

5 Ergebnisse

5.1 *In-vitro*-Kultivierung und Differenzierung von D3-Zellen

Für Experimente zur Zelldifferenzierung war als Ausgangsmaterial eine gleich bleibend differenzierungsfähige Zellkultur notwendig. Murine embryonale Stammzellen der Linie D3 (Doetschman et al., 1985) wurden in Anwesenheit des differenzierungsinhibierenden Faktors LIF (*Leukaemia inhibitory factor*) im undifferenzierten Zustand gehalten (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988).

Die D3-Zellen wuchsen adhärent in Clustern, deren Zellen eine heterogene Morphologie aufwiesen (Abbildung 3). Im Zentrum eines Clusters befanden sich undifferenzierte Zellen mit geringem Cytoplasmavolumen und ohne lichtmikroskopisch sichtbare Fortsätze. Am Rand und zwischen den Clustern waren Zellen sichtbar, die ein größeres Cytoplasmavolumen besaßen und Fortsätze ausgebildet hatten. Dieses Bild entsprach der typischen variablen Morphologie embryonaler Stammzellkulturen. Die Zellmorphologie wurde routinemäßig bei jeder Passage unter dem Mikroskop auf Veränderungen kontrolliert.

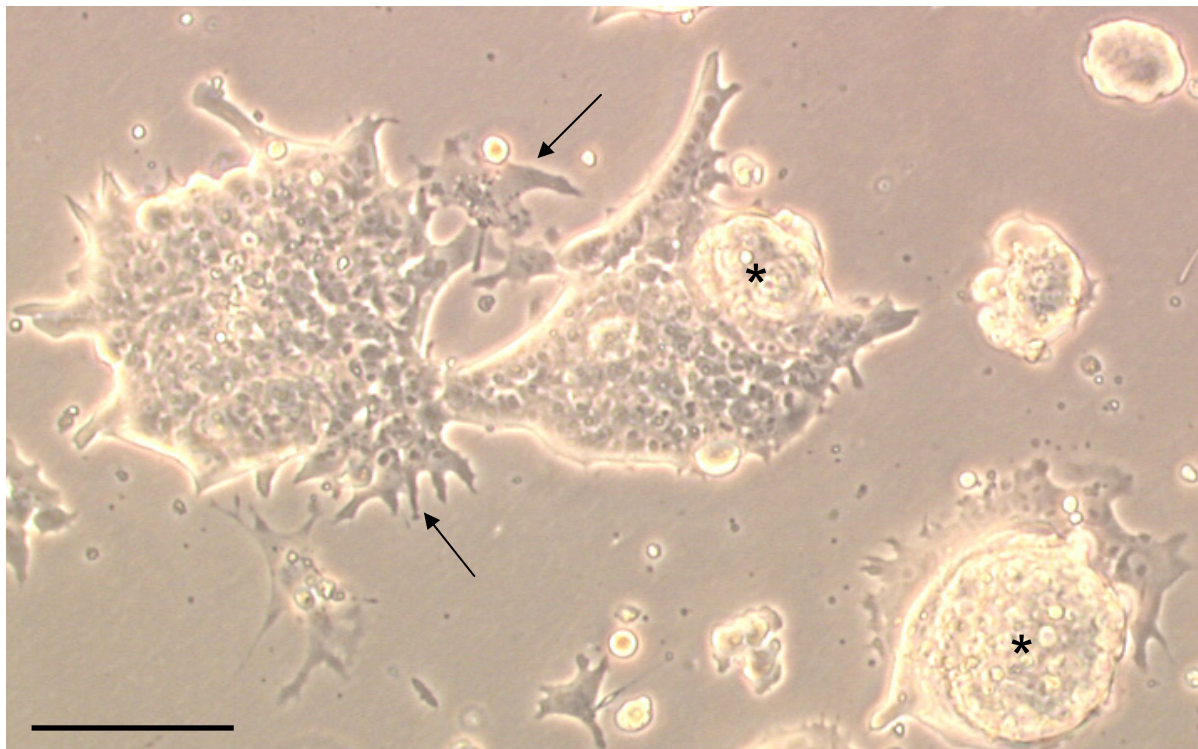


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme typischer undifferenzierter D3-Zellen.

D3-Zellen wachsen in Clustern, in deren zentralem Teil dichtgepackte undifferenzierte Zellen zu sehen sind (Sternchen), während sich am Rand z. T. Zellen befinden, die Fortsätze ausbilden (Pfeile) und deren Morphologie sich verändert hat. Der Balken entspricht 100µm.

5.1.1 Kontrolle der Differenzierungsfähigkeit

Die morphologische Differenzierungsfähigkeit zu Kardiomyozyten bildete die Grundlage der Arbeiten mit den ES-Zellen und wurde daher gründlich kontrolliert. Die Ergebnisse standardisierter Kontrollansätze mit 5-Fluorouracil (5-FU, Assaychecks; siehe 4.2.2.1) zeigten, dass die Fähigkeit der D3-Zellen, Herzmuskelzellen zu bilden, sowie ihre Sensitivität gegenüber embryotoxischen Substanzen reproduzierbar gegeben waren. In Abbildung 4 sind die Ergebnisse von vier Assaychecks dargestellt, bei denen auch MTT-Tests (4.2.2.3.1) mitgeführt wurden.

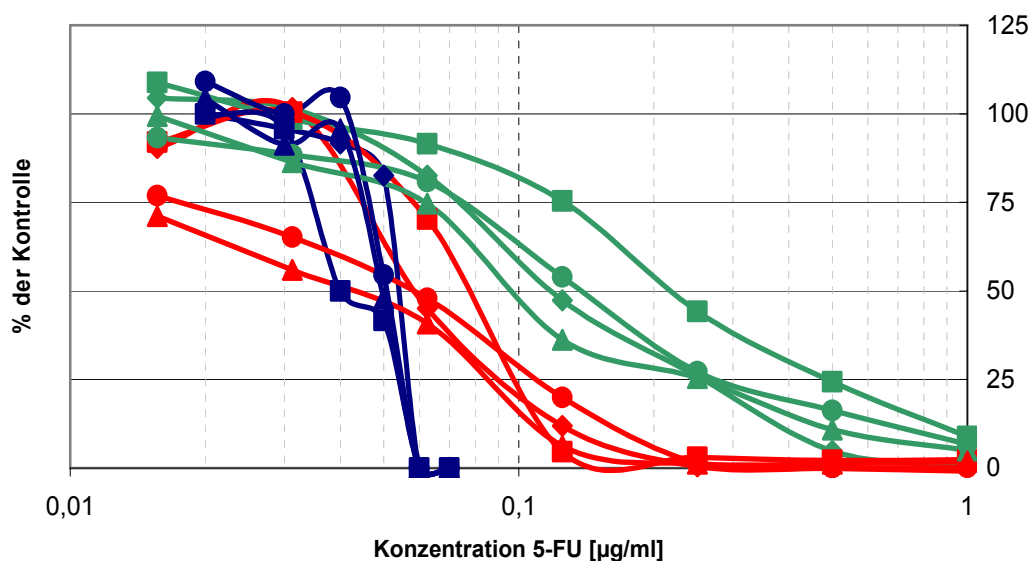


Abbildung 4: Repräsentative Ergebnisse von vier Assaychecks (AC).

Blau: mikroskopische Auswertung des Differenzierungsassays, rot: MTT-Messung der D3-Zellen; grün: MTT-Messung der 3T3-Zellen. Raute: ACa, Quadrat: ACb, Kreis: ACc, Dreieck: ACd

Oft wurde jedoch auf die Mitführung von MTT-Assays verzichtet, da die Differenzierungsfähigkeit der D3-Zellen und deren Hemmung durch embryotoxische Substanzen die wichtigsten Kriterien darstellten. Die Assaychecks unterscheiden sich von den in Abschnitt 5.3.3.1 gezeigten Substanztestungen mit 5-FU, da hier keine RNA-Isolierung durchgeführt wurde und daher nur 7 Tropfenplatten angesetzt werden mussten.

Die ID₅₀-Werte der Assaychecks lagen bei Behandlung mit der Referenzsubstanz 5-FU zwischen 0,03 und 0,07 µg/ml 5-FU (Daten nicht gezeigt).

5.1.2 Nachweis des differenzierungsspezifischen Markers TROMA-1

Ein Auftreten differenzierter Zellen wurde auf der Ebene der Proteinexpression durch Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie mit dem differenzierungsspezifischen Antikörper TROMA-1 dargestellt, da TROMA-1 das Cytokeratin K8 erkennt, das in Zellen des

Trophektoderms und zu einem frühen Zeitpunkt in Zellen des primitiven Endoderms exprimiert wird (Kemler et al., 1981).

5.1.2.1 TROMA-1-Expression in der Immunfluoreszenz

Nur ein geringer Anteil der D3-Zellen zeigte in der Immunfluoreszenzfärbung eine Immunreaktion gegen TROMA-1 (Abbildung 5). Dabei war deutlich zu erkennen, dass häufig solche Zellen, die morphologische Veränderungen gegenüber typischen undifferenzierten Zellen aufwiesen, eine TROMA-1-Färbung zeigten (Abbildung 5C und D). TROMA-1-positive Zellen wiesen vermehrt Zellfortsätze auf und besaßen ein größeres Zytoplasmavolumen als die ungefärbten Zellen. In Abbildung 5A ist ein Ausschnitt gezeigt, in dem einige Zellen in nahezu regelmäßiger Weise zum Rande eines Zellclusters eine TROMA-1-positive Färbung zeigen.

Die Immunfluoreszenzpräparate zeigten, dass der Anteil an differenzierten Zellen gering war.

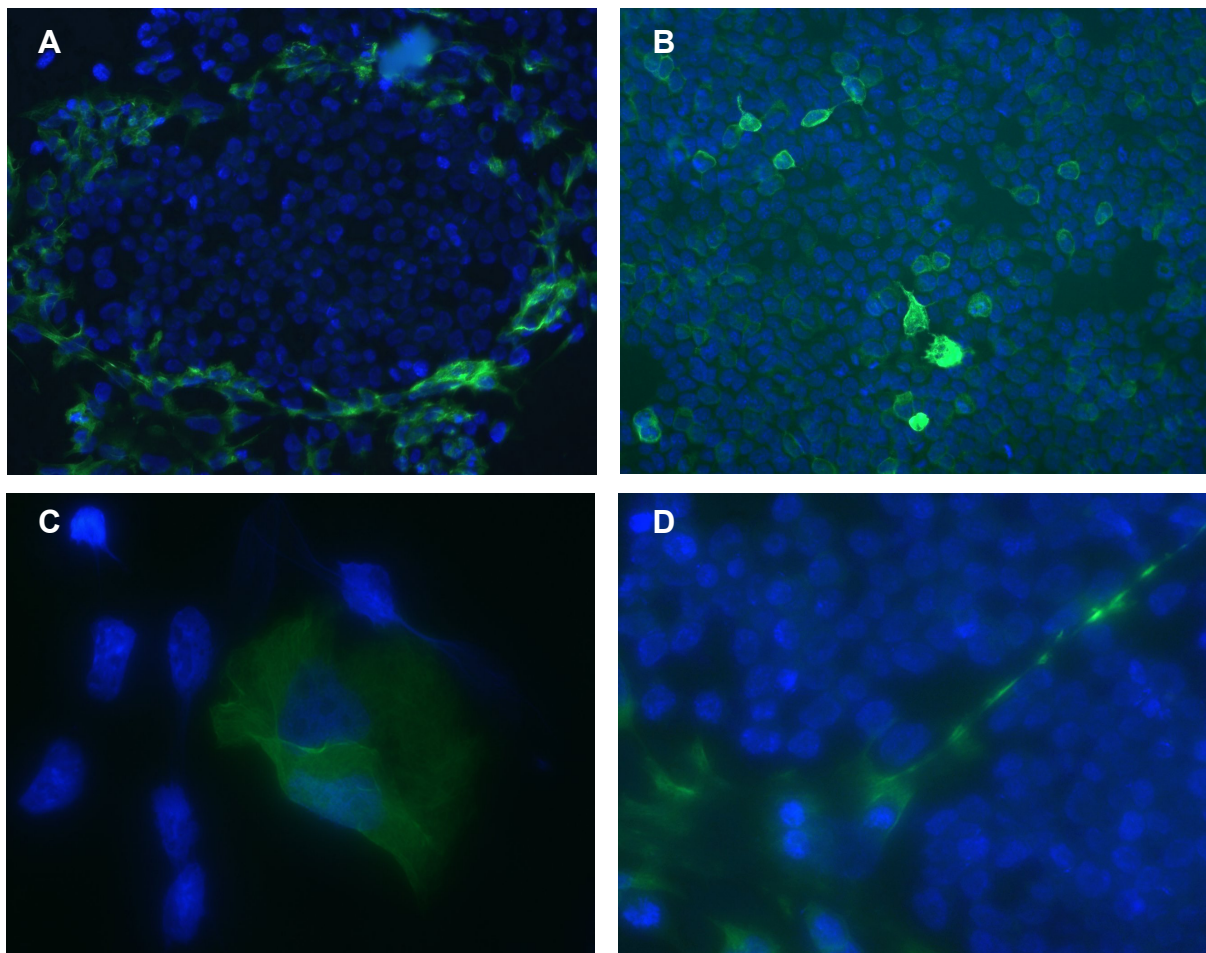


Abbildung 5: Expression von Cytokeratin K8 (TROMA-1-positiv) in undifferenzierten D3-Zellen.

Blau: Zellkerne (Hoechst); grün: Immunreaktion gegen TROMA-1. A, B: 100x Vergrößerung; A: Differenzierende Zellen (TROMA-1-positiv) am Rande eines undifferenzierten Clusters B: Einzelne TROMA-1-positive Zellen innerhalb einer Population von D3-Zellen C: TROMA-1-positive Zelle mit ausgeprägtem Cytokeratingeflecht (400x Vergr.) Die Zelle hat sich durch den Färbungsprozess teilweise abgelöst. D: TROMA-1-positive Zelle mit deutlich veränderter Zellmorphologie (200x Vergr.)

5.1.2.2 Analyse der TROMA-1-Expression mittels Durchflusszytometrie

Der Nachweis der TROMA-1-Expression mittels Durchflusszytometrie wurde mit zwei verschiedenen Chargen von D3-Zellen durchgeführt: D3-ZEBET, zur Verfügung gestellt von der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), und D3-ATCC, bezogen von der American-Type Cell Culture-Zellbank (ATCC).

In Abbildung 6 ist ein repräsentatives Beispiel einer TROMA-1-Messung als Histogramm dargestellt. Zur Darstellung der Eigenfluoreszenz der Zellen und des Hintergrunds des Zweitantikörpers dient die Kontrolle (blau) in der das Färbeprotokoll ohne ersten Antikörper durchgeführt wurde. Die Detektion der TROMA-1-positiven Zellen erfolgte mit erstem Antikörper (dargestellt mit roter Linie). Im rechten Bereich der Kurve tritt eine Erhöhung auf, die stark fluoreszierende Zellen darstellt, die nicht in der Kontrolle vorhanden sind. Es ist außerdem zu sehen, dass die Zugabe des ersten Antikörpers eine Erhöhung der Fluoreszenz der Gesamtzellpopulation hervorruft, die durch die Rechtsverschiebung des Kurvenmaximums gekennzeichnet ist.

Die Darstellung der Zellen über die Parameter Größe und Fluoreszenz (Abbildung 7) zeigt die TROMA-1-positive Population als getrennte Wolke. Die Messregion wurde so gewählt, dass die im Histogramm erkennbare Population von Zellen mit starker Fluoreszenz quantifiziert werden konnte.

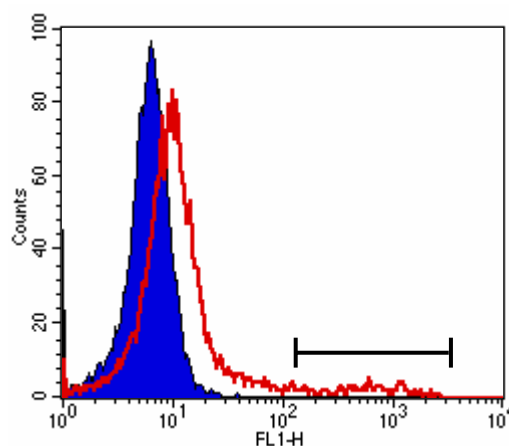


Abbildung 6: Histogramme der Fluoreszenzintensitäten einer repräsentativen Kontrolle ohne TROMA-1-Antikörper sowie der zugehörigen TROMA-1-gefärbten Probe in der Durchflusszytometrie.

x-Achse: Fluoreszenzintensität bei 488nm (grün) (FL1-H), ; y-Achse: Anzahl der Zellen (Counts). Ausgefüllt blau: Kontrolle nur mit zweitem Antikörper; rot umrandet: TROMA-1-gefärbte Probe; Balken: Bereich der TROMA-1-positiven Zellen, der für die Quantifizierung herangezogen wurde.

In der TROMA-1-gefärbten Probe ist neben dem schwach fluoreszierenden Hauptpeak eine kleine Population stark fluoreszierender Zellen zu erkennen. Im Vergleich zur Kontrolle bewirkte die Zugabe des ersten Antikörpers eine Verschiebung des Fluoreszenz-Maximums nach rechts.

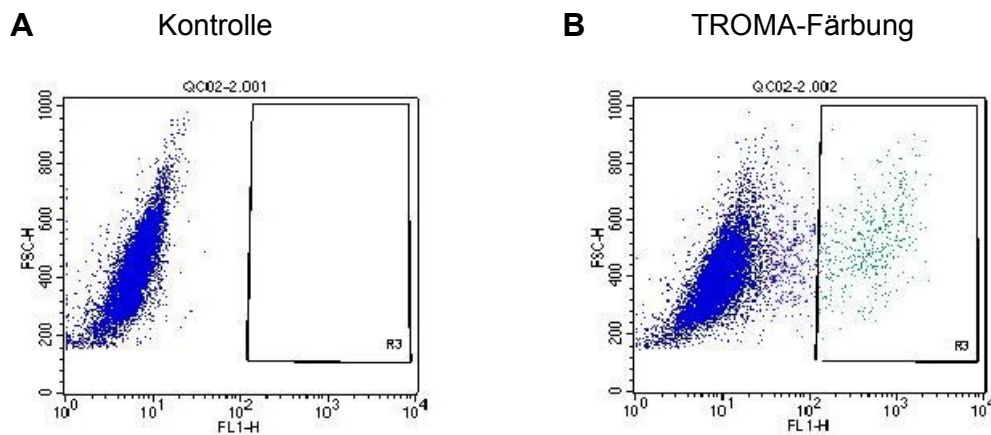


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analyse von D3-Zellen nach Färbung mit TROMA-1.

x-Achse: Fluoreszenzintensität bei 488nm (FL1-H); y-Achse: Größe der Zellen (FSC-H). **A:** Kontrolle ohne ersten, nur mit zweitem Antikörper **B:** Färbung mit TROMA-1 als erstem Antikörper und AlexaFluor488-konjugiertem Zweitantikörper. Als relevante Antikörperfärbung wurde Region R3 ausgewählt, da diese Zellen eine abgetrennte Population mit starker Fluoreszenz bildeten (grün dargestellt; vergleiche auch Balken in Abbildung 6).

Für standardmäßig passagierte Zellen ergab sich ein Gehalt TROMA-1-positiver Zellen zwischen 0,4 und 5,3 %.

Die Messwerte umfassten 14 Passagen nach dem Auftauen der Zellen. Dabei konnte keine Korrelation zwischen der Passagenanzahl und dem Anteil TROMA-1-positiver Zellen in der Zellkultur festgestellt werden. Durch dieses Ergebnis wurde bestätigt, dass die D3-Zellkultur keinen allmählichen Differenzierungsvorgängen unterlag, so dass die Zellen in den folgenden Versuchen eingesetzt werden konnten.

Die zwei getesteten D3-Zellchargen enthielten einen unterschiedlichen Gehalt an TROMA-1 positiven Zellen. Dieser lag bei D3-ATCC höher als bei D3-ZEBET (siehe Abbildung 8). Alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit Zellen der Charge D3-ZEBET durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob durch die Differenzierung der Zellen Veränderungen im Anteil TROMA-1-positiver Zellen auftreten, wurden D3-ZEBET-Zellen ohne LIF kultiviert und nach zwei bzw. fünf Tagen gemessen. In Abbildung 9 sind die Werte eines Einzelexperiments gezeigt. Nach fünf Tagen war die Anzahl TROMA-1-positiver Zellen deutlich angestiegen, während nach zwei Tagen noch keine Erhöhung zu beobachten war.

