

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

Balb/c 3T3-Zellen, Klon A31 wurden bezogen von ICN-Flow, Eschwege, Deutschland (Kat.Nr.: 03-465-83) oder American Type Culture Collection (ATCC (Rockville, USA) Kat.Nr.: CCL-163; zur Verfügung gestellt von der ZEBET).

Murine Embryonale Stammzellen der Linie D3 (129/Sv+/, Karyotyp XY) wurden in zwei verschiedenen Chargen eingesetzt:

D3-Zellen (ATCC): Diese Charge der D3-Zellen wurde von ATCC (Rockville, USA) bezogen.

D3-Zellen (ZEBET): Ein Aliquot dieser Charge D3-Zellen wurde dem Labor 1998 von der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) des Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) zur Verfügung gestellt. Die dortige Arbeitsgruppe hatte die Zellen direkt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Kemler erhalten, in dessen Labor sie 1985 isoliert wurden (Doetschman et al., 1985).

Für die D3-Zellchargen kann keine Aussage über die Anzahl der Passagen gemacht werden, die die Zellen vor Erhalt des Aliquots durchlaufen haben. Daher wurden definitionsgemäß die Passagen nach dem Auftauen eines Aliquots gezählt. Bei D3 (ATCC) wurden die unbekannt Passagen als P bezeichnet (nach dem Auftauen dementsprechend P1), bei D3 (ZEBET) als x. Sind mehrere Einfrier-Zyklen durchlaufen worden, steht die erste Zahl für die Passage der eingefrorenen Zellen, die zweite Zahl für die rezenten Passagen (z.B.: x12+3: eingefroren als x+12, seit 3 Passagen wieder in Kultur).

4.1.2 Zellkulturmaterialien

6-cm-Zellkulturschalen	60x15 mm Ø	Corning (Schiphol-Rijk, NL) oder Falcon (BD Biosciences, Heidelberg)
10-cm-Zellkulturschalen	100x20 mm Ø	Corning (Schiphol-Rijk, NL) oder Falcon (BD Biosciences, Heidelberg)
bakteriologische Petrischalen	60x15 mm Ø	Greiner (Frickenhausen)
96-Loch-Mikrotiterplatten f. Zellkultur (96-Well-Platten)		Falcon (BD Biosciences, Heidelberg)
24-Loch-Mikrotiterplatten f. Zellkultur (24-Well-Platten)		Falcon (BD Biosciences, Heidelberg)

4.1.3 Zellkulturmedien und -zusätze

4.1.3.1 Zusätze

Alle Mediumzusätze wurden als Lösungen bereitgestellt und je nach Herstellerangaben bei ca. +4°C oder ca. -20°C in Aliquoten gelagert.

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMEM mit L-Glutamine, Glukose und NaHCO ₃	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FCS)	getestet Chargen von Sigma (Taufkirchen) und Hyclone (Perbio Science, Bonn)
L-Glutamin	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Murines LIF (mLIF), ESGRO	Chemicon International (Temecula, USA)
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nichtessentielle Aminosäuren	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
D-PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Trypsin/ EDTA-Lösung	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)

LIF

LIF wurde nach der Passage der ES-Zellen direkt in die Zellkulturschalen/-flaschen zugegeben. Die LIF-Lösung mit einer Konzentration von 10⁶ U/ml wurde in Aliquoten bei ca. -20°C gelagert. Einmal aufgetaute Aliquote wurden bei ca. 4°C gelagert (stabil bis zu 1 Jahr).

Fetales Kälberserum (FCS)

FCS wurde bei 4°C aufgetaut und anschließend für ca. 30 min bei ca. 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Die Flasche wurde bei 4°C gelagert.

β-Mercaptoethanol (β-ME)

Eine 10 mM Arbeitslösung wurde in PBS angesetzt und bis zu einer Woche verwendet (Lagerung bei ca. +4°C). Für 5 ml Arbeitslösung wurden 3,5 µl reines β-ME zu 5 ml PBS gegeben.

4.1.3.2 Kulturmedien

Zellkulturmedien wurden in DMEM (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) angesetzt; angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen. D3-Medium wurde ohne LIF hergestellt und nicht länger als eine Woche eingesetzt (Lagerung bei ca. 4°C).

<u>D3-Medium:</u>		<u>3T3-Medium:</u>	
15 %	FCS	10 %	FCS
2 mM	Glutamin	4 mM	Glutamin
50 U/ml	Penicillin	50 U/ml	Penicillin
50 µg/ml	Streptomycin	50 µg/ml	Streptomycin
1 %	NAA		
0.1 mM	β-ME		
1000 U/ml	mLIF (direkt zur Schale)		

Differenzierungsmedium:
D3-Medium ohne Zusatz von mLIF

4.1.3.3 Einfriermedien

<u>D3-Zellen:</u>		<u>3T3-Zellen:</u>	
40 %	FCS	20 %	FCS
2 mM	Glutamin	4 mM	Glutamin
50 U/ml	Penicillin	50 U/ml	Penicillin
50 µg/ml	Streptomycin	50 µg/ml	Streptomycin
1 %	NAA	10 %	DMSO
0.1 mM	β-ME		
10 %	DMSO		

4.1.4 Verbrauchsmaterial

Verdünnungsracks	Greiner (Frickenhausen)
Verdünnungsröhrchen	Starlab (Ahrensburg)
Reaktionsgefäße, lichtundurchlässig	Eppendorf (Hamburg)
Cryoröhrchen (2 ml)	Nalgene (Rochester, USA)

4.1.5 Feinchemikalien

Wenn nicht anders erwähnt, wurden handelsübliche Chemikalien der Firmen Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) verwendet. Die Reinheitsstufe entsprach Analysequalität.

All- <i>trans</i> -Retinsäure (CAS Nr. 302-79-4)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
6-Aminonikotinamid (CAS Nr. 329-89-5)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Penicillin G (CAS Nr. 69-57-8)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
5-Fluorouracil (CAS Nr. 51-21-8)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Valproinsäure (CAS Nr. 99-66-1)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lithiumchlorid (CAS Nr. 7447-41-8)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Saccharin Natriumhydrat (CAS Nr. 82385-42-0)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
D-(+)-Campher (CAS Nr. 464-49-3)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Cytosinarabinosid (CAS Nr. 69-74-9)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Diphenylhydantoin (CAS Nr. 630-93-3)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Dexamethason (CAS Nr. 50-02-2)	Calbiochem (Merck, Darmstadt)
Staurosporin (CAS Nr. 62996-74-1)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Y27632 (CAS Nr. 146986-50-7)	TOCRIS (Biotrend, Köln)

4.1.6 Antikörper

Erster Antikörper: TROMA-1 IgG (Ratte)	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA
Zweiter Antikörper: AlexaFluor [®] 488 konjugierter Donkey-anti-Rat IgG, (H+L) 2mg/ml	MoBiTec, Göttingen

4.1.7 Lösungen, Ansätze, Puffer

2-Propanol (Isopropanol)	Merck (Darmstadt)
Aqua Bidest	Millipore (MilliQ-Anlage; Schwalbach)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol (96%, reinst)	Merck (Darmstadt)
Molekularer Marker III	Roche Diagnostics (Mannheim)
MTT	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka (Buchs, Schweiz)
PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe),
RNase-freies Wasser	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Saponin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

MTT-Lösung

Die Stammlösung wurde mit 5 mg/ml MTT in PBS angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße) und in Aliquoten bei ca. -20°C gelagert.

