomed. Online.* 17, 270-280

41 Cunningham,J.J. *et al.* (2012) Lessons from human teratomas to guide development of safe stem cell therapies. *Nat. Biotechnol.* 30, 849-857

42 Aldahmash,A. *et al.* (2013) Teratoma formation in immunocompetent mice after syngeneic and allogeneic implantation of germline capable mouse embryonic stem cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14, 5705-5711

43 Gong,S.P. *et al.* (2014) The co-injection of somatic cells with embryonic stem cells affects teratoma formation and the properties of teratoma-derived stem cell-like cells. *PLoS. One.* 9, e105975

44 Gordeeva,O.F. and Nikonova,T.M. (2013) Development of experimental tumors formed by mouse and human embryonic stem and teratocarcinoma cells after subcutaneous and intraperitoneal transplantations into immunodeficient and immunocompetent mice. *Cell Transplant.* 22, 1901-1914

45 Wu,J.C. *et al.* (2006) Transcriptional profiling of reporter genes used for molecular imaging of embryonic stem cell transplantation. *Physiol Genomics* 25, 29-38

46 Loh,Y.H. *et al.* (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38, 431-440

47 Player,A. *et al.* (2007) Gene expression analysis of RNA purified from embryonic stem cells and embryoid body-derived cells using a high-throughput microarray platform. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* Chapter 1, Unit

48 Player,A. *et al.* (2006) Comparisons between transcriptional regulation and RNA expression in human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev.* 15, 315-323

49 Choi,D. *et al.* (2005) In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: enrichment of endodermal cells in the embryoid body
1. *Stem Cells* 23, 817-827

50 Losino,N. *et al.* (2011) Maintenance of murine embryonic stem cells' self-renewal and pluripotency with increase in proliferation rate by a bovine granulosa cell line-conditioned medium
3. *Stem Cells Dev.* 20, 1439-1449

51 Tielens,S. *et al.* (2006) Generation of embryonic stem cell lines from mouse blastocysts developed in vivo and in vitro: relation to Oct-4 expression
1. *Reproduction.* 132, 59-66

52 Matsumoto,K. *et al.* (2008) Hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells in a three-dimensional culture system using polyurethane foam
1. *J. Biosci. Bioeng.* 105, 350-354

53 Okada,K. *et al.* (2012) Prospective isolation and characterization of bipotent progenitor cells in early mouse liver development
2. *Stem Cells Dev.* 21, 1124-1133

54 Zhu,N.L. *et al.* (2012) Hepatic stellate cell-derived delta-like homolog 1 (DLK1) protein in liver regeneration
1. *J. Biol. Chem.* 287, 10355-10367

55 Amabile,G. and Meissner,A. (2009) Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol. Med.* 15, 59-68

56 Mimeault,M. *et al.* (2007) Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82, 252-264

57 NIH (2006) *Regenerative Medicine*

58 NIH (2001) *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*

59 Filipovic,R. *et al.* (2012) Increasing doublecortin expression promotes migration of human embryonic stem cell-derived neurons. *Stem Cells* 30, 1852-1862

60 Becker,M. *et al.* (2002) Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems. *Br. J. Cancer* 87, 1328-1335

61 Zinn,K.R. *et al.* (2008) Noninvasive bioluminescence imaging in small animals. *ILAR. J.* 49, 103-115

62 Sato,A. *et al.* (2004) In vivo bioluminescence imaging. *Comp Med.* 54, 631-634

63 Lee,A.S. and Wu,J.C. (2011) Imaging of embryonic stem cell migration in vivo. *Methods Mol. Biol.* 750, 101-114

64 Ozawa,T. *et al.* (2013) Advances in fluorescence and bioluminescence imaging. *Anal. Chem.* 85, 590-609

65 Kain,S.R. and Ganguly,S. (2001) Overview of genetic reporter systems. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 9, Unit9

66 Prescher,J.A. and Contag,C.H. (2010) Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence
3. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 80-89

67 Lee,J. *et al.* (2011) In vivo measurement of glioma-induced vascular permeability. *Methods Mol. Biol.* 763, 417-422

68 Wetterwald,A. *et al.* (2002) Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am. J. Pathol.* 160, 1143-1153

69 Wang,X. *et al.* (2003) Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* 102, 3478-3482

70 Keil, M. Reportergen-Transfektion von Luciferase und grünfluoreszierendem Protein (GFP) in CD34 positive,Stammzellen aus Nabelschnurblut. 2005.
Ref Type: Thesis/Dissertation

71 Kelkar,M. and De,A. (2012) Bioluminescence based in vivo screening technologies. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 592-600

72 Theiler,K. (1998) *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*, Springer Verlag

73 Kluck-Swyen H. HSV/AAV-Hybridamplikonvektoren zur stabilen Transduktion humaner Zellen. 2007.
Ref Type: Thesis/Dissertation

74 Vallier,L. and Pedersen,R.A. (2005) Human embryonic stem cells: an in vitro model to study mechanisms controlling pluripotency in early mammalian development. *Stem Cell Rev.* 1, 119-130

75 Blum,B. and Benvenisty,N. (2007) Clonal analysis of human embryonic stem cell differentiation into teratomas. *Stem Cells* 25, 1924-1930

76 Blum,B. and Benvenisty,N. (2008) The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv. Cancer Res.* 100, 133-158

77 Gerecht-Nir,S. *et al.* (2004) Vascular development in early human embryos and in teratomas derived from human embryonic stem cells
3. *Biol. Reprod.* 71, 2029-2036

78 Gertow,K. *et al.* (2004) Organized development from human embryonic stem cells after injection into immunodeficient mice
2. *Stem Cells Dev.* 13, 421-435

79 Gertow,K. *et al.* (2011) Early events in xenograft development from the human embryonic stem cell line HS181--resemblance with an initial multiple epiblast formation. *PLoS. One.* 6, e27741

80 Pesce,M. *et al.* (1998) In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays* 20, 722-732

81 Binder, M. Untersuchungen zur Bioaktivierung eines *in vitro* Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen der Maus (*Mus musculus* L.). 2008.
Ref Type: Thesis/Dissertation

82 Stummann, T. C. *In vitro* Assessment of Developmental Toxicity and Cardiac Pharmacology using Embryonic Stem Cells. 2008.
Ref Type: Thesis/Dissertation

83 Schwetz,B.A. (1992) Criteria for judging the relative toxicity of chemicals from developmental toxicity data: a workshop summary
1. *Teratology* 45, 337-339

84 Smith,M.K. *et al.* (1983) A selection of candidate compounds for in vitro teratogenesis test validation
2. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 3, 461-480

85 Brown,N.A. (2002) Selection of test chemicals for the ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests. European Centre for the Validation of Alternative Methods
3. *Altern. Lab Anim* 30, 177-198

