

Analyse der Differenzierung von Herzmuskelzellen und neuronalen Zellen zur Weiterentwicklung des Embryonalen Stammzelltests (EST)

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:
Anke Visan
aus Sibiu (Rumänien)

2011

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Betreuung von
Frau Dr. Andrea Seiler
und Prof. Dr. Horst Spielmann
am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
Institut für Pharmazie – Pharmakologie und Toxikologie
an der Freien Universität Berlin
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Horst Spielmann
Institut für Pharmazie – Pharmakologie und Toxikologie
an der Freien Universität Berlin

Datum der Disputation: 16.03.2012

Für die OLFENBANDE

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Embryonale Stammzellen der Maus.....	5
1.1.1 Differenzierung zu Herzmuskelzellen.....	7
1.1.2 Neurale Differenzierung.....	8
1.2 Der Embryonale Stammzelltest (EST).....	11
1.3 Auswahl von Substanzen für die Weiterentwicklung des EST.....	12
1.4 Zielstellung der Arbeit.....	17
2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN.....	18
2.1 Zellkulturtechnik.....	18
2.1.1 Kultivierung der undifferenzierten D3-Zellen.....	18
2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung der D3-Zellen.....	19
2.1.3 Differenzierung der D3-Zellen zu Herzmuskelzellen.....	20
2.1.4 Differenzierung der D3-Zellen zu Neuronen und Gliazellen.....	21
2.2 Immunzytochemische Analysen.....	22
2.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	22
2.2.2 Durchflusszytometrie.....	24
2.2.3 Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot.....	26
2.2.4 Calcium-Imaging.....	29
2.3 Substanztestung.....	30
2.3.1 Differenzierungstest – Herzmuskelzellen.....	31
2.3.2 Differenzierungstest – Neuronen und Gliazellen.....	32
2.3.3 MTT-Zytotoxizitätstest.....	33
2.3.4 Statistik.....	35

3	ERGEBNISSE	36
3.1	Vorversuche zur Weiterentwicklung des EST – Analyse von molekularen Endpunkten für die Herzmuskelzellendifferenzierung	36
3.1.1	<i>Charakterisierung der Differenzierung zu Herzmuskelzellen</i>	36
3.1.2	<i>Quantitative Bestimmung der molekularen Marker</i>	38
3.1.3	<i>Substanztests an Herzmuskelzellen</i>	40
3.2	Weiterentwicklung des EST – Analyse von molekularen Endpunkten für die Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen	45
3.2.1	<i>Beschreibung der Differenzierung</i>	47
3.2.1.1	<i>Differenzierung nach dem Gelatine-Protokoll</i>	47
3.2.1.2	<i>Differenzierung nach dem Poly-L-Ornithin-Protokoll</i>	48
3.2.2	<i>Immunfluoreszenzmikroskopische Charakterisierung</i>	50
3.2.3	<i>Funktioneller Nachweis mittels Erfassung von Calcium-Signalen</i>	58
3.2.4	<i>Quantitative Bestimmung der molekularen Marker</i>	65
3.2.4.1	<i>Gelatine-Protokoll</i>	65
3.2.4.1.1	<i>Messung der molekularen Marker über die Zeit</i>	65
3.2.4.1.2	<i>Untersuchungen zur Protokolloptimierung</i>	69
3.2.4.2	<i>Poly-L-Ornithin-Protokoll</i>	72
3.2.4.2.1	<i>Messung der molekularen Marker über die Zeit</i>	72
3.2.4.2.2	<i>Untersuchungen zur Protokolloptimierung</i>	74
3.2.5	<i>Substanztestung</i>	78
3.2.5.1	<i>Substanztests an Neuronen</i>	78
3.2.5.2	<i>Substanztests an Neuronen und Gliazellen in Kokultur</i>	86
4	DISKUSSION	88
4.1	Weiterentwicklung des EST: Endpunkt Herzmuskelzellendifferenzierung	89
4.1.1	<i>Analyse von molekularen Markern zur Erfassung der Differenzierung zu Herzmuskelzellen</i>	89
4.1.2	<i>Evaluierung der Endpunkte für die Herzmuskelzellendifferenzierung Anhand von Substanztests</i>	90
4.1.3	<i>Fazit und Ausblick</i>	92

4.2 Weiterentwicklung des EST: Endpunkt neurale Differenzierung	94
4.2.1 Entwicklung eines standardisierbaren Protokolls.....	94
4.2.2 Analyse der Differenzierung.....	100
4.2.3 Analyse der molekularen Marker zur Erfassung der Differenzierung von Neuronen und Gliazellen.....	104
4.2.4 Evaluierung des Endpunktes für die neuronale Differenzierung anhand von Substanztests.....	106
4.2.5 Fazit und Ausblick.....	110
5 ZUSAMMENFASSUNG	112
5.1 Zusammenfassung.....	112
5.2 Summary.....	114
6 LITERATURVERZEICHNIS	116
7 PUBLIKATIONEN	131
8 DANKSAGUNG	132
9 LEBENS LAUF	133
10 ERKLÄRUNG	134
ANHANG	
1 Material.....	1
1.1 Technisches Material.....	1
1.2 Medien und Chemikalien.....	2
1.3 Antikörper.....	4
2 Medienzusammensetzungen.....	6
3 Zelllinie.....	6
4 Lösungen.....	6
5 Beschichtungen.....	8

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Die neurale Differenzierung von mES Zellen ist von der Kombination unterschiedlicher Einflussfaktoren abhängig	9
Abb. 2:	Prädiktionsmodell für die Einstufung der Substanzen im EST.....	12
Abb. 3 (A-C):	Beispiel für die Auswertung der Signale bei der durchflusszytometrischen Analyse.....	25
Abb. 4:	Schema für die Umwandlung von MTT zu Formazan.....	33
Abb. 5 (A, B):	Plattenbelegschema für den MTT-Test.....	34
Abb. 6 (A-C):	Murine ES Zellen der Linie D3 in der Phasenkontrastaufnahme...	37
Abb. 7:	Nachweis von Herzmuskelzellen.....	38
Abb. 8:	Analyse von α -Actinin und Myosin Heavy Chain (MHC) sowie der Zellzahl im zeitlichen Verlauf	40
Abb. 9:	Konzentrationsabhängiger Effekt von 5-Fluorouracil (5-FU) auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen.....	41
Abb. 10:	Konzentrationsabhängiger Effekt von all-trans Retinsäure (RA) auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen	42
Abb. 11:	Konzentrationsabhängiger Effekt von Penicillin G (PenG) auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen.....	43
Abb. 12:	Vergleich der mikroskopischen Analyse mit den molekularen Endpunkten MHC- und α -Actinin anhand der ID_{50} -Werte.....	44
Abb. 13 (A-F):	Differenzierung von mES Zellen zu Neuronen und Gliazellen auf Gelatine-beschichteten Platten.....	48
Abb. 14 (A-D):	Differenzierung von mES Zellen zu Neuronen und Gliazellen auf Poly-L-Ornithin (PLO)-beschichteten Platten.....	49
Abb. 15 (A, B):	Einfluss von Laminin auf das Wachstum von Neuriten.....	50
Abb. 16:	Nachweis von Pax6.....	51
Abb. 17:	Nachweis von Nestin.....	52
Abb. 18:	Nachweis von Radialgliazellen.....	53
Abb. 19:	Nachweis von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen.....	53
Abb. 20:	Nachweis von neuronalen Kernproteinen.....	54

Abb. 21:	Nachweis von neuronalen Strukturproteinen.....	55
Abb. 22:	Nachweis von Gliazellen.....	56
Abb. 23:	Nachweis von synaptischen Vesikeln.....	56
Abb. 24:	Nachweis von Neurotransmittern.....	57
Abb. 25 (A, B):	Ca ²⁺ -Antwort nach Stimulierung mit L-Glutamat.....	59
Abb. 26 (A-C):	Ca ²⁺ -Antwort nach Stimulierung mit NMDA.....	60-61
Abb. 27 (A-C):	Ca ²⁺ -Antwort nach Stimulierung mit AMPA.....	62
Abb. 28 (A, B):	Ca ²⁺ -Antwort nach Stimulierung mit Dopamin.....	63
Abb. 29 (A-C):	Zeitlicher Verlauf der Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen auf Gelatine-beschichteten Platten, gemessen anhand von Markerproteinen und der Zellzahl.....	66-67
Abb. 30 (A-D):	Nachweis von strukturspezifischen Proteinen im Western-Blot.....	69
Abb. 31 (A, B):	Einfluss der Zellaussaat am Tag 1 auf die Differenzierung zu Neuronen auf Gelatine-beschichteten Platten - Vergleich ATCC-Zellen (A) mit Kemler-Zellen (B).....	70
Abb. 32 (A, B):	Einfluss von bFGF auf die Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen auf Gelatine-beschichteten Platten	72
Abb. 33 (A, B):	Zeitlicher Verlauf der Differenzierung von mES Zellen zu Neuronen und Gliazellen auf PLO-beschichteten Platten, gemessen anhand von Markerproteinen und der Zellzahl.....	73
Abb. 34 (A, B):	Einfluss der Zellaussaat am Tag 1 (A) und des N2-Anteils im Medium (B) auf die Differenzierung zu Neuronen auf PLO- beschichteten Platten.....	75
Abb. 35 (A, B):	Einfluss von bFGF auf die Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen auf PLO-beschichteten Platten	76
Abb. 36 (A, B):	Einfluss von Fibronectin auf die Differenzierung von ATCC-Zellen (A) und Kemler-Zellen (B) zu Neuronen auf PLO-beschichteten Platten.....	77
Abb. 37 (A-D):	Vergleich der beiden Endpunkte MAP2 und β -Tubulin III anhand von Konzentrations-Wirkungskurven der Testsubstanzen.....	79
Abb. 38:	Konzentrationsabhängiger Effekt von 5-Fluorouracil (5-FU) auf die neuronale Differenzierung und Viabilität.....	80

Abb. 39:	Konzentrationsabhängiger Effekt von Penicillin G (PenG) auf die neuronale Differenzierung und Viabilität.....	81
Abb. 40:	Konzentrationsabhängiger Effekt von Lithiumchlorid (LiCl) auf die neuronale Differenzierung und Viabilität	82
Abb. 41:	Konzentrationsabhängiger Effekt von Methylazoxymethanolacetat (MAM) auf die neuronale Differenzierung und Viabilität.....	83
Abb. 42 (A, B):	Konzentrationsabhängiger Effekt von Valproinsäure (VPA) auf die neuronale Differenzierung und Viabilität.....	84
Abb. 43:	Vergleich des Endpunktes Differenzierung mit dem Endpunkt Viabilität anhand der ID ₅₀ - und IC ₅₀ -Werte	85
Abb. 44 (A, B):	Konzentrationsabhängiger Effekt von Valproinsäure (VPA) auf die Differenzierung zu Neuronen und Astrozyten.....	87

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Tabelle über die Einstufung von Substanzen bezüglich ihrer Entwicklungstoxizität nach Brown (2002).....	13
Tab. 2:	Durchführung der Herzmuskelzellendifferenzierung.....	20
Tab. 3:	Durchführung der neuralen Differenzierung nach dem Gelatine-Protokoll und dem PLO-Protokoll.....	22
Tab. 4:	Übersicht über die verwendeten Marker und Agonisten sowie der Nachweismethoden zur Charakterisierung der neuralen Differenzierung.....	46

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
AP5	D(-)-2-Amino-5 Phosphonopentansäure
APS	Ammoniumpersulfat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein (<i>bone morphogenetic protein</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
ChAT	Cholin Acetyltransferase
CNPase	2',3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase
CRABP	zelluläre Retinol-bindende Proteine
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNT	entwicklungsbedingte Neurotoxizität (<i>developmental neurotoxicity</i>)
EB	Embryoid-Körper (<i>embryoid body</i>)
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Embryonaler Stammzelltest
ECVAM	Europäisches Zentrum zur Validierung von alternativen Methoden
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
5-FU	5-Fluorouracil
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
(b)FGF	(basischer) Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
FL	Fluoreszenzintensität
FSC	<i>forward scatter</i>
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GATA-4	DNA-Sequenz "GATA" bindender Transkriptionsfaktor

GFAP	saures gliales Faserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
gp130	Glycoprotein 130
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase 3
5-HAT	5-Hydroxytryptamin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hES	humane embryonale Stammzellen
HRPO	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IC ₅₀	50% Hemmung des Wachstums (<i>50% inhibition of growth or cytotoxic effect</i>)
ID ₅₀	50% Hemmung der Differenzierung (<i>50% inhibition of differentiation</i>)
IFM	Immunofluoreszenzmikroskopie
JAK/STAT	<i>Janus kinase/signal transducer and activator of transcription</i>
KCL	Kaliumchlorid
Li ⁺	Lithium-Ionen
LiCl	Lithiumchlorid
(m)LIF	leukämischer inhibitorischer Faktor (aus der Maus)
MAM	Methylazoxymethanolacetat
MAP	Mikrotubulin-assoziiertes Protein
MEF	embryonale Fibroblasten der Maus
mES	embryonale Stammzellen der Maus
MHC	schwere Kette des Myosins (<i>myosin heavy chain</i>)
MLC-2v	<i>ventricle-specific myosin light chain-2</i>
MM	<i>micromass</i>
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NBQX	1,2,3,4-Tetrahydro-6-Nitro-2,3-Dioxobenzo-[f]quinoxalin-7-Sulfonamid Dinatriumsalz
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotids
NADPH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotidphosphats
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non-essential amino acids</i>)
NeuN	Neuronen-spezifisches nukleäres Protein (<i>neuronal nuclei</i>)
NHNP	normale humane neuronale Progenitorzellen
NiCl	Nickel(II)-Chlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Oct-4	Oktamer-Transkriptionsfaktor 4

OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>)
Pax6	Paired-Box Transkriptionsfaktor 6
PC12-Zellen	Phäochromozytomzellen
PCB	polychlorierte Biphenyle
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PenG	Penicillin G
PFA	Paraformaldehyd
PLO	Poly-L-Ornithin
R	Region
RA	All-trans Retinsäure (<i>all-trans retinoic acid</i>)
RAR	Retinsäure-Rezeptoren
RC2	Radialgliazellen 2
REACH	Registrierung, Evaluierung und Autorisierung von Chemikalien
RFU	relative Fluoreszenz Einheiten (<i>relative fluorescence units</i>)
ROI	interessierender Bereich (<i>region of interest</i>)
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RXR	Retinoid X Rezeptoren
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyle sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOP	Standardarbeitsanweisung (<i>Standard Operation Procedure</i>)
SSC	<i>side scatter</i>
SSEA	stadienspezifisches embryonales Antigen
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
VPA	Valproinsäure
WB	Western-Blot
WEC	<i>whole embryo culture</i>
Wnt	<i>wingless</i> und <i>int-1</i>
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch

1 EINLEITUNG

Im vorsorgenden Verbraucherschutz kommt der toxikologischen Bewertung chemischer Substanzen eine Schlüsselrolle zu. Chemikalien können die Entwicklung eines Organismus auf vielfältige Weise schädigen. Die empfindlichste Zeitspanne gegenüber solchen Einflüssen ist die embryonale Phase. Während und nach Ablauf der Organogenese können entwicklungstoxische Substanzen dosis- und zeitabhängig generalisierte oder auf bestimmte Organe beschränkte Retardierungen verursachen, strukturelle Fehlentwicklungen hervorrufen oder gar letale Folgen haben. Handelt es sich um einen adversen Effekt speziell auf die Gehirnentwicklung, so kann dieser auch Auswirkungen auf das Verhalten haben oder zu neurodegenerativen Erkrankungen führen.

Die Thalidomidkatastrophe in den frühen Sechzigerjahren brachte den ersten Nachweis für die fruchtschädigende Wirkung von chemischen Substanzen. Das damals auf Grundlage von konventionellen Toxizitätsprüfungen als harmlos geltende Beruhigungs- und Schlafmittel Thalidomid wurde in therapeutischen Dosen auch Schwangeren verordnet. Dies führte dazu, dass weltweit bei mehr als 10.000 Kindern teilweise schwere Missbildungen diagnostiziert wurden (Ghobrial und Rajkumar, 2003). In der Folge wurden weltweit die Prüfungs- und Zulassungsanforderungen für Arzneimittel verschärft. Viele Arzneimittel, darunter Antidepressiva, Tumortheraeutika und Blutdrucksenker gelten heute als potentiell entwicklungsschädigend.

Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte gerieten neben Medikamenten auch andere Stoffgruppen immer stärker in den Blick der sicherheitstoxikologischen Prüfung. Inzwischen gibt es etliche Substanzen, bei denen gesicherte Erkenntnisse über eine entwicklungsschädigende Wirkung vorliegen, wie z.B. Alkohol, verschiedene Industriechemikalien (z.B. polychlorierte Biphenyle (PCB)), Metalle (z.B. Blei, Quecksilber und Zink) und Hormone (z.B. Vitamin A).

Bezüglich der Chemikalien verständigte sich die Europäische Union im Jahr 2007 auf ein neues gemeinsames Sicherheitskonzept in der Chemikalienpolitik. Die europäische Chemikalienverordnung REACH zur Registrierung, Evaluierung und Autorisierung von Chemikalien trat am 01. Juni 2007 in Kraft (Nr. 1907/2006). Ziel ist es, alle in der Europäischen Union produzierten und in den Binnenmarkt importierten Chemikalien in einer zentralen Datenbank zu registrieren. Dies schließt auch die systematische Erfassung sogenannter Altstoffe ein, die vor 1981 auf den

Markt gebracht wurden und für die bislang keinerlei Registrierung und Risikobewertung erforderlich war.

Die Richtlinien zur Durchführung von toxikologischen Tests werden durch die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) formuliert. Dabei handelt es sich um standardisierte und international abgestimmte Prüfmethode für die Gewinnung von umwelt- und gesundheitstoxikologisch relevanten Daten. Reproduktionstoxikologische Effekte werden konventionell im Tierversuch überprüft, und zwar hauptsächlich an Nagern. Hierzu gibt es unterschiedliche Teststrategien, angefangen bei einer Studie zur pränatalen Entwicklungstoxizität bis hin zur 2-Generationsstudie, die gemäß der OECD-Richtlinien 414, 415, 416, 421 und 422 durchgeführt werden (Buschmann, 2006). REACH sieht vor, dass chemische Stoffe, von denen in Europa mehr als eine Tonne produziert bzw. in Verkehr gebracht werden, registriert und auf etwaige Risiken für die menschliche Gesundheit und Umwelt geprüft und bewertet werden. Die Verordnung schließt auch ca. 30.000 der sogenannten Altstoffe mit ein. Neuere Schätzungen gehen von insgesamt etwa 68.000 Chemikalien (Alt- und Neustoffe) aus, für deren sicherheitstoxikologische Bewertung ca. 54 Millionen Versuchstiere notwendig wären. Die Kosten würden sich auf ungefähr 9,5 Milliarden Euro belaufen (Hartung und Rovida, 2009). Nach dieser Berechnung werden die reproduktionstoxischen Sicherheitsprüfungen mit ungefähr 90% der Tiere und 70% der Kosten den weitaus größten Anteil an den Untersuchungen aufweisen. Schließlich werden allein für einen Test zur Entwicklungstoxizität etwa 150 Tiere und für eine 2-Generations-Studie etwa 3200 Tiere benötigt (Höfer et al., 2004).

In Artikel 47 der REACH-Verordnung wird darauf verwiesen, dass wo immer möglich bei der toxikologischen Prüfung alternative Methoden angewendet werden sollten. Das vorrangige Ziel dabei ist es, bei der Testung von Chemikalien Tierversuche zu ersetzen, zu reduzieren oder erträglicher zu gestalten. Dies geht auf die sogenannten 3R-Prinzipien (*reduce, refine, replace*) zurück, wie sie erstmals durch Russel und Burch (1959) formuliert wurden. Die Entwicklung von Alternativmethoden zum Tierversuch wird auf EU-Ebene durch das Europäische Zentrum zur Validierung von alternativen Methoden (ECVAM) initiiert, koordiniert und validiert. In Deutschland werden diese Aufgaben durch die Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung von Ergänzungs- und Ersatzmethoden zum Tierversuch (ZEBET) am heutigen Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) wahrgenommen.

Die Entwicklung von Alternativmethoden zum Tierversuch gewinnt zunehmend an Bedeutung, jedoch wird diesem Bereich auch ein großer Forschungsbedarf attestiert. Letzteres liegt nicht zuletzt daran, dass der Gesamtorganismus von Säugern in seiner Komplexität und insbesondere der Reproduktionszyklus durch alternative Methoden, wie z.B. *in vitro* Testverfahren nicht nachzubilden ist. Allerdings gelingt es Teilbereiche der embryonalen Entwicklung durch *in vitro* Testverfahren zu untersuchen. Für den Bereich Embryotoxizität wurden bislang drei *in vitro* Embryotoxizitätstests in einer größeren ECVAM-Studie erfolgreich validiert. Dabei handelt es sich um den *Whole Embryo Culture* Test (WEC; Test mit ganzen Rattenembryonen), den *Micromass* Test (MM; Test mit primären Zellen der Extremitätenknospen von Rattenembryonen) und den Embryonalen Stammzelltest (EST), wobei letzterer als einziger Test auf permanenten Zellkulturen basiert. Anhand von 20 Testsubstanzen konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse für alle drei Testverfahren gut reproduzierbar und hinreichend prädiktiv waren: Im EST wurden 78%, im MM 70% und im WEC 80% der 20 getesteten Substanzen korrekt klassifiziert (Genschow et al., 2004 und 2002; Spielmann et al., 1997).

Zunehmend rückt nun auch die Prüfung von entwicklungspezifisch neurotoxisch wirkenden Substanzen in den Fokus der Untersuchungen. Inzwischen ist hinreichend nachgewiesen worden, dass das sich entwickelnde Gehirn sehr empfindlich gegenüber toxischen Einflüssen reagiert, was u.a. auch damit zu begründen ist, dass in der pränatalen Phase der Gehirnentwicklung die Blut-Hirn-Schranke noch nicht vollständig ausgebildet ist. Darüber hinaus fehlen dem Fötus generelle Mechanismen zur Detoxifizierung, Metabolisierung und Ausscheidung von potenziell schädlichen Fremdstoffen (Bondy und Campbell, 2005). Für einige Substanzen, wie z.B. Ethanol, PCB, Vitamin A, Methylquecksilber und Blei gibt es bereits gesicherte Erkenntnisse über deren entwicklungsneurotoxische Wirkung. Für eine weitaus größere Gruppe, zu der u.a. Psychopharmaka, einige Metalle sowie Insektizide gezählt werden, liegen noch keine ausreichenden Erkenntnisse vor (Kuegler et al., 2010; Hass, 2006).

Bislang liegt bei der OECD eine Testvorschrift zum Prüfen von Substanzen auf Entwicklungsneurotoxizität (DNT; *developmental neurotoxicity*) - Effekte an Ratten vor (OECD-Richtlinie 426). Danach sollen neben der Erfassung von allgemeinen, entwicklungsrelevanten Parametern, auch spezielle neuropathologische Untersuchungen durchgeführt werden, angefangen von Untersuchungen zur

Erfassung von Substanzeffekten auf die morphologische Entwicklung unterschiedlicher Gehirnregionen bis hin zur Prüfung von Effekten auf die Proliferation, Migration, Differenzierung, Apoptose sowie die Myelinisierung von Gehirnzellen. Darüber hinaus sind im Test Verhaltensstudien integriert, die die motorischen und sensorischen Funktionen sowie Lern- und Gedächtnisleistungen der Nachkommen betreffen. Im Rahmen von REACH sind Untersuchungen zur Entwicklungsneurotoxizität noch nicht vorgesehen. Allerdings wird eine Integration von entwicklungsneurotoxisch relevanten Endpunkten in die Risikobewertung intensiv diskutiert (Crofton et al., 2011; Kuegler et al., 2010; Coecke et al., 2007; Lein et al., 2005; Hass 2003). Der DNT-Test mit Nagern wird, wie auch der 2-Generations-Test (OECD 416), als sehr tierverbrauchs-, arbeits- und kostenintensiv angesehen (Kaufmann, 2003).

Mittels *in vitro* Testverfahren lassen sich einige der grundsätzlichen Fragestellungen zur entwicklungsneurotoxischen Wirkung im Vorab klären, sind doch fundamentale Prozesse, wie beispielsweise Differenzierung, Migration, Proliferation und Apoptose, speziesübergreifend konserviert und können in der Zellkultur untersucht werden. Es gibt zahlreiche Studien, die anhand unterschiedlicher Zellsysteme und Endpunkte DNT-Effekte *in vitro* untersucht haben und somit geeignet wären, für die Entwicklung von Testsystemen eingesetzt zu werden (zusammengefasst in Coecke et al., 2007). In einigen neueren Studien ist dieses Ziel bereits konkret verfolgt worden. Beispielsweise haben Breier et al. (2008) einen Test auf Basis von humanen neuronalen Progenitorzellen entwickelt, um Substanzeffekte anhand der entwicklungsrelevanten Endpunkte Proliferation und Viabilität im „*high-throughput screening*“ (Hochdurchsatzverfahren) zu messen. In einer weiteren Studie wurden Neuroscreen-1 Zellen, die aus einem Subklon von Phäochromozytomzellen der Ratte (PC12 Zellen) gewonnen wurden, zur Testung von entwicklungsneurotoxischen Substanzen eingesetzt. Als Endpunkt diente hier das Neuriten-Wachstum der Zellen (Radio et al., 2008). In einem weiteren Ansatz mit normalen humanen neuronalen Progenitorzellen (NHNP) wurde als Endpunkt die Migration der Zellen zur Erfassung von entwicklungsneurotoxischen Effekten etabliert (Moors et al., 2007).