MTT-Desorb

Zur Lösung des in den Zellen produzierten blauen MTT-Formazan-Farbstoffes diente 0.7% SDS in Isopropanol. MTT-Desorb wurde jeweils vor Gebrauch frisch angesetzt. Beim Auftreten von Präzipitaten wurde die Lösung im Wasserbad auf ca. 37°C erwärmt.

4.1.8 RNA-Isolierung

QIAshredder	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)

4.1.9 cDNA-Synthese

TaqMan Reverse Transcription Reagents	PE Applied Biosystems (Foster City, USA)
---------------------------------------	--

4.1.10 Primer und Sonden für die TaqMan-PCR

Die im Folgenden aufgelisteten Primer wurden lyophilisiert und entsalzt wahlweise bei folgenden Firmen bestellt: PE Applied Biosystems (Foster City, USA), Eurogentec (Seraing, Belgien), MWG Biotech (Ebersberg) oder Roche Diagnostics (Mannheim).

Die zugehörigen Sonden wurden bei Metabion (Martinsried) oder Eurogentec bestellt. Die Sonden waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit dem Quencher TAMRA markiert.

Name	Accession number	Sonde (5'→3')	Primer (5'→3')
actinin α2	AF248643	aga gac cgc aga cac cga cac gg	forward: cca gtc ctt cat tga ctt cat gac reverse: tgt aag gct tat cag aag cca gaa t
cardiac α-Actin	X03767	aag ccc cgc tga acc cca agg	forward: aac acc caa ccc tgc tca ct reverse: tct ggg tca tct tct cac ggt
cardiotrophin	U18366	cac tgc agg cat ctt ctc agc caa gg	forward: ccc tct tca cgg cca aca reverse: cca tag agg ccg cac acg
cripto	M87321	tcc ttc tgt gcc tgc cct cct tcc t	forward: gct gtc tga atg gag gga ctt reverse: agt gct ctt tgc gaa cat cat gt
GATA-4	NM_008092	tct tta gcc ggt ggg tga tcc gaa	forward: ggc aga aag caa gga cta ggc reverse: ggt ctc gaa cac cct gag ca
Hand 1	NM_008213	tgg aac tca acc cca aaa gcc atg g	forward: acc ctt cca acc cat ctg reverse: gga cga gag agc gag cca
Hand 2	NM_010402	cgc cta cct cat gga tct gct gcc	forward: cgc ctg gct acc agc tac a reverse: ctc tcc gtt ctg gtc gtc ctt
MesP1	XM_133562	ccc atc gtt cct gta cgc aga aac agc	forward: agt cgc cgc aga atc gtg reverse: gct cca ttt cct gcc ttt cc
MesP2	U71125	ata tgg cct tac ctg cac ctg cgg tg	forward: agg acc ccc act gaa tat ttt cta ct reverse: cca agg cag ccc aaa tcc
MHC (alpha-)	NM_010856.1	aaa ggc tca tcc ttc caa aca gtg tct gc	forward: tgc ttc tgc tga tac cgg tg reverse: gtt cag att ttc ccg gtg ga
MHC (beta-)	M74752	atg ctg tcc gtg cca atg acg acc	forward: tgc tga agg aca ctc aaa tcc a reverse: tcc acg atg gcg atg ttc t
MLC-1	W54645	cca agc ctg aag aga tga gtt cca aga cac t	forward: cag agg tgc tgc gcg ttt reverse: ata ggt gcc ctg ctc ctt gtt
MLC-2v	NM_010861	tga cct aag gga cac att tgc tgc cc	forward: gag acg gct tca tgc aca aga reverse: cat ttt tca cgt tca ctc gtc cta
myocardin a	AF384055	cct ccc cga cag gct tct acc act ttg	forward: ccc aac acc ttg ccc agt tat reverse: gca gcg gac aag tca gat gag
NF-L	M55424	cca cat cca cgg taa agc cac gac aa	forward: cct ggt tgg aca cta cat cat ctt t reverse: cac caa aca caa gta gtg caa gct
Oct-4	X52437	taa gct gcg gcc cct gct gga	forward: ctt gca gct cag cct taa gaa ca reverse: gca tat ctc ctg aag gtt ctc att gt
Tbx 5	AF140427	tgt acc gtc acc acc gtg cag cc	forward: gga gga cat cag ctg taa cac atg reverse: agg tga aat gag cgg aga agt g
tpn T	L47599	cag ctc tgg gtc ctc ctt ggc acc	forward: tgt gcc ccc tgc ttg tgt reverse: act atc caa aca gga gtc tgc att g

4.1.11 TaqMan-PCR

18S rRNA PDARs (Predeveloped assay reagents) PE Applied Biosystems (Foster City, USA)

Rodent GAPDH control reagents PE Applied Biosystems (Foster City, USA)

Die Referenzgene der Firma PE Applied Biosystems waren VIC/TAMRA markiert. Für diese kommerziell bezogenen Kits können keine Sequenzen angegeben werden.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkulturmethoden

Die kultivierten Zelllinien und alle mit ihnen hergestellten Ansätze für Experimente wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ in Luft und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. D3-Zellen wurden in 6-cm-Zellkulturschalen, 3T3-Zellen, die einschichtig wachsen, wurden in 10-cm-Zellkulturschalen kultiviert. Das Passagieren erfolgte standardmäßig alle 2-3 Tage.

4.2.1.1 Auftauen von Zellen

D3- und 3T3-Zellen wurden zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach der Entnahme wurde das Zellaliquot möglichst schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert, um das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellett in Kulturmedium resuspendiert und in eine gelatinebeschichtete Zellkulturschale (30 min; 0,1% Gelatine-Lösung in PBS) überführt. Zu den D3-Zellen wurden 1 µl mLIF pro ml Kulturmedium zugegeben. Am ersten Tag nach dem Auftauen erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 1-2 (3T3), bzw. 2-3 Passagen (D3) konnten die Zellen in den Assays verwendet werden.

4.2.1.2 Passagieren der 3T3-Zellen

Die Zellen einer 10-cm-Zellkulturschale wurden mit D-PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, Gibco) gespült und mit ca. 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet. Nach kurzem Einwirken wurde die Trypsinlösung abgesaugt und die Schale im Brutschrank für ca. 2 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml 3T3-Medium resuspendiert und etwa 1/8 bis 1/10 in eine neue Zellkulturschale mit 9,5 ml 3T3-Medium überführt.