86 Hansen,D.K. and Grafton,T.F. (1994) Comparison of dexamethasone-induced embryotoxicity in vitro in mouse and rat embryos. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 14, 281-289

87 Street,J.C. *et al.* (1997) In vivo and ex vivo study of metabolic and cellular effects of 5-fluorouracil chemotherapy in a mouse mammary carcinoma. *Magn Reson. Imaging* 15, 587-596

88 Koutcher,J.A. *et al.* (1996) Effect of 6-aminonicotinamide on the pentose phosphate pathway: 31P NMR and tumor growth delay studies. *Magn Reson. Med.* 36, 887-892

89 Street,J.C. *et al.* (1996) 13C and 31P NMR investigation of effect of 6-aminonicotinamide on metabolism of RIF-1 tumor cells in vitro. *J. Biol. Chem.* 271, 4113-4119

90 Street,J.C. *et al.* (1997) Quantitation of metabolic and radiobiological effects of 6-aminonicotinamide in RIF-1 tumor cells in vitro. *Cancer Res.* 57, 3956-3962

91 Budihardjo,I.I. *et al.* (1998) 6-Aminonicotinamide sensitizes human tumor cell lines to cisplatin. *Clin. Cancer Res.* 4, 117-130

92 Walker,D.L. *et al.* (1999) Murine pharmacokinetics of 6-aminonicotinamide (NSC 21206), a novel biochemical modulating agent. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1057-1066

93 Barrach,H.J. and Kohler,E. (1970) Biochemical studies of the embryotoxic action of 6-aminonicotinamide. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmakol.* 266, 292-293

94 Merker,H.J. and Novak,L. (1970) [Disturbances of tooth development in rat embryos following administration of 6-aminonicotinamide]. *Experientia* 26, 1127

95 Weihrauch,M.R. *et al.* (2001) [Artificial sweeteners--are they potentially carcinogenic?]. *Med. Klin. (Munich)* 96, 670-675

96 Jentink,J. *et al.* (2010) Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *N. Engl. J. Med.* 362, 2185-2193

97 Clayton-Smith,J. and Donnai,D. (1995) Fetal valproate syndrome. *J. Med. Genet.* 32, 724-727

98 Nawrot,P. *et al.* (2003) Effects of caffeine on human health
1. *Food Addit. Contam* 20, 1-30

99 Hinds,T.S. *et al.* (1996) The effect of caffeine on pregnancy outcome variables
3. *Nutr. Rev.* 54, 203-207

100 Lindl and Bauer (1998) *Zell- und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen.*

101 Ginis,I. *et al.* (2004) Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 269, 360-380

102 Fernandes,T.G. *et al.* (2010) Kinetic and metabolic analysis of mouse embryonic stem cell expansion under serum-free conditions. *Biotechnol. Lett.* 32, 171-179

103 Furue,M. *et al.* (2005) Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 41, 19-28

104 Cui,L. *et al.* (2004) Spatial distribution and initial changes of SSEA-1 and other cell adhesion-related molecules on mouse embryonic stem cells before and during differentiation. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 1447-1457

105 Furusawa,T. *et al.* (2004) Embryonic stem cells expressing both platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and stage-specific embryonic antigen-1 differentiate predominantly into epiblast cells in a chimeric embryo. *Biol. Reprod.* 70, 1452-1457

106 Soteriou,D. *et al.* (2013) Comparative proteomic analysis of supportive and unsupportive extracellular matrix substrates for human embryonic stem cell maintenance. *J. Biol. Chem.* 288, 18716-18731

107 Lakshmipathy,U. *et al.* (2007) Gene transfer via nucleofection into adult and embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol.* 407, 115-126

108 Moore,J.C. *et al.* (2010) Efficient, high-throughput transfection of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 1, 23

109 Maurisse,R. *et al.* (2010) Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC. Biotechnol.* 10, 9

110 Lee,C.H. *et al.* (2008) Simple, efficient, and reproducible gene transfection of mouse embryonic stem cells by magnetofection. *Stem Cells Dev.* 17, 133-141

111 Shen,M.M. and Leder,P. (1992) Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 8240-8244

112 Tiffen,J.C. *et al.* (2010) Luciferase expression and bioluminescence does not affect tumor cell growth in vitro or in vivo. *Mol. Cancer* 9, 299

113 Wesselschmidt,R.L. (2011) The teratoma assay: an in vivo assessment of pluripotency. *Methods Mol. Biol.* 767, 231-241

114 Brink, N. *In vitro* Charakterisierung der tumor-lytischen Wirkung des *Aplysia punctata* ink toxins (APIT) auf humane Tumorzellen und Etablierung eines Xenotransplantat-Modells als Basis für *in vivo* Analysen von APIT. 2005.
Ref Type: Thesis/Dissertation

115 Dressel,R. *et al.* (2008) The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response. *PLoS. One.* 3, e2622

116 Lee,A.S. *et al.* (2009) Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells. *Cell Cycle* 8, 2608-2612

117 ez-Roux,G. *et al.* (2011) A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS. Biol.* 9, e1000582

118 Genschow,E. *et al.* (2000) Development of prediction models for three in vitro embryotoxicity tests in an ECVAM validation study. *In Vitr. Mol. Toxicol.* 13, 51-66

119 Flick, B. Optimierung und Standardisierung der Kultur ganzer Rattenembryonen als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest durch die Etablierung eines neuen Kulturmediums. 2006.
Ref Type: Thesis/Dissertation

120 Kaltenhäuser, J. Einfluss embryotoxischer Substanzen auf die Expression differenzierungsspezifischer Gene in murinen
embryonalen Stammzellen. 15-12-2006.
Ref Type: Thesis/Dissertation

121 Seiler,A.E. and Spielmann,H. (2011) The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro. *Nat. Protoc.* 6, 961-978

122 Seiler,A.E. *et al.* (2006) Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays: the embryonic stem cell test. *Methods Mol. Biol.* 329, 371-395

123 Buesen,R. *et al.* (2009) Embryonic stem cell test remastered: comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity in vitro. *Toxicol. Sci.* 108, 389-400

124 Aikawa,N. *et al.* (2014) Detection of Thalidomide Embryotoxicity by In Vitro Embryotoxicity Testing Based on Human iPS Cells. *J. Pharmacol. Sci.* 124, 201-207

125 Bremer,S. and Hartung,T. (2004) The use of embryonic stem cells for regulatory developmental toxicity testing in vitro--the current status of test development. *Curr. Pharm. Des* 10, 2733-2747

126 Scholz,G. *et al.* (1999) Prevalidation of the Embryonic Stem Cell Test (EST)-A New In Vitro Embryotoxicity Test. *Toxicol. In Vitro* 13, 675-681

127 Suzuki,N. *et al.* (2011) Evaluation of novel high-throughput embryonic stem cell tests with new molecular markers for screening embryotoxic chemicals in vitro. *Toxicol. Sci.* 124, 460-471