Ein vielversprechender Ansatz ist hierbei die Entwicklung von Testsystemen mit Hilfe von embryonalen Stammzellen der Maus (mES Zellen), wie er bereits im EST erfolgreich umgesetzt wurde. Dass zurzeit an mES Zellen vorrangig geforscht wird,

liegt u.a. daran, dass diese im Vergleich zu humanen Stammzellen bereits sehr gut untersucht sind. Zudem werden reproduktionstoxikologische Tests vorwiegend an Nagern durchgeführt, so dass in diesem Bereich eine umfangreiche Datenlage vorhanden ist, die sich für die Bewertung von *in vitro* Daten als nützlich erweist. Zuletzt liegt es auch daran, dass die Entwicklung von Testsystemen auf Basis von humanen Stammzellen in vielen Ländern - so wie auch in Deutschland - ein ethisches Problem darstellt und die Forschung gesetzlich stark reguliert wird.

Im EST wird als entwicklungstoxikologisch relevanter Endpunkt die Differenzierung zu Herzmuskelzellen gemessen. Darüber hinaus haben einige Arbeiten das Potenzial von mES Zellen für die Etablierung von *in vitro* Testmodellen zur Erfassung von entwicklungsneurotoxischen Substanzen anhand der Beeinflussung von Markergenen untersucht (Stummann et al., 2007; Zur Nieden et al., 2004).

1.1 Embryonale Stammzellen der Maus

Embryonale Stammzellen wurden erstmals im Jahr 1981 aus der inneren Zellmasse der Blastozyste trächtiger 129SvE Mäuse isoliert und *in vitro* kultiviert (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Im Blastozystenstadium, welches 3,5 Tage nach der Gestation beginnt, wird die innere Zellregion zum primitiven Ektoderm bzw. zum Epiblasten. Die hieraus isolierten ES Zellen sind pluripotent, d.h. sie besitzen die Fähigkeit, sich unter speziellen Kulturbedingungen in ein breites Spektrum unterschiedlicher Subtypen mesodermaler, endodermaler und ektodermaler Zellen sowie primordialer Keimzellen zu spezialisieren. Diese Eigenschaft macht sie sowohl für naturwissenschaftliche als auch für medizinische Forschungsansätze interessant. Im Vergleich zu den sogenannten totipotenten Stammzellen sind pluripotente Stammzellen jedoch nicht mehr ohne Weiteres in der Lage, extraembryonales Gewebe, wie z.B. die Plazenta, auszubilden und sich selbstständig zu einem vollständigen Organismus zu organisieren. Hingegen handelt es sich bei multipotenten Stammzellen um sogenannte adulte Stammzellen, die im Vergleich zu den pluripotenten Stammzellen im Differenzierungspotenzial noch weiter limitiert sind.

Eine weitere wichtige Eigenschaft der mES Zellen ist die Möglichkeit, sie nahezu unbegrenzt im undifferenzierten Zustand halten zu können. Dies wird durch die Stimulierung der Zellen mit dem Zytokin LIF (*leukaemia inhibitory factor*) erreicht.

Entweder wird LIF direkt ins Kultivierungsmedium dazugegeben oder die ES Zellen werden in Kokultur mit mitotisch inaktiven Fibroblasten, den sog. Feeder Zellen (MEF; *mouse embryonic fibroblasts*), kultiviert. Feeder Zellen besitzen die Eigenschaft, LIF zu bilden und den Faktor über das Medium an die ES Zellen abzugeben (Smith et al., 1988, Williams et al., 1988). LIF gehört zur Familie der Interleukin-6 Zytokine. Durch die Bindung des Faktors an den heterodimerischen LIF-Rezeptor β und gp 130 (*glycoprotein 130*) wird der JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*)-Signalweg in den ES Zellen aktiviert. Dies bewirkt eine Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 (*transducer and activator of transcription 3*) in den Zellkern, wo er die Genexpression zugunsten des undifferenzierten Zustands der Zellen beeinflusst (Niwa, 2007; Chambers, 2004). Darüber hinaus sind weitere Signalwege, wie z.B. der BMP (*bone morphogenetic protein*)- und Wnt (*wingless* und *int-1*)-Signalweg beim Erhalt der Pluripotenz involviert (Nusse, 2008; Liu et al., 2006). Als intrinsischer Faktor ist der Transkriptionsfaktor Oct4 (*octamer transcription factor 4*) beteiligt, welcher als Regulator für die Pluripotenz bis zu 8 weitere Gene ein- und ausschaltet. Wird Oct4 über- bzw. unterexprimiert, kommt es zur Differenzierung der Zellen in die endodermale und mesodermale bzw. in die trophektodermale Richtung (Liu et al., 2006). Als weitere wichtige Transkriptionsfaktoren, die in komplexen, selbstregulierten Netzwerken hemmend auf die Differenzierung wirken, wären auch Nanog (abgeleitet von „Tir na n'Og“) und Sox2 zu nennen (Niwa et al., 2007; Liu et al., 2006; Chambers, 2004; Mitsui et al., 2003). Charakteristisch für undifferenzierte mES Zellen sind außerdem der Marker Alkalische Phosphatase und das stadienspezifische embryonale Oberflächenantigen SSEA-1A (*stage-specific embryonic antigen-1A*). Zudem zeichnen sich undifferenzierte ES Zellen durch ein hohes Proliferationspotenzial sowie eine hohe Telomeraseaktivität aus und werden nicht durch andere Zellkontakte inhibiert (Liu et al., 2006). Sie durchlaufen einen relativ kurzen Zellzyklus (ca. 10 h) mit einer kurzen G1-Phase ohne G1/Kontrollpunkt (Burdon et al., 2002).

Zu erwähnen ist, dass sich die beschriebenen mES Zellen von humanen ES (hES) Zellen in einigen wichtigen Punkten unterscheiden. Die mES Zellen wachsen schneller und bilden mehr sphärische Kolonien im Vergleich zu den eher flachen Kolonien der hES Zellen. Diese wiederum reagieren im Unterschied zu mES Zellen nicht auf LIF, sondern benötigen MEF Feeder Zellen sowie den Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (bFGF; *basic fibroblast growth factor*), um im undifferenzierten

Zustand zu verbleiben. Des Weiteren exprimieren die undifferenzierten hES Zellen statt SSEA-1A u.a. die Marker SSEA-3 und SSEA-4 (Reubinoff et al., 2000).

Ohne LIF bilden die mES Zellen spontan Aggregate, auch „*embryoid bodies*“ (EBs) genannt, und differenzieren sich in eine morphologisch gemixte Population, deren Gene für endodermale und mesodermale Zelllinien charakteristisch sind (Chambers, 2004; Niwa et al., 2000). Durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen können die Zellen in viele verschiedene Zelltypen differenziert werden, beispielsweise zu Herzmuskelzellen (Wobus et al., 1997; Maltsev et al., 1994; Doetschman et al., 1985), neuronalen Zellen (Ying et al., 2003; Rolletschek et al., 2001; Lee et al., 2000; Bain et al., 1995, Strübing et al., 1995), Chondrozyten (Kramer et al., 2000); Osteoblasten (Buttery et al., 2001), Endothelzellen (Wartenberg et al., 1998), hämatopoetischen Zellen (Nishikama et al., 1998), Skelettmuskelzellen (Rohwedel et al., 1994) und Keimzellen (Hübner et al., 2003).

1.1.1 Differenzierung zu Herzmuskelzellen

Bereits im Jahr 1985 beschrieben Doetschman et al., dass mES Zellen in serumhaltigem Medium über die Bildung von Aggregaten, den sog. EBs, nach 8 Tagen zur Differenzierung in kontrahierende Herzmuskelzellen befähigt sind. Inzwischen haben sich viele Arbeitsgruppen mit dem Thema beschäftigt und die molekularen Grundlagen der Herzmuskelzelldifferenzierung weitgehend aufgeschlüsselt. Sie haben festgestellt, dass das Differenzierungsmuster der mES Zellen der embryonalen Herzzelldifferenzierung *in vivo* stark ähnelt. Die mES Zellen differenzieren sich zunächst in mesodermale Vorläuferzellen und anschließend in frühe kardiale Vorläuferzellen. Diese spezialisieren sich früh in Schrittmacherzellen und später in atriale, ventrikuläre, sinusnodal- und Purkinje Zellen, wie mit elektrophysiologischen Analysen nachgewiesen wurde (Hescheler et al., 1997; Fässler et al., 1996). Als Marker für die frühe mesodermale Differenzierung sind die Gene Brachyury und BMP-4 zu nennen, die in den ersten vier Tagen der EB Entwicklung exprimiert werden (Rohwedel et al., 2001). Die Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen zu Herzmuskelzellen zeigt eine charakteristische Sequenz von herzmuskelspezifischen Genexpressionen. Früh werden die Transkriptionsfaktoren mit Namen Nkx2.5 (Homeobox-Transkriptionsfaktor) und GATA-4 (DNA Sequenz „GATA“ bindendes Protein 4) gebildet, später MEF2C (*myocyte-specific enhancer factor 2c*), eHAND und dHAND (Transkriptionsfaktoren der basischen Helix-Loop-

Helix Familie), die speziell auf Gene Einfluss nehmen, die die Differenzierung zu Herzmuskelzellen begünstigen. Im reiferen Stadium lassen sich u.a. die Marker ANF (*atrial natriuretic factor*), Phospholamban sowie der L-Typ Ca^{2+} -Kanal nachweisen. Des Weiteren werden sarkomere Strukturproteine gebildet, wie z.B. MLC-2v (*ventricle-specific myosin light chain-2*), α - und β -MHC (*myosin heavy chain*), Titin (Z und M Bande), α -Actinin, Troponin-T, α -Actin und M-Protein (Sachinidis et al., 2003; Boheler et al., 2002). Morphologisch entwickeln sich durch den Aufbau von sarkomeren Einheiten aus kleinen runden Herzmuskelvorläuferzellen nach und nach größere gestreckte Kardiomyozyten. Auf Grund von intrazellulären Ca^{2+} -Oszillationen, die eine Depolarisation der Zellmembranen zur Folge haben, werden nach ca. 6 bis 10 Tagen der Differenzierung spontane Kontraktionen ausgelöst. Da die Kardiomyozyten über Zell-Zellkontakte (*Gap Junctions*) in Verbindung stehen, treten die Kontraktionen meist als flächige Areale auf. Die Schlagfrequenz innerhalb eines kontrahierenden Areals steigt während der Differenzierung an und sinkt mit zunehmender Terminierung der Differenzierung. Ausgereifte Herzmuskelzellen hören ganz auf zu kontrahieren, können jedoch über mehrere Wochen weiter in Kultur gehalten werden (Boheler et al., 2002).

1.1.2 Neurale Differenzierung

Spontan differenzieren mES Zellen nur zu einem sehr geringen Prozentsatz in neurale Zellen (Strübing et al., 1995). Die ersten Untersuchungen zum Thema zeigten, dass sich die Ausbeute an neuronalen Zellen unter Zugabe von 10^{-7} M Retinsäure, welche die aktive Form des Vitamins A ist, deutlich erhöhen lässt (Van Inzen et al., 1996; Strübing et al., 1995; Bain et al., 1995; Wobus et al., 1994). Inzwischen gibt es eine Reihe von unterschiedlichen Strategien, um mES Zellen in die neuroektodermale Richtung zu differenzieren. Die Protokolle unterscheiden sich in der Kombination von Zellkulturtechnik, Medienzusammensetzung bzw. Medienzusätzen, Beschichtung der Platten und dem Einsatz von Wachstumsfaktoren (Abb. 1). Sie sind abhängig von den eingesetzten ES Zelllinien und den gewünschten neuronalen Subtypenpopulationen (Cai und Grabel, 2007). Vielen Methoden gemeinsam ist der Entzug von LIF und Serum als Differenzierungs- und Selektionsstrategie.