Zum Ansetzen eines Zytotoxizitätsassays wurden die Zellen nach der Resuspension 4 min bei 100*g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellett in 3T3-Medium aufgenommen und die Zelldichte mittels Hämocytoometerkammer bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde wie beschrieben subkultiviert, der Rest für den Versuchsansatz eingesetzt.

4.2.1.3 Passagieren der D3-Zellen

Die Zellen einer 6-cm-Schale wurden mit D-PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gespült und mit ca. 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet. Nach ca. 2 min wurden die Zellen in der Trypsin-Lösung abgespült und durch kräftiges Resuspendieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen, um die Trypsinaktivität zu inhibieren. Nach einer Zentrifugation von 4 min bei 100*g wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellett in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen.

Für die Passage wurden die Zellen etwa 1:6 bis 1:8 verdünnt. Zur neuen Zellkulturschale wurden 1 µl mLIF pro ml Zellkulturmedium zugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank für 2 oder 3 Tage. Die Zellen wurden maximal 25 Passagen kultiviert, um Veränderungen der Zellkultur zu vermeiden.

Für Versuchsansätze wurde die Zelldichte nach der Resuspension mittels Hämocytometerkammer bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde wie beschrieben weiterkultiviert, der Rest für den Versuchsansatz eingesetzt.

4.2.1.4 Einfrieren von Zellen

Aliquote von D3- und 3T3-Zellen zur Langzeitaufbewahrung wurden in sterilen Cryoröhrchen (Nalgene) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Als kryoprotektives Agens im Einfriermedium wurde DMSO verwendet. Nach dem Abtrypsinieren und Zentrifugieren wurden die Zellen einer Zellkulturschale in 2 ml Einfriermedium resuspendiert und diese auf zwei Cryoröhrchen aufgeteilt. Die Röhrchen wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer („Mr. Frosty“, Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene) bei -80°C eingefroren. Dieser Container gewährleistet eine langsame und kontinuierliche Abkühlung mit ca. 1°C/min. Anschließend wurden die Cryoröhrchen in Flüssigstickstoff (-196°C) überführt.

4.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Durchführung der Arbeiten wurde eine Lebendzellzahlbestimmungen mit Trypanblau durchgeführt, indem ein Aliquot der Zellsuspension mit 1:2 Trypanblau versetzt wurde und in einer Hämocytometerkammer nach Neubauer ausgezählt wurde. Dabei wurde der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Da eine Vitalität der Zellen von ca. 90 – 95 % standardmäßig erreicht wurde, wurde für Versuchsansätze die Zellzahl routinemäßig anhand eines Aliquots ungefärbter Zellen mittels Neubauer-Kammer bestimmt.

4.2.2 Differenzierungsassay der D3-Zellen im Embryonalen Stammzelltest

Die Differenzierung der D3-Zellen zu Kardiomyozyten erfolgte während der zehntägigen Kultivierung nach dem Protokoll des Embryonalen Stammzelltests (EST; Scholz, 1998). Die Bildung der „*Embryoid Bodies*“ (EBs) wurde dabei nach der „*hanging drop*“-Methode (Wobus et al., 1991) durchgeführt.

Probennahmen für die RNA-Isolierung erfolgten für die Genexpressionsprofile täglich (siehe 4.2.2.1) oder an Tag 5, 7 und 10 während der Substanztests (siehe 4.2.2.2).

Tag 0: Ansetzen der Tropfenplatten

Eine Zellsuspension in Differenzierungsmedium (gegebenenfalls mit Substanz) mit 3.75×10^4 Zellen/ml wurde in Tropfen von je 20 μ l auf die Innenseite des Deckels einer mit 5 ml PBS gefüllten 10-cm-Zellkulturschale pipettiert (750 Zellen/Tropfen). Pro Deckel wurden ca. 50 Tropfen pipettiert. Zum Aufsetzen auf die Zellkulturschale wurde der Deckel vorsichtig in einer fließenden Bewegung umgedreht.

Die Herstellung der Zellsuspension erfolgte immer unmittelbar vor dem Pipettieren der Tropfen. Die hängenden Tropfen wurden 3 Tage im Brutschrank inkubiert.

Tag 3: Abspülen der Tropfen

Für jede Tropfenplatte wurde ein bakteriologisches 6-cm-Schälchen mit 5 ml Medium (bei Substanztests mit der gleichen Testkonzentration wie in den Tropfen) bereitgestellt. Aus dem 6-cm-Schälchen wurden mit einer Pipette mit großer Öffnung, um die EBs nicht zu beschädigen (z.B. 5 ml-Falconpipette) ca. 2,5 ml Medium aufgenommen. Die Tropfen des Deckels wurden mit dem Medium abgespült. Die EBs, die zu diesem Zeitpunkt feste Aggregate gebildet hatten und durch den Vorgang nicht angegriffen wurden, wurden in die 6-cm-Schale transferiert. Ohne Wechselwirkung mit der Schälchenoberfläche wuchsen die EBs in Suspensionskultur und behielten die runde, kugelige Form bei. Die Inkubationsdauer der Schalen bei im Brutschrank betrug 2 Tage.

Tag 5: Aussaat der EBs

Es wurde Differenzierungsmedium mit den gleichen Substanzkonzentrationen angesetzt, wie an Tag 0 und Tag 3.

Für jede unterschiedliche Konzentration wurde eine Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefungen (*Wells*; 24-*Well*-Platte) zur mikroskopischen Auswertung angesetzt. Dazu wurde in jedes *Well* 1 ml Differenzierungsmedium der entsprechenden Substanzkonzentration vorgelegt. Mit einer Pipette wurde ein einzelner EB in jedes freie *Well* der 24-*Well*-Platte überführt. Für die RNA-Isolierung wurden die EBs aus den restlichen bakteriellen 6 cm-Schälchen in die gleiche Anzahl 10-cm-Zellkulturschalen überführt, in die je 10 ml Differenzierungsmedium mit der entsprechenden Substanzkonzentration vorgelegt wurden. Die Inkubation erfolgte für 5 Tage im Brutschrank.

Tag 10: Mikroskopische Auswertung der Kardiomyozytendifferenzierung

An Tag 10 wurde die Differenzierung von kontrahierenden Kardiomyozyten lichtmikroskopisch am Phasenkontrastmikroskop ausgewertet. Dazu wurde der EB in jedem *Well* untersucht. Waren

in einem *Well* schlagende Kardiomyozyten zu finden, wurde dies in einem Auswertblatt zur Rohdatenerfassung vermerkt. Konnte auch nach mehrmaliger Untersuchung in einem EB kein kontrahierender Bereich ausgemacht werden, wurde dies ebenso vermerkt. Die Größe der schlagenden Areale wurde nicht in die Auswertung einbezogen. Die Anzahl der EBs mit schlagenden Kardiomyozyten im Verhältnis zur Anzahl vorhandener EBs stellte das Ergebnis einer 24-*Well*-Platte dar.