128 Romero,A.C. *et al.* (2011) Shortening and Improving the Embryonic Stem Cell Test through the Use of Gene Biomarkers of Differentiation. *J. Toxicol.* 2011, 286034

129 Pamies,D. *et al.* (2010) Specific effect of 5-fluorouracil on alpha-fetoprotein gene expression during the in vitro mouse embryonic stem cell differentiation. *Int. J. Toxicol.* 29, 297-304

130 van Dartel,D.A. *et al.* (2009) Disentangling cellular proliferation and differentiation in the embryonic stem cell test, and its impact on the experimental protocol. *Reprod. Toxicol.* 28, 254-261

131 Romero,A.C. *et al.* (2011) Shortening and Improving the Embryonic Stem Cell Test through the Use of Gene Biomarkers of Differentiation. *J. Toxicol.* 2011, 286034

132 Dechaphunkul,A. *et al.* (2012) Response to 5-Fluorouracil-based chemotherapy in a patient with metastatic colonic-type adenocarcinoma arising in a primary mediastinal teratoma. *Case. Rep. Oncol. Med.* 2012, 729278

IV. ANHANG

1. Biolumineszenzmessungen von 7AC5/Luc-stammzellabgeleiteten Teratomen in Abhängigkeit von der transplantierten Zellzahl

$1x10^2$ bis $1x10^5$/$1x10^6$ 7AC5/Luc-Stammzellen wurden s.c., i.splen. bzw. i.hep. appliziert. Das Engraftment und die Teratombildungsrate in Abhängigkeit von der applizierten Zellzahl wurden mittels Biolumineszenz täglich dokumentiert.

Im Folgenden sind die Ergebnisse exemplarisch für die s.c. Applikation und die untersuchten Zellzahlen von $1x10^2$ bis $1x10^5$ dargestellt.

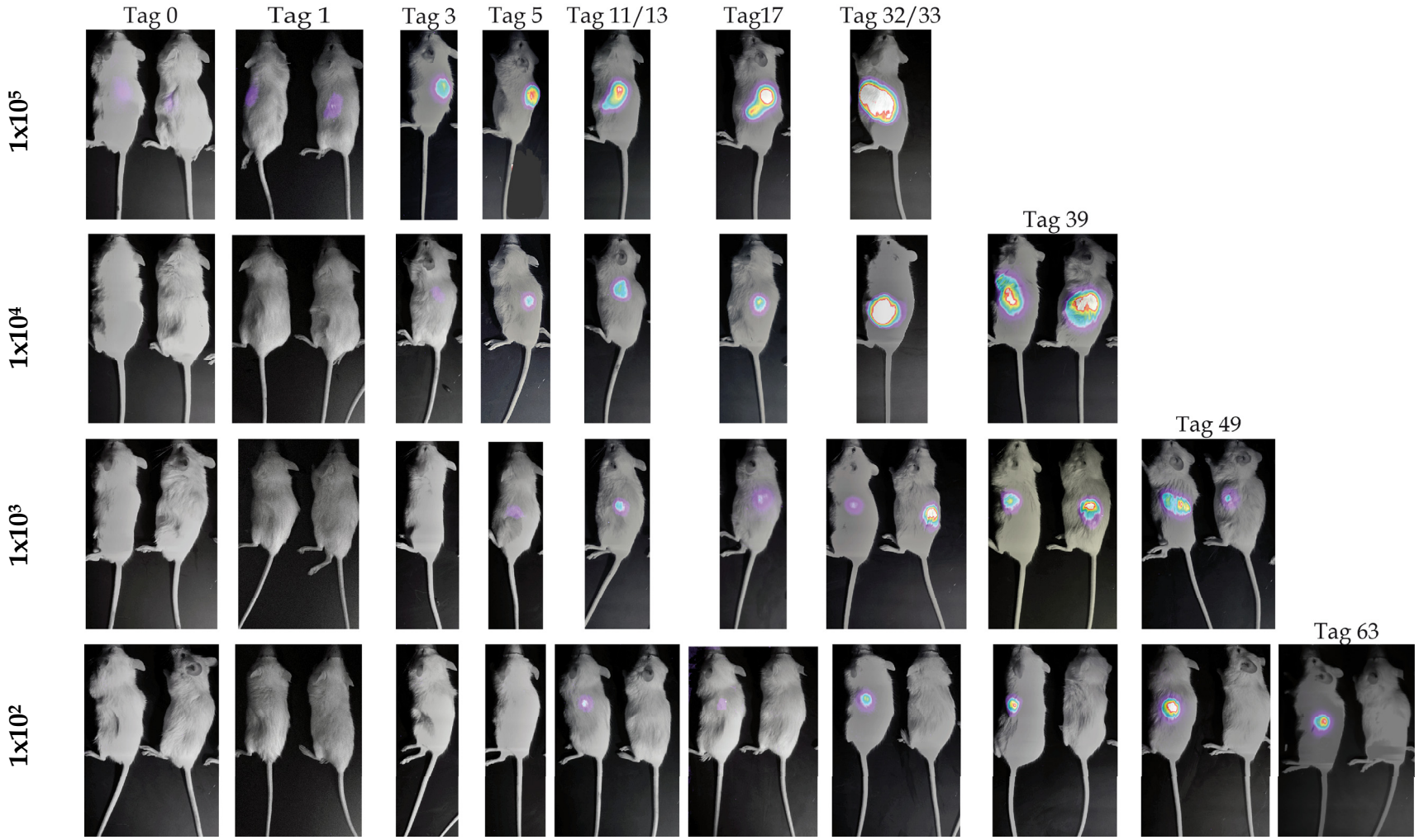


Abbildung 54 Nachweis der zellzahlabhängigen Teratombildung nach der s.c. Transplantation von 7AC5/Luc-Zellen mittels Biolumineszenz