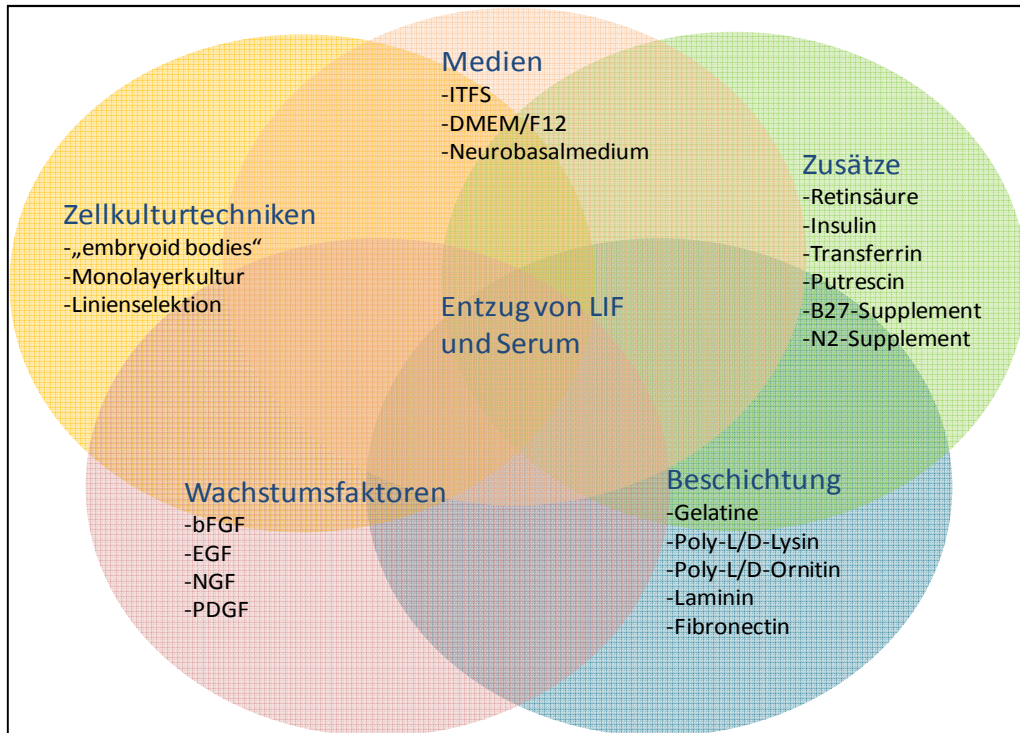


Abb. 1: Die neurale Differenzierung von mES Zellen ist von der Kombination unterschiedlicher Einflussfaktoren abhängig

Jedoch lässt sich über die Bildung von EBs und die Zugabe von Retinsäure auch mit Serum eine hohe Ausbeute an neuronalen Zellen erzielen (Strübing et al., 1995; Bain et al., 1995). Durch Retinsäure erfahren die mES Zellen eine Hemmung in der mesodermalen Differenzierung, wie anhand des mesodermalen Markers Brachyury gezeigt werden konnte (Bain et al., 1996). Ohne Retinsäure-Induktion hat sich die Methode der sogenannten Linienselektion als erfolgreich erwiesen. Die mES Zellen werden in Form von EBs unter serumfreien Bedingungen und der anschließenden Selektion unter Zugabe neurotropher Wachstumsfaktoren wie z.B. bFGF (*basic fibroblast growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*, Okabe et al., 1996), FGF8 (*fibroblast growth factor 8*) und Sonic Hedgehog (Lee et al., 2000) zu Neuronen und Gliazellen differenziert (zusammengefasst bei Guan et al., 2001). Bei der sogenannten Monolayerdifferenzierung werden die mES Zellen in geringer Dichte in serumfreiem Medium ohne die Bildung von Aggregaten, jedoch unter Einsatz von definierten Medien und Wachstumsfaktoren, wie N2B27-Differenzierungsmedium in Kombination mit bFGF oder FGF8 sowie Sonic Hedgehog, zur effizienten Produktion von Neuronen und Gliazellen stimuliert (Ying et al., 2003). Mit serumfreien Protokollen ist es gelungen, spezielle neurale Phänotypen zu

gewinnen, wie z.B. dopaminerge Neuronen (Kawasaki et al., 2000; Lee et al., 2000), Motorneuronen (Wichterle et al., 2002), cerebrale Neuronen (Salero und Hatten, 2007) und Oligodendrozyten (Liu et al., 2000; Brüstle et al., 1999).

Der neuronalen Differenzierung liegen vielfältige komplexe molekulare Regulationsmechanismen zu Grunde, die längst noch nicht vollständig erforscht sind. Jedoch hat man auch hier festgestellt, dass die Vorgänge der ES Zell-Differenzierung auf zellulärer und genetischer Ebene der Gehirnentwicklung *in vivo* stark ähneln (Cazillis et al., 2006).

Auf dem Weg zur neuronalen Identität spezialisieren sich die mES Zellen stufenweise und werden gleichzeitig nach und nach in ihrem Differenzierungspotenzial eingeschränkt. Sie differenzieren zunächst in multipotente neuronale Stammzellen, deren neuroektodermale Identität durch charakteristische Marker, wie beispielsweise FGF5, Sox1, Sox2, Sox3, Otx2 und Pax6, gekennzeichnet ist (Cai und Grabel, 2007). Auf Grund von extrinsischen Signalen, wie z.B. den bereits genannten Wachstumsfaktoren EGF und FGF2, sowie u.a. auch darüber ausgelösten intrinsischen Signalen, wie z.B. der Aktivierung der Signalwege Notch und/oder der Hemmung der Wnt-Signalkaskade (Cai und Grabel, 2007), entwickeln sich die neuronalen Stammzellen weiter in neuronale Vorläuferzellen, wie z.B. Neuroepithelialzellen, die je nach Umgebung mit einem spezifischen Satz an Transkriptionsfaktoren ausgestattet werden. Sie sind multipotent, d.h. sie können sich - wenn auch begrenzt - sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch teilen. Meist unterliegen sie zunächst symmetrischen, proliferativen Teilungen. Danach folgen asymmetrische Teilungen in identische und nicht-epitheliale Vorläuferzellen, wie z.B. neuronale Progenitorzellen oder Neuronen. Neuronale Progenitorzellen, wie beispielsweise Radialgliazellen, besitzen die Fähigkeit, sich entweder weiter asymmetrisch zu teilen oder sich symmetrisch in entweder zwei Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten auszudifferenzieren (Götz et al., 2005). Ein charakteristischer Marker für neuroepitheliale Zellen und neuronale Progenitorzellen ist beispielsweise Nestin. Ausdifferenzierte Zellen lassen sich je nach Typ (Neuronen oder Gliazellen) und Subtypenspezifität (z.B. GABAerge Neuronen) durch charakteristische Markerproteine sowie unterschiedliche Neurotransmitter klassifizieren. Des Weiteren zeichnen sich neuronale Zellen durch funktionelle Eigenschaften aus, wie beispielsweise ihre Erregbarkeit durch die Bildung von spannungsgesteuerten Na⁺, K⁺ und Ca²⁺- Kanälen sowie die Ausbildung

spezifischer Transmitter-Rezeptoren, Generierung von Aktionspotenzialen und Weiterleitung von Signalen durch synaptische Übertragung. In einigen Arbeiten konnten diese Eigenschaften auch an zu Neuronen differenzierten mES Zellen mittels elektrophysiologischer und/oder Ca^{2+} -Imaging Methoden nachgewiesen werden (Raye et al., 2007; Lang et al., 2004; Bibel et al., 2004; Lee et al., 2000; Strübing et al., 1995).

1.2 Der Embryonale Stammzelltest (EST)

Basierend auf der *in vitro* Differenzierung von mES Zellen der Linie D3 in schlagende Herzmuskelzellen wurde bei ZEBET der Embryonale Stammzelltest (EST) als Methode zur Erfassung embryotoxischer Substanzen entwickelt (Spielmann et al., 1997). Der EST war das erste auf Zellkulturen basierende *in vitro* Modellsystem, mit dem Ziel, eine Alternative zu Tierversuchen im Bereich der Reproduktionstoxikologie zu etablieren. Dabei handelt es sich um ein kombiniertes Testsystem mit drei Endpunkten. Untersucht wird die hemmende Wirkung von potentiell embryotoxischen Substanzen auf die Differenzierung der mES Zellen zu kontrahierenden Herzmuskelzellen. Das Ergebnis wird in Bezug zum zytotoxischen Effekt der Substanzen auf die mES Zellen und auf differenzierte 3T3 Maus Fibroblasten ausgewertet. Dazu werden anhand von Konzentrations-Wirkungskurven für alle drei Endpunkte Halbhemmkonzentrationen bestimmt. Der ID_{50} -Wert steht für die 50%ige Hemmung der Differenzierung ($\text{ID}_{50}\text{D3}$); der IC_{50} -Wert für den zytotoxischen Effekt, bei dem 50% der Zellen in ihrem Wachstum gehemmt werden ($\text{IC}_{50}\text{D3}$ und $\text{IC}_{50}\text{3T3}$). Die Werte werden in die Formeln für die Berechnung der Klassifizierung der Testsubstanzen in die drei Embryotoxizitätsklassen: „nicht“, „schwach“ oder „stark embryotoxisch“ eingesetzt (Abb. 2). Dazu wurde eigens ein logarithmisches, auf linearer Diskriminanzanalyse basierendes Prädiktionsmodell entwickelt (Scholz et al., 1999).

I	$5,92 \lg(IC_{50} 3T3) + 3,50 \lg(IC_{50} D3) - 5,31 \frac{IC_{50} 3T3 - ID_{50}}{IC_{50} 3T3} - 15,7$
II	$3,65 \lg(IC_{50} 3T3) + 2,39 \lg(IC_{50} D3) - 2,03 \frac{IC_{50} 3T3 - ID_{50}}{IC_{50} 3T3} - 6,85$
III	$-0,125 \lg(IC_{50} 3T3) - 1,92 \lg(IC_{50} D3) + 1,50 \frac{IC_{50} 3T3 - ID_{50}}{IC_{50} 3T3} - 2,67$

<ul style="list-style-type: none"> • nicht embryotoxisch • schwach embryotoxisch • stark embryotoxisch 	<p>→</p> <p>→</p> <p>→</p>	<p>wenn I > II und I > III</p> <p>wenn II > I und II > III</p> <p>wenn III > I und III > II</p>
---	----------------------------	---

Abb. 2: Prädiktionsmodell für die Einstufung der Substanzen im EST (nach Scholz et al., 1999)

Nach Standardisierung der Testbedingungen wurde der EST im Rahmen einer europäischen Validierungsstudie auf seine Reproduzierbarkeit und sein Vorhersagepotenzial geprüft (Genschow et al., 2004 und 2002; Scholz et al., 1999). Im Endergebnis hat der EST 78% der getesteten 20 Substanzen korrekt eingestuft, wobei die stark embryotoxischen Substanzen zu 100% richtig klassifiziert wurden. In einer weiteren Studie zur Bewertung des Testsystems für pharmazeutische Zwecke wurden ähnliche Resultate erzielt, jedoch wurde hier ein hoher Anteil an falsch-positiven Ergebnissen ermittelt (ca. 40%; Paquette et al., 2008). In Hinblick auf eine behördliche Akzeptanz zum Einsatz für regulatorische Zwecke, gehen die Empfehlungen dahin, den EST weiterzuentwickeln. Zum einen sollte die Datenbasis für den EST verbreitert sowie ein metabolisierendes System zur Erkennung von proteratogenen Substanzen eingeführt werden. Zum anderen sollten weitere Endpunkte für eine mögliche Verwendung des EST im Hochdurchsatzverfahren etabliert werden (Marx-Stoelting et al., 2009; Piersma et al., 2004). Letztere Anforderung stellte den Gegenstand für die Forschung der vorliegenden Arbeit dar.

1.3 Auswahl von Substanzen für die Weiterentwicklung des EST

Für die Weiterentwicklung des EST ist die Auswahl spezifischer Testsubstanzen von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde neben vier bekannten Substanzen auch ein bislang noch nicht untersuchter Stoff verwendet. Im Folgenden werden alle getesteten Substanzen näher beschrieben.

5-Fluorouracil (5-FU) ist primär eine zytotoxisch wirkende Substanz, die als Zytostatikum in der Therapie gegen diverse Krebserkrankungen eingesetzt wird. 5-FU bewirkt, dass vor allem in stark proliferierenden Zellen fehlerhaft Fluoronucleotide in die RNA und DNA eingebaut werden und es u. a. zu einer Hemmung des Nukleotidsynthese-Enzyms Thymidylatsynthetase kommt. Letzterer Wirkmechanismus wird vor allem als Ursache für die entwicklungsstoxische Wirkung von 5-FU verantwortlich gemacht (Longley et al., 2003; Lau et al., 2001). So wurden durch 5-FU multiple teratogene Effekte, wie z.B. Gaumenspalten und Missbildungen an Extremitäten bei vielen Tierspezies beobachtet (Shuey et al., 1994). In einem Fall wurden auch beim menschlichen Fetus nach Exposition mit 5-FU multiple kongenitale Anomalien beschrieben (Stephens et al., 1980). 5-FU wurde im Rahmen der Substanzauswahl für *in vitro* Validierungsstudien zur Testung von Embryotoxizität als eine entwicklungsschädigende Substanz der Klasse 3 eingestuft (Einstufung siehe Tab. 1, nach Brown, 2002) und in den Studien zum EST als „stark embryotoxisch“ erkannt (Verwei et al., 2006; Genschow et al. 2004 und 2002; Scholz et al., 1998). Weil die Substanz in allen bisherigen Untersuchungen sehr gut reproduzierbare Ergebnisse lieferte, wird sie als standardpositive Referenzsubstanz für den EST empfohlen (Seiler et al., 2006).

Tab. 1: Tabelle über die Einstufung von Substanzen bezüglich ihrer Entwicklungstoxizität nach Brown (2002)

Class 1	Chemicals not developmentally toxic at maternally toxic exposures, but which may show some minor embryo/fetal toxicity at high maternally toxic exposures, and which cannot be separated from maternal toxicity.
Class 2 (a)	Developmentally toxic in multiple (but not all) species, with a high A/D ratio*.
Class 2 (b)	Developmentally toxic in multiple species, inducing multiple effects, with exposures that are clearly less than maternally toxic exposures.
Class 2 (c)	Was defined as developmentally toxic, inducing effects that are clearly unrelated to maternal toxicity, but with exposures that are close to maternally toxic exposures.
Class 3	Developmentally toxic in all species tested, inducing multiple developmental effects, and with a high A/D ratio*.