Der Differenzierungsassay wurde verwendet für Assaychecks (4.2.2.1), Erstellung von Genexpressionsprofilen (4.2.2.2) und Substanztests (4.2.2.3).

4.2.2.1 Assaycheck

Nach dem Auftauen eines neuen Zellaliquots wurden die Zellen mithilfe eines standardisierten Kontrollansatzes, des Assaychecks, auf ihre Fähigkeit, Herzmuskelzellen zu bilden und auf ihre Sensitivität gegenüber der embryotoxischen Wirkung der Referenzsubstanz 5-Fluorouracil (5-FU) überprüft. Dazu wurde ein Differenzierungsassay mit einer unbehandelten Kontrolle sowie 6 Konzentrationen 5-FU (0,02 bis 0,07 µg/ml in Abständen von 0,01 µg/ml) angesetzt. An Tag 10 wurde in 24-*Well*-Platten die Anzahl der EBs bestimmt, in denen sich Kardiomyozyten differenziert hatten. Aus den Ergebnisse der sieben Platten wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt.

Als Validitätskriterium für die Auswertung wurde festgelegt, dass die unbehandelte Kontrolle mindestens 21 von 24 EBs mit schlagenden Kardiomyozyten enthalten musste, um zu gewährleisten, dass die Zellen ausreichend differenzierungsfähig waren. Die ID_{50} (Halbhemmkonzentration für die Bildung von Herzmuskelzellen) nach Behandlung mit 5-FU musste zwischen 0,04 und 0,07 µg/ml liegen.

Ein valides Ergebnis des Assaychecks diene als hinreichende Bedingung für die Verwendung eines Zellaliquots in den weiteren Experimenten.

4.2.2.2 Expressionsprofile

Um die Genexpression der ausgewählten entwicklungspezifischen Gene möglichst detailliert zu untersuchen, wurden Proben von Zellen an jedem Tag des Differenzierungszeitraumes isoliert. Dies konnte zu Beginn der experimentellen Arbeiten aus labortechnischen Gründen nicht aus einem einzigen Ansatz bewerkstelligt werden. Daher wurden an verschiedenen Tagen Zellen angesetzt, die wiederum zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten isoliert wurden. Aus diesen Proben wurden im Anschluss durchgehende Profile von Tag 1 bis Tag 10 zusammengestellt.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden nochmals Proben aus gemeinsamen Ansätzen fortlaufend isoliert. Die Messungen dieser Proben wurden aus technischen Gründen mit 18S rRNA als Referenzgen durchgeführt, da für dieses Referenzgen die Duplexmessung etabliert war.

Die Größe der Ansätze wurde jeweils so konzipiert, dass Proben der Zellen an jedem Differenzierungstag (Tag 0-10) isoliert werden konnten (Tabelle 4). Besonders für die Isolierung von Proben der frühen Differenzierungsstadien von Tag 1 bis 3 aus Tropfen waren große Mengen an EBs notwendig, da die einzelnen Aggregate noch sehr wenige Zellen enthielten.

Kontrollansätze wurden an Tag 10 unter dem Mikroskop einzeln auf kontrahierende Bereiche mit Kardiomyozyten untersucht und so das Differenzierungspotential der angesetzten Zellen überprüft. Die Expression ausgewählter Gene wurde auf RNA-Ebene quantifiziert und die Veränderung ihrer Expression innerhalb des zehntägigen Differenzierungszeitraums bestimmt (siehe 4.2.3.8).

Tabelle 4: Ansatz der D3-Zellen für die Probenisolierung

Tag	Lysat aus	Anzahl
0 (Ansatz)	Zellkulturschalen	2
1	Schalen mit Tropfen	30
2	Schalen mit Tropfen	20
3	Schalen mit Tropfen	15
4	Suspensionsschälchen	10
5	Suspensionsschälchen	8
6	24-Well-Platten	6
7	24-Well-Platten	1
8	24-Well-Platten	1
9	24-Well-Platten	1

4.2.2.3 Substanztestungen

Die Wirkung der Testsubstanzen auf die Differenzierung der D3-Zellen zu Kardiomyozyten wurde in einem Differenzierungsassay mit verschiedenen Substanzkonzentrationen untersucht, wobei EBs für die Isolierung von RNA an Tag 5, Tag 7 und Tag 10 mitgeführt wurden.

Standardmäßig bestand ein Substanztest aus 8 Konzentrationen: 6 Substanzkonzentrationen sowie 2 Lösungsmittelkontrollen. Eine Lösungsmittelkontrollen wurde zu Beginn des Testansatzes pipettiert (Kontrolle 1), die andere am Ende (Kontrolle 2). Dieses Verfahren stellte sicher, dass keine unspezifischen Effekte auftraten. Die Substanzkonzentrationen wurden standardmäßig in einer Verdünnungsreihe mit der Testsubstanz in D3-Medium angesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Lösungsmittelkonzentration in allen Konzentrationen gleich war

und nicht die festgesetzte Höchstmenge überschritt (Tabelle 5). Die gleiche Konzentration wurde in den Lösungsmittelkontrollen verwendet. Pro Testkonzentration für einen Test mit RNA-Isolierung wurden mindestens 5 Schalen benötigt. Zwei Schalen wurden für die RNA-Isolierung an Tag 5 angesetzt, jeweils eine Schale wurde an Tag 7 und Tag 10 benötigt, und zusätzlich wurde eine Schale für die mikroskopische Auswertung der Differenzierung verwendet. In den höheren Testkonzentrationen wurden jedoch mehr Schalen für die RNA-Isolierung angesetzt, da die EBs erfahrungsgemäß durch zytotoxische Effekte einer Substanz kleiner wurden. Ein Standardassay mit sechs Konzentrationen und zwei Kontrollen bestand daher aus ca. 50 Tropfenplatten an Tag 0.

Tabelle 5: Maximale Konzentrationen der verwendeten Lösungsmittel im Zellkulturmedium, die keinen Effekt auf die Differenzierung der D3-Zellen ausüben.

Höchste Lösungsmittelkonzentrationen [Vol%]	
DMSO	0.25%
Ethanol	0.50%
PBS	1.00%

4.2.2.3.1 Durchführung der Zytotoxizitätstests

Zur Prädiktion des embryotoxischen Potentials innerhalb des EST sind zusätzlich zum ID₅₀-Wert IC₅₀-Werte aus Zytotoxizitätsassays mit D3- und 3T3-Zellen notwendig. Es werden über den Zeitraum von 10 Tagen parallel zum Differenzierungsassay Zellen in 96-Well-Platten mit verschiedenen Substanzkonzentrationen behandelt und abschließend im MTT-Assay die Viabilität gemessen. Aus dieser Konzentrationsreihe wird die IC₅₀ ermittelt.