2. Histopathologische Begutachtung der stammzellabgeleiteten Teratome in Abhängigkeit von der Transplantationsroute

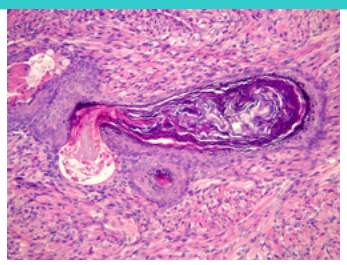
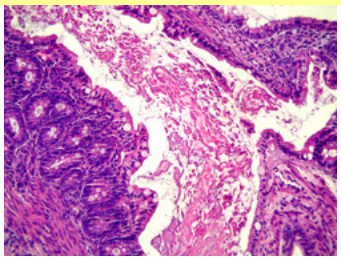
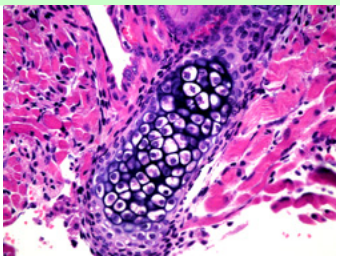
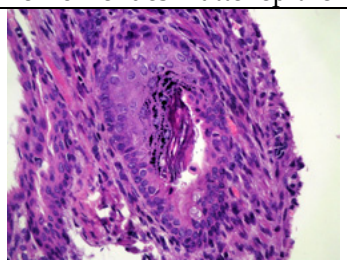
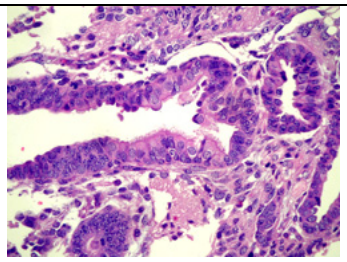
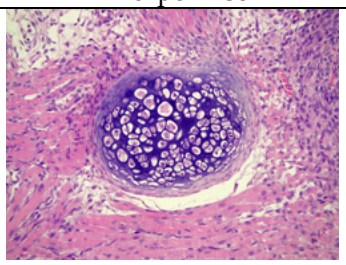
	Ektoderm	Endoderm	Mesoderm
7AC5/Luc	 verhornendes Plattenepithel	 darmähnliche Strukturen	 Knorpellinse
7AC5/FF	 verhornendes Plattenepithel	 Flimmerepithel	 Knorpellinse

Abbildung 55 H&E-Färbung der 7AC5/Luc- und 7AC5/FF-abgeleiteten Teratome in NOD/SCID-Mäusen nach i.splen. Applikation der Stammzellen

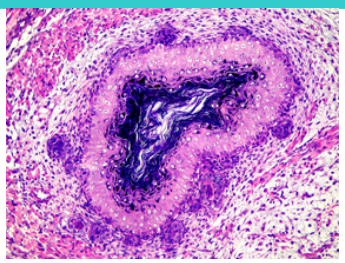
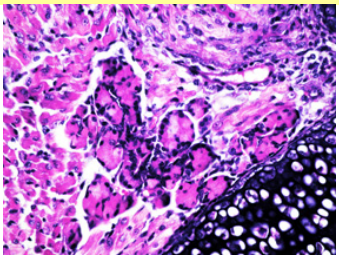
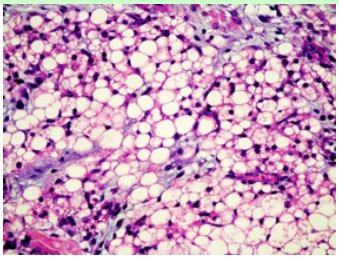
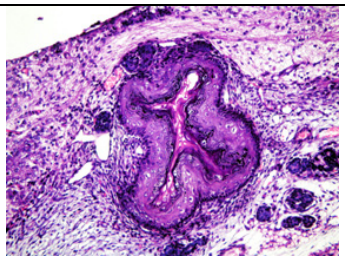
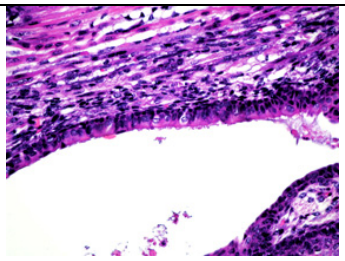
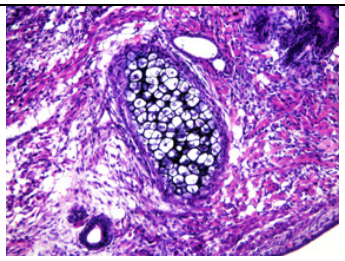
	Ektoderm	Endoderm	Mesoderm
7AC5/Luc	 verhornende Epidermis	 Drüsenläppchen vermutlich Pankreas	 Fett
7AC5/FF	 verhornende Epidermis	 Flimmerepithel	 Knorpellinse

Abbildung 56 H&E-Färbung der 7AC5/Luc- und 7AC5/FF-abgeleiteten Teratome in NOD/SCID-Mäusen nach i.hep. Applikation der Stammzellen

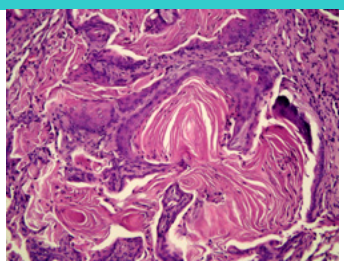
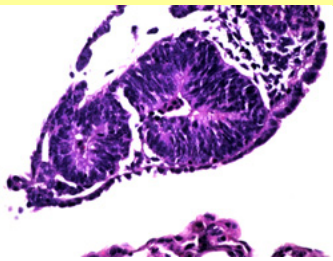
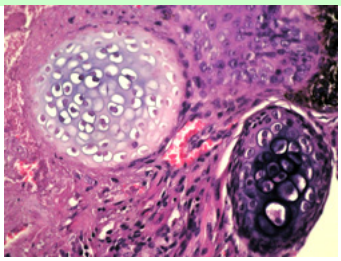
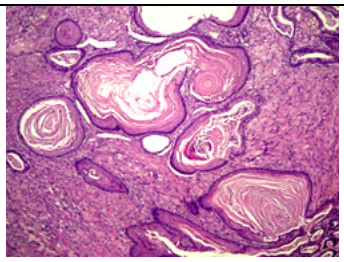
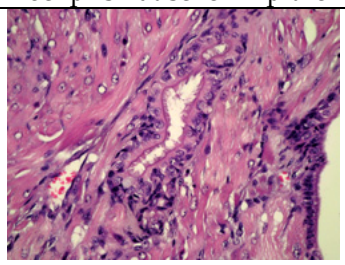
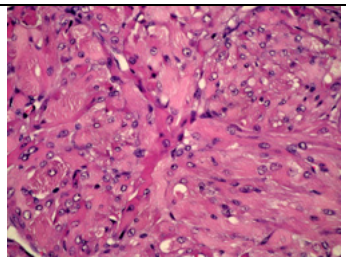
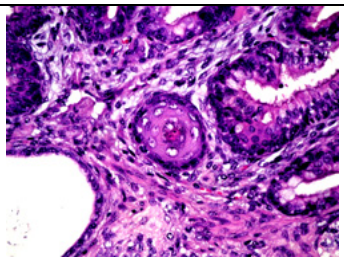
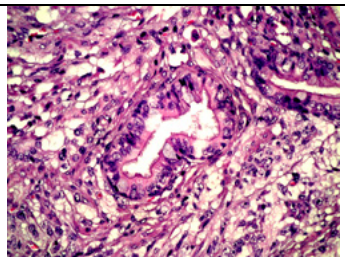
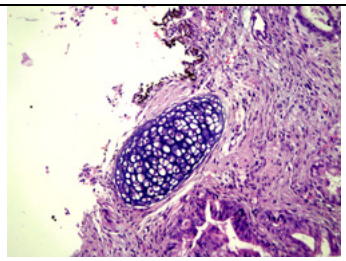
	Ektoderm	Endoderm	Mesoderm
7AC5/Luc	 epidermale, verhornende Strukturen	 tubuläre, epitheliale Struktur mit hochprismatischem Epithel	 Knorpellinse
	 epidermale, verhornende Strukturen	 tubuläre, epitheliale Struktur mit Flimmerhärchen und Becherzellen	 Muskelgewebe
7AC5/FF	 epidermale, verhornende Struktur mit Keratohyalingranula	 tubuläre, epitheliale Struktur mit Flimmerhärchen und Becherzellen	 Knorpellinse