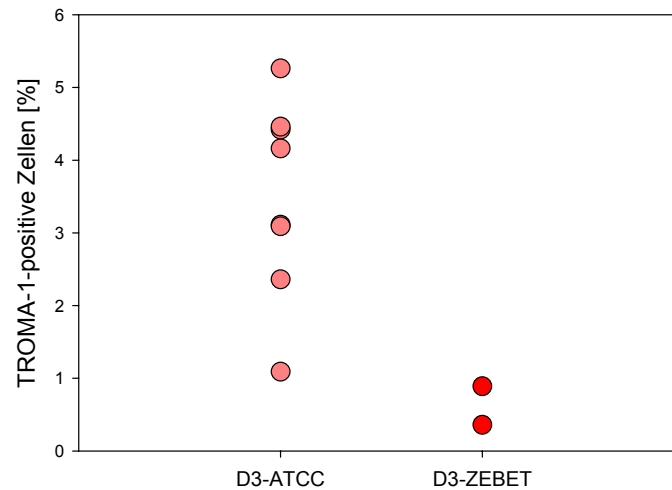


Abbildung 8: Anteil TROMA-1-positiver Zellen der zwei untersuchten D3-Zellchargen.

Dargestellt sind die Ergebnisse von durchflusszytometrischen Messungen nach Färbung mit TROMA-1 (zweiter Antikörper mit AlexaFluor488-konjugiert) mit Zellen der beiden D3-Zellchargen D3-ATCC und D3 ZEBET. rosa: D3-ATCC rot: D3-ZEBET. n=8 für D3-ATCC; n=2 für D3-ZEBET.

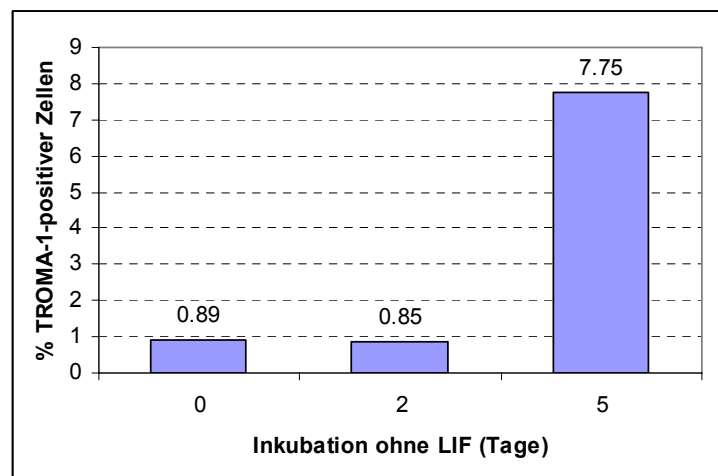


Abbildung 9: Veränderung des Anteils TROMA-1-positiver Zellen ohne LIF.

D3-Zellen der Charge D3-ZEBET wurden in Medium ohne LIF für die angegebenen Zeiträume inkubiert und anschließend aufgearbeitet. Nach Färbung mit TROMA-1 und AlexaFluor488-konjugiertem Zweitantikörper wurde der Gehalt TROMA-1-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

5.2 Untersuchungen zur Expression ausgewählter Entwicklungsgene während der ES-Zelldifferenzierung

Die Expression der ausgewählten Gene wurde mittels TaqMan-PCR in Proben bestimmt, die im täglichen Abstand aus unbehandelten D3-Zellen während der zehntägigen Entwicklung isoliert wurden. Ein Überblick über die gemessenen Gene findet sich in Tabelle 3 (Seite 19). Es wurden jeweils TaqMan-Messungen im Singleplex- oder Duplexverfahren mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Gezeigt werden in den folgenden Graphiken jeweils die Mittelwerte aus repräsentativen Einzelexperimenten.

5.2.1 Expression von Komponenten des kontraktile Apparates

5.2.1.1 Kardiales α -Actin

In den drei Einzelexperimenten wurde übereinstimmend ein Anstieg der α -Actin-Expression von Tag 0 bis Tag 10 gefunden. Der Anstieg der α -Actin-Expression erfolgte relativ gleichmäßig vom undifferenzierten Zustand über die EB-Bildung bis zur Differenzierung kontrahierender Kardiomyozyten. In Differenzierungszeitraum erhöhte sich die in der TaqMan-PCR gemessene Menge an α -Actin-Transkripten in der cDNA um mehr als Faktor 1000 (Abbildung 10).

5.2.1.2 Myosin heavy chain (MHC)-Gene

Die Expression von kardialem α -MHC stieg ab Tag 6-8 an und erreichte an Tag 8 ein Plateau (Abbildung 11). Am Ende der zehntägigen Differenzierung resultierte eine mehr als 1000fache Expressionssteigerung von α -MHC.

Zwischen Tag 0 und Tag 3, in der Phase, in der die ES-Zellen Zellaggregate in den hängenden Tropfen bilden, konnte in einigen Proben keine Expression bestimmt werden. In einer Probe von Tag 2 und in allen Proben von Tag 3 ließ sich keine Transkription von α -MHC nachweisen, während an den Tagen 0 und 1 ein niedriger Wert gemessen werden konnte. Die Expression von β -MHC zeigte in den ersten Tagen der Entwicklung in einem Fall einen leichten Abfall, in einer zweiten Kurve konnte ein Wert an Tag 4 nicht bestimmt werden (unterhalb der Nachweisgrenze). Ein deutlicher Anstieg über die Expression in undifferenzierten Zellen begann ab Tag 6-7 (Abbildung 12) und führte zu einer Erhöhung der Genexpression um Faktor 10000 (α -MHC) oder ca. 1000 (β -MHC) gegenüber undifferenzierten Zellen. Der starke Anstieg der Expression erfolgte zwischen Tag 7 und 10, in einem Fall zwischen Tag 5 und 7 (Experiment 3). Dies liegt in der Phase, in der die EBs auf der Oberfläche von Zellkulturschalen anwachsen konnten.

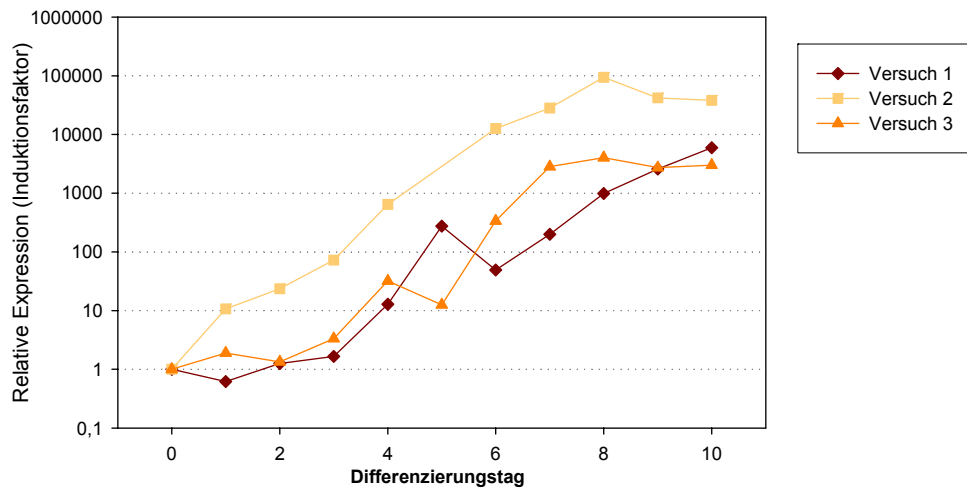


Abbildung 10: Expression von α -Actin während der D3-Zelldifferenzierung.

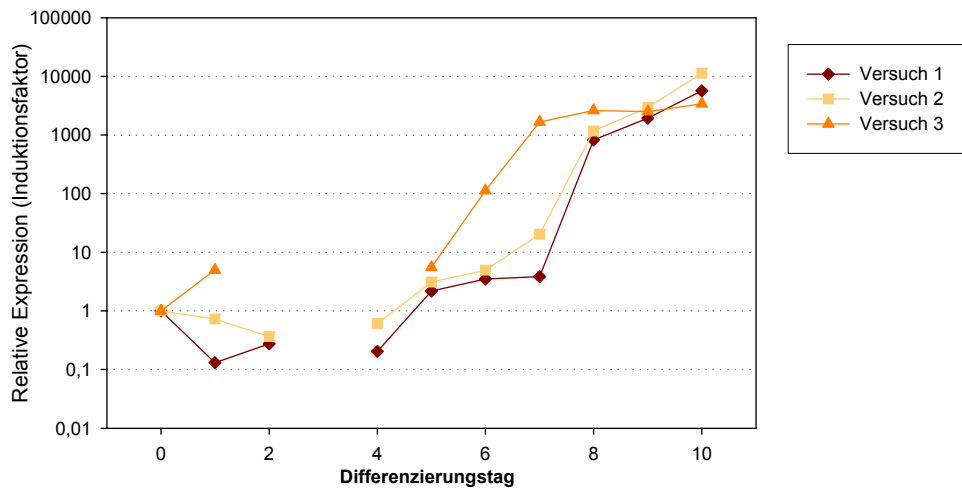


Abbildung 11: Expression von kardialem α -MHC während der D3-Zelldifferenzierung.
An Tag 2 und Tag 3 konnte in mehreren Proben keine Expression nachgewiesen werden.

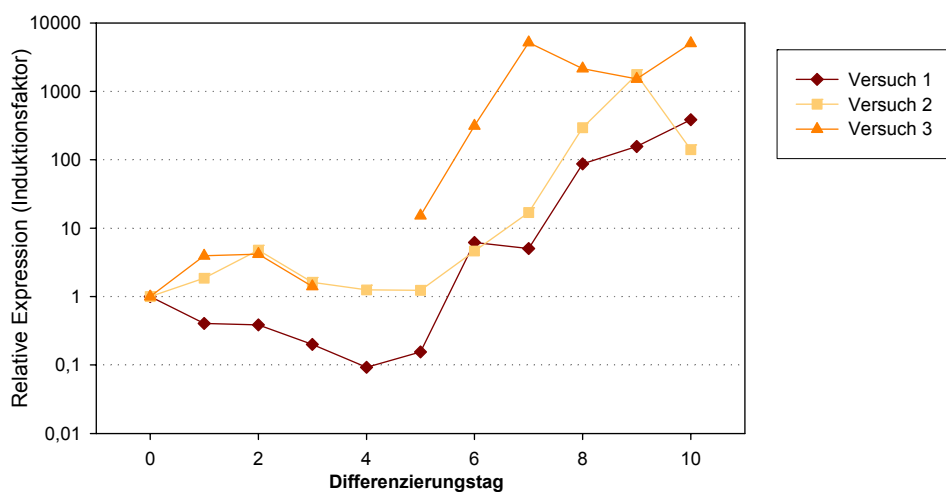


Abbildung 12: Expression von kardialem β -MHC während der D3-Zelldifferenzierung.
In Experiment 3 konnte in der Probe von Tag 3 keine Expression nachgewiesen werden.

Abbildung 10-12: Dargestellt sind jeweils drei Einzelexperimente, wobei die Punkte Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

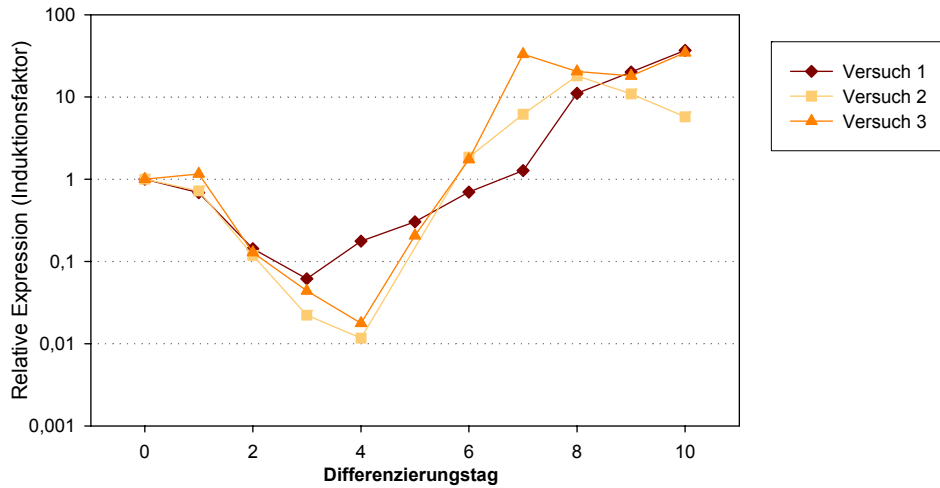


Abbildung 13: Expression von MLC1 während der D3-Zelldifferenzierung.

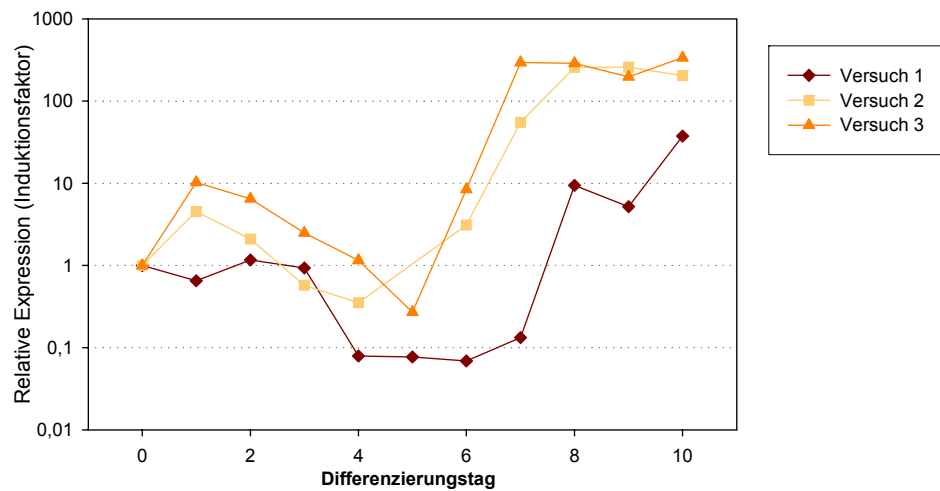


Abbildung 14: Expression von MLC2v während der D3-Zelldifferenzierung.

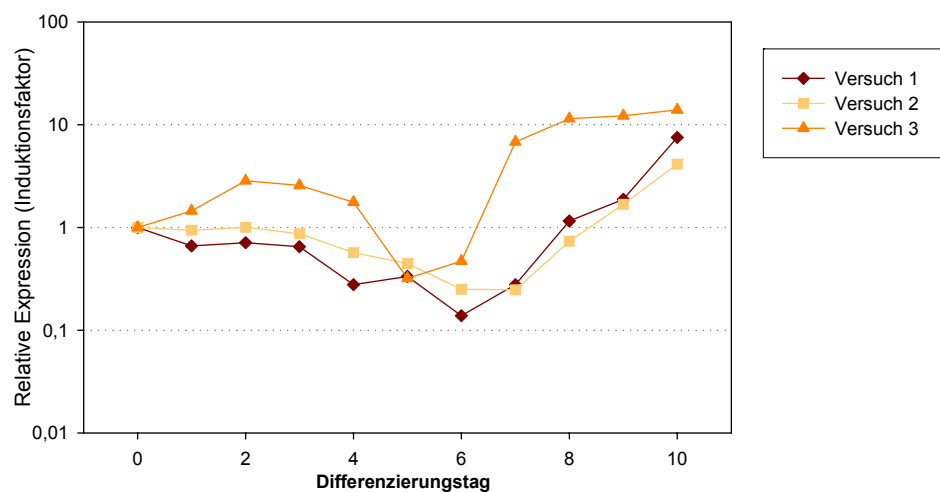


Abbildung 15: Expression von α -Actinin während der D3-Zelldifferenzierung.

Abbildung 13-15: Dargestellt sind jeweils drei Einzelexperimente, wobei die Punkte Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

5.2.1.3 Myosin light chain (MLC)-Gene

Die Myosin *light chain*-Gene MLC-1 und MLC2v zeigten beide einen Anstieg zwischen Tag 0 und Tag 10, hatten jedoch einen etwas unterschiedlichen Verlauf. Bei MLC1 fiel die Expression zu Beginn der Differenzierung zwischen Tag 0 und 4 recht stark ab (mindestens Faktor 10) und stieg ab Tag 5 bis Tag 10 an (Abbildung 13). Insgesamt zeigte sich ein Anstieg um Faktor 10 bis 100 an Tag 8-9. In einem Fall wurde ein Abfall zwischen Tag 8 und 10 gemessen, sodass an Tag 10 nur eine Steigerung um Faktor 6 gegenüber Tag 0 resultierte (Experiment 2), während die beiden anderen Experimente eine Steigerung um Faktor zwischen 30 und 40 zeigten (Experiment 1: 37, Experiment 3: 35).

MLC2v blieb zwischen Tag 0 und Tag 4 weitgehend konstant und stieg in der zweiten Hälfte des Differenzierungszeitraumes an (Abbildung 14). Ein steiler Anstieg erfolgte zwischen Tag 5 und 7 in zwei Experimenten, bzw. zwischen Tag 7 und 8 in Experiment 1.

5.2.1.4 α -Actinin

Die Expression von α -Actinin blieb zu Beginn der Differenzierung zwischen Tag 0 und Tag 4 nahezu konstant und stieg erst ab Tag 8-9 in allen Messungen über den Wert undifferenzierter D3-Zellen an (Abbildung 15). Insgesamt zeigte sich an Tag 10 ein Anstieg um den Faktor 10 gegenüber Tag 0. Dieser Anstieg war relativ gering im Vergleich zu den anderen Herzmuskelgenen abgesehen von MLC1.

5.2.1.5 Kardiales Troponin T

Während zwei Kurven einen gleich bleibenden Verlauf zwischen Tag 0 und Tag 4 zeigten, sank der Anteil an Troponin T-Transkripten in den Proben von Experiment 1 ab. Auch im restlichen Differenzierungszeitraum lag die Kurve niedriger als die der beiden anderen Experimente. Ein Anstieg der Genexpression zeigte sich bei Troponin T ab Tag 5-6 (Abbildung 16). Bis Tag 10 stieg die Expression im Vergleich zu Tag 0 um mehr als das Hundertfache an.

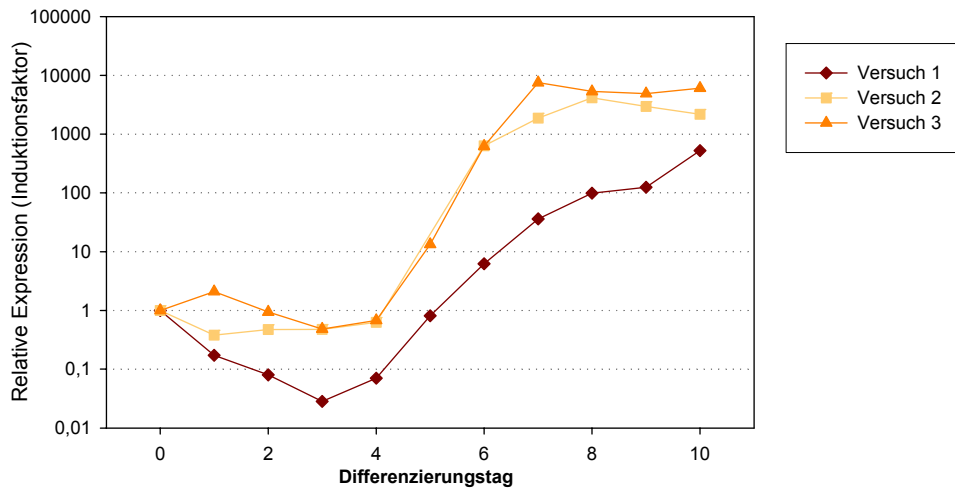


Abbildung 16: Expression von Troponin T während der D3-Zelldifferenzierung.

Dargestellt sind drei Einzelexperimente, wobei die Punkte jeweils Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

5.2.1.6 Zusammenfassende Betrachtung

Die Expression der am Aufbau des kontraktiven Apparats beteiligten Gene α -Actin, α -MHC, β -MHC, MLC2v und Troponin T stieg bis zum Ende des Differenzierungszeitraums deutlich an, wobei bei diesen Genen bis auf β -MHC und Troponin T, bei denen Tag 9 unwesentlich über Tag 10 lag, an Tag 10 die höchste Expression gemessen wurde. Meist erfolgte nach einer gleich bleibenden Expression oder einem anfänglichen leichten Absinken ein Anstieg, der zwischen Tag 4 und Tag 6 begann und bis Tag 10 anhielt. Die jeweilige Expressionssteigerung betrug mehrere Zehnerpotenzen. Die Expression der beiden Gene MLC1 und α -Actinin setzte dagegen erst an Tag 8 ein. Der Anstieg bis Tag 10 war bei beiden Genen schwach und betrug ca. Faktor 10.

Vergleicht man den Zeitpunkt, zu dem ein Gen eine zehnfache Expression gegenüber undifferenzierten Zellen zeigt, so ergibt sich eine zeitliche Abfolge. Als frühestes Gen verzehnfachte sich die Expression von α -Actin an Tag 3, anschließend folgten relativ zeitgleich α - und β -MHC- und Troponin T-Transkripte an Tag 6. An Tag 7 stieg die MLC2v-Expression und zwischen Tag 7 und 8 MLC1 gerade zehnfach über die Transkription an Tag 0 an (Abbildung 17). α -Actinin lag an Tag 10 knapp unter dieser aus praktischen Gründen gesetzten Marke.