Die Bestimmung der IC₅₀ mit D3-Zellen ermöglicht einen Vergleich des differenzierungshemmenden mit dem zytotoxischen Konzentrationsbereich einer Substanz. Die Bestimmung der IC₅₀ mit der recht robusten fibroblastoiden Zelllinie 3T3 im MTT-Assay wird als Maß für eine allgemeine Substanztoxizität eingesetzt und lässt eine Abschätzung gegenüber dem embryonalen Modellsystem der D3-Zellen zu.

Tag 0: Aussaat der D3- oder 3T3-Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturmedium in einer Suspension mit 1×10^4 Zellen angesetzt. Je 50 µl der Zellsuspension wurden in die zentralen 8x10 Wells der 96-Well-Platte pipettiert (500 Zellen pro Well). Die äußeren Wells der 96-Well-Platte wurden anschließend mit 200 µl DMEM befüllt. Sie verhinderten ein Austrocknen der zellengefüllten Wells und dienten zur Messung des Hintergrunds in der MTT-Messung (Blanks).

Nach einer zweistündigen Eingewöhnungszeit im Brutschrank, die den Zellen ermöglichte, sich vor der Substanzbehandlung am Boden anzuheften, wurden 150 µl des Mediums mit der entsprechenden Substanzkonzentration oder Kontrollmedium zu den *Wells* gegeben.

Tag 3 und Tag 5: Mediumwechsel

Das Medium aus den mit Zellen belegten *Wells* wurde abgesaugt, wobei darauf geachtet wurde, die Zellschicht am Boden der *Wells* nicht zu beschädigen.

Je *Well* wurden 200 µl der entsprechenden Substanzkonzentration oder des Kontrollmediums zugegeben.

Tag 10: MTT-Messung

In jedes *Well* der 96-*Well*-Platte wurden 20 µl MTT-Lösung zugegeben und anschließend die Platte ca. 2 Std im Brutschrank inkubiert. Das Medium aller *Wells* wurde vorsichtig abgesaugt, wobei darauf geachtet wurde, die Zellschicht am Boden nicht zu beschädigen. Die Platte wurde auf mehreren Lagen Filterpapier ausgeklopft. Zu jedem *Well* wurden 130 µl MTT Desorb zugegeben. Die Platte wurde 15 min auf einem Schüttler geschüttelt, um das blaue MTT-Formazan zu lösen. Die Messung erfolgte mit einem 96-*Well*-Platten Photometer (Mikrotiterplattenreader) bei einer Wellenlänge von 570 nm (OD₅₇₀), die Messdatei wurde mit der Software „SoftMax Pro“ (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) erstellt.

4.2.2.3.2 Auswertung des Zytotoxizitätsassays der D3- und 3T3-Zellen

Die OD₅₇₀ aller „Blank“-*Wells* wurde gemittelt und dieser Wert nachfolgend von den Messwerten aller anderen *Wells* abgezogen (dieser Schritt korrigiert den möglichen Fehler durch eine Adhärenz des MTT-Farbstoffs am Plastikmaterial). Die mittlere OD₅₇₀ der unbehandelten Lösemittelkontrollen wurde bestimmt und gleich 100% gesetzt. Die mittlere OD₅₇₀ der jeweiligen Testkonzentrationen wurde bestimmt und als Zellwachstum in % der Lösemittelkontrolle in einer Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt. Aus der Kurve wurde die Konzentration, bei der eine 50%ige Inhibition des Zellwachstums auftrat (IC₅₀) bestimmt.

4.2.3 Molekularbiologische Arbeiten

4.2.3.1 Lyse der Proben

Die Zellen wurden jeweils in Lysispuffer aufgenommen und zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren. Der Lysispuffer stammte aus dem zur RNA-Isolierung eingesetzten RNeasy-Kit (β -Mercaptoethanol-versetzter RLT-Puffer; Qiagen, Hilden).

4.2.3.2 RNA-Isolierung

Aus den Lysaten wurde die Gesamt-RNA isoliert.

Die RNA-Isolierung aus Kulturen von D3-Zellen erfolgte mithilfe der vorgefertigten Kits QIAshredder und RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers. Mit den im QIAshredder bereitgestellten Säulen wurden die Zellkulturproben aufgeschlossen, um einen maximalen Zugang zur RNA zu gewährleisten. Die Isolierung der RNA von den restlichen Komponenten der Zelle erfolgte mittels RNeasy-Kit. Vor der Elution wurde ein DNase-Verdau (RNase-Free DNase Set, Qiagen) durchgeführt, um zu vermeiden, dass genomische DNA die RNA verunreinigt. Diese kann sonst in anschließenden Anwendungen (TaqMan-PCR) zu falschpositiven Ergebnissen führen. Bei substanzbehandelten Zellen wurde darauf geachtet, genügend Material anzusetzen, um Proben mit ausreichender Gesamt-RNA zu erhalten.

4.2.3.3 Überprüfung der RNA-Qualität mittels Gelelektrophorese

Zur Qualitätsüberprüfung der RNA wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Im RNA-Pool bildet die ribosomale RNA (rRNA) den größten Anteil. Hauptsächlich waren die rRNAs der kleinen und großen Untereinheiten der Ribosomen (18S und 28S rRNA) mit ca. 2 bzw. 5kb als Banden zu sehen. Diese beiden Banden sollten auf jedem Gel deutlich zu erkennen sein und keinen Abbau zeigen.

4.2.3.4 cDNA-Synthese

Eine definierte Menge der isolierten RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Dieser Schritt war notwendig um die Bestimmung der Menge eines *Templates* in einer PCR-Reaktion zu ermöglichen. Da RNA gegenüber DNA sehr leicht abgebaut wird, wurde auf diese Weise gewährleistet, dass die vorhandenen Sequenzen für weitere molekularbiologische Arbeiten stabil erhalten blieb.

Für die Proben der Genexpressionsprofile wurde ein oligo-dT-Primer verwendet, der besonders gut mRNA-Fragmente mit polyA-Schwanz bindet. Dies führte zu einer stärkeren Repräsentation der mRNA in der erstellten cDNA. Sinnvoll war dieser Schritt, da z. T. sehr gering exprimierte Gene untersucht werden sollten.

Für Proben der Substanztests, die mit 18S rRNA als Referenzgen gemessen wurden, wurden *random hexamer*-Primer eingesetzt, die statistisch an jede vorhandene RNA-Sequenz binden.

Je 1 µg der aus den Zellkulturproben extrahierten RNA wurde zur Herstellung von cDNA mittels des TaqMan Reverse Transcription Reagents (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Im Mastermix wurde im geeigneten Puffer ein RNase-Inhibitor, dNTP-Mix und die RNA-abhängige DNA-Polymerase Multiscribe zugegeben.