*A/D ratio = adult versus developmental toxicity ratio

Penicillin G (PenG) ist ein β -Laktam-Antibiotikum, welches bei der Behandlung von bakteriellen Erkrankungen eingesetzt wird. Die Substanz ist zwar plazentagängig, zeigt jedoch keine teratogene Wirkung und wird somit für die Einnahme während

der Schwangerschaft als unbedenklich eingestuft (Nahum et al., 2006). Für die ECVAM-Validierungsstudie wurde PenG als Negativkontrolle getestet (Klasse 1 nach Brown, 2002) und in der Validierungsstudie zum EST als „nicht embryotoxisch“ eingestuft (Scholz et al., 1998; Genschow et al. 2002 und 2004).

All-trans Retinsäure (RA) wird im Körper durch die Oxidation des Retinols (Vitamin A1) gebildet. Als aktiver Metabolit ist RA für die Embryonalentwicklung essentiell. Es wird vermutet, dass RA über die Bindung an zelluläre Retinol-bindende Proteine (CRABPs; *cellular retinoic acid-binding proteins*) und die Aktivierung der nukleären RA-Rezeptoren RAR (*retinoic acid receptors*) und RXR (*retinoid X receptors*) auf die Gentranskription Einfluss nimmt und somit in feine Regulationsmechanismen von Differenzierungsprozessen eingreift (Rühl et al., 2001). Als synthetisch hergestelltes Retinoid wird RA bei der Behandlung von dermatologischen Erkrankungen sowie in der Krebstherapie eingesetzt. RA ist plazentagängig und wirkt bereits in therapeutischen Dosen stark teratogen. Dies wurde in zahlreichen Untersuchungen sowohl beim Menschen als auch beim Tier belegt. So können beispielsweise – je nach Zeitpunkt und Dauer der RA-Exposition – Fehlbildungen am kardiovaskulären System, im ZNS, kraniofaziale Fehlbildungen sowie strukturelle Veränderungen am Skelettsystem auftreten (Azaïs-Braesco und Pascal, 2000; Sinning, 1998; Chan et al., 1996; Morris-Kay et al., 1991; Lammer et al., 1985). Für die ECVAM-Validierungsstudie wurde RA als „stark embryotoxische“ Substanz eingestuft (Brown, 2002) und im validierten EST als ebensolche bewertet (Genschow et al. 2004 und 2002).

Die Substanz **Valproinsäure (VPA)** wird in der Therapie aufgrund ihrer antikonvulsiven Eigenschaft hauptsächlich als Antiepileptikum verschrieben. Zunehmend wird VPA auch bei der Behandlung von Migräne, bipolaren Erkrankungen und in der Krebstherapie eingesetzt. Den breiten Anwendungsgebieten stehen jedoch einige schwerwiegende Nebenwirkungen gegenüber: VPA wirkt lebertoxisch und teratogen. Bei den *in vivo* induzierten teratogenen Effekten handelt es sich hauptsächlich um Störungen des Neuralrohrverschlusses, welche zu den Erkrankungen Spina Bifida, Anenzephalie und Exenzephalie führen (Massa et al., 2005; Yerby, 2003; Nau et al., 1991). Des Weiteren wurden auch durch VPA verursachte Fehlentwicklungen des Herzens registriert (Michaelis et al, 2004; Nau et al, 1991). Zudem konnte *in vitro* gezeigt

werden, dass VPA die Differenzierung von mES Zellen zu Herzmuskelzellen hemmt (Na et al., 2003). Die molekularen Mechanismen, die zur Teratogenität führen, sind noch weitgehend unklar. Untersuchungen deuten darauf hin, dass die teratogenen Effekte durch VPA durch die Inhibition von Histondeacetylasen verursacht werden. Über die Deacetylierung von Histonen nehmen die Enzyme regulativen Einfluss auf die Expression spezifischer Gene, die bei der Entwicklung eine wichtige Rolle spielen (Eikel et al., 2006; Kultima et al., 2004; Göttlicher et al., 2002). Für die Validierungsstudie ist die Substanz in die Klasse 2 (b) eingestuft (Brown, 2002) und im EST als „schwach embryotoxische“ Substanz klassifiziert worden (Genschow et al. 2004 und 2002)

Lithium-Ionen (Li⁺) werden in großem Umfang zur Behandlung von psychiatrischen Erkrankungen, insbesondere von bipolaren affektiven Störungen eingesetzt. Hinter dem therapeutischen Effekt stehen komplexe molekulare Wirkmechanismen, die auch zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen führen (Grandjean und Aubry, 2009). Li⁺ weisen somit sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Eigenschaften auf, deren zu Grunde liegenden Wirkmechanismen noch nicht genau geklärt sind (Fountoulakis et al., 2008). Li⁺ passieren ungehindert die Plazenta. Diverse entwicklungsschädigende Effekte wurden sowohl in einigen Tierspezies als auch beim Menschen registriert. Die Bezeichnung „Lithium Baby“ wird für Kinder mit Fehlentwicklungen gebraucht, deren Mütter zwischen den Jahren 1969 und 1972 im ersten Trimester der Schwangerschaft mit Li⁺ behandelt wurden (Giles und Bannigan, 2006; Pinelli et al., 2002; Moore, 1995). Beim Menschen induzieren Li⁺ in Form von Lithiumchlorid (LiCl) in erster Linie Fehlbildungen des Herzens und des kardiovaskulären Systems (relatives Risiko, RR = 3,5) und mit geringerem Risiko (RR = 1,2) andere kongenitale Missbildungen (Giles and Bannigan, 2006). Unter therapeutischen Dosen wurden in verschiedenen Tierversuchen keine adversen entwicklungsspezifischen Effekte beobachtet. Jedoch führten höhere Dosen in vielen Fällen bei Ratten und Mäusen zu einem weiten Spektrum an teratogenen Effekten, wie z.B. Gaumenspalten, Exenzephalie und skelettalen Missbildungen (Giles und Bannigan, 2006). In diesem Zusammenhang werden zwei Hauptansatzpunkte diskutiert: LiCl inhibiert die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) und die Inositol-1-Phosphatase - ein Schlüsselenzym für die Synthese von Inositol. Somit greift LiCl in die Signalwege Wnt/GSK-3 und Phosphatidylinositol ein, die während der Entwicklung wichtige regulatorische Funktionen haben (Giles und

Bannigan, 2006; Quiroz et al., 2004). Für die Validierungsstudie ist die Substanz in die Klasse 2 (b) eingestuft (Brown, 2002) und im EST zur Messung des Effektes auf die Herzmuskelzellendifferenzierung als „schwach embryotoxische Substanz“ klassifiziert worden (Genschow et al. 2004 und 2002).

Bei **Methylazoxymethanolacetat (MAM)**, dem aktiven Metaboliten des Cycasins, handelt es sich um eine DNA-methylierende Substanz, die mutagene und karzinogene Wirkung zeigt. In der Forschung wird MAM als Modellstoff zur Untersuchung von neurotoxischen Effekten auf die Entwicklung des Gehirns eingesetzt. Die Substanz passiert die Plazenta und zeigt spezifisch antiproliferative Effekte auf mitotische Neuroepithelzellen und unreife Neuronen im Gehirn von Nagetieren, die bei den Nachkommen dosis- und zeitabhängig zu morphologischen und funktionellen Missbildungen des Gehirns führen können (Kaufmann und Gröters, 2006; Kisby et al., 2006; Kleven et al., 2004). MAM wurde im EST bislang noch nicht untersucht.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Im Labor der Fachgruppe Alternativmethoden zu Tierversuchen – ZEBET am Bundesinstitut für Risikobewertung werden tierversuchsfreie sicherheitstoxikologische Prüfmethoden entwickelt und validiert. Ein spezieller Bereich ist hierbei die Entwicklung von *in vitro* Teststrategien zur Messung von embryotoxischen Substanzen.

Eingebunden im Rahmen zweier Verbundprojekte zum EST, hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, den validierten EST für den Einsatz in sicherheitstoxikologischen Prüfungen zur Embryotoxizität durch die Etablierung molekularer Endpunkte weiterzuentwickeln.

Im ersten Schritt sollte der Endpunkt „mikroskopische Analyse der Herzmuskelzellendifferenzierung“ durch einen oder mehrere geeignete molekulare Endpunkte ersetzt werden. Diese sollten quantitativ mittels Durchflusszytometrie bestimmbar sein.

Im zweiten Schritt sollte für die Weiterentwicklung des EST ein neuer Endpunkt für die Erfassung entwicklungsbedingter neurotoxischer Effekte bestimmt werden. Hierzu gehören die Etablierung eines einfachen, standardisierbaren und auf Substanztestung abgestimmten Differenzierungsprotokolls sowie eine umfassende Charakterisierung der sich differenzierenden neuronalen Zellen. Zudem sollten auch hier geeignete Marker für die durchflusszytometrische Endpunktmessung untersucht werden.

Die neu etablierten molekularen Endpunkte sollten schließlich im Rahmen von Substanztests auf ihre Einsatzfähigkeit geprüft werden. Bei dem Endpunkt für die Herzmuskelzellendifferenzierung sollte die mikroskopische Auswertung mit der Erfassung der molekularen Endpunkte anhand der drei aus der Validierungsstudie erprobten Substanzen 5-FU, PenG und RA verglichen werden. Für die Evaluierung des neuen Endpunktes für Entwicklungsneurotoxizität sollten die Substanzen 5-FU, PenG, VPA, LiCl und MAM untersucht werden.

2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Für die Kultivierung der mES Zellen, die Differenzierung zu Herzmuskelzellen und neuronalen Zellen sowie der Durchführung von Substanztests wurde zum Teil auf bereits vorhandene SOPs (*Standard Operation Procedures*) zurückgegriffen oder es wurden bestehende SOPs in Zusammenarbeit mit den Kollegen und Kolleginnen aus dem ZEBET-Labor weiterentwickelt. Der validierte EST wurde gemäß der SOPs „*Quality Control of Undifferentiated Stem Cells*“ und „*Embryonic Stem Cell Test*“ durchgeführt. Die Arbeiten zur Weiterentwicklung des EST führten zur Erstellung der SOP „*Determination of Myocardial Cells by Flow Cytometry during ES Cell Differentiation*“. Für die neuronale Differenzierung nach dem Gelatine-Protokoll und die Durchführung von Substanztests entstanden während dieser Zeit die SOPs „*Protocol for Efficient Derivation of Neurons via Monolayer Differentiation*“ und „*Protocol for Generation of Dose Response Profiles for Differentiating Neural Cells*“. An der SOP für die Durchführung der neuronalen Differenzierung nach dem PLO-Protokoll wird derzeit im ZEBET-Labor weiter gearbeitet.

Im Folgenden werden die Untersuchungsmethoden näher beschrieben. Die für die Untersuchungen verwendeten Materialien, Zellkulturen, Medien, Lösungen und Beschichtungsmethoden sind im Anhang aufgelistet.

2.1 Zellkulturtechnik

2.1.1 Kultivierung der undifferenzierten D3-Zellen

Die ES Zellen der Mauslinie D3 wurden im D3-Kulturmedium unter Zugabe des Zytokins mLIF (*murine leukemia inhibitory factor*) im undifferenzierten Zustand gehalten. Dazu wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert und dabei in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ für eine Kultur über 2 Tage oder $1,5 \times 10^5$ für eine Kultur über 3 Tage auf 6 cm Petrischalen (mit einer Bodenfläche von $19,5 \text{ cm}^2$) ausgesät. Zum Ablösen der Zellen wurden diese einmal mit warmen PBS gewaschen und in 2 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung bei Raumtemperatur (RT; ca. 20°C) ein bis zwei Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch druckvolles Auf- und Abpipettieren vereinzelt und die Zellsuspension zentrifugiert (RT/5 min/170 x g). Das Zellpellet wurde in Abhängigkeit des Pelletvolumens in 3 bis 5 ml frischem D3-

Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Thoma Zählkammer bestimmt. Je nach Kultivierungszeit wurde das entsprechend errechnete Volumen an Zellsuspension in frisches D3-Kulturmedium (5 ml als Endvolumen) unter Zugabe von 1000 U/ml mLIF aufgenommen. Die Zellen wurden im Brutschrank unter optimalen Umgebungsbedingungen (5% CO₂-Gehalt, 95% relative Luftfeuchte, 37°C) kultiviert. Zur Überprüfung der Viabilität der Zellen wurde der Trypanblautest durchgeführt.

2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung der D3-Zellen


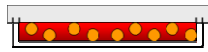
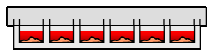
Zur langfristigen Lagerung wurden die D3-Zellen bei einer Temperatur von -196°C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dazu wurden die undifferenzierten vitalen D3-Zellen in möglichst niedriger Passage mit Trypsin abgelöst und zentrifugiert (5 min/RT/170 x g). Nach der Ermittlung der Zellzahl mittels Thoma Zählkammer wurden die Zellen in einer hohen Zelldichte (10⁶/ml) in 1 ml DMSO-haltiges D3-Einfriermedium aufgenommen. Das Lösemittel DMSO dient bei der Kryokonservierung als Gefrierschutzmittel und verhindert, dass bei der Prozedur des Einfrierens die Zellen durch die Bildung von Eiskristallen geschädigt werden. Die Zellsuspension wurde anschließend zügig auf Kryoröhrchen verteilt und in einer Gefrierhalterung langsam bis auf -80°C herunter gekühlt. Abschließend wurden die Kryoröhrchen in die flüssige Phase des Stickstoffs eingetaucht.