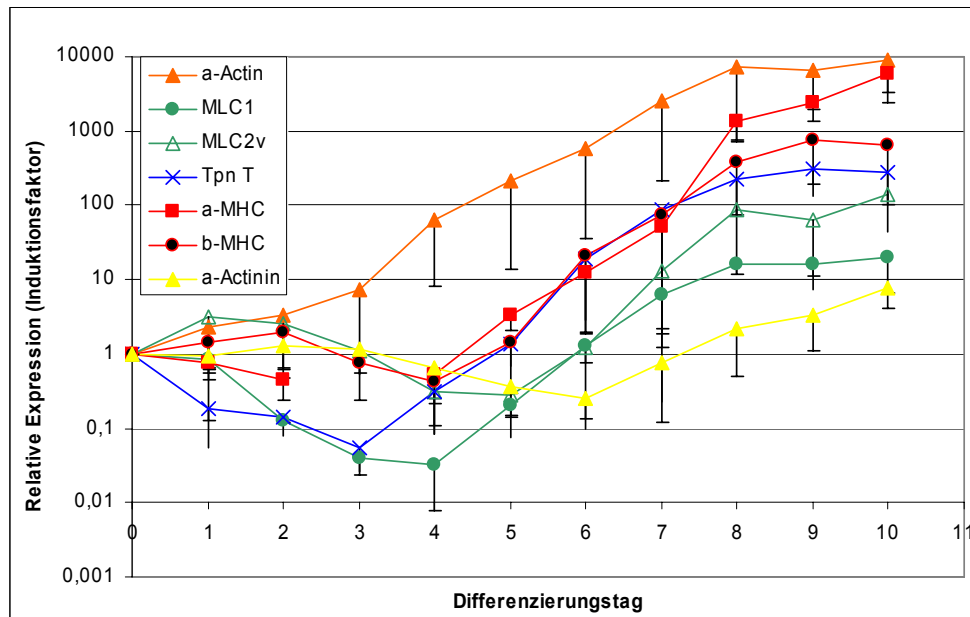


Abbildung 17: Zusammenfassende Darstellung der Genexpressionsprofile der herzmuskelspezifischen Gene. Dargestellt sind die Mittelwerte der im Ergebnisteil gezeigten Kurven. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Standardabweichungen nur nach unten angegeben.

5.2.2 Expression entwicklungsspezifischer Transkriptionsfaktoren

5.2.2.1 Tbx5

Das Expressionsprofil von Tbx5 ließ einen Anstieg zwischen Tag 4 und Tag 6 erkennen und erreichte ca. ab Tag 6 ein Plateau (Abbildung 18). Ein Experiment ergab Werte, die ca. zehnfach niedriger als in den beiden anderen Kurven lagen. In diesem Fall war ein Abfall der Genexpression um den Faktor 10 zwischen Tag 0 und Tag 1 zu sehen, den die zwei anderen Kurven nicht aufwiesen. Dies weist daraufhin, dass in der Probe von Tag 0 ein besonders hoher Tbx-5-Wert gemessen wurde. Da alle folgenden Werte auf diese Probe bezogen werden, lag die gesamte Kurve recht niedrig, sie wies jedoch einen nahezu parallelen Verlauf mit den anderen Experimenten auf.

Die Induktion von Tbx5 betrug an Tag 10 in zwei Experimenten 2400, sowie 3600 gegenüber Tag 0. In der abweichenden Kurve ergab sich eine 150fache Induktion.

5.2.2.2 GATA-4

Ein Anstieg der GATA-4-Expression trat in den Messungen zwischen Tag 4 und Tag 6 auf, während zwischen Tag 0 und Tag 3 keine eindeutige Veränderung gegenüber Tag 0 zu erkennen war. Von Tag 6 bis Tag 10 blieb der Gehalt von GATA-4-Transkripten in den Proben wiederum konstant auf einem Niveau, das ca. zehnfach über der Expression undifferenzierter D3-Tellen lag (Abbildung 19). Die Induktionsfaktoren gegenüber Tag 0 betrugen an Tag 10 die Werte 16, 9 und 56.

5.2.2.3 Myocardin

Die Expression von Myocardin blieb zwischen Tag 0 und Tag 5 relativ niedrig und stieg zwischen Tag 5 und Tag 8 um einen Faktor von 100-1000 an. Von Tag 8 bis Tag 10 blieb die Expression relativ konstant, wobei zwei Experimente einen leichten Abfall zwischen Tag 9 und Tag 10 aufwiesen. Ein Experiment zeigte einen sehr niedrigen Wert an Tag 4 (Experiment 3).

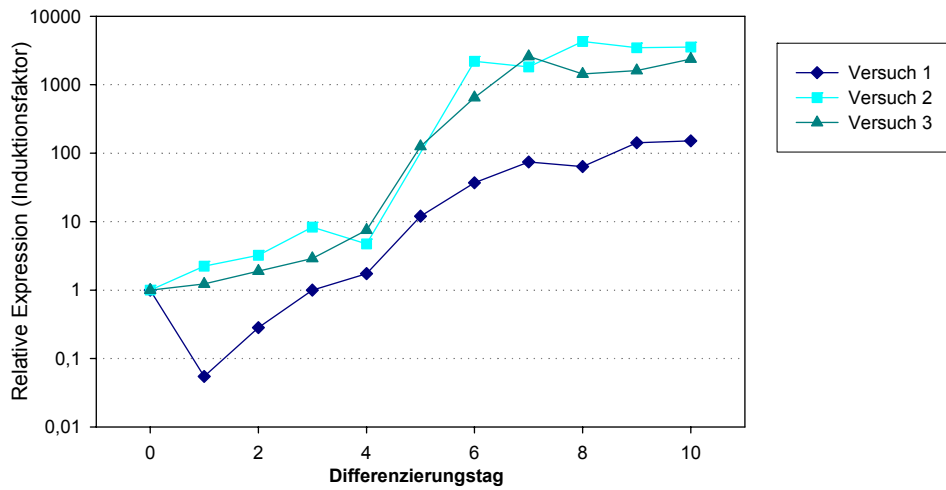


Abbildung 18: Expression von Tbx5 während der D3-Zelldifferenzierung.

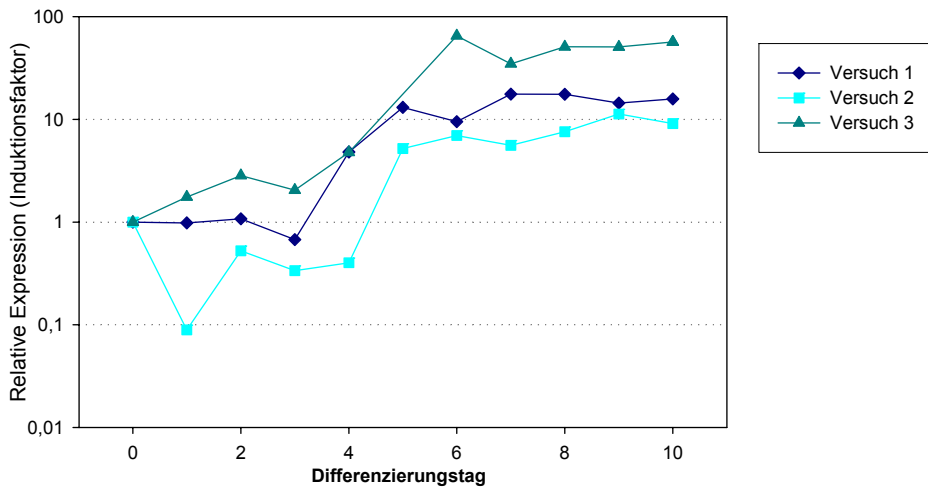


Abbildung 19: Expression von GATA-4 während der D3-Zelldifferenzierung.

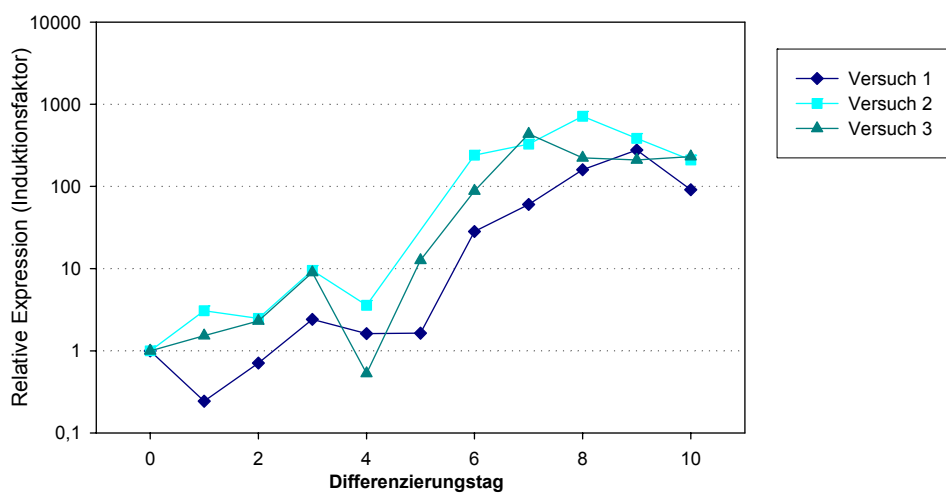


Abbildung 20: Expression von Myocardin während der D3-Zelldifferenzierung.

Abbildung 18-20: Dargestellt sind jeweils drei Einzelexperimente, wobei die Punkte Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

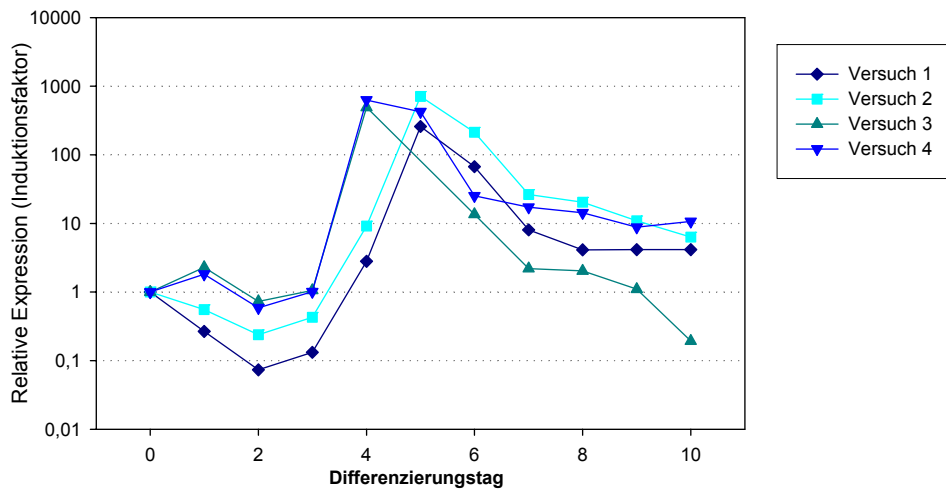


Abbildung 21: Expression von MesP1 während der D3-Zelldifferenzierung.
 Dargestellt sind vier Einzelexperimente, wobei die Punkte jeweils Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

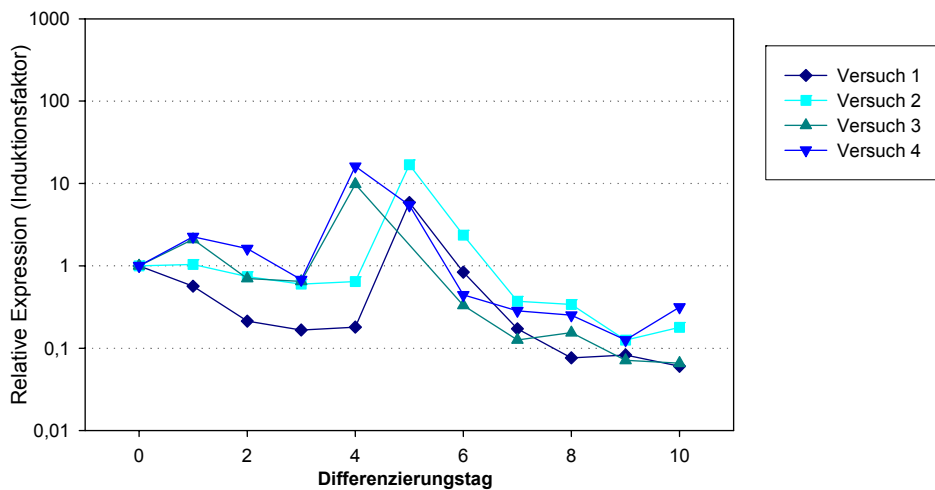


Abbildung 22: Expression von MesP2 während der D3-Zelldifferenzierung.
 Dargestellt sind vier Einzelexperimente, wobei die Punkte jeweils Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

Tabelle 7: Maximale Induktionsfaktoren gegenüber Tag 0 von MesP1 und MesP2.

Experiment	Induktionsfaktor		maximale Expression
	MesP1	MesP2	
1	260	6	Tag 5
2	710	17	Tag 5
3	490	10	Tag 4
4	630	16	Tag 4

5.2.2.4 Mesoderm Posterior (MesP)1 und 2

Die Expression der Gene der beiden homologen Proteine zeigte einen ähnlichen Verlauf, in dem nach einer Anfangsphase, die dem Zeitraum der EB-Bildung in den Tropfen entsprach, ein sehr steiler Anstieg bis zu einem Maximum der Expression an Tag 4 oder 5 auftrat (Abbildung 21 und Abbildung 22). Bei MesP1 lag das Maximum bei der mehr als 100fachen Expression undifferenzierter Stammzellen, während MesP2 bis ca. Faktor 10 anstieg. Anschließend sank die Expression beider Gene ab, wobei die MesP1-Transkription auch an Tag 10 gegenüber Tag 0 erhöht war. Die MesP2-Expression verringerte sich dagegen weiterhin bis zum Tag 10. Die Maximalwerte der Kurven sind in Tabelle 7 angegeben.

5.2.2.5 Hand1 und 2

Die Expression der beiden homologen Gene Hand1 und Hand2 zeigte einen steilen Anstieg zwischen Tag 4 und 6. Die Hand1-Expression erreichte an Tag 6 ihr Maximum (Abbildung 23). Von Tag 6 bis Tag 10 war ein leichter Abfall zu sehen. Die Expression von Hand2 erreichte am Tag 7 ein Plateau (Abbildung 24). Die Höhe des Anstiegs war bei Hand2 etwas stärker ausgeprägt.

In einer nicht gezeigten Kurve kam es bei Hand1 zu einem Absinken der Expression zwischen Tag 1 und Tag 4 auf weniger als ein Zehntel der Expression an Tag 0. Da dies wahrscheinlich auf eine aberrante Tag 0-Probe zurückzuführen war, wurde die Messung ausgeschlossen.

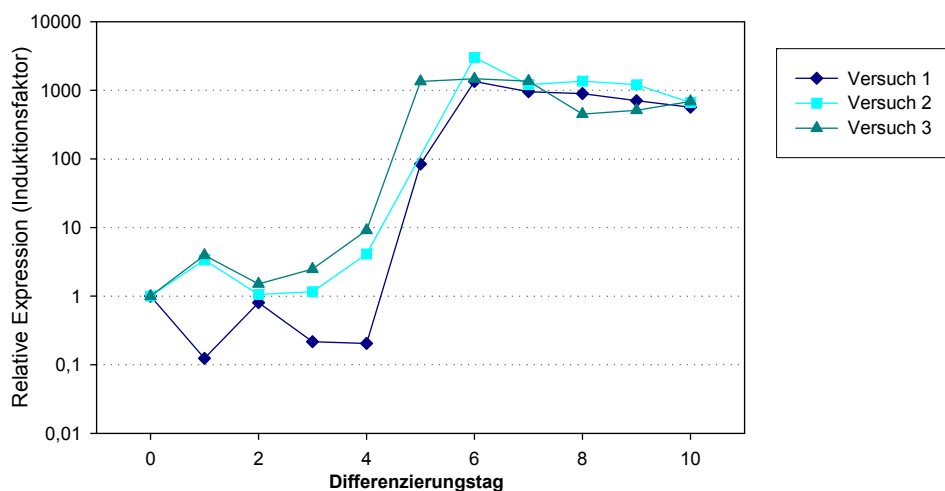


Abbildung 23: Expression von Hand1 während der D3-Zelldifferenzierung.

Dargestellt sind drei Einzelexperimente, wobei die Punkte jeweils Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

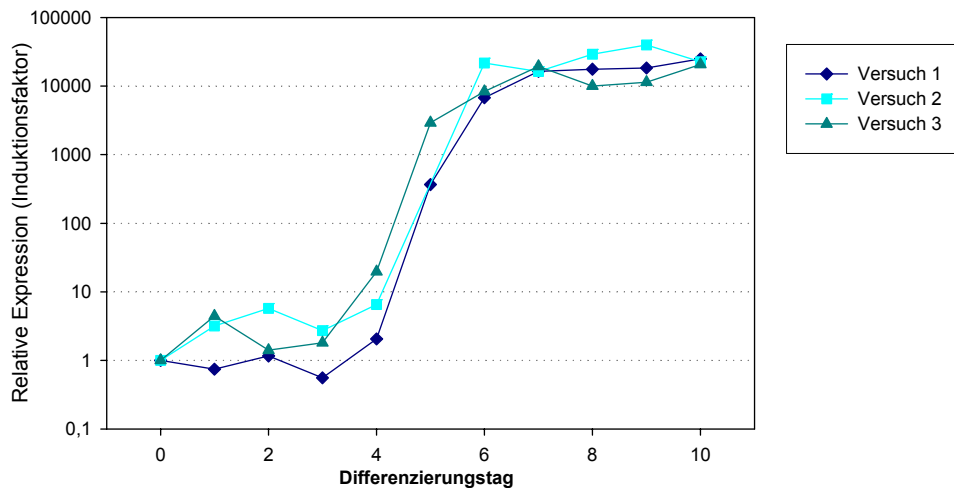


Abbildung 24: Expression von Hand 2 während der D3-Zelldifferenzierung.

Dargestellt sind drei Einzelexperimente, wobei die Punkte jeweils Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

Zusammenfassende Betrachtung

Der Verlauf der Expression der Transkriptionsfaktoren zeigte ein heterogenes Bild. Es wurden Gene gefunden, die zu verschiedenen Zeiten während der Differenzierung maximal exprimiert wurden:

Die Transkriptionsfaktoren Tbx5, Myocardin und GATA-4 zeigten in den Versuchen einen relativ ähnlichen Verlauf (Abbildung 25). Die Myocardin-Expression stieg etwas früher an. Tbx5 und Myocardin zeigten Anstiege um Faktor 100 bis Tag 10. Bei GATA-4 trat nach einem Anstieg um Faktor 10 ab Tag 6 ein Plateau auf.

Die Homologen MesP1 und MesP2 zeigten Maxima an Tag 5 der Differenzierung (Abbildung 26), während bei Hand1 und 2 ein Anstieg an Tag 6 mit anschließendem Plateau gemessen werden konnte (Abbildung 27). Bei Hand1 und 2 wurde eine starke Induktion um einen Faktor von mehr als 1000 beobachtet.

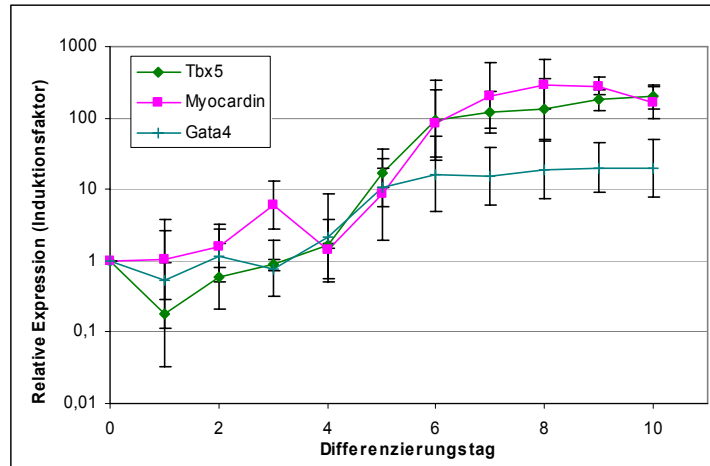


Abbildung 25: Zusammenfassende Darstellung der Expression von Tbx5, Myocardin und GATA-4. Dargestellt sind Mittelwerte der in Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20 gezeigten Kurven mit Standardabweichungen.

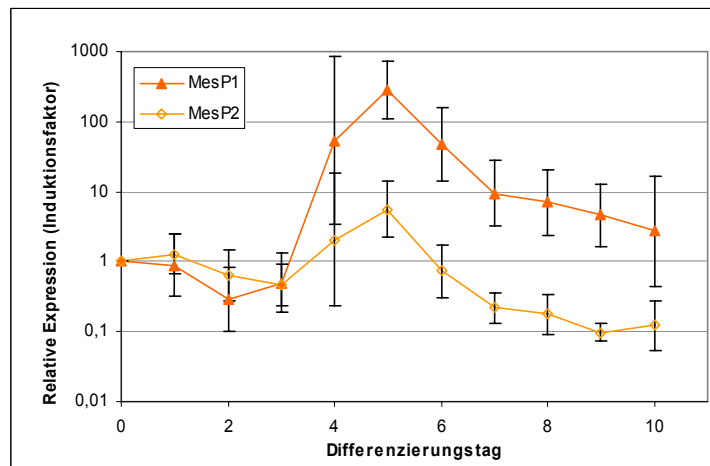


Abbildung 26: Expression von MesP1 und 2 im Vergleich. Dargestellt sind Mittelwerte der in Abbildung 21 und Abbildung 22 gezeigten Kurven mit Standardabweichungen.