Abbildung 57 H&E-Färbung der 7AC5/Luc- und 7AC5/FF-abgeleiteten Teratome in NOD/SCID-Mäusen nach i.v. Applikation der Stammzellen

3. Histopathologische Begutachtung der stammzellabgeleiteten Teratome in Abhängigkeit von der transplantierten Zellzahl

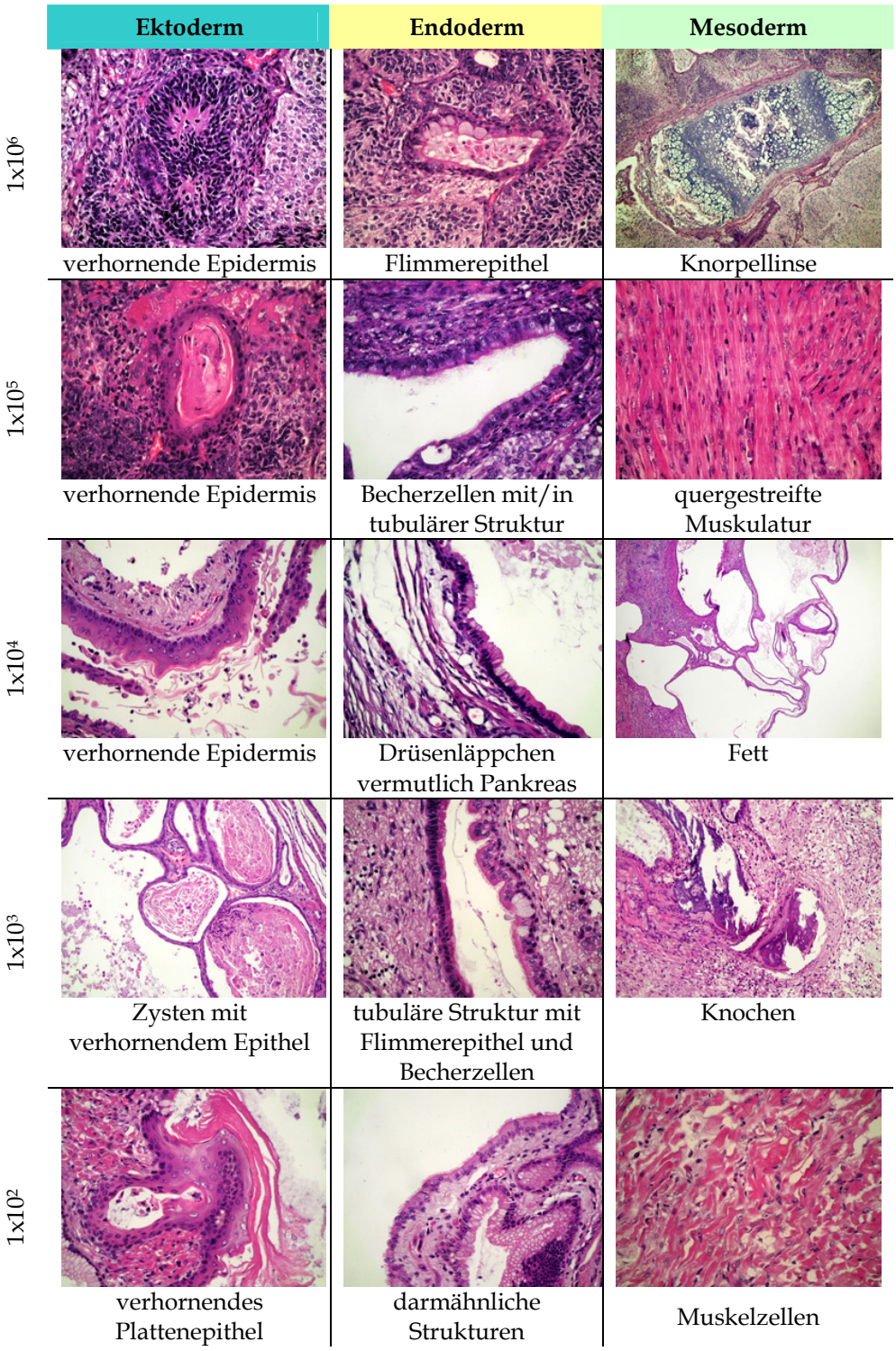


Abbildung 58 Histopathologische Bewertung der 7AC5/Luc-stammzellabgeleiteten Teratome nach s.c. Applikation in Abhängigkeit von der transplantierten Zellzahl
Unabhängig von der applizierten Zellzahl ($1x10^2$-$1x10^6$-7AC5/Luc-Stammzellen) bilden sich Teratome, die typische Strukturen der drei Keimblätter aufweisen (Ekto-, Endo- und Mesoderm).