Das Wiederauftauen der Zellen musste ebenso zügig durchgeführt werden, um mögliche toxische Effekte, die durch das Lösemittel verursacht werden können, zu vermeiden. Dazu wurde zunächst das Kryoröhrchen kurz im Wasserbad bei 37°C geschwenkt, bis die darin enthaltene Zellsuspension sichtlich aufgetaut war. Die 1 ml Zellsuspension wurde sogleich in ein Zentrifugenröhrchen mit 9 ml vorgewärmtes D3-Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (5 min/RT/170 x g). Anschließend wurde das Zellpellet erneut in D3-Kulturmedium mit 1000 U/ml mLIF aufgenommen und in eine Gelatine (0,1%)-beschichtete Kulturschale mit 6 cm Durchmesser überführt. Nach zwei Inkubationstagen im Brutschrank wurden die Zellen passagiert und bei diesem Schritt ihre Viabilität mittels Trypanblautest überprüft.

2.1.3 Differenzierung der D3-Zellen zu Herzmuskelzellen

Für die Differenzierung zu Herzmuskelzellen wurden die D3-Zellen (Kemler) über drei Tage im hängenden Tropfen im D3-Kulturmedium ohne mLIF kultiviert. Dazu wurde eine Zellsuspension mit $3,75 \times 10^4$ Zellen/ml mit undifferenzierten D3-Zellen hergestellt, von der mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 50 Tropfen von je 20 μ l Zellsuspension auf die Deckelunterseite einer 10 cm Petrischale gesetzt wurden. Jeder Tropfen enthielt 750 Zellen. Anschließend wurde der Deckel mit den Tropfen vorsichtig umgedreht und auf den Schalenboden gestülpt. Um das Austrocknen der Tropfen zu vermeiden, wurden zuvor 5 ml PBS in die Petrischalen vorgelegt. Während der Kultivierungsperiode im hängenden Tropfen aggregierten die Zellen zu sog. „embryoid bodies“ (EBs). Am dritten Tag wurden die EBs vom Deckel der Platte mit 5 ml frischem Kultivierungsmedium vorsichtig herunter gespült und - um das Anheften der EBs am Boden zu vermeiden - in eine 6 cm bakterielle Petrischale überführt. So wurden die EBs zwei weitere Tage als frei schwebende Aggregate weiterkultiviert. Am fünften Tag wurden die EBs wieder auf Gewebekulturschalen mit frischem Medium ausplattiert. Für die mikroskopische Analyse wurden die EBs in eine 24-Multiwellplatte gesetzt (1 EB/Well). Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 50 EBs auf einer 10 cm Petrischale möglichst gleichmäßig verteilt. Ein schematischer Überblick über die Durchführung der Herzmuskelzell-differenzierung ist in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Durchführung der Herzmuskelzellendifferenzierung

Tag der Differenzierung	geeigneter Ansatztag	Durchführung der Herzmuskelzellendifferenzierung
0	Freitag	Kultivierung der mES Zellen in hängenden Tropfen in 10 cm Petrischalen (Gewebekultur) 
3	Montag	Transfer der embryoid bodies (EBs) in 6 cm bakterielle Petrischalen 
5	Mittwoch	Transfer der EBs in 24-Well-Platten oder 10 cm Petrischalen (Gewebekultur) 
7	Freitag	Mediumwechsel oder Ablösen der Zellen für die durchflusszytometrische Auswertung
10	Montag	Mikroskopische Auswertung

2.1.4 Differenzierung der D3-Zellen zu Neuronen und Gliazellen

Vor dem Start der Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen wurden die mES Zellen in hoher Zellzahl ($2 - 3 \times 10^6$ Zellen) auf eine 6 cm Petrischale ausgesät und für 24 h in 5 ml D3-Kulturmedium mit mLIF (1000 U/ml) kultiviert. Am Tag 1 der gerichteten Differenzierung wurden die Zellen, die einen nahezu konfluenten Zellrasen bildeten, wieder abgelöst und auf 0,1% Gelatine-beschichteten Petrischalen in geringerer Zellzahl (7×10^4 Zellen pro 6 cm Schale) ausgesät. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Zellen im serumfreien Neuronendifferenzierungsmedium (N2B27) gehalten. Ein Mediumwechsel erfolgte an den Tagen 2, 5 und 7. Am Tag 8 wurde dem Differenzierungsmedium der Wachstumsfaktor bFGF (10 ng/ml) zugegeben. Ab Tag 9 erfolgte der Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage, wobei dem Medium bFGF zugesetzt wurde (Tab. 3 - Gelatine-Protokoll). Für die Charakterisierung der Zellen und die quantitative Erfassung der molekularen Marker über die Zeit wurden die Zellen bis einschließlich Tag 30 kultiviert. Bei der Etablierung des Gelatine-Protokolls wurde anfangs mit ATCC-Zellen gearbeitet. Aufgrund von zunehmender Instabilität bei der Differenzierung der Zellen, wurde es nach einiger Zeit notwendig, auf Kemler-Zellen der gleichen Zelllinie zu wechseln. Um zu prüfen, ob die Kemler-Zellen die gleichen Eigenschaften besaßen wie die ATCC-Zellen, wurden einige der vorangegangenen Untersuchungen mit den Kemler-Zellen wiederholt.

Ausgehend von dem o.g. Gelatine-Protokoll wurden einige Versuche durchgeführt, um die Zellzahl, Beschichtungsform, Wachstumsfaktoren und Zusammensetzung der Medien zu optimieren. Bei einer modifizierten Methode wurden die mES Zellen am Tag 1 der Differenzierung anstatt auf Gelatine-beschichteten Petrischalen, auf Poly-L-Ornithin (PLO)-beschichteten Petrischalen (15 $\mu\text{g/ml}$) zur Differenzierung kultiviert. Dazu wurden am ersten Tag der Differenzierung $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 6 cm Petrischale ausgesät. Dem Neuronendifferenzierungsmedium wurde außerdem am Tag 1 FCS in geringer Konzentration (0,2%) und an den Tagen 1, 2, 5 und 7 jeweils 1 $\mu\text{g/ml}$ Laminin zugesetzt. Der Wachstumsfaktor bFGF (10 ng/ml) wurde, wie beim Gelatine-Protokoll beschrieben, am Tag 8 und bei jedem weiteren Mediumwechsel dazugegeben (Tab.3 - PLO-Protokoll). Für die Differenzierung der Zellen nach dem PLO-Protokoll wurden ausschließlich Kemler-Zellen eingesetzt.

Tab. 3: Durchführung der neuralen Differenzierung nach dem Gelatine-Protokoll und dem PLO-Protokoll

Tag der Differenzierung	geeigneter Ansatztag	Neuronen (Gelatine-Protokoll)	Neuronen (PLO-Protokoll)
0	Mittwoch	Aussaat der D3-Zellen in hoher Dichte in D3-Kulturmedium + mLiF (1000 U/ml)	Aussaat der D3-Zellen in hoher Dichte in D3-Kulturmedium + mLiF (1000 U/ml)
1	Donnerstag	Transfer auf Gelatine-beschichtete Platten; Kultivierung im N2B27-Medium	Transfer auf PLO-beschichtete Platten; Kultivierung im N2B27-Medium+ FCS (0,2%) + Laminin (1 µg/ml)
2, 5, 7	Freitag, Montag, Mittwoch	Mediumwechsel (N2B27-Medium)	Mediumwechsel (N2B27-Medium + Laminin)
8	Donnerstag	Zugabe von bFGF (10 ng/ml)	Zugabe von bFGF (10 ng/ml)
9, 12, ... 30	Freitag, Montag,...	Mediumwechsel (N2B27-Medium + bFGF)	Mediumwechsel (N2B27-Medium + bFGF)

2.2 Immunzytochemische Analysen

2.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Eine nähere Charakterisierung der Herzmuskelzellen und der neuralen Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung und anschließender mikroskopischer Auswertung.

Für die Anfärbung von herzmuskelzellspezifischen Proteinen wurden die EBs am Tag 5 der Differenzierung auf Gelatine-beschichteten Deckgläsern ausgesät. Die Deckgläser wurden zuvor in 6-Well-Platten eingesetzt. Da immer mit einem Verlust zu rechnen war, wurden mit einer Pipette pro Deckglas ca. 8 EBs überführt.

Für die Markierung von neuralen Zellen wurden die ES Zellen am Tag 1 der Differenzierung entweder auf Gelatine oder auf PLO-beschichteten Deckgläsern ausgesät.

Ein Mediumwechsel erfolgte gemäß der beschriebenen Methoden (Kap. 2.1.3 und 2.1.4) zur Differenzierung alle 2 bis 3 Tage.

Am Tag der Färbung wurden das Medium entfernt und die auf den Deckgläsern angewachsenen Zellen zweimal vorsichtig mit PBS bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte über 25 min mit Paraformaldehyd-(PFA)-Fixierlösung. Für die Markierung der Zellen mit den Antikörpern Anti-Gamma-Aminobuttersäure (Anti-GABA) oder Anti-Cholin Acetyltransferase (Anti-ChAT) wurde der PFA-Fixierungslösung 0,1% (v/v) Glutaraldehyd zugesetzt. Für die Markierung mit Anti-Nestin wurde die PFA-Fixierlösung zusätzlich mit 50 mM Natriumtetraborat gepuffert (pH 9,5). Nach dem Fixiervorgang wurden die Zellen vorsichtig dreimal mit Waschpuffer I gewaschen und die zu färbenden Bereiche auf dem Deckglas mit einem Fettstift umrandet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie zur Permeabilisierung der Membranen wurden die Zellen mit Blockierungslösung für 30 min bei RT behandelt. Ausgenommen waren Antikörper - wie z.B. Anti-Serotonin - die aufgrund starker Kreuzreaktionen ohne den Zusatz von BSA behandelt werden mussten und Anti-ChAT, welcher mit Eselserum inkubiert wurde. Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über eine Stunde bei RT. Alle Antikörper wurden in der entsprechenden Blockierungslösung verdünnt. Nach der Antikörper-Inkubation wurden die Zellen dreimal jeweils 5 min mit Waschpuffer II (bzw. Waschpuffer II ohne BSA) gewaschen. Zur Visualisierung der spezifischen Markierung wurden die Zellen mit einem Carbocyanin (Cy3 oder Cy2)-konjugierten Sekundärantikörper eine weitere halbe Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde erneut dreimal mit Waschpuffer II jeweils 5 min gewaschen.

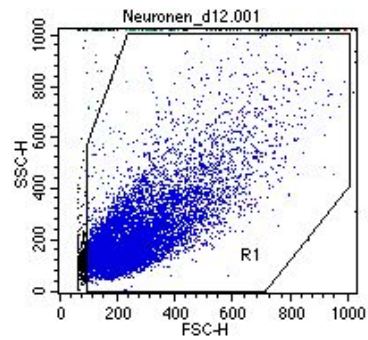
Zur Färbung der Zellkerne wurden die Zellen mit 4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI; 0,1 µg/ml in PBS) für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden das ungebundene DAPI mit Waschlösung I entfernt und die Deckgläser trocken gesaugt. Zuletzt wurden die Deckgläser mit 30% Moviol (in PBS) auf Objektträger eingedeckt und bei RT im Dunkeln getrocknet.

Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Marke BX51, Olympus) untersucht und mit einer Digitalkamera (Marke SIS ColorView II) fotografiert.