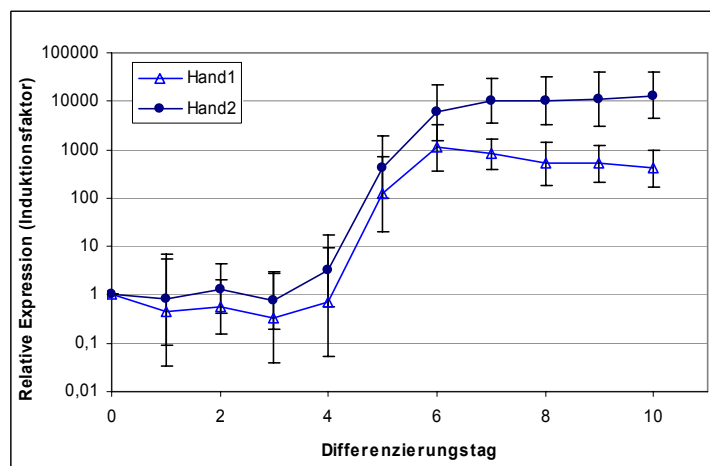


Abbildung 27: Expression von Hand1 und 2 im Vergleich. Dargestellt sind Mittelwerte der in Abbildung 23 und Abbildung 24 gezeigten Kurven mit Standardabweichungen.

5.2.3 Expression der ausgewählten Wachstumsfaktoren und Cytokine

5.2.3.1 *cripto-1*

Die Expression von *cripto-1* zeigte nach einer gleich bleibenden Phase zu Beginn der Differenzierung zwischen Tag 0 und Tag 4 eine Verringerung der Transkriptmenge. Zwischen Tag 4 und Tag 7 verringerte sich die Transkriptmenge in den Proben in allen Experimenten um einen Faktor von 10-100 (Abbildung 28). An Tag 10 hatte sich die Expression auf 1-10% des Wertes von undifferenzierten D3-Zellen an Tag 0 verringert.

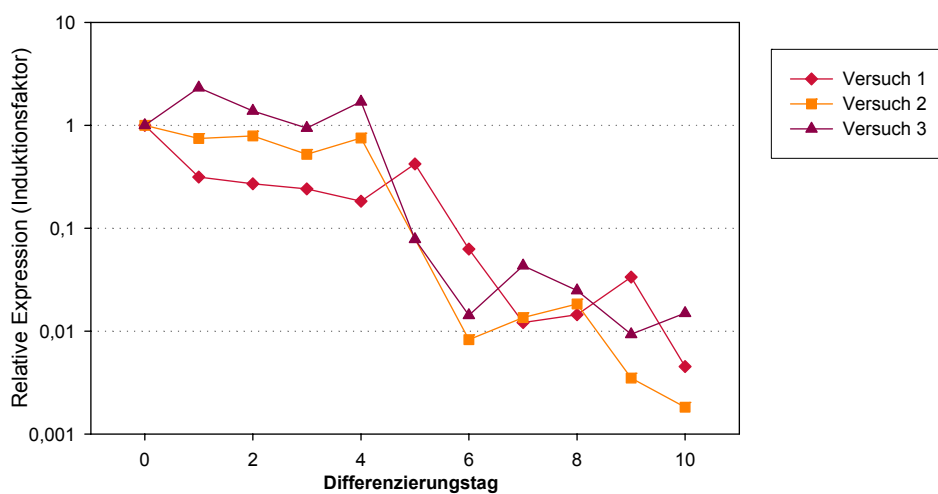


Abbildung 28: Expression von *cripto* während der D3-Zelldifferenzierung.

Dargestellt sind drei Einzelexperimente, wobei die Punkte jeweils Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

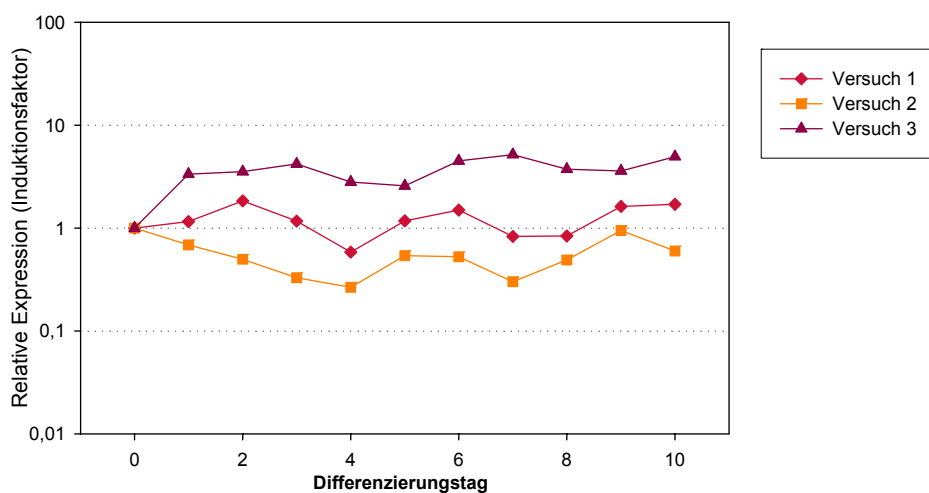


Abbildung 29: Expression von Cardiotrophin-1 während der D3-Zelldifferenzierung.

Dargestellt sind drei Einzelexperimente, wobei die Punkte jeweils Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

5.2.3.2 Cardiotrophin-1

Die Expression von Cardiotrophin-1 (Ct-1) zeigte innerhalb des Differenzierungszeitraumes keine Veränderungen (Abbildung 29). Die Schwankungen der Graphen in Abbildung 29 lagen weniger als eine Zehnerpotenz von Tag 0 entfernt.

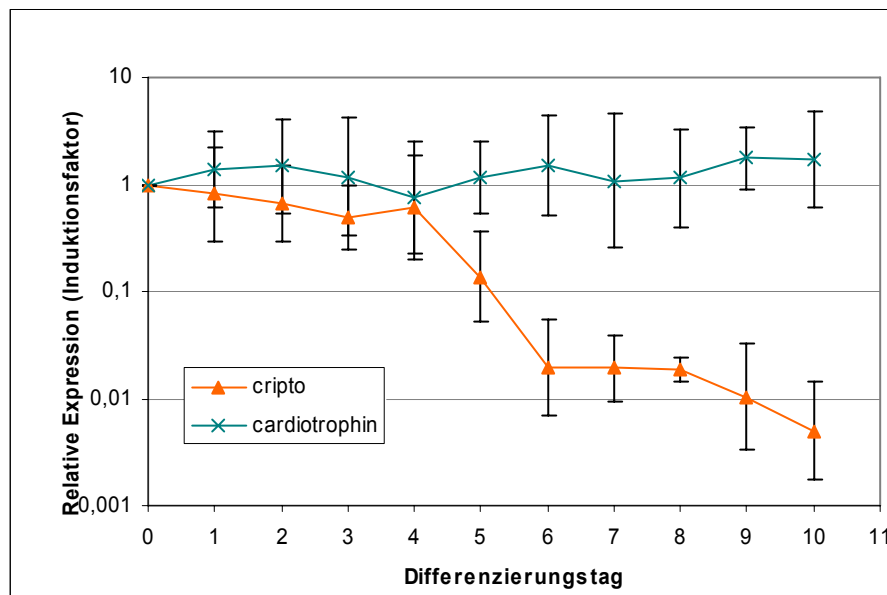


Abbildung 30: Zusammenfassende Darstellung der Expression von cripto-1 und cardiotrophin-1. Dargestellt sind Mittelwerte der Einzelerperimente mit Standardabweichungen.

5.2.4 Messung nicht-herzspezifischer Gene

5.2.4.1 Oct4

Die Expression von Oct4 zeigte im untersuchten Zeitraum in allen Experimenten einen abfallenden Verlauf (Abbildung 31). Bis Tag 6 sank die Expression auf ca. 10% des Wertes undifferenzierter Zellen ab. An Tag 10 war die Transkriptmenge in den Proben von 3 von 4 Experimenten auf weniger als 1% des Werts an Tag 0 reduziert. Ein Experiment zeigte einen etwas höheren Wert von ca. 4% (Versuch 2).

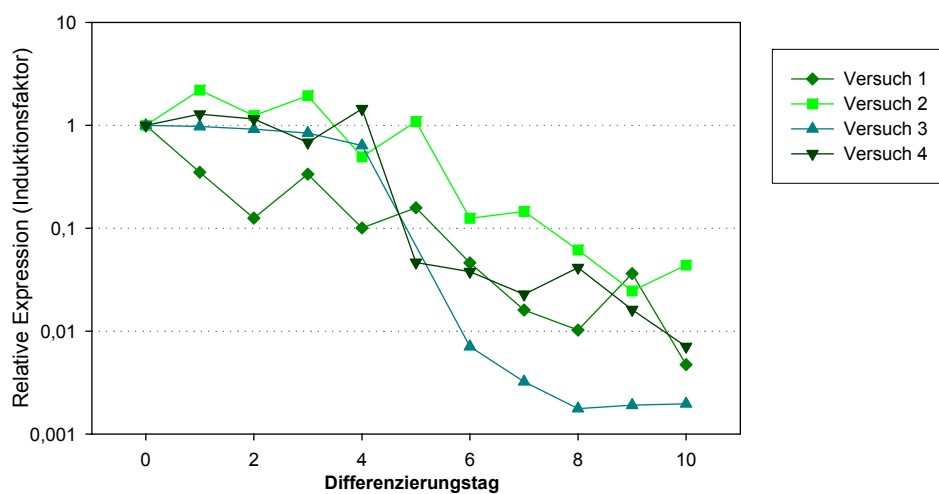


Abbildung 31: Expression von Oct4 während der D3-Zelldifferenzierung.

Dargestellt sind vier Einzelexperimente, wobei die Punkte jeweils Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

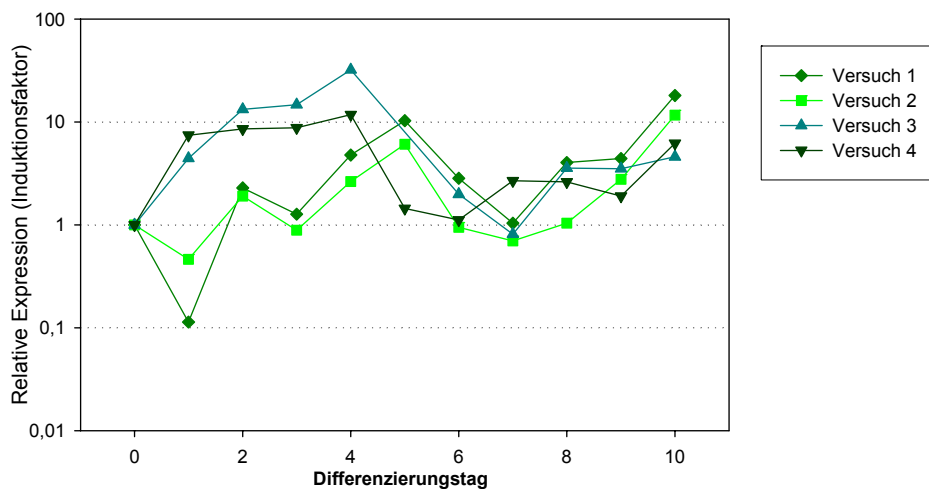


Abbildung 32: Expression von Neurofilament (*light polypeptide*) während der D3-Zelldifferenzierung.

Dargestellt sind vier Einzelexperimente, wobei die Punkte jeweils Mittelwerten aus Doppelbestimmungen entsprechen. Alle Graphen wurden auf Tag 0 normalisiert.

5.2.4.2 Neurofilament L (NF-L)

NF-L-Transkripte konnten in Proben aller Differenzierungstage nachgewiesen werden. Gegenüber Tag 0 zeigte sich jedoch bis Tag 7 keine klare Veränderung, die durch alle Kurven bestätigt wurde (Abbildung 32). Ein relativ einheitlicher ansteigender Trend war zwischen Tag 8 und 10 zu sehen. Alle Kurven zeigten an Tag 10 einen positiven Induktionsfaktor, der um Faktor 10 schwankte (Experimente 1-4 hatten die Werte 18, 11, 5 und 6).

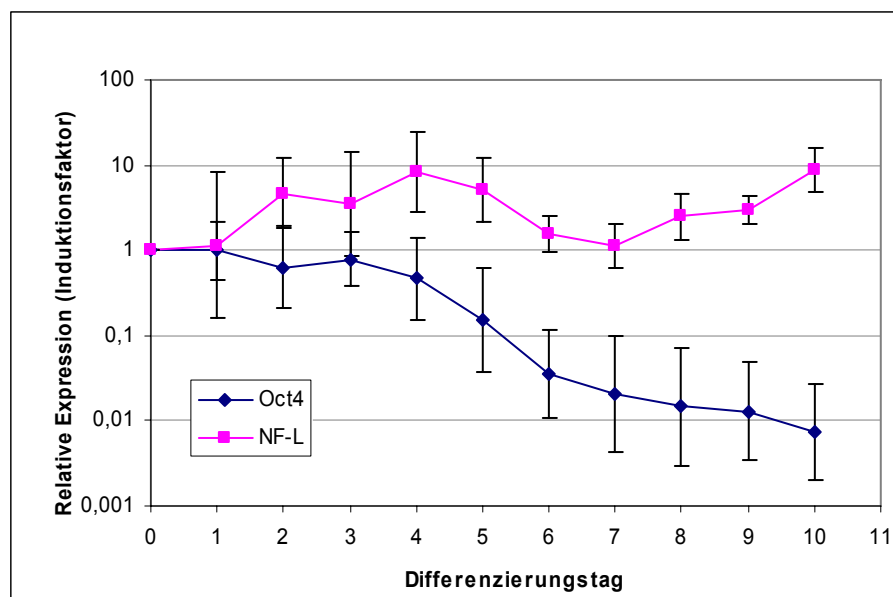


Abbildung 33: Zusammenfassende Darstellung der Expression von Oct4 und NF-L.
Dargestellt sind Mittelwerte der Einzelexperimente mit Standardabweichungen.

5.2.5 Verwendung der Referenzgene

Um in RT-PCR-Messungen eine Vergleichbarkeit der gemessenen Genexpressionshöhen zu gewährleisten, wurde ein Referenzgen als interner Standard benötigt. Eine wichtige Eigenschaft des Referenzgens ist seine stabile Expression unter Versuchsbedingungen.

5.2.5.1 GAPDH

Als Referenzgen für die Untersuchung der Genexpression in unbehandelten ES-Zellen während der Differenzierung wurde zu Beginn der Versuche das *housekeeping*-Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet. GAPDH hat sich unter vielen Bedingungen und auch für differenzierende embryonale Stammzellen als geeignetes Referenzgen erwiesen (Murphy und Polak, 2002). Zur Messung wurde ein kommerziell bezogenes Primer- und Sondenset verwendet (PE Applied Biosystems, Foster City, USA).

Die Zusammenstellung der GAPDH-Messwerte von 16 TaqMan-Läufen zeigt, dass die Expressionshöhe nicht gerichtet durch die Differenzierung der ES-Zellen beeinflusst wird. Dargestellt sind in Abbildung 34 die C_T -werte („*Cycle of Threshold*“), die den Anstieg der Fluoreszenz der Probe über ein gewähltes Maß (*Threshold*) während der PCR markieren.

Der mittlere C_T -Wert der einzelnen Differenzierungstage unterschied sich um 1,5 C_T -Werte. Die Einzelergebnisse zeigen Minimal- und Maximalwerte, die sich um bis zu 3-4 C_T -Werte unterschieden.

Es zeigte sich keine gerichtete Veränderung des GAPDH-Gehalts der ES-Zellen während des Differenzierungszeitraumes. Aufgrund dessen konnte GAPDH als Referenzgen verwendet werden.

5.2.5.2 18S rRNA

In den folgenden Substanztestungen wurde 18S rRNA als Referenzgen eingesetzt. Eine visuelle Kontrolle der Verteilung der Werte stellte sicher, dass die Expression von 18S rRNA nicht durch Substanzbehandlung beeinflusst wurde (nicht gezeigt). 18S rRNA diente auch in einem Teil der Genexpressionsprofile als Referenzgen. Auch hier trat keine gerichtete Veränderung der Expression während des Differenzierungszeitraums auf (nicht gezeigt).

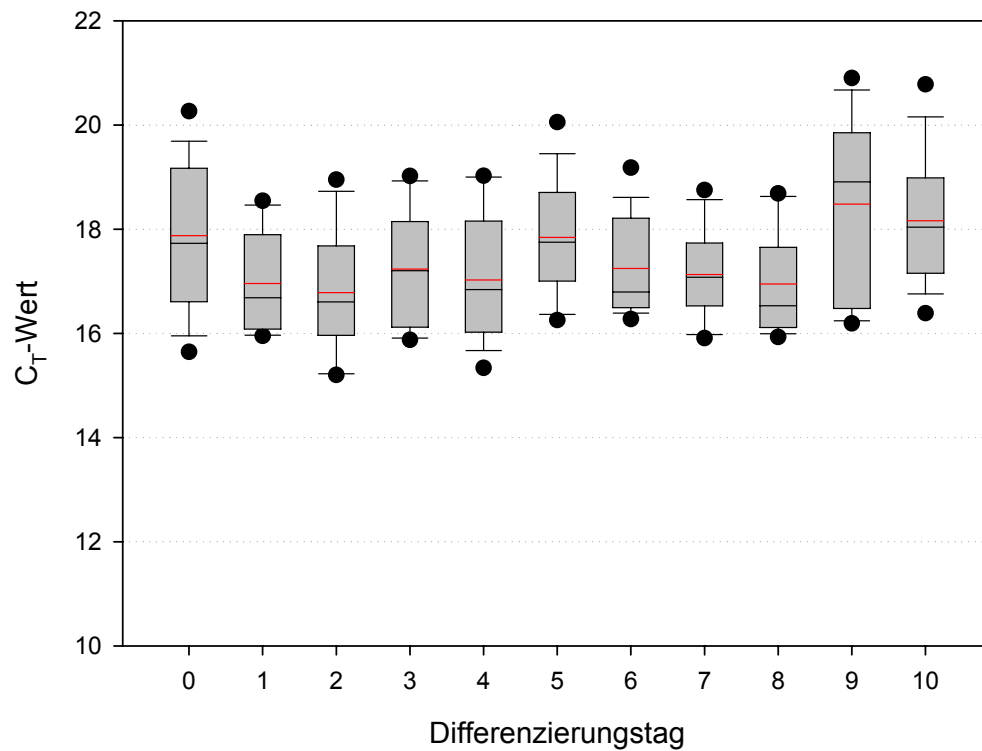


Abbildung 34: Box-Whisker-Plot der GAPDH-Expression während des Differenzierungszeitraumes.

Verteilung der Werte von 16 TaqMan-Läufen. Box: 25.-75. Perzentil, Median schwarz, Mittelwert rot; unterer Whisker: 10.-25. Perzentil; oberer Whisker: 75.-90. Perzentil; Punkte: Werte innerhalb des 1.-10., sowie des 91-100. Perzentils.

5.3 Einfluss von Substanzen auf Kardiomyozytendifferenzierung und Expression ausgewählter Gene

In diesem Abschnitt lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Kardiomyozytendifferenzierung. Zu diesem Zweck wurden Konzentrationsreihen mit *in vivo* nicht, schwach und stark embryotoxischen Substanzen erstellt und deren Halbhemmkonzentrationen (ID_{50}) bestimmt. Die Expression zweier Markergene wurde zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert und die $IC_{50\text{ Exp}}$ bestimmt. Das Ziel war, herauszufinden, ob an der Herzentwicklung beteiligte Gene durch alle Substanzen gleichermaßen beeinflusst werden, sobald diese auch einen Einfluss auf die morphologische Differenzierung in der mikroskopischen Auswertung ausübten.

5.3.1 Verwendung potentieller Markergene anhand der Expressionsprofile

Anhand der Expressionsprofile wurden die zwei Gene Mesoderm posterior 1 (MesP1) und *Myosin light chain 1* (MLC1) zur Durchführung von Substanztests mit den Testsubstanzen ausgewählt. Dabei diente MesP1 als früh exprimiertes Gen, dessen Expression an Tag 5 bestimmt wurde, um möglichst schon nach einem kurzen Inkubationszeitraum spezifische, auf die Entwicklung der ES-Zellen wirkende Effekte zu erfassen. MLC1 wurde als spät exprimiertes Gen ausgewählt, das durch die Messung an Tag 10 eine Korrelation mit dem morphologischen Endpunkt der Kardiomyozytendifferenzierung gestattet. Die Messung erfolgte zusätzlich an Tag 7, um möglichst frühe Veränderungen zu detektieren.