In den Ansatz wurden 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Alle Komponenten wurden wie folgt zusammenpipettiert: 1x 10x TaqMan RT-Buffer, 5,5 mM MgCl₂, 500 µM dNTP-Mix, 2,5 µM Random Hexamer Primer oder Oligo-dT-Primer, 0,4 U/µl RNase Inhibitor, 1,25 U/µl Multiscribe RT, 1 µg Gesamt-RNA, RNase-freies Wasser ad 25 µl.

Die Reverse Transkriptase wurde als letztes zugegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 25°C, 30 min bei 48°C und 5 min bei 95°C inkubiert.

4.2.3.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die Färbung erfolgte an D3-Zellen, die in Anwesenheit von LIF zwei Tage auf gelatinebeschichteten Objektträgern angezogen wurden.

Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und in 3,7% Formaldehyd-Lösung 10 min fixiert. Nach 2 Waschschritten mit PBS+1% BSA+0,015% Saponin wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper TROMA-1 (monoklonaler IgG (Ratte); 1:100 in PBS+1%BSA+0,015%Saponin) für eine Stunde inkubiert. Auf zwei weitere Waschschrritte folgte die Inkubation mit dem AlexaFluor488-gekoppelten Zweitantikörper (Donkey-anti Rat IgG (H+L), 2 mg/ml 1:1000) für 20 min. Anschließend folgten zwei Waschschrritte und die Kernfärbung mit Hoechstfarbstoff (1:200 in PBS+1% BSA+0,015% Saponin).

4.2.3.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen in Suspension gebracht, einzeln durch eine Kapillare gesaugt und ihre optischen Eigenschaften bestimmt. Folgende Parameter können auf diese Weise bestimmt werden: die Fluoreszenz im roten sowie im grünen Bereich, die Größe und die Granularität (durch die Absorption, bzw. Ablenkung des Lichts durch die Zelle). Es ergibt sich daraus eine Verteilung der Messwerte, anhand derer man Zellpopulationen verschiedener Eigenschaften unterscheiden kann. Diese können durch die Auswahl bestimmter Messregionen statistisch ausgewertet werden.

Die Durchführung der Durchflusszytometrie erfolgte nach einem Protokoll der ZEBET. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert, zur ZEBET transportiert und dort gemessen. Zwei Tage kultivierte Zellen wurden mit PBS/EDTA gewaschen und zur Ablösung mit

Trypsin+DNase behandelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, 2x mit PBS gewaschen und 1x 10^6 Zellen/ml in PBS resuspendiert. Nach Zugabe von einem Volumen 2% Formaldehyd / PBS wurden die Zellen 25 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, um das Formaldehyd vollständig zu entfernen. Zur Färbung mit dem intrazellulären TROMA-I-Antikörper wurden die Zellen mit Saponin-haltigem Puffer weiterbehandelt (PBS+1% BSA+0,015% Saponin). Saponin ist ein Detergenz, das in der Zellmembran reversibel ca. 8 nm große Poren bildet, die bis zu 200 kD große Moleküle, wie z. B. Antikörper (mit etwa 150 kD) passieren können. 2×10^5 Zellen je Ansatz wurden in Saponinpuffer resuspendiert und 1x gewaschen. Die Antikörperfärbungen wurden in 30–50 μ l Volumen Saponinpuffer bei RT durchgeführt. Die Inkubation mit dem TROMA-1-Antikörper erfolgte für 60 min und mit Zweitantikörper für 30 min bei RT. Nach jeder Inkubation wurden die Zellen mit Saponinpuffer gewaschen um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Gemessen wurden 10000 Zellen je Probe. Die Auswertung erfolgte mit der Software Cellquest Pro[®] (Beckton Dickinson)

4.2.3.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion (Mullis und Faloona, 1987) dient zur in vitro Amplifikation von DNA-Sequenzen. Als Primer für die DNA-Synthese werden synthetische Oligonukleotide von ca. 20 nt Länge verwendet, die komplementär zu Anfang und Ende des zu amplifizierenden Bereichs sind. In zyklischen Wiederholungen werden drei Schritte durchlaufen. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA der Probe durch Erhitzen auf 95°C in die Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend wird die Probe auf eine Temperatur abgekühlt, die für die Hybridisierung der Primer an ihrer Zielsequenz optimal ist (Primer-Annealing), so dass für die hitzestabile Polymerase ein doppelsträngiger Startpunkt für die Auffüllreaktion des DNA-Einzelstranges entsteht. Eine Temperaturerhöhung auf 72°C verschafft optimale Bedingungen für die Amplifikation der DNA durch die hitzestabile Polymerase (Elongation). Durch Wiederholung von Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation wird eine exponentielle Vermehrung der Ziel-DNA erreicht. PCR wurde eingesetzt, um die Primer auf Spezifität zu überprüfen.

4.2.3.8 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Mittels qRT-PCR (quantitativer PCR mit vorangestelltem Reversen Transkriptionsschritt (Heid et al., 1996)) kann die relative Menge eines gesuchten Transkripts innerhalb eines aus RNA erstellten cDNA-Pools bestimmt werden. Für diese Arbeiten wurde das TaqMan[®]-System ABI PRISM[®] 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) eingesetzt.

Zur quantitativen Bestimmung von cDNA-Sequenzen wird wie in der herkömmlichen PCR eine gesuchte Sequenz mithilfe von spezifischen Primern von einer Polymerase vermehrt. In der konventionellen RT-PCR werden die Transkriptmengen verschiedener Proben verglichen, indem die PCR-Reaktion innerhalb der exponentiellen Phase nach einer definierten Anzahl von Amplifikationszyklen gestoppt wird und die Stärke der Amplikon-Banden auf einem Gel verglichen wird. Beim in dieser Arbeit angewendeten TaqMan-System wird dagegen ein weiteres Oligonukleotid, die Sonde, eingesetzt, die den exponentiellen Anstieg der Amplikonmenge während der PCR-Reaktion sichtbar macht. Die Sonde trägt am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter (z.B. FAM, VIC), dessen Emission durch einen Quencher (z.B. TAMRA) am 3'-Ende verhindert wird. Sie bindet an eine Sequenz auf der Template-DNA zwischen *forward*- und *reverse*-Primer. Wenn die DNA-Polymerase das PCR-Produkt synthetisiert, hydrolysiert sie aufgrund ihrer 5'-Exo-Nuklease-Aktivität die Sonde. Durch die nun eintretende räumliche Trennung vom Quencher wird die Fluoreszenz des Reporters detektierbar. Im optimalen Fall wird bei jeder Bildung eines PCR-Produkts genau ein Sondenmolekül gespalten, so dass der Anstieg der Fluoreszenz proportional der Produktzunahme verläuft. Die Fluoreszenz wird bei jedem PCR-Zyklus gemessen und anschließend als Kurve dargestellt.