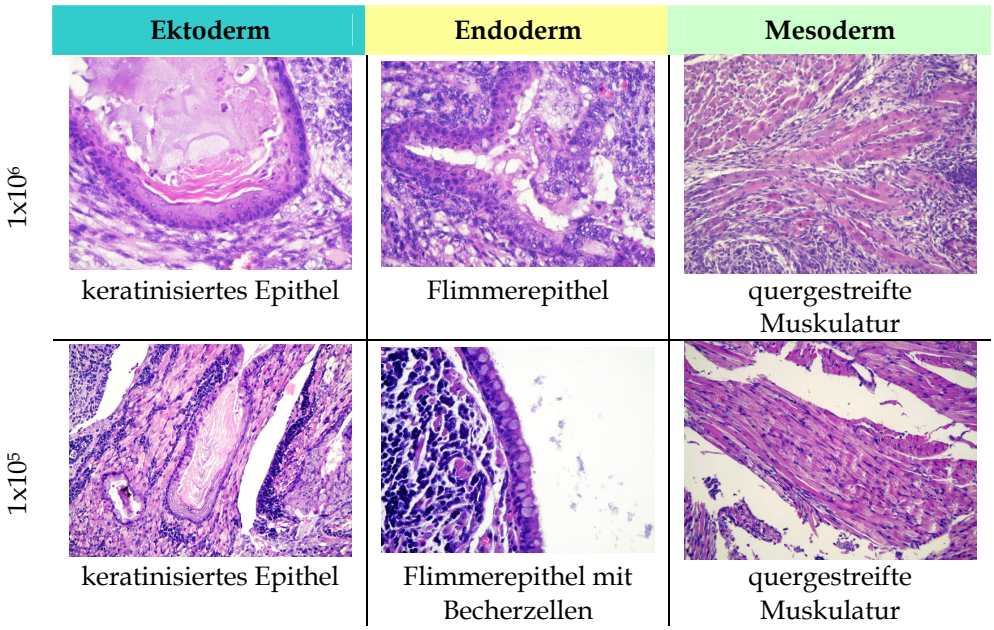


Abbildung 59 Histopathologische Bewertung der 7AC5/Luc-stammzellabgeleiteten Teratome nach i.hep. Applikation in Abhängigkeit von der transplantierten Zellzahl
Es wurden $1x10^2$ bis $1x10^6$ 7AC5/Luc-Stammzellen i.hep. transplantiert. Nur bei $1x10^5$ und $1x10^6$ transplantierten Zellen konnten Teratome mit den drei Keimblattstrukturen dokumentiert werden.

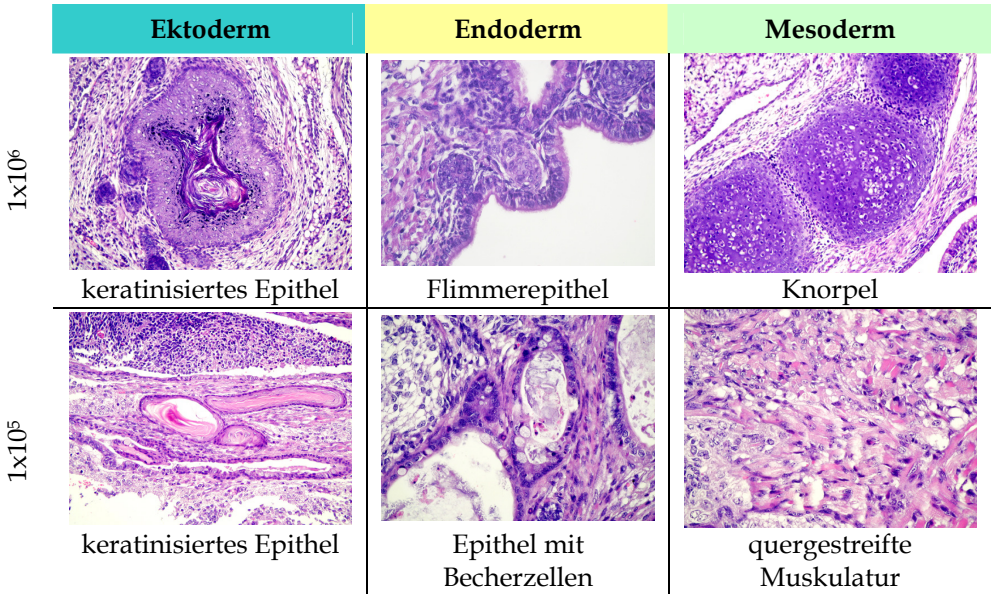


Abbildung 60 Histopathologische Bewertung der 7AC5/Luc-stammzellabgeleiteten Teratome nach i.splen. Applikation in Abhängigkeit von der transplantierten Zellzahl
Es wurden $1x10^2$ bis $1x10^6$ 7AC5/Luc-Stammzellen i.hep. transplantiert. Nur bei $1x10^5$ und $1x10^6$ transplantierten Zellen konnten Teratome mit den drei Keimblattstrukturen dokumentiert werden.

4. Histopathologische Begutachtung der stammzellabgeleiteten Teratome nach der Behandlung mit Referenzsubstanzen

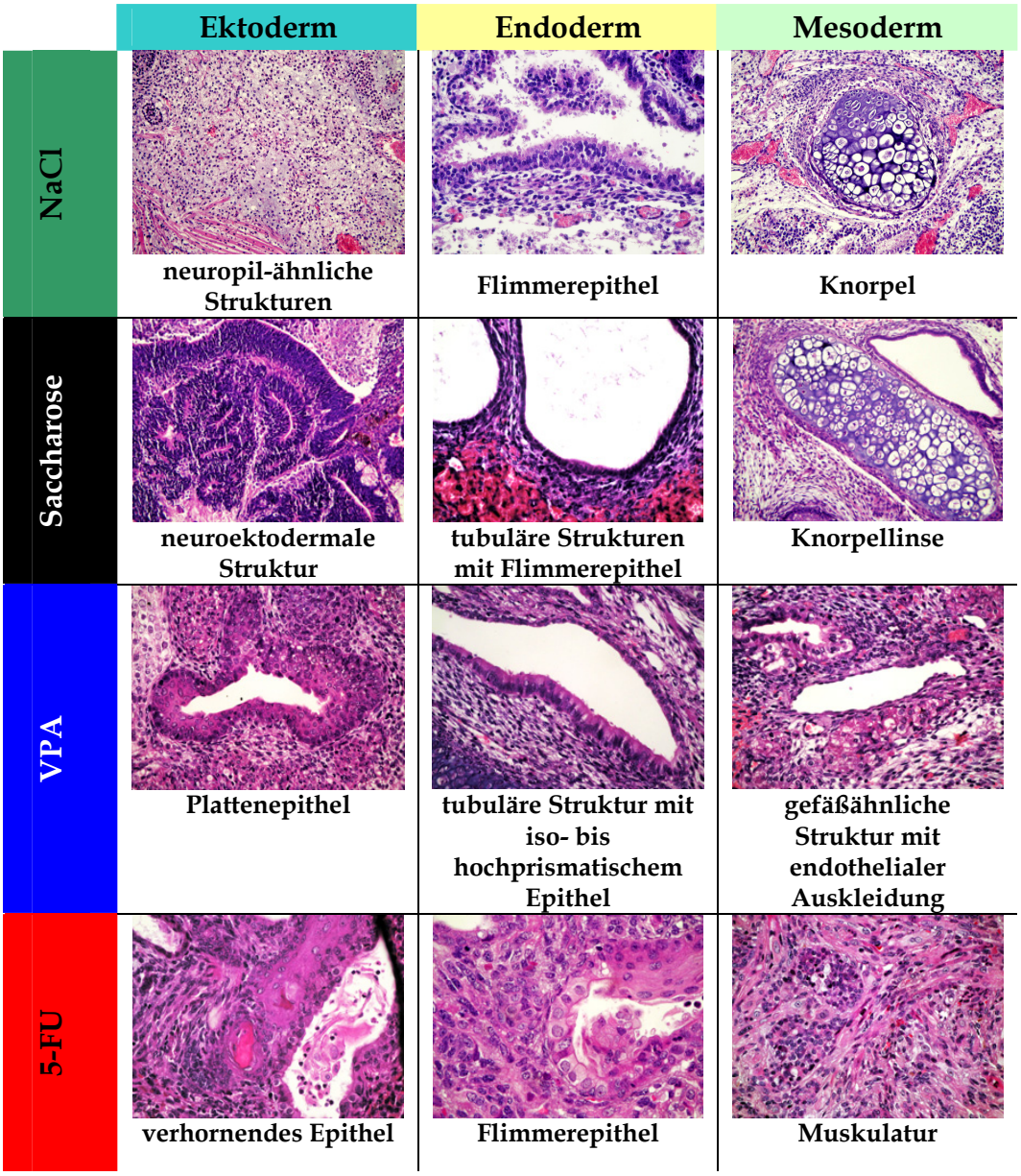


Abbildung 61 Histopathologische Begutachtung der i.splen. abgeleiteten Teratome nach der Behandlung mit den Referenzsubstanzen