2.2.2 Durchflusszytometrie

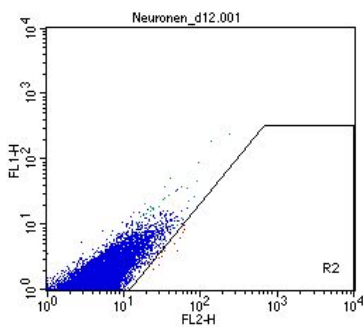
Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, gleichzeitig Fluoreszenz- und Streulichtsignale an einzelnen Zellen zu messen und die multiplen miteinander korrelierten Daten innerhalb von wenigen Minuten an mehreren tausend Zellen quantitativ auszuwerten. Bei der Analyse wird aufgrund eines Überdrucks die Zellsuspension im Probenstrom beschleunigt. Durch den Prozess der sog. hydrodynamischen Fokussierung werden die Zellen sequentiell zum Analysepunkt geführt und dort von einem Laserstrahl im rechten Winkel angestrahlt. Unterschiedliche Detektoren erfassen Streulicht- und Fluoreszenzsignale und Photomultiplier (PMT) wandeln die optischen Signale in elektrische Signale um und verstärken sie. Das gemessene Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße, das im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreute Licht (*side scatter*, SSC) ist ein Maß für die Granularität. Mit dem hier eingesetzten Durchflusszytometer sind bis zu drei verschiedene Fluoreszenzintensitäten detektierbar (FL-1 = 530 nm; FL-2 = 585 nm und FL-3 = 650 nm). Durch Festlegung eines Schwellenwertes (*threshold*) können Signale geringerer Intensität von vornherein von der Messung ausgeschlossen werden. Die erzeugten Daten werden als sog. Listmode-Daten (sequentielle Auflistung jedes Ereignisses) gespeichert und können in unterschiedlicher Kombination sowie in verschiedenen Darstellungsformen, wie z.B. in der Punktwolkendarstellung (Dot Plot) oder im Histogramm, angezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Analysen mit einem FACS Calibur Durchflusszytometer durchgeführt. Als Laserstrahlquelle diente ein Argonlaser, welcher die Fluoreszenzfarbstoffe bei 488 nm Wellenlänge anregt. Die Auswertung erfolgte mit dem Analyse-Programm Cell Quest Pro™. Als Fluorochrom wurde Phycoerythrin (PE) eingesetzt, welches bei 585 nm im Fluoreszenzkanal FL2 detektiert wird. Pro Analyse wurden i.d.R. 10.000 Ereignisse erfasst und die Signale nach dem in Abb. 3 dargestellten Beispiel ausgewertet. Bei einem Ereignis handelt es sich um eine Einheit von Daten, die im Durchflusszytometer für ein Teilchen oder eine Zelle gemessen wird. Da im Vorfeld jeder Fluoreszenzanalyse Zellbruchstücke und Zellklumpen im FSC/SSC Dot-Plot-Fenster ausgegrenzt wurden (Abb. 3/A), entspricht der Anteil der gemessenen fluoreszenzpositiven Ereignisse im FL1/FL2 Dot-Plot Fenster dem Anteil antikörpermarkierter Zellen in 10.000 gemessenen Ereignissen (Abb. 3/C).



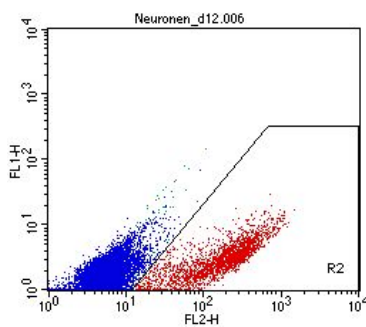
A)

Im ersten Dot-Plot-Fenster wurden anhand der Auftragung von FSC gegen SSC die registrierten Ereignisse nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) durch das Setzen von Region 1 (R1) eingegrenzt, um Zellbruchstücke und Zellklumpen von der Auswertung auszuschließen



B)

In einem weiteren Dot-Plot-Analysenfenster wurden für die in R1 ausgewählten Ereignisse die Fluoreszenzintensitäten FL-1 gegen FL-2 logarithmisch aufgetragen. Anhand von Kontrollzellen (Färbung ohne Primärantikörper) war es möglich, das unspezifische Signal (blau) zu identifizieren und vom spezifischen Signal in Region 2 (R2) abzugrenzen.



C)

Das spezifische Phycoerythrin (PE)-Signal (rot) wurde in R2 bei der FL-2 entsprechenden Wellenlänge (585 nm) erfasst. Bei der Ermittlung von Substanzeffekten wurde zunächst R2 anhand der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle definiert. Anschließend wurden in der festgelegten Region die Ereignisse für die einzelnen Substanzkonzentrationen ermittelt.

Abb. 3 (A-C): Beispiel für die Auswertung der Ereignisse bei der durchflusszytometrischen Analyse

SSC = *side scatter*, FSC = *forward scatter*, FL1 = Fluoreszenzintensität 1 (530 nm), FL2 = Fluoreszenzintensität 2 (585 nm), R1, 2 = Region 1, 2.

Für die Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse spezifisch markierter intrazellulärer Proteine wurden die zu analysierenden Zellen aus dem Zellverband gelöst, die Zellen fixiert, die Zellmembranen permeabilisiert und anschließend die spezifischen Proteine angefärbt. Dazu wurde zunächst das Differenzierungsmedium entfernt und die Zellen mit vorgewärmter PBS-EDTA-Lösung gewaschen und in der DNase-Dissoziationslösung (4 U/ml) mit Trypsin-EDTA (1,5 ml je 6 cm oder 3 ml je 10 cm Petrischale) 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch

vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in Falcon-Zentrifugenröhrchen in 3 ml kalter PBS-EDTA-FCS-Lösung überführt. Es folgten eine Zentrifugation (5 min/RT/170 x g), das Aufnehmen des Zellpellets in 3 ml kalte PBS-EDTA-FCS-Lösung und die Inkubation der Zellen über 30 min bei 4°C. Anschließend wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (s.o.) und das Zellpellet in Abhängigkeit vom Pelletvolumen in 3 bis 10 ml kalter PBS-EDTA-Lösung resuspendiert. Für die Zellzahlbestimmung wurden 100 µl entnommen; die restlichen Zellen wurden erneut zentrifugiert (s.o.) und in 500 µl Waschlösung I aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des CASY-Zellzählers ermittelt. Nach Überführen der Zellen in ein Eppendorfgefäß wurden sie mit 500 µl einer 4%igen PFA-Lösung (in PBS) über 25 min auf Eis fixiert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (3 min/4°C/1400 x g) und in 1 ml Waschlösung I aufgenommen. Diese Waschprozedur wurde ein zweites Mal durchgeführt und anschließend wurde das Zellpellet in je 1 ml Blockierungslösung 30 min auf Eis inkubiert. Für die Markierung mit dem Primärantikörper wurden 6×10^5 Zellen entnommen und 1 h in der entsprechenden Antikörperlösung auf Eis inkubiert. Es folgten drei Waschvorgänge (Zentrifugation 3 min/4°C/1400 x g und Resuspendieren der Zellen) mit jeweils 1 ml Waschlösung II. Für die Detektion von herzmuskelspezifischen Proteinen wurden die Zellen anschließend mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper in der entsprechenden Antikörperlösung 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang (s.o.) wurden die Zellen anschließend mit PE-konjugiertem Streptavidin 15 min auf Eis gefärbt. Für die Markierung von Neuronen und Gliazellen wurden die Zellen nach der Inkubation mit dem Primärantikörper und einem anschließenden Waschvorgang (s.o.) mit einem PE-konjugierten Sekundärantikörper 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen dreimal mit Waschlösung II und einmal mit Waschlösung I gewaschen und zuletzt in 0,2 ml Waschlösung I plus 0,2 ml FACS-Flow für die Messung am Durchflusszytometer aufgenommen.

2.2.3 Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot

Für den Nachweis von spezifischen Proteinen mittels Western-Blot wurden die Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese – kurz SDS-PAGE (*sodium dodecyle sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) genannt – handelt es sich um eine Methode zur

Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Molekülmasse. Eine Schlüsselrolle kommt bei diesem Verfahren dem anionischen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) zu. Als negativ geladenes Molekül bindet sich SDS mit großer Affinität an Proteine und zerstört deren Proteinfaltung. Die Proteine werden denaturiert und die ursprüngliche Ladungsverteilung durch die Negativladung der SDS-Moleküle ersetzt. Somit würden alle SDS-Proteine im elektrischen Feld mit gleicher Geschwindigkeit in Richtung Anode wandern. Allerdings bremst die Siebeigenschaft der Gelmatrix - hier Acrylamid - den Lauf größerer Proteine stärker als den Lauf kleinerer Proteine. Bei den so aufgetrennten Proteinen können die Molekülmassen anhand von parallel aufgetragenen Standardproteinen bestimmt werden.

Um die Proteine für Antikörper zugänglich zu machen, werden sie im Western-Blot Verfahren aus dem Gel auf eine dünne Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wird senkrecht zur Gelebene eine Spannung angelegt und die SDS-Proteine werden elektrophoretisch anodenwärts aus dem Gel auf die Matrix der Membran transferiert. Dort liegen sie gebunden vor und können durch Antikörper spezifisch nachgewiesen werden.

Mit der sehr sensitiven Nachweismethode ECL (*enhanced luminescence detection*) können gebundene Antikörper sichtbar gemacht werden. Der sekundäre Antikörper ist mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRPO; *horseradish peroxidase*) verknüpft, welche in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die chemische Substanz Luminol in einen oxidierten Zustand katalysiert. Das so angeregte Luminol emittiert Licht, welches anhand eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht werden kann.

Proteinextraktion

Für die Extraktion der Proteine wurden die Zellkulturen in den Platten dreimal mit eiskaltem PBS auf Eis gewaschen. Nach einer kurzen Inkubation in SDS-Probenpuffer (250 µl pro 6 cm Platte), wurden die Zellen mit einem Laborschaber von der Platte geschabt und mit einer Pipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Pro Ansatz wurden jeweils zwei auf 6 cm Petrischalen differenzierten Zellkulturen gepoolt. Die Proben wurden im Heizblock 5 min bei 96°C erhitzt und anschließend auf Eis wieder abgekühlt. Mit einer Kanüle (mit 0,5 - 0,6 mm Durchmesser) wurden die Zellen durch Auf- und Abziehen mechanisch aufgeschlossen. Zuletzt wurden die Zellsuspension hochtourig zentrifugiert (20 min/4°C/14000 x g) und der Überstand (Zellextrakt) bei -20°C gelagert. Da für die Charakterisierung lediglich eine Aussage

über die Molekülmasse gemacht werden sollte, wurde eine quantitative Proteinbestimmung nicht durchgeführt.

SDS-PAGE

Nach dem Aufbau der Elektrophorese-Einrichtung wurde das Trenngel, bestehend aus 10% Acrylamid/Bis-Acrylamid, 25% Trenngelpuffer, 0,1% Tetramethylethylen-diamin (TEMED) und 0,075% Ammoniumpersulfat (APS) in die Gießkammern (2 Kammern á 0,75 mm) gegossen und mit Ethanol (EtOH) überschichtet. Zum Auspolymerisieren wurden die Kammern ca. 30 min stehen gelassen und anschließend das EtOH durch Spülen mit bidest. H₂O wieder entfernt. Danach wurden die Kammern mit Sammelgel, bestehend aus 3% (v/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid, 25% Sammelgelpuffer, 0,1% TEMED und 0,15% APS befüllt. Die Taschen zum Auftragen der Proben wurden durch Einsetzen eines Probenkammes gebildet und das Sammelgel ebenfalls über 30 min polymerisiert. Anschließend wurden die Gele in die Trennapparatur eingesetzt und die Apparatur mit Laufpuffer aufgefüllt. Zuletzt wurden die Taschen mit dem blauen Laufpuffer markiert und mit Hilfe einer Hamilton Spritze vorsichtig mit den Proben befüllt.

Die Elektrophorese wurde mit einer Laufzeit von ca. 50 min bei konstanter Stromstärke von 30 mA und einer Spannung von 96 V bis 200 V durchgeführt.

Western-Blot

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran wurde das Gel auf die Membran aufgelegt und in einer mit Tank-Blot-Puffer gefüllten Schale im Sandwich-Verfahren zwischen Blot-Papier und Schwammpolstern fixiert. Anschließend wurde die Kassette in den mit Tank-Blot-Puffer gefüllten Blotting-Tank platziert und für ca. 1 h bei konstanter Stromstärke von 350 mA und einer Spannung von ca. 200 V ein elektrisches Feld angelegt. Im Anschluss an den Transfer wurde mit Hilfe der Ponceau Rot-Färbung ein erster Nachweis über die erfolgte Proteintrennung erbracht. Für die anschließende Antikörper-Färbung wurden die Gele mittels Entfärber-Lösung wieder entfärbt. Die Membran wurde zuletzt dreimal mit bidest. H₂O gewaschen und getrocknet.

Antikörperfärbung und Detektion

Für die Antikörperfärbung wurde die Membran zunächst in Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 (TBST)-Blockierungslösung über 1 h bei RT blockiert und

anschließend in TBST-Blockierungslösung mit Primärantikörper über 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBST (3 x 5 min) wurde die Membran in TBST-Blockierungslösung mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und zuletzt erneut dreimal mit TBST gewaschen.

Der Antikörpernachweis wurde in den ersten Versuchen mit der 3,3'-Diaminobenzidin-Nickel(II)chlorid (DAB-NiCl)-Färbung durchgeführt. Dazu wurde die Membran in DAB-NiCl-Farblösung eingetaucht und bis zur Farbentstehung leicht geschüttelt. Später wurde für den Antikörpernachweis die sensitivere Chemilumineszenzmethode eingesetzt. Dazu wurde die Membran 5 min mit der frisch angesetzten Substrat-Arbeitslösung „*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat*“ inkubiert und mit Frischhaltefolie umwickelt in eine Filmkassette eingelegt. Der Röntgenfilm wurde unterschiedlich lange (10 sec, 30 sec, 1 min, 5 min) exponiert und entwickelt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Scanners erfasst und digitalisiert.