C_T-Wert-Bestimmung

Aus der Kurve wird als Ergebnis der Messung für jede Probe der C_T-Wert bestimmt. Dieser Wert benennt die Anzahl der PCR-Zyklen, nach denen die Fluoreszenz einer Probe einen Schwellenwert übersteigt (*Cycle of Threshold*; C_T). Die Anzahl ist geringer, wenn bereits zu Beginn viele Kopien eines Transkripts in der Probe enthalten sind. Ist ein Transkript nur sehr schwach repräsentiert, sind mehr Amplifikationszyklen notwendig, bis die Fluoreszenz den Schwellenwert erreicht (bei einer Halbierung der Transkriptmenge in der Probe tritt eine Erhöhung des C_T-Werts um 1 auf, da ein Verdopplungszyklus mehr benötigt wird). In anschließenden Berechnungen muss darauf geachtet werden, dass es sich beim C_T-Wert um einen Exponenten handelt.

4.2.3.8.1 Referenzgene

Da eine Veränderung des Fluoreszenzsignals nicht nur mit der in den Zellen vorhandenen Menge des Zielgens in Zusammenhang steht, sondern auch mit der eingesetzten Menge an cDNA schwankt, ist es notwendig, die RNA-Menge auf ein unverändert auftretendes Referenzgen zu beziehen (zu normalisieren).

Als Referenzgen für die Expressionsprofile wurde ein Gen benötigt, das im gesamten Differenzierungszeitraum mit gleicher Stärke exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde in den ersten Experimenten das *housekeeping*-Gen Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, in späteren Versuchen wurde 18S ribosomale RNA (18S rRNA) gewählt. In den Substanztests wurde ausschließlich 18S rRNA eingesetzt.

4.2.3.8.2 Auswahl von Primern und Sonden der Zielgene

Die kodierende Sequenz des gewünschten Gens wurde mithilfe der Online-Datenbank PubMed Nucleotide ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>). Sequenzen geeigneter Primer und Sonden wurden mit dem Programm Primer Express[®] 1.0 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) erstellt.

Eine geeignete Sonde sollte möglichst nicht länger als 30 Basen sein, mehr Cs als Gs enthalten, möglichst wenig doppelte Nukleotide aufweisen und keine an den Enden, sowie eine berechnete Schmelztemperatur von 70°C oder 69°C haben. Geeignete Primer sollten eine Länge von ca. 20 Basen, jedoch nicht weniger als 18 aufweisen und die Summe von C+G in den letzten 5 Basen sollte kleiner 2 sein. Der Zwischenraum zwischen Primerende und Bindungssequenz der Sonde sollte möglichst gering sein (keinesfalls >50 bp). Die Schmelztemperatur T_M sollte 60°C oder 59°C betragen (10°C weniger als die Sonde). Das gesamte Transkript sollte unter 300 Basen aufweisen.

Es wurden Primer und Sonden für die in 4.1.10 aufgeführten Gene ausgewählt, die möglichst viele dieser Kriterien realisierten.

4.2.3.8.3 Primer- und Sonden-Optimierung

Die Primer wurden vor Bestellung der Sonde in einer herkömmlichen PCR getestet. Dabei wurde überprüft, ob in der anschließenden Gelelektrophorese das Amplikon als klare Bande der erwarteten Größe auftauchte und ausgeschlossen, dass störende Banden anderer Größe zu finden waren. Die getesteten Primerkonzentrationen waren standardmäßig 300, 600 und 900 nM Primer. Die optimale Konzentration der Sonde wurde in einer TaqMan-RT-PCR mit der zuvor ermittelten Primerkonzentration im Bereich von 50-300 nM bestimmt. Die optimale Sondenkonzentration ist vom Fluoreszenzhintergrund sowie der Primer-Konzentration abhängig. Es wurde überprüft, ob ein klares Fluoreszenzsignal vorhanden war, und mit der Konzentration weitergearbeitet, die bei steilem Kurvenverlauf den kleinsten C_T -Wert ergab.

4.2.3.8.4 Erstellung der Genexpressionsprofile

Die Genexpressionsstudien wurden an Proben unbehandelter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung durchgeführt, die jeweils aus mehreren EBs gepoolt wurden. Da sich innerhalb von *Embryoid Bodies* (EBs) verschiedene Zelltypen differenzieren, wurde mit dieser Methode keine einheitliche Zellpopulation untersucht, sondern eine Mischung von in unterschiedlichen Entwicklungswegen und -stadien befindlichen Zellen. Genspezifische Primer und Sonden dienten dazu, Teilpopulationen mit ähnlichem Differenzierungsweg zu untersuchen.

Für jedes Primer- und Sonden-Set wurde eine Verdünnungsreihe gemessen und die Steigung mit der von GAPDH verglichen (Steigungvergleich). Dadurch wurde sichergestellt, dass Ziel- und Referenzgen eine vergleichbare Amplifikationseffizienz besaßen. Konnte dies gewährleistet werden, erfolgten die Messungen der Expressionsprofile.

Die Messung der Genexpressionsprofile wurden im Singleplex-Verfahren durchgeführt, bei dem ein Gen pro *Well* gemessen wurde. In jeder Probe wurde die relative Menge an Ziel- und Referenzgen in Doppelwerten bestimmt.

Die Auswertung der Genexpressionsprofile erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Bei dieser Methode werden die Differenzen der C_T -Werte von Ziel- und Referenzgen berechnet (ΔC_T) und diese auf den Wert der in undifferenzierten D3-Zellen an Tag 0 bezogen ($\Delta\Delta C_T$). Anschließend erfolgt die Delogarithmierung der Daten. Der Verlauf der Expression eines Gens über die Zeit wurde als Profil dargestellt.

4.2.3.8.5 Erstellung der Konzentrationswirkungskurven

Konzentrationswirkungskurven wurden aus substanzbehandelten Proben des jeweils gleichen Differenzierungstages erstellt (Tag 5 für die Messung von MesP1, Tag 7 und 10 für die Messung von MLC1). Die Messung der Genexpression mittels TaqMan-PCR wurde in Dreifachwerten gegenüber 18S rRNA als Referenzgen durchgeführt. In jedem *Well* der 96-*Well*-Platte wurde die Expression des Ziel- und des Referenzgens gleichermassen bestimmt (Duplex-Verfahren). Dazu wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierte Sonden eingesetzt. Für die Messung von 18S rRNA wurde ein kommerziell erhältliches Kit (PDARs, siehe 4.1.11) eingesetzt, das eine VIC-markierte Sonde enthielt. Die Sonden der Zielgene waren durchgehend FAM-markiert. Das Duplex-Verfahren minimiert den Fehler, der durch das Pipettieren der Proben eingebracht wird.