5.3.2 Durchführung der Substanztestungen

Bei den Substanztests wurden die Zellen durchgehend von Tag 0 mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz behandelt. In Tabelle 3 (S.19) sind die getesteten Substanzen aufgelistet.

Standardmäßig wurden sechs Substanzkonzentrationen und zwei Kontrollen mit gleichem Lösemittelgehalt angesetzt. Der zeitliche Ablauf entsprach dem Standard-EST.

Die Auswertung erfolgte einerseits an Tag 10 mikroskopisch am Phasenkontrastmikroskop, wobei die Anzahl von EBs mit schlagenden Bereichen im Verhältnis zu allen EBs der 24-Well-Platte bestimmt wurde. Zusätzlich wurden an Tag 5, Tag 7 und Tag 10 der Entwicklung Proben zur RNA-Isolierung genommen und darin mittels Taqman-PCR die Expression der ausgewählten Markergene bestimmt.

Es sind im Folgenden jeweils drei Testungen jeder Substanz dargestellt. Zum Teil mussten mehrere Versuche durchgeführt werden, um drei valide Tests zu erhalten.

Im Abschnitt 5.3.8 ist die Klassifizierung der Substanzen in die Kategorien nicht, schwach und stark embryotoxisch tabellarisch dargestellt. Sie wurde mit Hilfe des mathematischen Prädiktionsmodells (*improved Prediction model*; iPM) aus den ID_{50} -, bzw. $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werten der Substanztests berechnet. Die Ergebnisse der Klassifizierung sind jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit schon unter den jeweiligen Substanztests genannt.

5.3.3 Testung stark embryotoxischer Substanzen

Vier *in vivo* als stark embryotoxisch eingestufte Substanzen 5-Fluorouracil, all-*trans*-Retinsäure, 6-Aminonikotinamid und Cytosinarabinosid wurden getestet.

5.3.3.1 5-Fluorouracil (5-FU)

5-FU wurde als Referenzsubstanz eingesetzt, um die Ergebnisse mit denen der Validierungsstudie des konventionellen EST (mikroskopischer Endpunkt) zu vergleichen (Genschow et al., 2002). Außerdem diente die Substanz als interne Positivkontrolle beim Assaycheck neu aufgetauter D3-Zellaliquote. In Abbildung 35 sind drei Experimente gezeigt. Die Konzentrations-Wirkungskurven der mikroskopischen Auswertung wiesen einen einheitlichen Verlauf auf. Am Mikroskop wurde nach Behandlung mit 0,02 -0,03 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU reproduzierbar eine Erhöhung der Größe der Areale und z. T. auch der Stärke des Schlagens festgestellt, die jedoch nicht quantitativ erfasst werden konnte. Die Bestimmung der Halbhemmkonzentration für den Differenzierungsendpunkt (ID_{50}) ergab in einem Fall keinen validen Wert (Experiment 2). Einige Schwankungen traten bei der Messung der Genexpression aller drei verwendeten Marker auf, wo z. T. sehr hohe Induktionen nach Behandlung mit ca. 0,05 $\mu\text{g/ml}$ zu sehen sind. Bei höheren Konzentrationen war jedoch in Übereinstimmung mit der mikroskopischen Auswertung ein Abfall der Genexpression vorhanden. In Experiment 2, in dem sich keine mikroskopische ID_{50} ergab, erreichte auch die Messung der Genexpression bei MesP1 und MLC1 an Tag 10 keine $IC_{50 \text{ Exp}}$. Bei MLC1 an Tag 7 konnte ein $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wert bei 0,06 $\mu\text{g/ml}$ gemessen werden. Die Messung von MesP1 in Proben aus Experiment 3 erbrachte in niedrigen 5-FU-Konzentrationen Werte, die unter 50% der Kontrolle lagen, so dass kein zuverlässiger $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wert bestimmt werden konnte.

Bei der mikroskopischen Auswertung war zwischen 0,03 $\mu\text{g/ml}$ und 0,07 $\mu\text{g/ml}$ eine deutliche Größenabnahme zu beobachten, die EBs enthielten jedoch auch nach Behandlung mit 0,06 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU oft noch kontrahierende Areale.

Für 5-FU existieren viele historische Daten der mikroskopischen Auswertung, die zeigen, dass die ID_{50} -Werte immer in diesem Bereich und nie höher als 0,1 $\mu\text{g/ml}$ liegen (Spielmann et al., 1997; Genschow et al., 2004; Seiler et al., 2004; eigene Beobachtungen aus Assaychecks). Dies,

in Verbindung mit dem steilen, eindeutigen Abfall der Konzentrations-Wirkungskurven, lässt es bei 5-FU zu, ID₅₀-Werte, die oberhalb des Messbereichs lagen, zum Einsetzen in das mathematische Prädiktionsmodell (iPM) gleich 0,06 µg/ml zu setzen (es resultiert keine Änderung der Prädiktion durch das Einsetzen von 0,1 µg/ml). Für zwei Experimente mit MesP1, in denen die Kurven einen abfallenden Verlauf zeigen, aber oberhalb der 50%-Grenze enden, wurde ebenso verfahren. Eine Kurve von MLC1 an Tag 10 (Experiment 2), die keinen deutlich abfallenden Verlauf zeigte, wurde dagegen ausgeschlossen.

Es konnten zehn Datensätze mit dem iPM ausgewertet werden. Eine der MesP1-Messungen konnte nicht verwendet werden, da bei geringen Substanzkonzentrationen Genexpressionswerte unter 50% der Kontrolle gemessen wurden. Mit allen Endpunkten konnte die Substanz korrekt als stark embryotoxisch klassifiziert werden (Tabelle 9).

5.3.3.2 All-trans-Retinsäure (Tretinoin) (RA)

Die Testung von RA erfolgte über einen Konzentrationsbereich von mehr als drei Zehnerpotenzen von 6 pg/ml bis 14 ng/ml.

Bei der Testung von RA traten in der mikroskopischen Auswertung unerwartete Effekte auf. Eine Erhöhung der Konzentration der Substanz führte im Bereich von über 0,05 ng/ml erst zu einer Abnahme des Auftretens von schlagenden Kardiomyozyten, die aber bei noch höheren Konzentrationen wieder anstieg. Bei der höchsten Konzentration von 14 ng/ml traten wieder in fast ebenso vielen EBs Kardiomyozyten auf, wie in der Kontrolle (22/24). Dies ließ sich in der Expression von MLC1 an Tag 10 nachvollziehen, während weder MesP1 noch MLC1 an Tag 7 diese Kurvenform zeigten. Die Expression der beiden zuletzt genannten Endpunkte sank bei RA-Konzentrationen über 0,1 ng/ml ab und zeigte keine Erhöhung bei steigenden Konzentrationen. MLC1-Transkripte erreichten an Tag 7 der Differenzierung auch in keiner der niedrig behandelten Proben so hohe Werte wie in der Kontrolle.

Es konnten 6 valide IC_{50 Exp}-Werte bestimmt werden, die in das iPM eingesetzt wurden, einer für die Messung von MLC1 an Tag 7, zwei für Tag 10 und drei für die Messung von MesP1 an Tag 5. Die Auswertung der Ergebnisse mit dem iPM führte in allen Fällen zu einer korrekten Klassifizierung als stark embryotoxisch (Tabelle 9). Für die mikroskopischen Differenzierung konnte kein ID₅₀-Wert bestimmt werden.

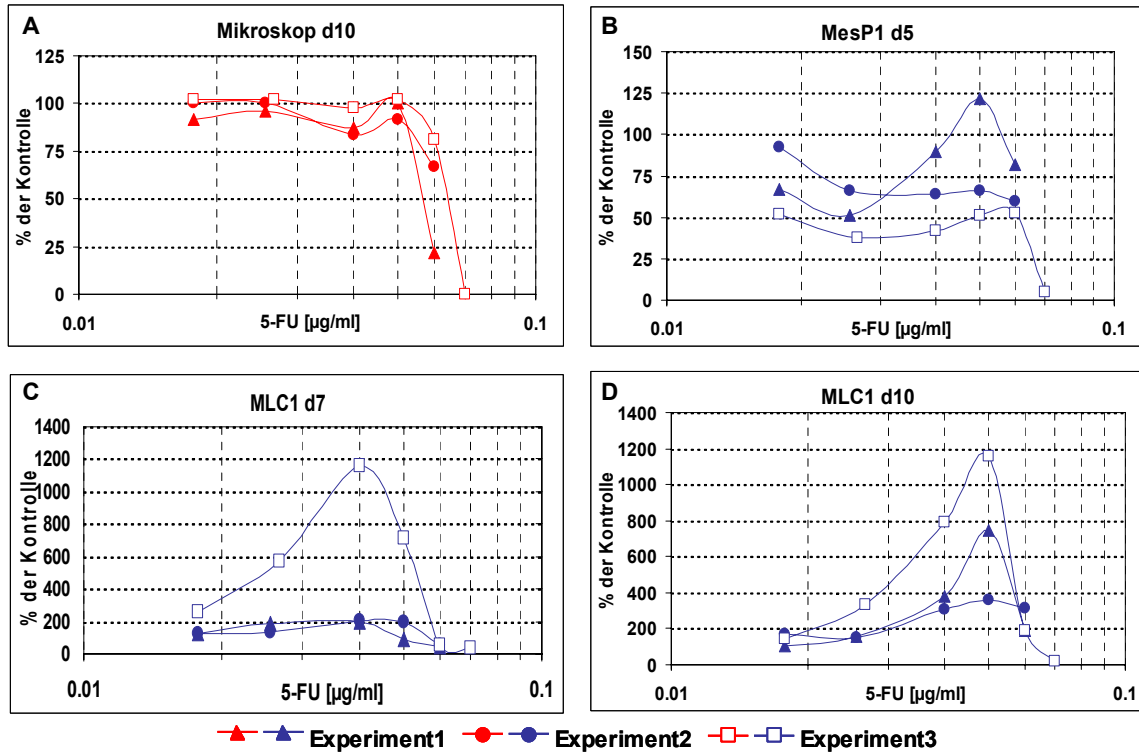


Abbildung 35: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit 5-Fluorouracil (5-FU) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

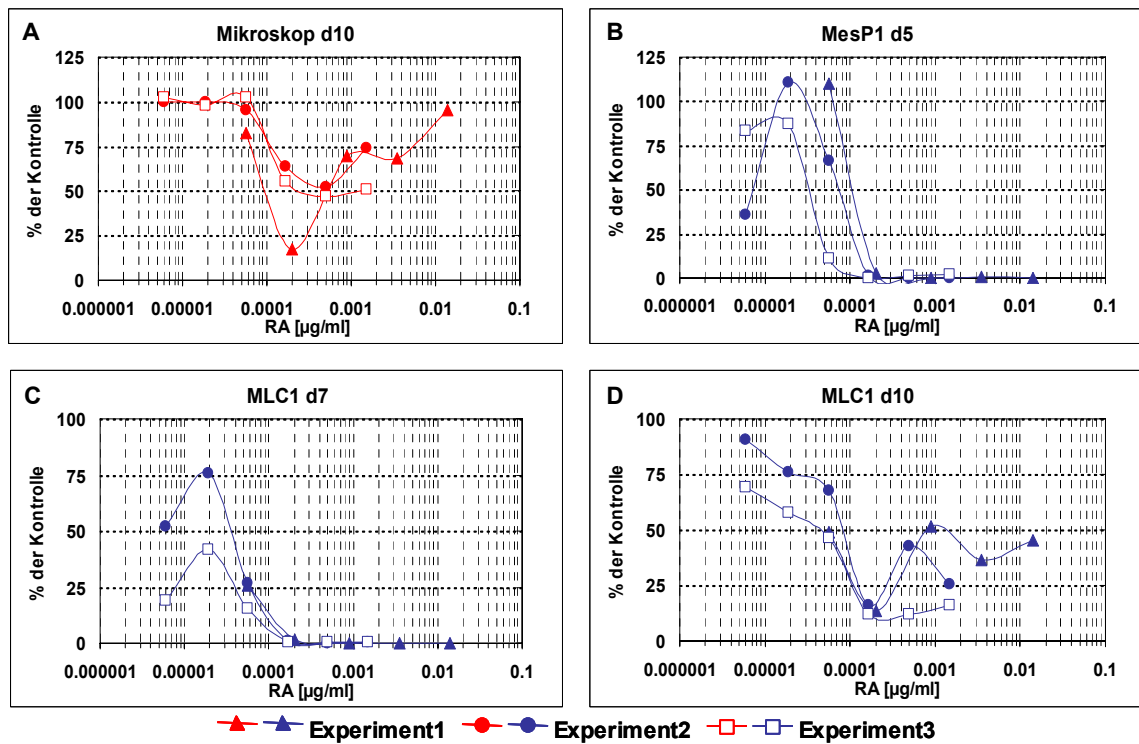


Abbildung 36: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit all-trans-Retinsäure (RA) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

5.3.3.3 Cytosinarabinosid (AraC; Cytarabin)

Die drei durchgeführten Versuche ergaben in der mikroskopischen Auswertung ID_{50} -Werte, die in einem sehr engen Bereich zwischen 0,02 und 0,07 $\mu\text{g/ml}$ lagen. Die aus den Messungen der Genexpression resultierenden $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte zeigten eine sehr hohe Übereinstimmung, sowohl zwischen den einzelnen Wiederholungen, wie auch im Verhältnis zur mikroskopischen Auswertung (Abbildung 37). In Experiment 1 wurde im Verlauf der Kurve eine Induktion der Genexpression von MLC1 um Faktor 5 (Tag 7), bzw. Faktor 3 (Tag 10) gemessen. Bei höheren Konzentrationen, in denen auch die mikroskopische Auswertung eine Verringerung kontrahierender Areale zeigte, erfolgte jedoch ein rapider Abfall, so dass bei allen Kurven eindeutige $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte bestimmt werden konnten, die im gleichen Konzentrationsbereich lagen. Bei der Messung von MesP1 lagen die Genexpressionswerte der niedrigsten Konzentration recht niedrig, in einem Fall unterhalb 50% der Kontrolle. Da im Weiteren die beiden anderen Kurven einen sehr ähnlichen Verlauf zeigten, wurde der resultierende $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wert als valide akzeptiert.

Es konnten für alle Endpunkte jeweils drei ID_{50} -, bzw. $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte ermittelt werden, so dass zwölf Datensätze zur Klassifizierung des embryotoxischen Potentials mittels iPM eingesetzt wurden. Die Auswertung der Ergebnisse mit dem iPM führte in allen Fällen zu einer korrekten Klassifizierung der Substanz als stark embryotoxisch (Tabelle 9).

5.3.3.4 6-Aminonikotinamid (6-AN)

Bei der Testung von 6-AN ergaben sich gute Übereinstimmungen zwischen den vier bestimmten Endpunkten (Abbildung 38). Die ID_{50} und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte lagen in allen Fällen zwischen 0,6 und 1,1 $\mu\text{g/ml}$. Zwar zeigte Experiment 2 bei der Messung von MLC1 sowohl an Tag 7 wie auch an Tag 10 einen sehr hohen Induktionswert bei den Proben von 0,75 $\mu\text{g/ml}$, jedoch führten höhere Konzentrationen zu einem rapiden Abfall der Genexpression, so dass die ermittelten ID_{50} - und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte übereinstimmend zwischen 0,6 und 1,1 $\mu\text{g/ml}$ lagen.

Es wurden 12 vollständige Datensätze erstellt, die in das Prädiktionsmodell eingesetzt wurden. Die Auswertung der Ergebnisse mit dem iPM führte in allen Fällen zu einer korrekten Klassifizierung als stark embryotoxisch (Tabelle 9).

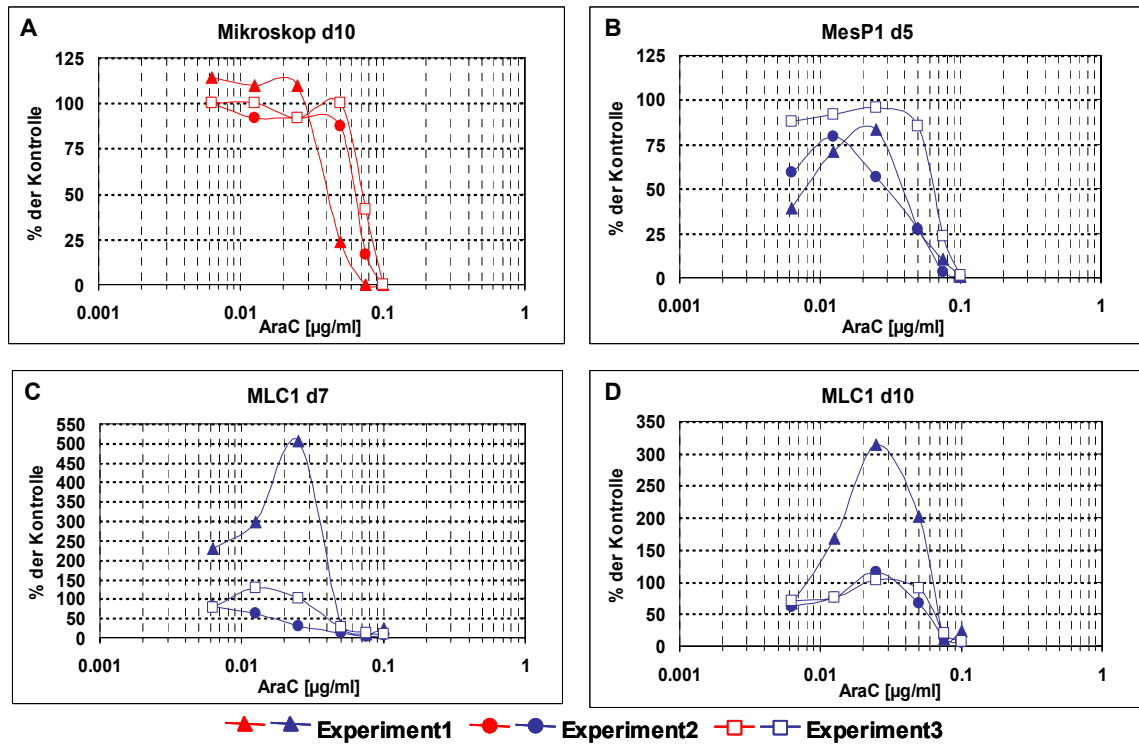


Abbildung 37: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit Cytosinarabinsid (AraC) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

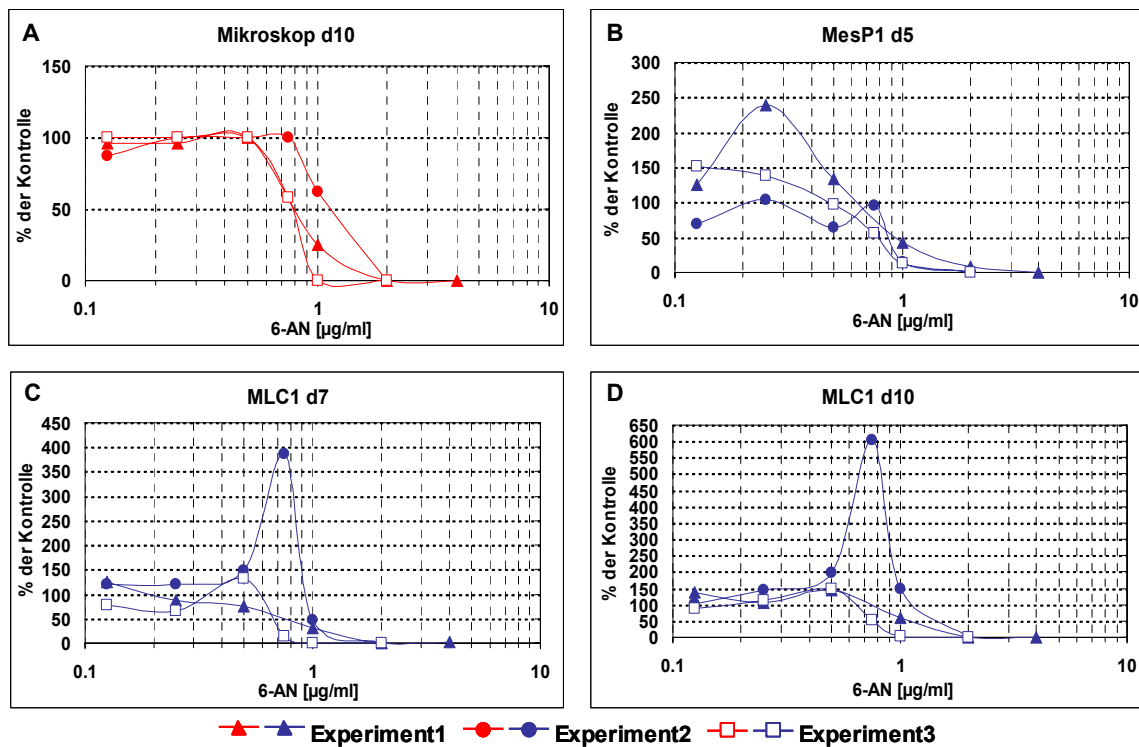


Abbildung 38: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit 6-Aminonikotinamid (6-AN) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

5.3.4 Testung schwach embryotoxischer Substanzen

Es wurden die vier *in vivo* schwach embryotoxischen Substanzen Diphenylhydantoin, Lithiumchlorid, Valproinsäure und Dexamethason eingesetzt.