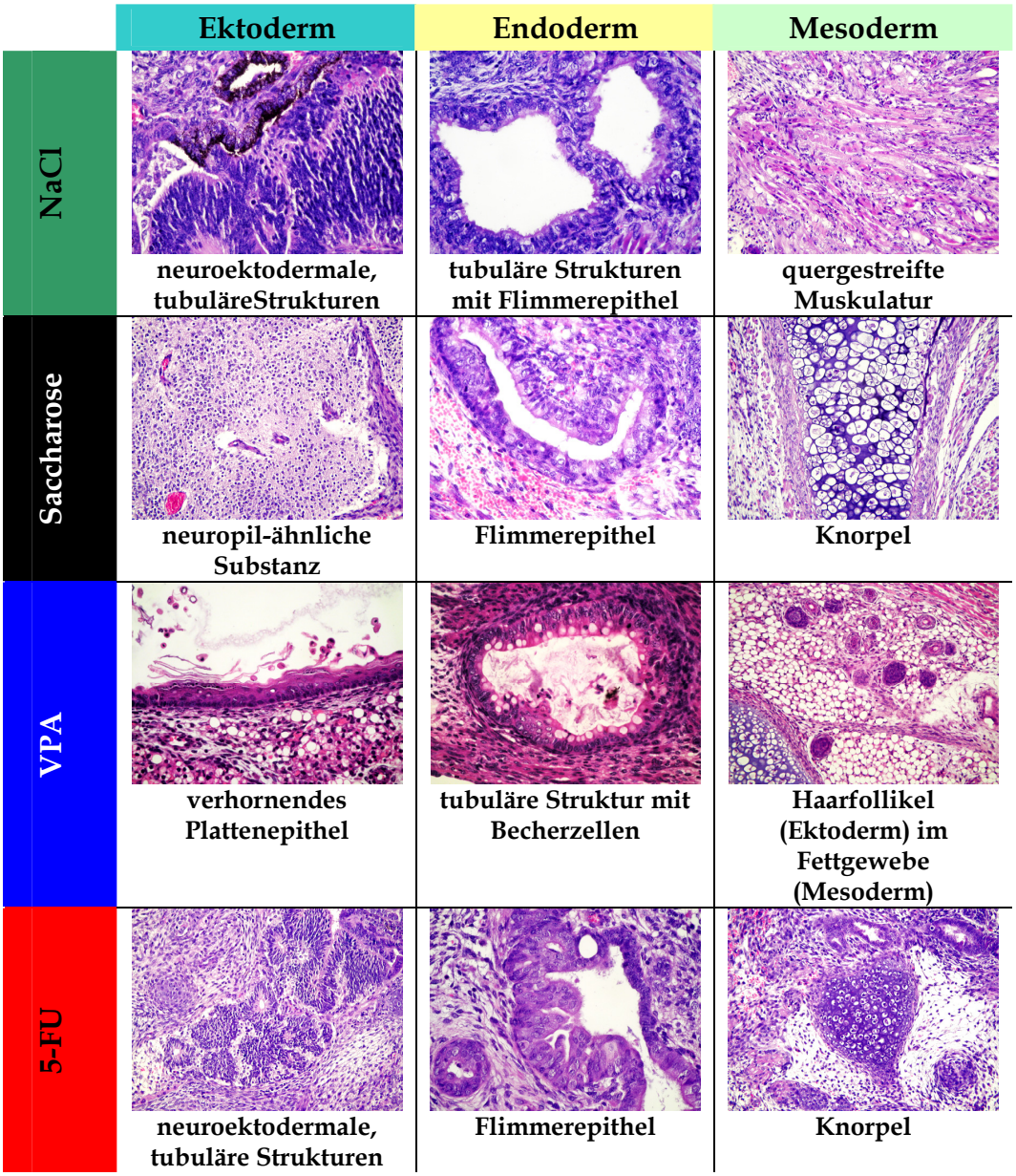


Abbildung 62 Histopathologische Begutachtung der i.hep. abgeleiteten Teratome nach der Behandlung mit den Referenzsubstanzen

V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU	5- Fluoruracil
6-AN	6-Aminonicotinamid
7AC5/FF	7AC5/EYFP-Stammzelllinie unter feeder- und serumfreien Kulturbedingungen
7AC5/Luc	7AC5/EYFP-Stammzelllinie unter feeder- und serumfreien Kulturbedingungen, mit Luc-Plasmid transfiziert
7AC5/MEF	7AC5/EYFP-Stammzelllinie unter Standardkulturbedingungen auf CD1-Feeder
Abb.	Abbildung
aSMA	alpha Smooth muscle actin
AFP	Alpha-Fetoprotein
b-3-Tub	beta-3-Tubulin
BMP	Bone morphogenetic protein
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CDD	cool charged couple device
CK	Cytokeratin (Zytokeratin)
C_T	Threshold Cycle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DLK	Delta-Like
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC	embryonale Stammzellen (embryonic stem cells)
EST	embryonaler Stammzelltest (embryonic stem cell test)
EYFP	verstärkt gelb leuchtendes Fluoreszenzprotein (enhanced yellow fluorescent protein)
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (Fluorescence Activated Cell Sorting)
ff	folgende
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (Fibroblast Growth Factor)
FITC	Fluorescein
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenz

g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
Gy	Gray
h	Stunde
hESC	humane embryonale Stammzellen (human embryonic stem cells)
HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor (Hepatocyte Growth Factor)
HNF	Hepatozytenkern-Faktor ()Hepatocyte Nuclear Factor
ICM	innere Zellmasse (inner cell mass)
Id	Inhibitor der DNA-Bindung (DNA-binding protein inhibitor)
IgG	Immunglobulin G
i.hep.	intrahepatisch
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
iPSC	induziert pluripotente Stammzellen (induced pluripotent stem cells)
i.splen.	intrasplenal
i.v.	intravenös
l	Liter
KG	Körpergewicht
Klf	Kruppel-like factor
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
Luc	Luciferase
m	Meter
mM	Millimolar
MACS	magnetische Zellseparation (Magnetic Cell Separation)
MEF	murine embryonale Fibroblasten (murine embryonic fibroblast)
mESC	murine embryonale Stammzellen (murine embryonic stem cells)
µ	mikro
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano
n =	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren (Non Essential Amino Acids)
NF	Neurofilament