GAPDH wurde als Referenzgen nicht verwendet, da nicht auszuschließen war, dass es unter Einfluss von Substanzen zu Veränderungen der GAPDH-Expression kommen kann (Bustin,

2000). 18S rRNA ist ein weit verbreitetes Referenzgen, das sich in sehr vielen Situationen als stabil erwiesen hat (Schmittgen und Zakrajsek, 2000).

In jedem Lauf wurde eine Standardkurve mitgeführt, mittels derer für jedes Gen die Amplifikationseffizienz bestimmt wurde. Bei halblogarithmischer Darstellung entspricht eine negativen Steigung von ca. 3,3219 einer 100%igen Effizienz. Die Effizienz E kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$E = (10^{-1/y} - 1) * 100$$

wobei y die Steigung der Standardkurve ist.

Als Validitätskriterium für die Auswertung wurde festgelegt, dass die aus der Standardkurve berechnete Effizienz der Genamplifikation beider Gene zwischen 80-120% liegen musste.

Zur Auswertung wurden die gemessenen C_T-Werte jedes Gens mithilfe der Steigung der Standardkurve in relative Einheiten umgerechnet. Aus diesen wurde jeweils das Verhältnis zwischen Ziel- und Referenzgen gebildet (Normalisierung mit 18S rRNA). Anschließend wurden die Werte auf den Mittelwert der beiden Kontrollproben bezogen.

Für einen Ansatz mit 25 µl wurden folgende Komponenten pipettiert: 12.5 µl 2x MasterMix (Eurogentec), 0.3 µl Zielgen-Primer *fw* und *rev* (50 µM), 0.05 µl Zielgen-Sonde (50 µM), 1.25 µl 18S rRNA PDAR-Mix (20fach), 9.9 µl H₂O und 1 µl cDNA.

4.2.4 Bestimmung des embryotoxischen Potentials mittels Prädiktionsmodell

Für die Einschätzung des embryotoxischen Potentials von Substanzen mit dem EST wurde das in der Validierungsstudie erstellte mathematisches Prädiktionsmodell (iPM; *improved prediction model*) herangezogen (Genschow et al., 2002).

Das iPM besteht aus einer linearen Diskriminanzanalyse mit drei Differentialgleichungen (Tabelle 6). Die drei darin verwendeten Variablen sind die ID₅₀ der D3-Zellen (Halbhemmkonzentration der mikroskopische Auswertung der Kardiomyozytendifferenzierung an Tag 10), sowie zwei Zytotoxizitätsparameter, die im MTT-Assay bestimmt werden: IC₅₀_{3T3} mit 3T3-Zellen und IC₅₀_{D3} mit D3-Zellen. Durch die Verwendung der differenzierten Zelllinie 3T3 wird innerhalb des EST ein Korrektiv für allgemeine Toxizität eingeführt.

Die in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen für eine 50%ige Hemmung der Markergenexpression als molekulare Endpunkte (IC₅₀_{Exp}) wurden wie die ID₅₀-Werte der mikroskopischen Auswertung als Halbhemmkonzentrationen der Differenzierung eingesetzt. Für eine Klassifizierung der Substanzen, für die keine eigenen MTT-Assays durchgeführt wurden,

wurden historische Daten der ZEBET herangezogen (Biometrischer Abschlussbericht, 2004, mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Seiler).

Das iPM erfasst Werte bis 1000 µg/ml, höhere Werte werden gleich 1000 gesetzt. Die Lösungen der drei Gleichungen werden miteinander verglichen. Die Gleichung, deren Lösung den höchsten Wert hat, gibt die Embryotoxizitätsklasse an. Dabei gilt folgende Zuordnung: Klasse I: nicht embryotoxisch, Klasse II: schwach embryotoxisch, Klasse III: stark embryotoxisch.

Tabelle 6 Differentialgleichungen des mathematisches Prädiktionsmodells (iPM) zur Klassifizierung von Substanzen mit dem EST

Klasse I	$5.92 \cdot \log(\text{IC}_{50\ 3\text{T}3}) + 3.5 \cdot \log(\text{IC}_{50\text{D}3}) - 5,31 \cdot ((\text{IC}_{503\text{T}3} - \text{ID}_{50}) / \text{IC}_{503\text{T}3}) - 15.7$
Klasse II	$3.65 \cdot \log(\text{IC}_{50\ 3\text{T}3}) + 2.39 \cdot \log(\text{IC}_{50\text{D}3}) - 2.03 \cdot ((\text{IC}_{503\text{T}3} - \text{ID}_{50}) / \text{IC}_{503\text{T}3}) - 6.85$
Klasse III	$(-0.125) \cdot \log(\text{IC}_{50\ 3\text{T}3}) - 1.92 \cdot \log(\text{IC}_{50\text{D}3}) + 1.5 \cdot ((\text{IC}_{503\text{T}3} - \text{ID}_{50}) / \text{IC}_{503\text{T}3}) - 2.67$

4.2.5 Biostatistik

Ein Vergleich der Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung mit den molekularen Markern erfolgte mit dem Friedman-Test. Bei diesem Test handelt es sich um eine nicht-parametrische, rangbasierte Varianzanalyse für wiederholte Messungen, mit der der Einfluss unterschiedlicher Bedingungen (hier: Messmethoden) auf verschiedene Individuen (hier: Substanztestungen) abgeschätzt werden kann.

Aufgrund der niedrigen Anzahl von Wiederholungen mit jeder Substanz (n=3; bei Y27632 n=4) war es nicht zweckmäßig, die Ergebnisse jeder Substanz einzeln zu vergleichen.

Für die gemeinsame Auswertung mehrerer Substanzen konnte jedoch kein mittelwertbasiertes Testverfahren angewendet werden, da die Ergebnisse in verschiedenen Größenordnungen lagen und keiner Normalverteilung entsprachen. Daher wurde mit dem Friedman-Test ein Verfahren gewählt, das folgende Vorteile bot: 1.) Die Ergebnisse mussten nicht normalverteilt sein, 2.) durch die Vergabe von Rängen konnten Ergebnisse unterschiedlicher Größenordnung einbezogen werden, und 3.) es konnten auch Substanztests einbezogen werden, in denen einer der Endpunkte innerhalb des Messbereichs oberhalb der 50%-Grenze blieb.

Jedem der vier Ergebnisse eines Substanztests wurde nach seiner Höhe ein Rang zugeordnet. Ausgeschlossen wurden Tests, bei denen eine Rangvergabe nicht eindeutig war (z.B. mehr als ein Wert oberhalb des Messbereichs oder ein nicht valides Ergebnis bei mind. einem Endpunkt). Alle Substanztests, in denen allen vier Endpunkten Ränge zugeordnet werden konnten (21 der 40 Experimente), wurden herangezogen. Die Rangsummen, die sich für die einzelnen Tests ergaben

wurden ausgewertet. Die Analyse wurde mit dem Programm SigmaStat 3.00 (SPSS Inc., Chicago,USA) durchgeführt.