5.3.4.1 Diphenylhydantoin (DPH; Phenytoin)

Die durchgeführten Experimente ergaben in der mikroskopischen Auswertung einen halbmaximalen Effekt auf die Differenzierung bei ca. 30 µg/ml (Abbildung 39). Ähnliche Werte ergaben sich bei der Messung der Genexpression von MLC1 an Tag 7 und Tag 10. Bei der Messung von MesP1 kam es in zwei von drei Experimenten zu einer Induktion der Genexpression bei Konzentrationen um 10-30 µg/ml, bei höheren Konzentrationen erfolgte jedoch ein Abfall, so dass sich in allen Endpunkten halbmaximale Effekte von ca. 30-40 µg/ml ergaben.

Es konnten zwölf Datensätze in das Prädiktionsmodell eingesetzt werden. Die Einschätzung des embryotoxischen Potentials mit dem iPM ergab in allen Fällen die Klassifizierung „schwach embryotoxisch“ (Tabelle 10).

5.3.4.2 Lithiumchlorid (LiCl)

Die halbmaximale Inhibition der Differenzierung trat bei der Testung von LiCl im Bereich um ca. 300 µg/ml auf (Abbildung 40). Die Messung der Genexpression in den drei durchgeführten Tests führte zu variablen Kurvenverläufen. So lag bei der Messung von MesP1 und bei MLC1 an Tag 7 die Genexpression in einem Experiment bei Substanzkonzentrationen von ca. 100 µg/ml unter 50%, stieg dann jedoch bei höheren Konzentrationen über 50% an. Da die $IC_{50\text{ Exp}}$ -Werte von MesP1 in den anderen beiden Experimenten gut übereinstimmten, wurde das Ergebnis dieses Experiments mit in die Prädiktion einbezogen. Bei MLC1 Tag 7 konnte die entsprechende Kurve nicht verwendet werden, da der Verlauf der anderen beiden Kurven mit unterschiedlichen, validen $IC_{50\text{ Exp}}$ -Werten keine Einschätzung zuließ, welcher der Schnittpunkte mit der 50%-Achse der wahrscheinlich aussagekräftige sei. Eine Kurve von MesP1 zeigte einen Anfangswert, der unter 50% lag.

Es konnten somit elf Datensätze in das Prädiktionsmodell eingetragen werden, die alle das Ergebnis „schwach embryotoxisch“ ergaben (Tabelle 10).

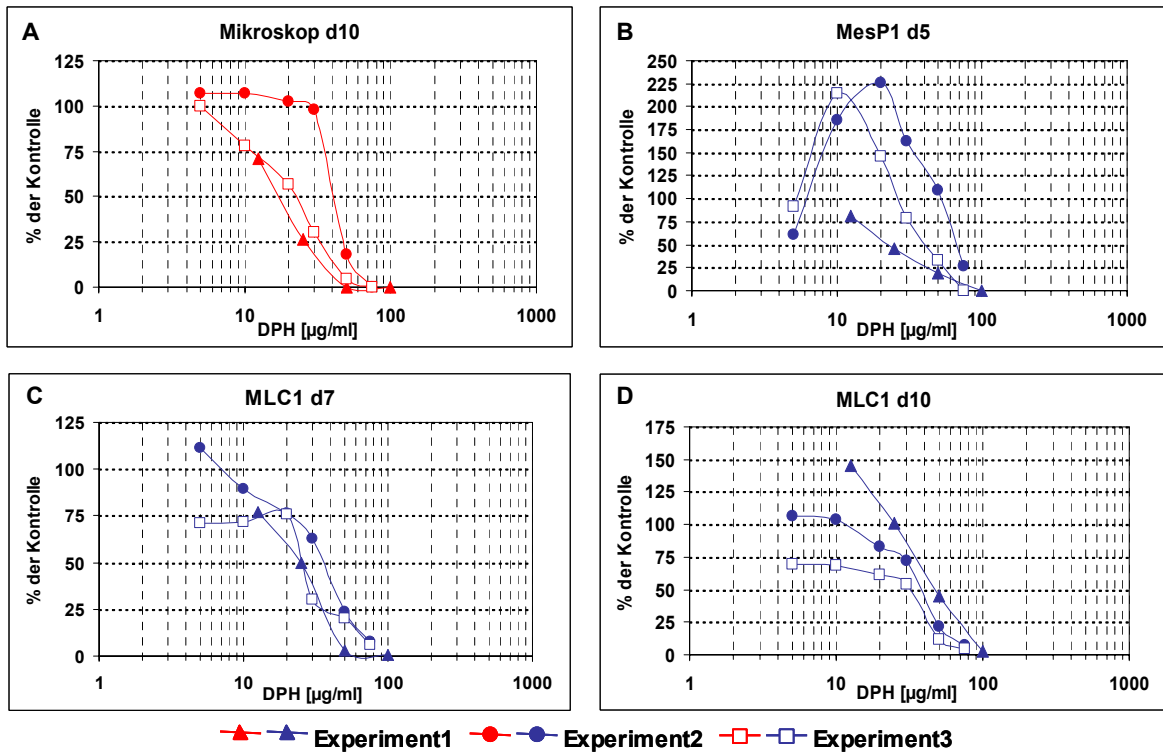


Abbildung 39: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit Diphenylhydantoin (DPH) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

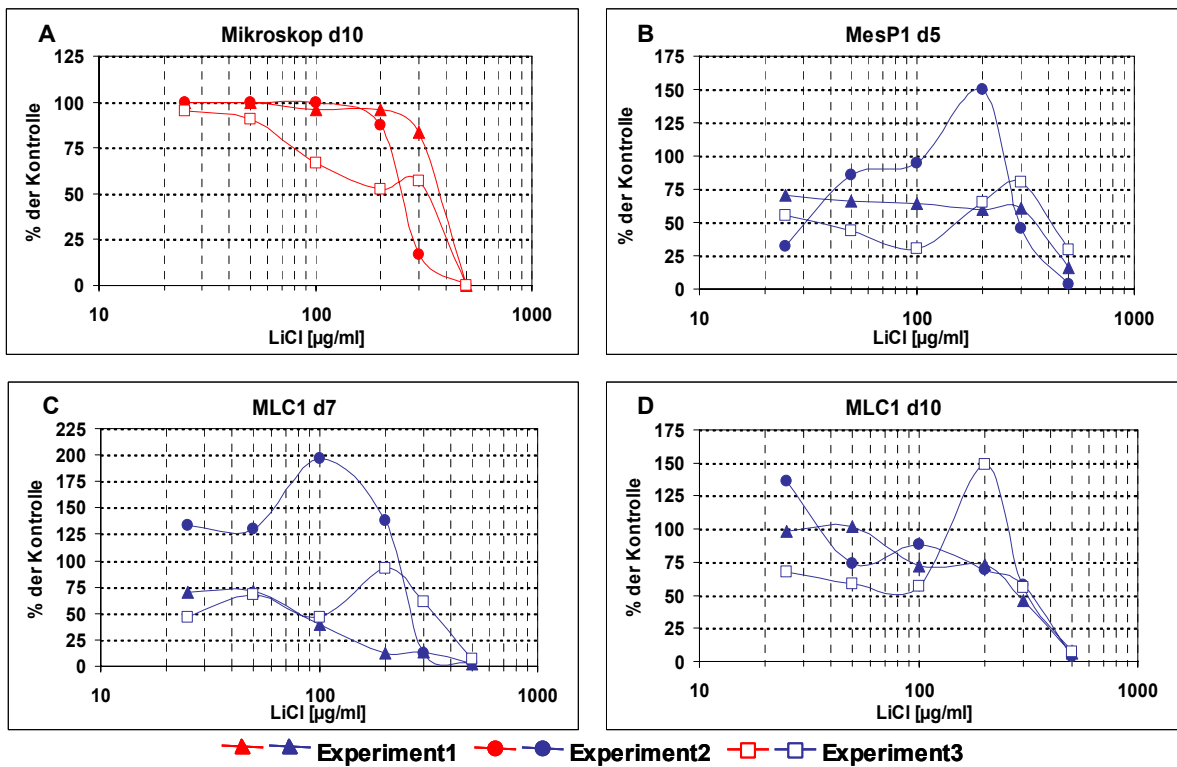


Abbildung 40: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit Lithiumchlorid (LiCl) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

5.3.4.3 Valproinsäure (VPA)

Behandlung der D3-Zellen mit VPA während der Differenzierung führte zu ID_{50} - und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werten, die eine gute Übereinstimmung aufwiesen (Abbildung 41). In den durchgeführten Experimenten zeigten die Kurven der Genexpressionsmessungen zwar in einigen Fällen hohe Induktionswerte, es konnten jedoch für die vier gezeigten Endpunkte sehr gut übereinstimmende ID - und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte ermittelt werden. Die halbmaximale Hemmung von Differenzierung und Genexpression lag im Mittel bei ca. 90 $\mu\text{g/ml}$ mit Werten zwischen 60 und 140 $\mu\text{g/ml}$.

Die Einschätzung des embryotoxischen Potentials mit dem iPM ergab in elf von zwölf Fällen die Klassifizierung „schwach embryotoxisch“ (Tabelle 10). Bei einer Messung von MLC1 an Tag 7, wo der resultierende $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wert höher lag als die verwendeten Zytotoxizitätswerte der D3 und 3T3-Zellen (Experiment 1) wurde die Substanz als „nicht embryotoxisch“ eingestuft.

5.3.4.4 Dexamethason (Dex)

Die Wirkung von Dexamethason auf die Differenzierung wurde im Bereich von 1-50 $\mu\text{g/ml}$ untersucht. Die ID_{50} -Werte stimmten in den durchgeführten Experimenten sehr gut überein, auch die $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte zeigten eine große Kongruenz (Abbildung 42). Einzelne Abweichungen traten bei der Messung von MesP1 auf, wo in Experiment 1 die niedrigen getesteten Konzentrationen Werte unter 50% der Kontrolle ergaben. Die ermittelten ID - und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte lagen im Bereich von 40 $\mu\text{g/ml}$. Bei der Messung von MLC1 an Tag 7 lag ein Wert mit 20 $\mu\text{g/ml}$ etwas niedriger (Experiment 2).

Mit Dexamethason wurden auch eigene Zytotoxizitätsassays mit D3- und 3T3-Zellen erstellt. Die ins Prädiktionsmodell eingetragenen Werte stammen somit aus zusammengehörigen Experimenten. Die Auswertung der Ergebnisse mit dem iPM führte in allen Fällen zu einer Klassifizierung als schwach embryotoxisch (Tabelle 10).

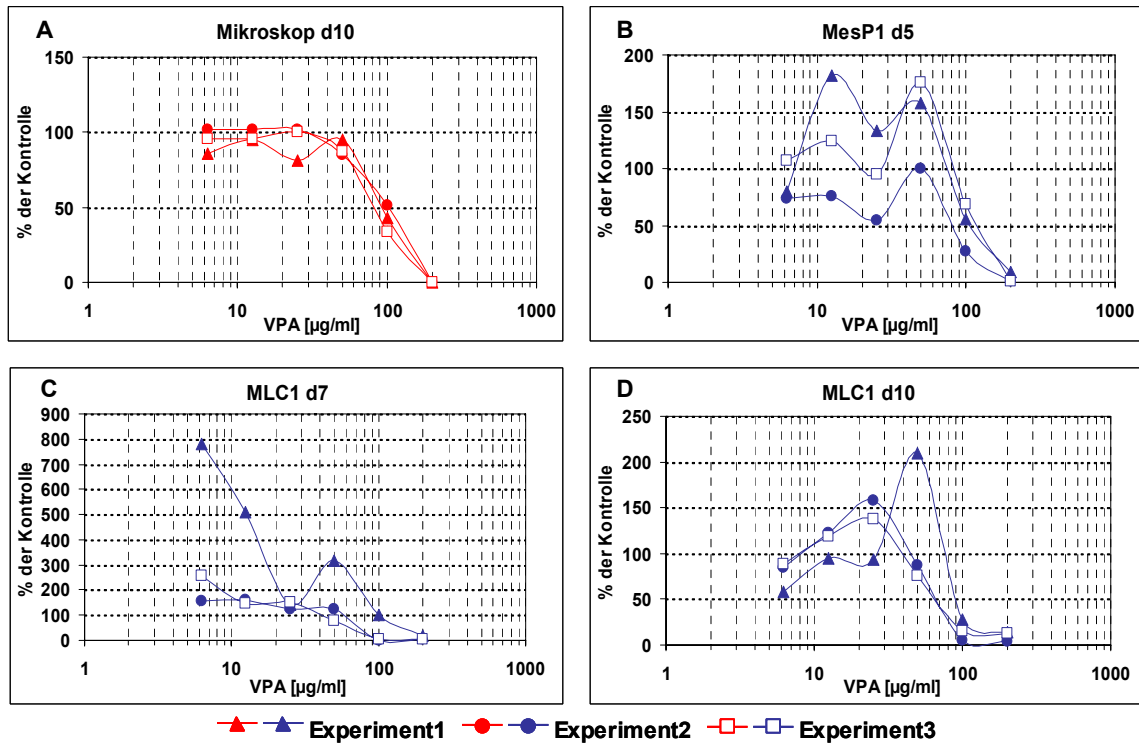


Abbildung 41: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit Valproinsäure (VPA) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

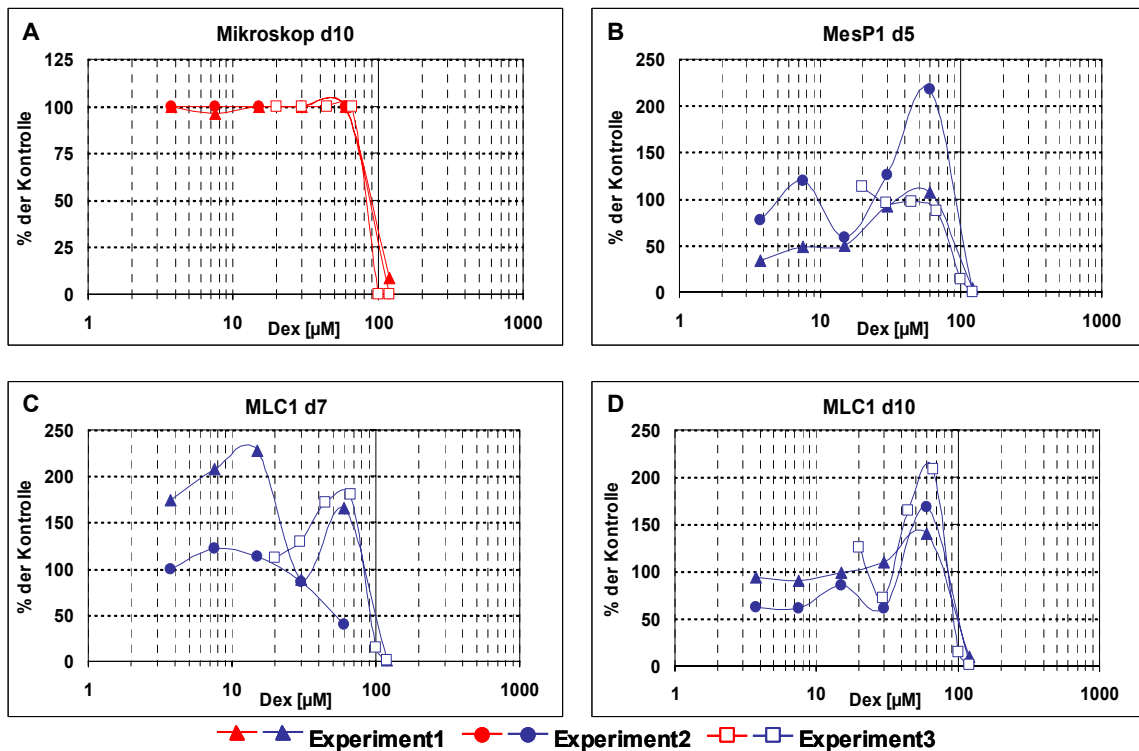


Abbildung 42: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit Dexamethason (Dex) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

5.3.5 Testung nicht embryotoxischer Substanzen

Drei Substanzen ohne embryotoxische Wirkung wurden ausgewählt, um deren Effekte auf die Genexpression der gewählten Markergene zu untersuchen. Dabei handelte es sich um Campher, Saccharin und Penicillin G.

Die Testung der nichtembryotoxischen Substanzen erwies sich z. T. als schwierig. Zum einen mussten die Testkonzentrationen oft sehr hoch gewählt werden, so dass zytotoxische Effekte auftraten, während im gleichen Ansatz noch Kardiomyozyten gefunden wurden. Zum anderen ließ sich eine Substanz (Campher) schlecht im Kulturmedium in Lösung bringen.

5.3.5.1 Campher (Cam)

Im Test erwies sich Campher als schwierig, da die alkoholische Stammlösung im Zellkulturmedium oft ausfiel.

Der getestete Bereich lag zwischen 30 und 1000 µg/ml (Abbildung 43). In der mikroskopischen Auswertung ergaben sich in zwei von drei Versuchen ID₅₀-Werte, die zwischen 700 und 800 µg/ml lagen, im dritten Experiment wurde bis zur höchsten Testkonzentration von 1000µg/ml keine ID₅₀ erreicht. Die Durchführung von Genexpressionsmessungen führte zu Kurven mit zum Teil großen Schwankungen. Dies trat besonders bei der Messung von MLC1 an Tag 7 auf, wo ein Experiment keine valide Kurve ergab (Experiment 2). In Experiment 3, in dem bei der mikroskopischen Untersuchung kein ID₅₀-Wert erreicht wurde, ergaben sich auch keine unter 50% der Kontrolle abfallenden Werte bei der Messung der Genexpression. Die MesP1-Expression zeigte in beiden gemessenen Probensätzen mit steigender Cam-Konzentration einen Anstieg.

Insgesamt konnten 9 Datensätze mit dem iPM ausgewertet werden. Der Höchstwert, der in das iPM eingesetzt werden kann, beträgt 1000 µg/ml. Zeigt sich bis zu dieser Konzentration kein Abfall, ist es zulässig, als Endpunkt 1000 einzusetzen. Im Fall von Campher wurde dies in sechs Fällen durchgeführt. Auch die Kurven von MesP1 wurden daher für die Prädiktion verwendet. Alle Datensätze ergaben als Klassifizierung das Ergebnis „nicht embryotoxisch“ (Tabelle 11).