NOD/SCID	Nicht-fettleibig-diabetisch, mit schwerer kombinierter Immundefizienz (Non-Obese Diabetic / Severe Combined Immunodeficiency)
OSM	Oncostatin-M
Oct	Octamer binding transcription factor
PBS	Phosphat-Puffer (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
Sac	Saccharose
SCF	Stem Cell Factor
SD	Standardabweichung (standard deviation)
sec	Sekunden
SOX	SRY (sex determining region Y)-box
SSC	Side Scatter
SSEA	Stage-Specific Embryonic Antigen
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
tgl.	täglich
TRA	Tumor Related Antigen
V	Volumen
VPA	Valproinsäure
%	Prozent

VI. PUBLIKATIONSLISTE

Fachartikel

Stecklum,M. Wulf-Goldenberg A, Purfürst B, Siegert A, Keil M, Eckert K, Fichtner I. (2014) Cell differentiation mediated by co-culture of human umbilical cord blood stem cells with murine hepatic cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim*

Vorträge

Stecklum M, Kunze F, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2014) Stem cell transplantation in mice for the detection of engraftment and cell differentiation: useful system for embryotoxicity testing. Your bench and beyond, Berlin.

Stecklum M, Kunze F, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2013) Live cell imaging (bioluminescence) of transplanted murine embryonic stem cells in NOD/SCID mice. Sciensation – Communicate your ideas, Kremmen.

Stecklum M, Kunze F, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2013) Non-invasive monitoring of teratoma formation and embryotoxicity. Student Cancer Club, Berlin.

Stecklum M, Kunze F, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2011) Teratoma formation - a method for the characterization of pluripotency and differentiation of murine embryonic stem cells. 12th MDC/FMP/HST PhD Retreat, Liebenwalde.

Posterpräsentationen

Stecklum M, Kunze F, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2014) Stem cell transplantation in immunodeficient mice for the detection of engraftment and cell differentiation: useful system for embryotoxicity testing. 2nd International Annual Conference of GSCN, Heidelberg.

Stecklum M, Kunze F, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2013) Detection of murine embryonic stem cells after transplantation in NOD/SCID mice by in vivo imaging (bioluminescence). World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig.

Sil'vestrov M, Siegert A, **Stecklum M**, Keil M, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2013) Differentiation of murine embryonic stem cells into hepatocyte-like cells for in vivo application. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig.

Stecklum M, Kunze F, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2013) Live cell imaging (bioluminescence) of transplanted murine embryonic stem cells in NOD/SCID mice. 7th International Meeting Stem cell network North Rhine-Westphalia, Köln.

Stecklum M, Kunze F, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2012) Live cell imaging (bioluminescence) of transplanted murine embryonic stem cells in NOD/SCID mice. International Society of Differentiation Conference - Stem Cells, Development and Regulation, Amsterdam.

Stecklum M, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2011) Teratoma formation of murine embryonic stem cells as a method for the characterization of pluripotency and differentiation. 6th International Meeting Stem cell network North Rhine-Westphalia, Essen.

Stecklum M, Kunze F, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2011) The effect of luciferase transfection on pluripotency and differentiation of murine embryonic stem cells in vitro and in vivo. Stem Cells in Development and Disease, Berlin.

Siegert A, **Stecklum M**, Keil M, Sil'vestrov M, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2011) Differentiation of murine embryonic stem cells (mESC) into hepatocyte-like cells for in vivo application. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig

Stecklum M, Kunze F, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2011) Detection of murine embryonic stem cells after transplantation in NOD/SCID mice by in vivo imaging (bioluminescence). World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig

Stecklum M, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2010) Application of different cultivation methods for mouse embryonic stem cells on pluripotency and differentiation potential in vitro and in vivo. Stem Cells Europe, Edinburgh.

Stecklum M, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2010) Application of different cultivation methods for mouse embryonic stem cells on pluripotency and differentiation potential in vitro and in vivo. 12th MDC/FMP/HST PhD Retreat, Rheinsberg.

Stecklum M, Siegert A, Haider W, Eckert K, Fichtner I. (2010) Influence of different cultivation methods for murine embryonic stem cells on pluirpotency and differentiation potential in vitro and in vivo. PhD Symposium "Stem Cells: Hopes and Fears", Berlin. Preis/Auszeichnung: bestes Poster

VII. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die diese Arbeit durch ihre Motivation und Unterstützung erst ermöglicht haben.

Als erstes möchte ich mich herzlich bei Dr. Iduna Fichtner für die Überlassung des Themas, die hilfreichen Ideen und Diskussionen bedanken.

Herrn Dr. Klaus Eckert danke ich für die fortwährende Unterstützung während der Promotion und die freundliche Betreuung, die hilfreichen Anregungen und stetige Diskussionsbereitschaft.

Dr. Antje Siegert unterstützte mich nicht nur praktisch, sondern gab mir stets neue Ansätze zur Bewältigung der wissenschaftlichen Thematik und ermöglichte damit den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit.

Prof. Dr. Roland Lauster danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation.

Prof. Dr. Jens Kurreck möchte ich für die Erstellung des Gutachtens danken.

Der Firma epo GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion, die im Rahmen des ProFIT Projektes erst möglich wurde.

Ein großer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe, für das angenehme, freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Friedrich Kunze, Britta Büttner, Nadine Bäsler, Silke Burghardt, Carsta Werner und allen anderen Kollegen danke ich für ihren Beitrag an dieser Arbeit und die praktische Unterstützung während dieser Zeit, die vielen schönen Momente beruflich wie privat.

Besonders möchte ich mich bei meinen langjährigen Wegbegleiterinnen im Labor bedanken. Maxi und Maria hatten nicht nur im Arbeitsalltag immer ein offenes Ohr für mich, sondern haben mich auch beim Leben neben der Arbeit freundschaftlich begleitet.

Annika danke ich für den Einstieg in mein Forscherdasein und für ihre stetige wissenschaftliche Betreuung und das freundschaftliche Miteinander während und nach der Arbeit.

Meiner Familie danke ich für die fortwährende und tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen, dass sie immer ein Fels in der Brandung waren und sind.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich noch bei weiteren wichtigen Menschen in meinem Leben bedanken, die mich vor allem in den letzten Monaten weiter motiviert haben. Neben Fanni und Feli geht auch ein ganz lieber und herzlicher Dank an Felix.

VIII. ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Promotionsverfahren vorgelegt.

Datum	Unterschrift