

7 Zusammenfassung

Der Embryonale Stammzelltest (EST) stellt eine tierversuchsfreie Alternativmethode dar, die zur Einschätzung des embryotoxischen Potentials von Substanzen dienen soll (Spielmann et al., 1997). Die Grundlage bildet die Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus (Linie D3), deren Fähigkeit, innerhalb von 10 Tagen kontrahierende Kardiomyozyten auszubilden, als Modell der Embryonalentwicklung verwendet wird. Die Kultivierung erfolgt dazu in Zellaggregaten, den *Embryoid Bodies* (EBs), welche an Tag 10 mikroskopisch auf kontrahierende Bereiche untersucht werden. Als Parameter für embryotoxische Substanzwirkung dient die Konzentration einer Testsubstanz, bei der die Kardiomyozytendifferenzierung in der Hälfte der EBs inhibiert wird (ID_{50}). Zur Abgrenzung allgemeiner toxischer Effekte wird zusätzlich mittels D3-Zellen und einer fibroblastoiden Zelllinie (3T3) die Halbhemmkonzentration des Zellwachstums ($IC_{50\ D3}$, bzw. $IC_{50\ 3T3}$) bestimmt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Genexpression während der Kardiomyozytendifferenzierung zu untersuchen und nach Auswahl von Kandidatengen molekulare Marker für Substanzeffekte zu etablieren.

Innerhalb des Differenzierungszeitraumes von 10 Tagen wurden mittels quantitativer RT-PCR Genexpressionsanalysen von 18 Genen durchgeführt, deren Bedeutung bei der Ausbildung des Mesoderms und des Herzens während der *In-vivo*-Entwicklung nachgewiesen ist. Darunter waren die herzmuskelspezifischen Gene des kontraktile Apparats α -MHC, β -MHC, MLC1, MLC2v, α -Actin, α -Actinin und Troponin T, Transkriptionsfaktoren der frühen mesodermalen und Herzentwicklung GATA-4, Tbx5, Hand1 und 2, MesP1 und 2, sowie Myocardin, das Cytokin Cardiotrophin-1, der Wachstumsfaktor *cripto-1* und zusätzlich die nicht-herzspezifischen Gene Oct4 und NF-L. Die Mehrzahl der Gentranskripte konnte während der Differenzierung von D3-Zellen zu Kardiomyozyten *in vitro* in Mustern gefunden werden, die mit ihrer Rolle *in vivo* in Übereinstimmung stehen. Die Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren wie MesP1 und 2, sowie Hand1 und 2 wurde zum ersten Mal in D3-Zellen während der Kardiomyozytendifferenzierung bestimmt.

Zur Etablierung molekularer Marker für eine Einschätzung embryotoxischer Effekte auf Genexpressionsebene wurden exemplarisch die Gene MesP1 und MLC1 ausgewählt, deren Expression nach Substanzbehandlung zu geeigneten Zeitpunkten (MesP1 an Tag 5, sowie MLC1 an Tag 7 und zusätzlich Tag 10) untersucht wurde.

Elf Substanzen mit bekanntem embryotoxischen Potential *in vivo* wurden ausgewählt, deren konzentrationsabhängiger Effekt auf die Differenzierung schlagender Kardiomyozyten und auf die Expression der Markergene bestimmt und verglichen wurde. Zusätzlich wurden zwei Substanzen getestet, für die keine umfangreichen *In-vivo*-Daten vorlagen. Der Vergleich der vier gemessenen Parameter in den Substanztests, mikroskopische Auswertung an Tag 10, MesP1-Expression an Tag 5, MLC1-Expression an Tag 7 und MLC1-Expression an Tag 10, zeigte, dass mit den molekularen Markern bis auf wenige Ausnahmen eine mit der konventionellen mikroskopischen Auswertung vergleichbare Sensitivität erreicht wurde.

Die Analyse der Ergebnisse der elf bekannten Testsubstanzen mit Hilfe eines mathematischen Prädiktionsmodells für die Einschätzung des embryotoxischen Potentials (Genschow et al., 2002) führte mit allen vier Endpunkten bis auf zwei Einzelergebnisse immer zur korrekten Klassifikation.

Es konnten somit erfolgreich molekulare Marker etabliert werden, von denen zwei schon zu einem früheren Zeitpunkt während der Differenzierung von D3-Zellen eine korrekte Prädiktion des embryotoxischen Potentials einer Substanz ermöglichten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, die *In-vitro*-Kardiomyozytendifferenzierung aus D3-Zellen mit Kenntnissen molekularer Abläufe zu unterlegen und dadurch die Möglichkeiten des EST zu erweitern, als Screening-Test auf embryotoxische Effekte in der frühen Substanzentwicklung eingesetzt zu werden. Die Resultate erlauben eine Verkürzung des Testzeitraumes und durch die Verwendung molekularer Endpunkte wird die Möglichkeit einer Teilautomatisierung geschaffen. Aufgrund der Tatsache, dass mit einem frühen mesodermalen Gen wie MesP1 eine korrekte Prädiktion des embryotoxischen Potentials einer Testsubstanz möglich war, können die präsentierten Ergebnisse dazu beitragen, Gene auszuwählen, die als molekulare Marker für weitere Differenzierungsvorgänge genutzt werden können.