5.3.5.2 Saccharin (Sac)

Nachdem Saccharin bei der mikroskopischen Analyse bei Konzentrationen bis 1500 µg/ml in zwei Experimenten keine 50%ige Verringerung im Auftreten von Kardiomyozyten hervorrief, wurde ein drittes Experiment mit einer Maximalkonzentration von 2500 µg/ml angesetzt. Auch

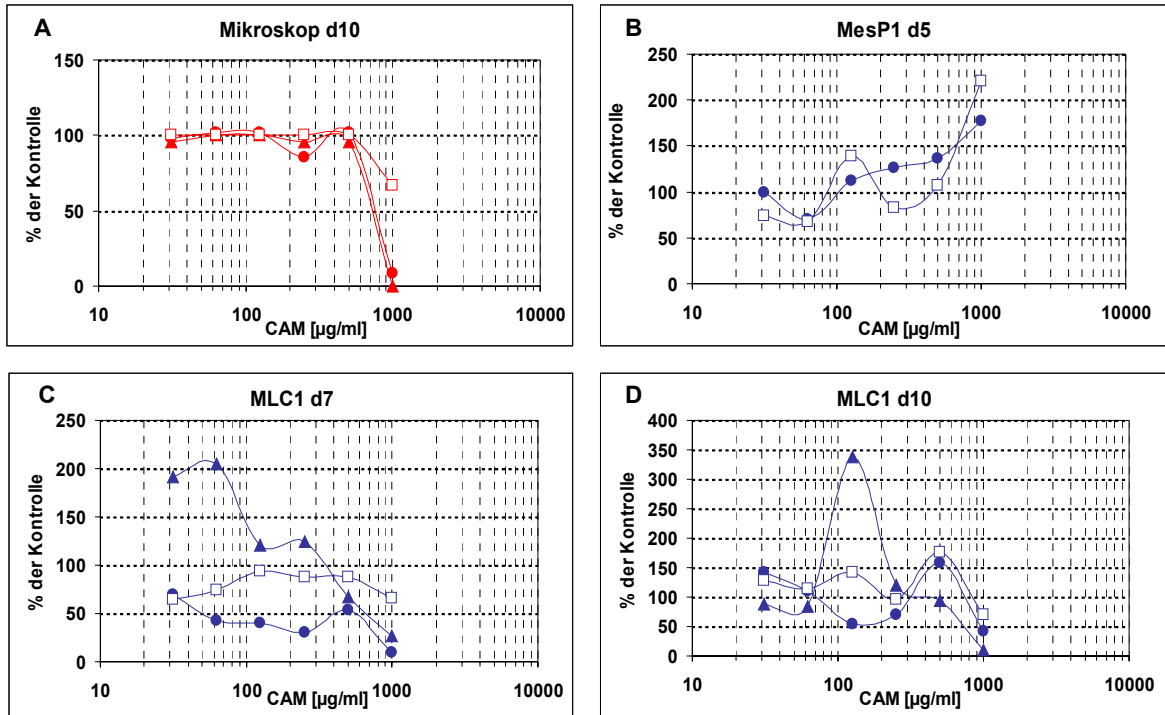


Abbildung 43: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit Campher (Cam) a anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

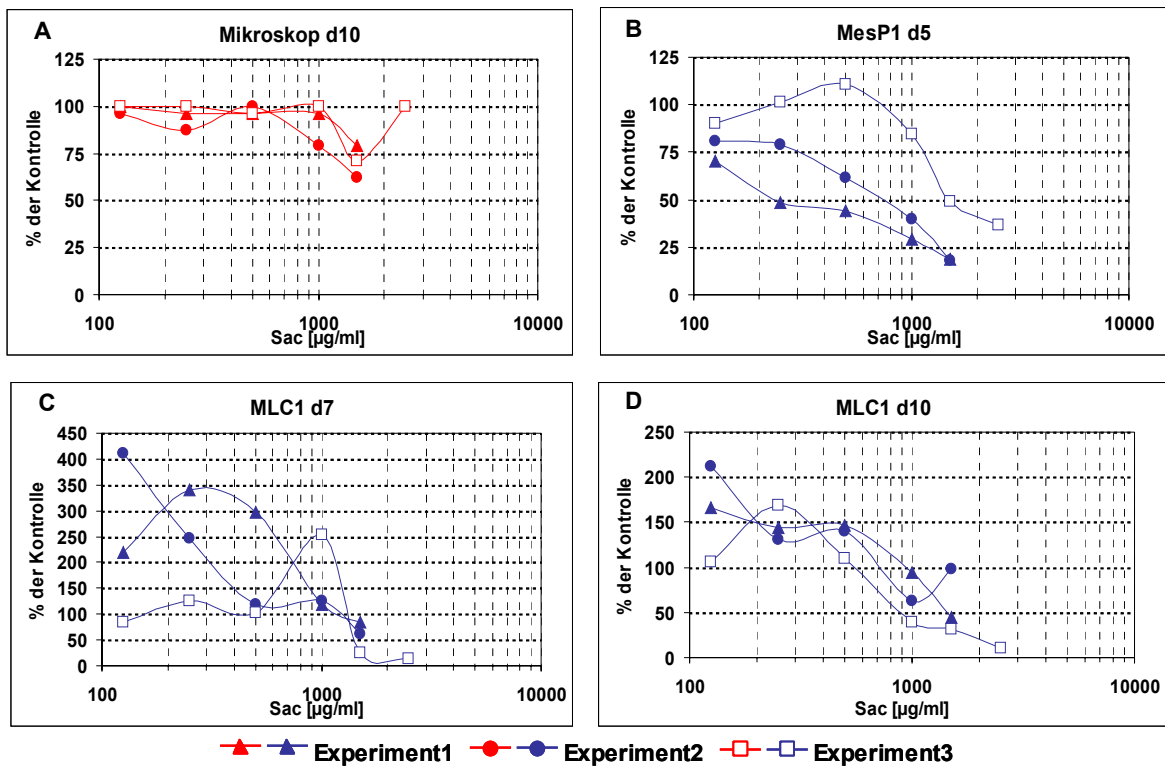


Abbildung 44: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit Saccharin (Sac) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

in diesem Experiment konnte jedoch kein mikroskopischer ID_{50} -Wert bestimmt werden (Abbildung 44). In der Genexpressionsanalyse zeigte sich dagegen bei steigender Saccharinkonzentration eine Verringerung der Genexpression der drei gemessenen Endpunkte. Die Halbhemmkonzentration der MLC1-Expression lag an Tag 7 und Tag 10 bei Konzentrationen über 700 $\mu\text{g/ml}$. Die Messung von MesP1 erbrachte sehr unterschiedliche Werte. In einem Experiment trat ein Abfall der Genexpression auf, der zu einem $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wert bei 210 $\mu\text{g/ml}$ führte.

Dieser niedrige Wert führte zu einer falschen Klassifikation im iPM mit dem Ergebnis „schwach embryotoxisch“ (Tabelle 11). Die Auswertung mit dem Prädiktionsmodell ergab in den anderen Fällen eine Klassifizierung als „nicht embryotoxisch“.

5.3.5.3 Penicillin G (PenG)

Effekte von PenG auf die D3-Zelldifferenzierung wurden bis zu einer Konzentration von 1500 $\mu\text{g/ml}$ untersucht. Die mikroskopische Auswertung an Tag 10 nach Behandlung mit PenG zeigte bei den abgebildeten Versuchen eine gute Übereinstimmung, wenn auch nicht in jedem Fall ein ID_{50} -Wert erreicht wurde (Abbildung 45). Auch die Genexpressionsmessungen an Tag 5 zeigten eine akzeptable Übereinstimmung miteinander, wobei die $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte etwas niedriger lagen als in der morphologischen Auswertung. Die Messung von MLC1 an Tag 7 zeigte einen sehr heterogenen Verlauf, da die Genexpression bei MLC1 in Experiment 1 sehr niedrig lag und in Experiment 2 eine sehr hohe Induktion zeigte. Ein heterogener Verlauf trat auch bei der Messung von MLC1 an Tag 10 auf, bei der in Experiment 2 kein $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wert bestimmt werden konnte.

Es wurden zehn Datensätze in das iPM eingesetzt, die alle die Klassifizierung „nicht embryotoxisch“ ergaben (Tabelle 11). Eine Kurve von MLC1 an Tag 7 wurde wegen ihres sehr niedrigen Verlaufs nicht verwendet (Experiment 1; Beginn der Kurve um 50% der Kontrolle), eine Kurve von MLC an Tag 10 wurde wegen ihres ansteigenden Verlaufs nicht mit einbezogen.

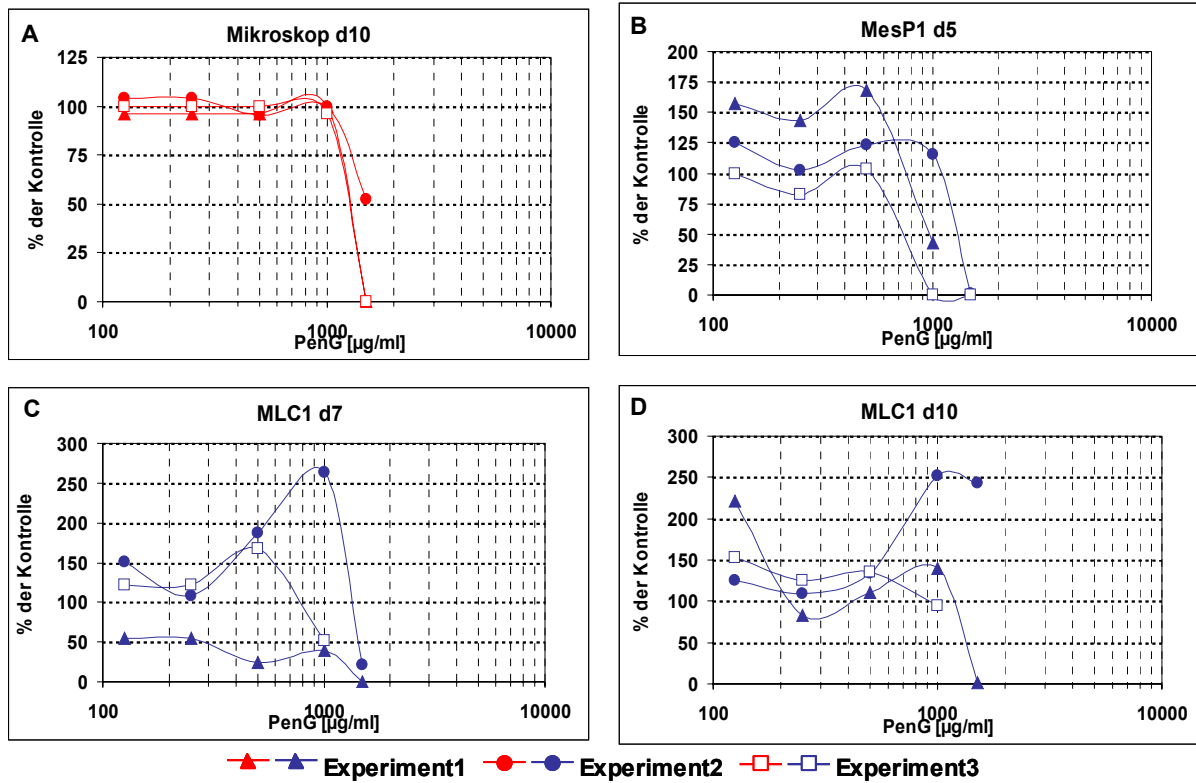


Abbildung 45: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzzelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit Penicillin G (PenG) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan). Abweichend vom Standardschema wurde MLC1 in Experiment 3 an Tag 9 statt an Tag 7 gemessen.

5.3.6 Testung der nicht klassifizierten Substanzen

5.3.6.1 Y27632

Die mit Y27632 durchgeführten Substanztestungen ergaben sehr heterogene Verläufe, wobei sich die vier Experimente in zwei Gruppen einteilen ließen (Abbildung 46). In der einen Gruppe wurde keine mikroskopische ID_{50} erreicht, weil die Anzahl an EBs mit Kardiomyozyten bis zur höchsten getesteten Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ konstant blieb. Dieselben Versuche zeigten auch keine $IC_{50 \text{ Exp}}$ bei der Messung von MLC1 an Tag 10, während die Expression von MesP1 und MLC1 an Tag 7 bei relativ hohen Konzentrationen abfiel und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte bestimmt werden konnten. In der zweiten Gruppe ergaben sich ID_{50} - sowie $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte für die Messung von MLC1 an Tag 7 und Tag 10. In diesen Experimenten zeigte jedoch MesP1 einen ansteigenden Verlauf, so dass kein $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wert bestimmt werden konnte. In den durchgeführten MTT-Tests mit D3- und 3T3-Zellen trat diese Heterogenität nicht auf (Tabelle 12).

Es konnten acht Datensätze erstellt werden, die in das Prädiktionsmodell (iPM) eingesetzt wurden. Alle ergaben trotz der differierenden Kurven die Klassifizierung „schwach embryotoxisch“ (Tabelle 12).

5.3.6.2 Staurosporin (STS)

Der getesteten Konzentrationsbereich lag zwischen 0,1 ng/ml und 0,01 $\mu\text{g/ml}$. Die durchgeführten Untersuchungen mit STS ergaben gut übereinstimmende Kurven in der mikroskopischen Auswertung, deren resultierende ID_{50} -Werte im Bereich von 0,001 bis 0,004 $\mu\text{g/ml}$ lagen (Abbildung 47). Die Messung der Genexpression zeigte unterschiedliche Verläufe bei den verschiedenen Endpunkten. Ein starker Effekt trat bei der MesP1-Messung auf, die der alle drei Kurven einen steilen Abfall zeigten. Die resultierenden $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte lagen eine Zehnerpotenz niedriger als die ID_{50} -Werte der mikroskopischen Auswertung.

Die Messung von MLC1 ergab hohe Induktionswerte in Experiment 3, wobei die $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte trotzdem im gleichen Bereich wie die ID_{50} -Werte lagen. In Experiment 2 ergaben sich keine $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte bei der Messung von MLC1 an Tag 7 und Tag 10. Dieser Versuch erbrachte auch in der mikroskopischen Auswertung nur sehr knapp eine Inhibierung um 50%. Die Kurven von Experiment 1 zeigen einen abfallenden Verlauf mit niedrigen $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werten. Auch der Verlauf der mikroskopischen Auswertung lag hierbei etwas niedriger als in den anderen Experimenten. Es konnten sechs vollständige Datensätze in das Prädiktionsmodell eingetragen werden (Tabelle 12). Die Auswertung des Prädiktionsmodells ergab für die Messung von MesP1 das Ergebnis

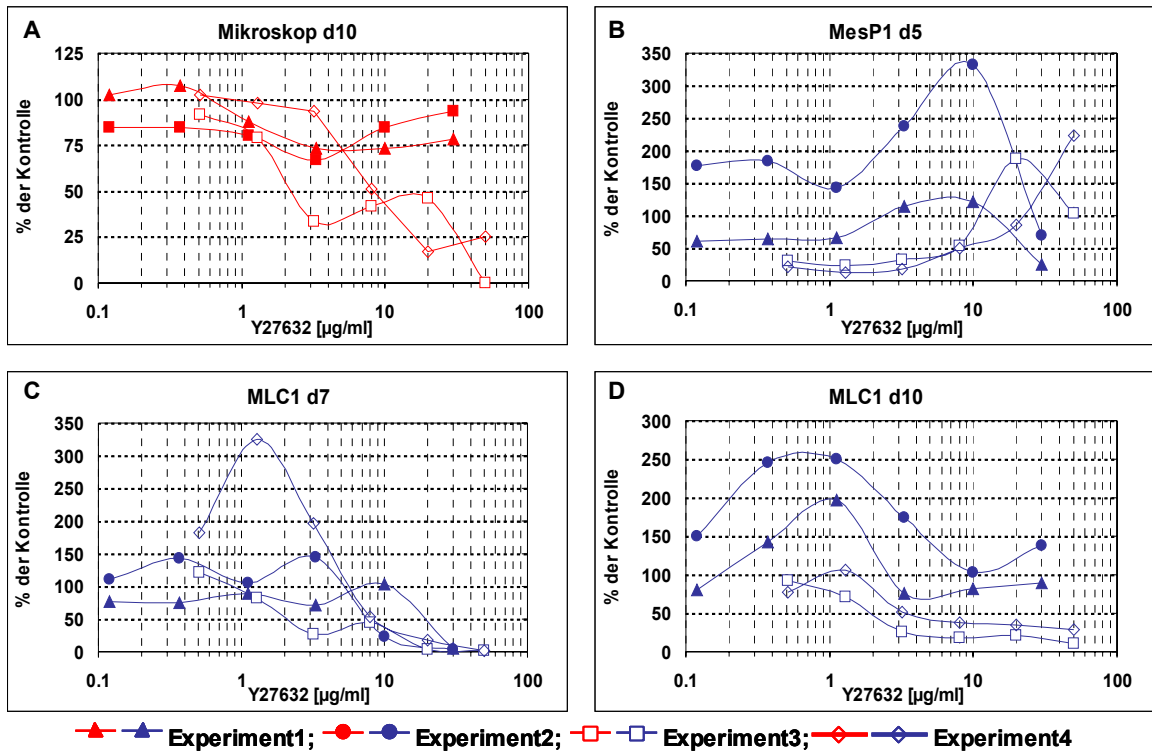


Abbildung 46: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzcelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Y27632 anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

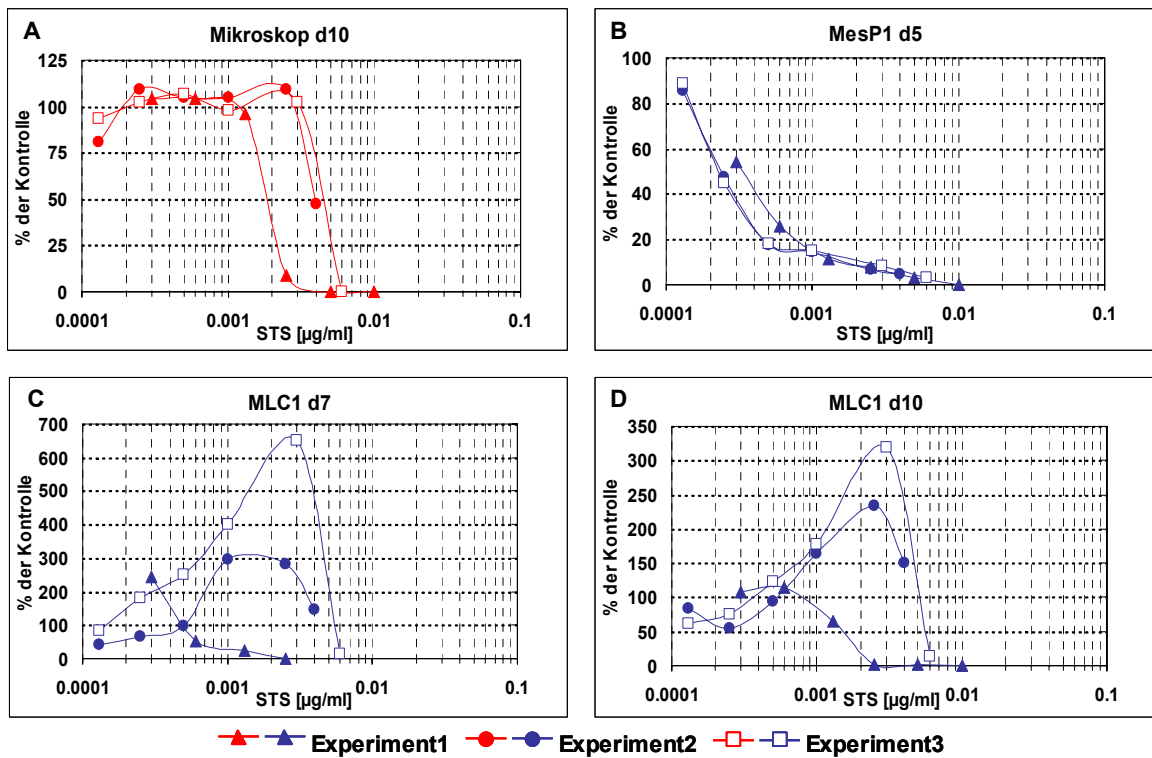


Abbildung 47: Vergleich der mikroskopischen Auswertung der Herzcelldifferenzierung an Tag 10 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Staurosporin (STS) anhand kontrahierender Areale (A) mit der Messung der Expression der Gene MesP1 an Tag 5 (B) und MLC1 an Tag 7 (C) sowie Tag 10 der Differenzierung (D) mittels qRT-PCR (TaqMan).

„stark embryotoxisch“, wobei bei den vorhandenen Werte der anderen drei Endpunkte „nicht embryotoxisch“ resultierte. Dieses Ergebnis ist auf die relativ großen Unterschiede in der Messung der ID_{50} - und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte gegenüber MesP1 zurückzuführen.

5.3.7 Zusammenfassung der resultierenden ID_{50} - und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte

Von den gezeigten Dosis-Wirkungskurven wurden jeweils die Schnittpunkte mit der 50%-Achse für jeden der vier Endpunkte bestimmt. Die resultierenden ID_{50} -Werte der mikroskopischen Auswertung, sowie die $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte der Genexpressionsmessungen sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Konzentrationen sind wie in den vorangehenden Abbildungen in $\mu\text{g/ml}$ und zusätzlich in $\mu\text{mol/l}$ dargestellt.

Deutlich ist eine Abstufung der Wirksamkeit der Substanzen zu sehen. Die bekannten nicht embryotoxischen Substanzen wiesen ID_{50} - und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte auf, die oberhalb $700 \mu\text{g/ml}$ lagen. Bei den schwach embryotoxischen Substanzen lagen die Werte zwischen 10 und $400 \mu\text{g/ml}$, während die stark embryotoxischen Substanzen schon bei Konzentrationen bis zu $1 \mu\text{g/ml}$ halbmaximale Effekte hervorriefen.

Die Unterschiede oder Ähnlichkeiten der ID_{50} - und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte der vier Endpunkte dienten zur Einschätzung der Vergleichbarkeit der molekularen Marker und der mikroskopischen Auswertung. Zu diesem Zweck wurden die Substanztests mit dem rangbasierten Friedman-Test ausgewertet. Es wurden 21 Tests mit 9 Substanzen herangezogen, in denen jedem der vier Endpunkte ein eindeutiger Rang zugeordnet werden konnte.

Die Auswertung mit dem Friedman-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede durch die Verwendung der vier unterschiedlichen Endpunkte ($P = 0,203$).

Tabelle 8: Ergebnisse der Substanztestungen in µg/ml und µmol/l. Dargestellt sind die aus den gezeigten Kurven bestimmten ID₅₀- und IC_{50 Exp}-Werte

in vivo	Sub- stanz	MW	run	Mikroskop	MesP1	MLC1 d7	MLC1 d10	Mikroskop	MesP1	MLC1 d7	MLC1 d10	
				Werte in µg/ml				Werte in µM				
stark embryotoxisch	5-FU	130,1	1	0,057	> 0,06	0,058	> 0,06	0,44	> 0,46	0,45	> 0,46	
			2	> 0,06	> 0,06	0,06	> 0,06	> 0,46	> 0,46	0,46	> 0,46	
			3	0,063		0,063	0,067	0,48		0,48	0,52	
	RA	300,4	1		0,0001				0,00033			
			2		0,00007	0,00004	0,00008		0,00023	0,00012	0,00027	
			3		0,00003		0,00005		0,00010		0,00016	
	ARA C	279,7	1	0,04	0,039	0,049	0,068	0,14	0,14	0,18	0,24	
			2	0,061	0,029	0,017	0,058	0,22	0,10	0,06	0,21	
			3	0,07	0,065	0,04	0,064	0,25	0,23	0,14	0,23	
	6-AN	137,1	1	0,8	1,1	0,75	1,1	5,8	8,0	5,5	8,0	
			2	1,1	0,85	0,98	1,3	8,0	6,2	7,1	9,5	
			3	0,79	0,75	0,66	0,75	5,8	5,5	4,8	5,5	
schwach embryotoxisch	DPH	274,3	1	17	22	24	45	62	80	88	164	
			2	40	66	35	38	146	241	128	139	
			3	22	40	25	31	80	146	91	113	
	LICI	42,4	1	380	330	82	280	8964	7784	1934	6605	
			2	240	290	250	310	5661	6841	5897	7313	
			3	310	400	305	305	7313	9436	7195	7195	
	VPA	144,2	1	90	100	140	90	624,1	693,4	970,8	624,1	
			2	100	80	73	65	693,4	554,7	506,2	450,7	
			3	81	110	61	64	561,7	762,8	423,0	443,8	
	Dex	392,5	4	35,3	35,3	39,3	39,3	90	90	100	100	
			5	34,1	39,3	20,4	39,3	87	100	52	100	
			6	32,6	32,2	36,1	36,5	83	82	92	93	
nicht embryotoxisch	CAM	152,2	1	710		630	730	4664		4138	4795	
			2	730	>1000			4795	>6500			
			3	>1000	>1000	>1000	>1000	>6500	>6500	>6500	>6500	
	SAC	223,2	1	>1500	210	>1500	1300	> 6720	941	> 6720	5825	
			2	>1500	760	>1500		> 6720	3405	> 6720	0	
			3	>2500	1300	1400	890	>11200	5825	6273	3988	
PenG	356,4	1	1250	950		1200	3508	2666		3367		
		2	1400	1200	1300		3928	3367	3648			
		3	1200	710	1000	1150	3367	1992	2806	3227		
unbekannt	Y	338,3	1	-	23	20	-		68,0	59,1		
			2	-	-	7,6	-			22,5		
			3	2,4/ 20	-	2,1	1,9	7/ 59		6	5,6	
			4	8,2	-		3,5	24			10,3	
	STS	466,5	1	0,0018	0,00033	0,0006	0,0015	0,0039	0,0007	0,0013	0,0032	
			2	0,0039	0,00024	-	-	0,0084	0,0005			
3			0,0045	0,00023	0,0058	0,0056	0,0096	0,0005	0,0124	0,0120		

5.3.8 Klassifizierung des embryotoxischen Potentials der untersuchten Substanzen

Die in Tabelle 8 gezeigten ID₅₀- und IC_{50 Exp}-Werte wurden zur Einschätzung des embryotoxischen Potentials in das mathematische Prädiktionsmodell (iPM) eingesetzt. Für die Substanzen Dex, Y27632 und STS wurden eigene IC_{50 D3}- und IC_{50 3T3}-Werte eingesetzt. Für die restlichen Substanzen wurden historische IC_{50 D3}- und IC_{50 3T3}-Werte der ZEBET herangezogen, um eine Auswertung zu ermöglichen.

Tabelle 9: Ergebnisse der Testung von 4 stark embryotoxischen Substanzen mit dem iPM

In Spalten 2-5 wurden die Ergebnisse der Endpunkte der im EST verwendeten Assays eingesetzt. Die in dieser Arbeit ermittelten ID₅₀- und IC_{50 Exp}-Werte der Differenzierungs- und Genexpressionsassays sind in der dritten Spalte eingetragen. Die Werte der Zytotoxizitätstest IC_{50 D3} und IC_{50 3T3} sind Mittelwerte, die aus Datensätzen der ZEBET übernommen wurden, um eine Einschätzung mittels iPM durchführen zu können. In den Spalten equation 1-3 sind die Lösungen der drei Gleichungen des Prädiktionsmodells aufgeführt. Der höchste Wert dieser Gleichungen bestimmt die Prädiktion der embryotoxischen Klasse (class iPM), die unter „*in vitro*“ ausformuliert angegeben ist. Dabei steht equation 1 für „nicht“, 2 für „schwach“, und 3 für „stark embryotoxisch“. Die *In-vivo*-Klassifizierung der Testsubstanz ist in der letzten Spalte eingetragen.

Substanz, Endpunkt	RUN	ID ₅₀ , IC _{50Exp} µg/ml	IC _{50 D3} µg/ml	IC _{50 3T3} µg/ml	equation 1	equation 2	equation 3	class iPM	in vitro	in vivo
5-FU Mikroskop T10	1	0,057	0,087	0,3	-26,83	-12,95	0,64	3	stark	stark
	2	0,06	0,087	0,3	-26,77	-12,93	0,63	3	stark	stark
	3	0,063	0,087	0,3	-26,72	-12,91	0,61	3	stark	stark
5-FU MesP1 T5	1	0,06	0,087	0,3	-26,77	-12,93	0,63	3	stark	stark
	2	0,06	0,087	0,3	-26,77	-12,93	0,63	3	stark	stark
	3									
5-FU MLC1 T7	1	0,058	0,087	0,3	-26,81	-12,94	0,64	3	stark	stark
	2	0,06	0,087	0,3	-26,77	-12,93	0,63	3	stark	stark
	3	0,063	0,087	0,3	-26,72	-12,91	0,61	3	stark	stark
5-FU MLC1 T10	1	0,06	0,087	0,3	-26,77	-12,93	0,63	3	stark	stark
	2									
	3	0,067	0,087	0,3	-26,65	-12,88	0,59	3	stark	stark
RA Mikroskop T10	1									
	2									
	3									
RA MesP1 T5	1	0,0001	0,04	0,08	-32,41	-16,24	1,64	3	stark	stark
	2	0,00007	0,04	0,08	-32,41	-16,24	1,64	3	stark	stark
	3	0,00003	0,04	0,08	-32,41	-16,24	1,64	3	stark	stark
RA MLC1 T7	1									
	2	0,00004	0,04	0,08	-32,41	-16,24	1,64	3	stark	stark
	3									
RA MLC1 T10	1									
	2	0,00008	0,04	0,08	-32,41	-16,24	1,64	3	stark	stark
	3	0,00005	0,04	0,08	-32,41	-16,24	1,64	3	stark	stark
AraC Mikroskop T10	1	0,04	0,0039	17,5	-22,10	-10,11	3,29	3	stark	stark
	2	0,061	0,0039	17,5	-22,09	-10,11	3,29	3	stark	stark
	3	0,07	0,0039	17,5	-22,09	-10,11	3,29	3	stark	stark
AraC MesP1 T5	1	0,039	0,0039	17,5	-22,10	-10,11	3,29	3	stark	stark
	2	0,29	0,0039	17,5	-22,02	-10,08	3,27	3	stark	stark
	3	0,065	0,0039	17,5	-22,09	-10,11	3,29	3	stark	stark
AraC MLC1 T7	1	0,049	0,0039	17,5	-22,09	-10,11	3,29	3	stark	stark
	2	0,017	0,0039	17,5	-22,10	-10,11	3,29	3	stark	stark
	3	0,04	0,0039	17,5	-22,10	-10,11	3,29	3	stark	stark
AraC MLC1 T10	1	0,068	0,0039	17,5	-22,09	-10,11	3,29	3	stark	stark
	2	0,058	0,0039	17,5	-22,09	-10,11	3,29	3	stark	stark
	3	0,064	0,0039	17,5	-22,09	-10,11	3,29	3	stark	stark
6-AN Mikroskop T10	1	0,8	2,75	15,5	-12,18	-3,38	-2,24	3	stark	stark
	2	1,1	2,75	15,5	-12,07	-3,35	-2,27	3	stark	stark
	3	0,79	2,75	15,5	-12,18	-3,39	-2,24	3	stark	stark
6-AN MesP1 T5	1	1,1	2,75	15,5	-12,07	-3,35	-2,27	3	stark	stark
	2	0,85	2,75	15,5	-12,16	-3,38	-2,24	3	stark	stark
	3	0,75	2,75	15,5	-12,19	-3,39	-2,24	3	stark	stark
6-AN MLC1 T7	1	0,75	2,75	15,5	-12,19	-3,39	-2,24	3	stark	stark
	2	0,98	2,75	15,5	-12,12	-3,36	-2,26	3	stark	stark
	3	0,66	2,75	15,5	-12,23	-3,40	-2,23	3	stark	stark
6-AN MLC1 T10	1	1,1	2,75	15,5	-12,07	-3,35	-2,27	3	stark	stark
	2	1,3	2,75	15,5	-12,01	-3,32	-2,29	3	stark	stark
	3	0,75	2,75	15,5	-12,19	-3,39	-2,24	3	stark	stark

Tabelle 10: Ergebnisse der Testung von 4 schwach embryotoxischen Substanzen mit dem iPM

In Spalten 2-5 wurden die zur Auswertung benötigten Endpunkte der im EST verwendeten Assays eingesetzt. Die in dieser Arbeit ermittelten ID₅₀- und IC_{50 Exp}-Werte der Differenzierungs- und Genexpressionsassays sind in der dritten Spalte eingetragen. Die Werte der Zytotoxizitätstest IC_{50 D3} und IC_{50 3T3} für DPH, LiCl und VPA sind Mittelwerte, die aus Datensätzen der ZEBET übernommen wurden um eine Einschätzung mittels iPM durchführen zu können. Für Dexamethason wurden eigene Zytotoxizitätstests herangezogen. Die Erklärung der Spalten ist bei Tabelle 9 angegeben.

Substanz, Endpunkt	RUN	ID ₅₀ , IC _{50Exp} µg/ml	IC _{50 D3} µg/ml	IC _{50 3T3} µg/ml	equation 1	equation 2	equation 3	class iPM	in vitro	in vivo
DPH	1	17	265,5	328	2,61	6,21	-6,21	2	schwach	schwach
Mikroskop	2	40	265,5	328	2,99	6,35	-6,32	2	schwach	schwach
T10	3	22	265,5	328	2,71	6,25	-6,23	2	schwach	schwach
DPH	1	22	265,5	328	2,71	6,25	-6,23	2	schwach	schwach
MesP1	2	66	265,5	328	3,42	6,52	-6,43	2	schwach	schwach
T5	3	40	265,5	328	3,01	6,37	-6,31	2	schwach	schwach
DPH	1	24	265,5	328	2,76	6,28	-6,24	2	schwach	schwach
MLC1	2	35	265,5	328	2,94	6,35	-6,29	2	schwach	schwach
T7	3	25	265,5	328	2,79	6,29	-6,25	2	schwach	schwach
DPH	1	45	265,5	328	3,11	6,42	-6,33	2	schwach	schwach
MLC1	2	38	265,5	328	3,01	6,38	-6,30	2	schwach	schwach
T10	3	31	265,5	328	2,91	6,34	-6,27	2	schwach	schwach
LiCl	1	380	500	740	8,11	9,09	-7,47	2	schwach	schwach
Mikroskop	2	240	500	740	7,11	8,71	-7,19	2	schwach	schwach
T10	3	310	500	740	7,61	8,90	-7,33	2	schwach	schwach
LiCl	1	330	500	740	7,75	8,96	-7,37	2	schwach	schwach
MesP1	2	290	500	740	7,47	8,85	-7,29	2	schwach	schwach
T5	3	400	500	740	8,26	9,15	-7,51	2	schwach	schwach
LiCl	1	82	500	740	5,98	8,27	-6,87	2	schwach	schwach
MLC1	2	250	500	740	7,18	8,74	-7,21	2	schwach	schwach
T7	3									
LiCl	1	280	500	740	7,40	8,82	-7,27	2	schwach	schwach
MLC1	2	310	500	740	7,61	8,90	-7,33	2	schwach	schwach
T10	3	305	500	740	7,58	8,89	-7,32	2	schwach	schwach
VPA	1	90	102	80	3,23	5,16	-6,95	2	schwach	schwach
Mikroskop	2	100	102	80	3,89	5,41	-7,13	2	schwach	schwach
T10	3	81	102	80	2,63	4,93	-6,78	2	schwach	schwach
VPA	1	100	102	80	3,89	5,41	-7,13	2	schwach	schwach
MesP1	2	80	102	80	2,56	4,90	-6,76	2	schwach	schwach
T5	3	110	102	80	4,55	5,67	-7,32	2	schwach	schwach
VPA	1	140	102	80	6,54	6,43	-7,88	1	nicht	schwach
MLC1	2	73	102	80	2,10	4,72	-6,63	2	schwach	schwach
T7	3	61	102	80	1,30	4,42	-6,40	2	schwach	schwach
VPA	1	90	102	80	3,23	5,16	-6,95	2	schwach	schwach
MLC1	2	65	102	80	1,57	4,52	-6,48	2	schwach	schwach
T10	3	64	102	80	1,50	4,50	-6,46	2	schwach	schwach
Dex	1	35,3	34,9	17,7	2,36	3,43	-7,28	2	schwach	schwach
Mikroskop	2	34,1	39,3	30,2	-0,70	2,63	-6,11	2	schwach	schwach
T10	3	32,6	34,9	40,0	-1,83	2,31	-5,55	2	schwach	schwach
Dex	1	35,3	34,9	17,7	2,36	3,43	-7,28	2	schwach	schwach
MesP1	2	39,3	39,3	30,2	0,20	2,97	-6,36	2	schwach	schwach
T5	3	32,2	34,9	40,0	-1,88	2,29	-5,54	2	schwach	schwach
Dex	1	39,3	34,9	17,7	3,54	3,88	-7,62	2	schwach	schwach
MLC1	2	20,4	39,3	30,2	-3,11	1,71	-5,42	2	schwach	schwach
T7	3	36,1	34,9	40,0	-1,36	2,49	-5,68	2	schwach	schwach
Dex	1	39,3	34,9	17,7	3,54	3,88	-7,62	2	schwach	schwach
MLC1	2	39,3	39,3	30,2	0,20	2,97	-6,36	2	schwach	schwach
T10	3	36,5	34,9	40,0	-1,31	2,51	-5,70	2	schwach	schwach

Tabelle 11: Ergebnisse der Testung von 3 nicht embryotoxischen Substanzen mit dem iPM

In Spalten 2-5 wurden die zur Auswertung benötigten Endpunkte der im EST verwendeten Assays eingesetzt. Die in dieser Arbeit ermittelten ID₅₀- und IC_{50 Exp}-Werte der Differenzierungs- und Genexpressionsassays sind in der dritten Spalte eingetragen. Die Werte der Zytotoxizitätstest IC_{50 D3} und IC_{50 3T3} sind Mittelwerte, die aus Datensätzen der ZEBET übernommen wurden um eine Einschätzung mittels iPM durchführen zu können. Die Erklärung der Spalten ist bei Tabelle 9 angegeben.

Substanz, Endpunkt	RUN	ID ₅₀ , IC _{50 Exp} µg/ml	IC _{50 D3} µg/ml	IC _{50 3T3} µg/ml	equation 1	equation 2	equation 3	class iPM	in vitro	in vivo
PenG	1	> 1000	1000	925	12,75	11,32	-8,91	1	nicht	nicht
Mikroskop	2	> 1000	1000	925	12,75	11,32	-8,91	1	nicht	nicht
T10	3	> 1000	1000	925	12,75	11,32	-8,91	1	nicht	nicht
PenG	1	950	1000	925	12,47	11,21	-8,83	1	nicht	nicht
MesP1	2	> 1000	1000	925	12,75	11,32	-8,91	1	nicht	nicht
T5	3	710	1000	925	11,09	10,68	-8,44	1	nicht	nicht
PenG	1									
MLC1	2	> 1000	1000	925	12,75	11,32	-8,91	1	nicht	nicht
T7	3	1000	1000	925	12,75	11,32	-8,91	1	nicht	nicht
PenG	1	> 1000	1000	925	12,75	11,32	-8,91	1	nicht	nicht
MLC1	2									
T10	3	> 1000	1000	925	12,75	11,32	-8,91	1	nicht	nicht
Sac	1	> 1000	1000	1000	12,52	11,28	-8,80	1	nicht	nicht
Mikroskop	2	> 1000	1000	1000	12,52	11,28	-8,80	1	nicht	nicht
T10	3	> 1000	1000	1000	12,52	11,28	-8,80	1	nicht	nicht
Sac	1	210	1000	1000	8,33	9,67	-7,61	2	schwach	nicht
MesP1	2	760	1000	1000	11,25	10,79	-8,44	1	nicht	nicht
T5	3	> 1000	1000	1000	12,52	11,28	-8,80	1	nicht	nicht
Sac	1	> 1000	1000	1000	12,52	11,28	-8,80	1	nicht	nicht
MLC1	2	> 1000	1000	1000	12,52	11,28	-8,80	1	nicht	nicht
T7	3	> 1000	1000	1000	12,52	11,28	-8,80	1	nicht	nicht
Sac	1	> 1300	1000	1000	14,11	11,89	-9,25	1	nicht	nicht
MLC1	2									
T10	3	890	1000	1000	11,94	11,06	-8,63	1	nicht	nicht
Cam	1	710	290	285	15,33	11,04	-9,93	1	nicht	nicht
Mikroskop	2	730	290	285	15,70	11,18	-10,04	1	nicht	nicht
T10	3	> 1000	290	285	20,73	13,10	-11,46	1	nicht	nicht
Cam	1									
MesP1	2	> 1000	290	285	20,73	13,10	-11,46	1	nicht	nicht
T5	3	> 1000	290	285	20,73	13,10	-11,46	1	nicht	nicht
Cam	1	630	290	285	13,84	10,46	-9,51	1	nicht	nicht
MLC1	2									
T7	3	> 1000	290	285	20,73	13,10	-11,46	1	nicht	nicht
Cam	1	730	290	285	15,70	11,18	-10,04	1	nicht	nicht
MLC1	2									
T10	3	> 1000	290	285	20,73	13,10	-11,46	1	nicht	nicht

Tabelle 12: Ergebnisse der Testung von 2 Substanzen mit unbekanntem embryotoxischen Potential mit dem iPM

In die Spalten 3-5 wurden die zur Auswertung benötigten Endpunkte der im EST verwendeten Assays eingesetzt. Die ID_{50} - und $IC_{50\text{Exp}}$ -Werte der Differenzierungs- und Genexpressionsassays, sowie die Werte der Zytotoxizitätstest $IC_{50\text{D}3}$ und $IC_{50\text{3T}3}$ wurden in dieser Arbeit gemessen. Der weitere Aufbau der Tabelle wie unter Tabelle 9 angegeben. Es konnte für diese beiden Substanzen keine *In-vivo* Klassifikation angegeben werden.

Substanz, Endpunkt	RUN	ID_{50} , $IC_{50\text{Exp}}$ µg/ml	$IC_{50\text{D}3}$ µg/ml	$IC_{50\text{3T}3}$ µg/ml	equation 1	equation 2	equation 3	class iPM	in vitro
Y27632	1	-	47	19					
Mikroskop	2	-	42	19					
T10	3	2,4 (20)	43	23	-6,70	0,21	-4,63	2	schwach
	4	8,2	25	20	-6,27	0,04	-4,63	2	schwach
Y27632	1	23	47	19	-1,19	2,25	-6,35	2	schwach
MesP1	2	-	42	19					
T5	3	-	43	23					
	4	-	25	20					
Y27632	1	20	47	19	-2,03	1,93	-6,12	2	schwach
MLC1	2	7,6	42	19	-5,66	0,48	-5,04	2	schwach
T7	3	2,1	43	23	-6,77	0,18	-4,61	2	schwach
	4		25	20					
Y27632	1	-	47	19					
MLC1	2	-	42	19					
T10	3	1,9	43	23	-6,82	0,16	-4,60	2	schwach
	4	3,5	25	20	-7,51	-0,43	-4,28	2	schwach
STS	1	0,0018	-	-					
Mikroskop	2	0,0039	0,0019	0,00045	-4,36	-10,00	-8,53	1	nicht
T10	3	0,0045	0,0016	0,00052	-4,31	-9,97	-8,38	1	nicht
STS	1	0,00033	-	-					
MesP1	2	0,00024	0,0019	0,00045	-47,52	-26,53	3,66	3	stark
T5	3	0,00023	0,0016	0,00052	-47,89	-26,67	3,93	3	stark
STS	1	0,0006	-	-					
MLC1	2	-	0,0019	0,00045					
T7	3	0,0058	0,0016	0,00052	8,95	-4,89	-12,13	1	nicht
STS	1	0,0015	-	-					
MLC1	2	-	0,0019	0,00045					
T10	3	0,0056	0,0016	0,00052	6,91	-5,67	-11,55	1	nicht