2.2.4 Calcium-Imaging

Für die Durchführung von Calcium-Imaging Experimenten bot sich im Rahmen der Dissertation die Möglichkeit, mit einem konfokalen Lasermikroskop der Marke TCS SP5 von Leica in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Pohl im Institut für Zell- und Neurobiologie der Charité Berlin zu arbeiten. Bei dem Mikroskop handelte es sich um ein Zweiphotonenmikroskop, welches mit einem 20x Objektiv (numerische Apertur: 0,5) für Wasser-Immersion ausgestattet ist. Im Vergleich zur Einphotonenanregung, wie sie bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie angewendet wird, erfolgt bei dieser Methode durch die Anregung eines fluoreszierenden Moleküls mittels Zweiphotonen-Ultrakurzpuls-Laserstrahler bei einer Wellenlänge von 800 nm eine gleichzeitige Absorption zweier Photonen. Die Vorteile sind neben der Erzeugung einer höheren Bildqualität, vor allem eine geringere Phototoxizität in Bezug auf die zu untersuchenden Organismen sowie ein geringeres Photobleichen der Farbstoffe. Als Strahlenquelle diente ein Moden-gekoppelter Titan-Saphir-Laser (der Marke Tsunami, Spectra-Physics). Die Emission der Fluoreszenz wurde unter dem Einsatz eines 525/50 Banddurchlassfilters mit Hilfe der entsprechenden Detektoren registriert. Nach einer 30-minütigen Äquilibration des Gerätes wurden die Bilder im Zeitraffer alle 3 s über einen Zeitraum von 10 bis 20 min im Scan-

Format 512 x 512 Pixel aufgenommen. Die Analyse der Bilder erfolgte offline mit dem Softwareprogramm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>; Stand: 20.02.2012). Für die Darstellung des Fluoreszenzsignals wurden die Bilder in die „Green Fire Blue“ Darstellung konvertiert. Zur Analyse des Calcium-Signals wurde über jeweils drei Zellen eine ROI (*region of interest*)-Analyse erstellt. Hierzu wurde jeweils die Intensität des Signals im Zellsoma ermittelt. Für die graphische Darstellung wurde das Programm EXCEL verwendet.

Für die Detektion von Calcium-Signalen wurden die mES Zellen nach den beschriebenen Protokollen (Kapitel 2.1.3 und 2.1.4) auf speziellen 6 cm Kulturschalen mit Glasbodeneinsatz kultiviert. Zuvor wurden die Kulturschalen mit Gelatine oder PLO beschichtet. Am Tag der Messung wurden die Zellen mit dem Calcium-sensitiven, Membran-permeablen Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM (6 μM , gelöst in Pluronic-DMSO) 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit vorgewärmter Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)-Pufferlösung manuell gewaschen. Nach einer 30-minütigen Äquilibration des Gerätes wurde zunächst vor jeder Zugabe eines Agonisten eine 10-minütige Kontrollaufzeichnung gemacht. Anschließend wurde jeweils einer der Agonisten (30 μM L-Glutamin, 30 μM NMDA, 30 μM AMPA oder 600 μM Dopamin, alle gelöst in PBS) manuell in die HEPES-Pufferlösung pipettiert und die Calcium-Signale über ca. 20 min aufgezeichnet. Vor der jeweils nächsten Zugabe eines Agonisten wurden die Zellen zweimal mit HEPES-Pufferlösung gewaschen. In einigen Versuchen erfolgte vor der Zugabe des Agonisten das Blockieren des jeweiligen Rezeptors mittels eines Antagonisten. Als Antagonist für den NMDA-Rezeptor wurde AP5 (50 μM in PBS) eingesetzt. Als Antagonist für den AMPA-Rezeptor diente NBQX (30 μM in PBS). Pro Kulturschale wurden maximal drei unterschiedliche Agonisten bzw. ein Agonist mit dem entsprechenden Antagonisten getestet. Als positive Kontrolle wurde in den Zellen mit KCl (30 mM) eine unspezifische Depolarisation erzeugt.

2.3 Substanztestung

Alle Substanzen wurden mit den entsprechenden Lösemitteln (PBS, EtOH oder DMSO; siehe Kap. 2.3.1 und 2.3.2) gelöst und anschließend aliquotiert. Aus Vorversuchen wurden die maximalen Lösemittelkonzentrationen abgeleitet, bei

denen ein Lösemittelleffekt ausgeschlossen werden konnte. So wurde festgelegt, dass die Endkonzentration für PBS als Lösungsmittel 1%, für EtOH 0,5% und für DMSO 0,25% nicht überschreiten sollte. Die Substanzen wurden am Beginn der Differenzierung und bei jedem weiteren Mediumwechsel dem Differenzierungsmedium hinzugegeben (siehe auch Kapitel 2.3.1 und 2.3.2).

Pro Versuchsansatz wurden i.d.R. sechs verschiedene Konzentrationen einer Substanz getestet, die mit Hilfe von Verdünnungsreihen hergestellt wurden. In Vorversuchen wurde dazu der aktive Konzentrationsbereich ermittelt. Darüber hinaus wurden immer zwei Kontrollen mit unbehandelten Zellen und zwei Kontrollen mit Lösungsmittel behandelten Zellen (Lösungsmittelkontrollen) mitgeführt. Die Testergebnisse wurden in Bezug auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle (Mittelwert aus den beiden Kontrollmessungen) in % der Lösungsmittelkontrolle ausgewertet und grafisch in Form von Konzentrations-Wirkungskurven aufgetragen. Entsprechend den Vorgaben aus der Validierungsstudie (Genschow et al., 2002 und 2004) wurde für alle Substanzen die Konzentrationen in der Einheit $\mu\text{g/ml}$ verwendet.

2.3.1 Differenzierungstest - Herzmuskelzellen

Für die Substanztestung mit Herzmuskelzellen wurden die mES Zellen wie beschrieben (Kap. 2.1.3) zu Herzmuskelzellen differenziert. Die Zugabe der Substanzen erfolgte mit jeder Neuzugabe des Differenzierungsmediums am Tag 0, 3 und 5. Die Testsubstanzen waren: 5-Fluorouracil (5-FU; gelöst in 0,0045% PBS), all-trans Retinsäure (RA; gelöst in 0,0005% EtOH) und Penicillin G (PenG; gelöst in 0,67% PBS).

Für die mikroskopische Auswertung wurden die Zellen auf 24-Well-Platten differenziert (pro Well ein EB, siehe Kapitel 2.1.3). Pro Substanztest wurden sechs 24-Well-Platten mit sechs unterschiedlichen Substanzkonzentrationen, zwei 24-Well-Platten mit Lösungsmittel behandelten Zellen und zwei 24-Well-Platten mit unbehandelten Zellen angesetzt. Am Tag der Auswertung (Tag 10 der Differenzierung) wurde mikroskopisch die Anzahl der Bereiche mit differenzierten Herzmuskelzellen pro 24-Well-Platte ermittelt. Eine erfolgreiche Differenzierung zeigte sich durch rhythmisch kontrahierende Zellbereiche. Das Experiment wurde als valide beurteilt, wenn in mindestens 21 von 24 Wells der Lösungsmittelkontrolle

kontrahierende Herzmuskelzellen zu beobachten waren. Das Ergebnis (21, 22, 23 oder 24) wurde mit 100% Differenzierung gleichgesetzt. Der Einfluss einer Testsubstanz zeigte sich daran, dass auf einer 24-Well-Platte in weniger als 21 Wells kontrahierende Bereiche zu beobachten waren. Das Ergebnis wurde in % der Lösungsmittelkontrolle umgerechnet. Die Durchführung der mikroskopischen Auswertung erfolgte nach den Vorgaben des validierten EST (Genschow et al., 2004 und 2002).

Zur Auswertung der molekularen Marker wurde die durchflusszytometrische Analyse herangezogen. Hierzu wurden pro Substanzkonzentration 50 EBs auf eine 10 cm Petrischale für die Analyse im Durchflusszytometer kultiviert (siehe Kap. 2.1.3). Demnach wurden pro Test i.d.R. sechs Schalen mit den unterschiedlichen Substanzkonzentrationen, zwei Schalen mit Lösungsmittelkontrollen und zwei Schalen mit unbehandelten Kontrollen angesetzt. Die Auswertung der Markerproteine erfolgte am Tag 7 der Differenzierung. Pro Analysepunkt wurden 10.000 Ereignisse gemessen. Da es in den höchsten Substanzkonzentrationen auch zum Abfall in der Zellzahl kommen konnte, wurde festgelegt, dass in Ausnahmen bei der höchsten Substanzkonzentration auch weniger Zellen in die Auswertung einbezogen werden konnten. Allerdings sollten für eine valide Aussage mindestens noch 3.000 Ereignisse erfassbar sein, wie in Vorversuchen ermittelt wurde.

2.3.2 Differenzierungstest – Neuronen und Gliazellen

Für die Substanztestung mit Neuronen und Gliazellen wurden die mES Zellen wie beschrieben (Kap. 2.1.4) entweder nach dem Gelatine-Protokoll oder nach dem PLO-Protokoll kultiviert. Auch hier erfolgte die Zugabe der Substanzen während der Differenzierung im Neuronendifferenzierungsmedium bis zum Auswertetag mit jedem Mediumwechsel. Eine Ausnahme bildete Tag 1 der Differenzierung. Nach der Überführung der Zellen auf die beschichteten Platten wurden sie zunächst zwei Stunden in 2,5 ml Neuronendifferenzierungsmedium pro 6 cm Petrischale ohne Testsubstanz im Brutschrank kultiviert. So sollte vermieden werden, dass die Anheftung der Zellen am Schalenboden durch eine frühzeitige Substanzzugabe gestört wird. Nach zwei Stunden erfolgte dann die Zugabe der jeweiligen Substanz in unterschiedlicher Konzentration. Dabei wurde die Testsubstanz in doppelter

Konzentration in 2,5 ml Medium pro 6 cm Schale dazugegeben. Auch hier wurden pro Test i.d.R. sechs Schalen mit den unterschiedlichen Substanzkonzentrationen, zwei Schalen mit Lösungsmittelkontrollen und zwei Schalen mit unbehandelten Kontrollen für die Analyse im Durchflusszytometer angesetzt.

Folgende Substanzen wurden getestet: 5-Fluorouracil (5-FU, gelöst in 0,0036% PBS), Penicillin G (PenG, gelöst in 0,1% PBS), Lithiumchlorid (LiCl, gelöst in 0,199% PBS), Methylazoxymethanolacetat (MAM, gelöst in 0,1% PBS) und Valproinsäure (VPA, gelöst in 0,075% DMSO).

2.3.3 MTT-Zytotoxizitätstest

Beim MTT-Zytotoxizitätstest handelt es sich um eine effiziente, standardisierte Methode zur photometrischen Bestimmung der Viabilität von Zellen. Dabei wird der Anteil lebender Zellen nach Behandlung mit einer Testsubstanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt. Der Nachweis beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid), wobei das dunkelviolette, wasserunlösliche Formazan entsteht (Abb. 4). Diese Reaktion findet nur in viablen Zellen statt. In erster Linie erfolgt die Spaltung durch Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mit Hilfe der Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH; zu einem geringeren Anteil erfolgt die Reduktion auch durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase (Berridge et al., 1996).

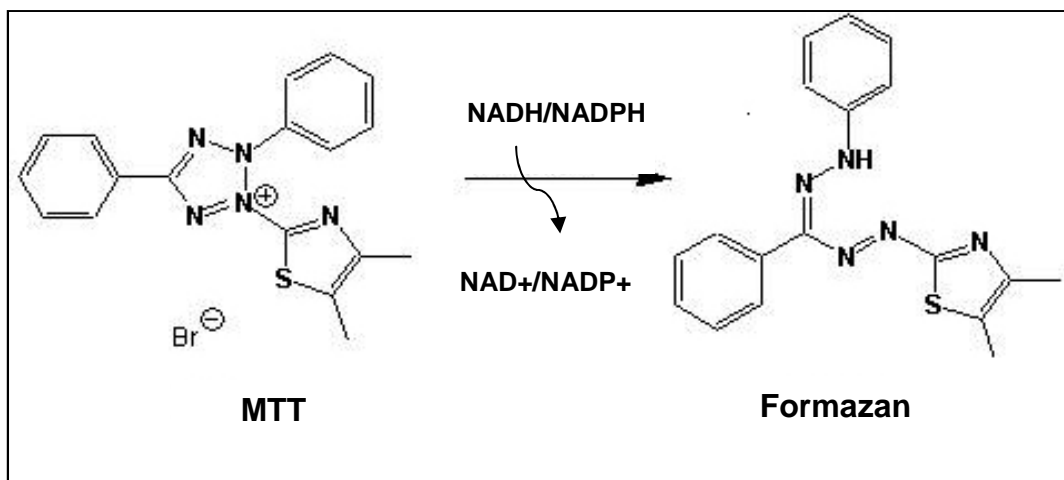


Abb. 4: Schema für die Umwandlung von MTT zu Formazan
(verändert nach Technical Resources, BioTec Instruments)

Für die Bestimmung der Viabilität wurden die Neuronen auf Gelatine- oder PLO-beschichteten 24-Well-Platten kultiviert. Die am Tag 1 auszusäende Zellzahl wurde auf die Bodenfläche der Wells (2 cm^2) entsprechend umgerechnet. Pro Testsubstanz und Ansatz wurden zwei 24-Well-Platten benötigt. Die Plattenbelegung erfolgte nach dem in Abb. 5 (A, B) dargestellten Plattenbelegschema: Bei jeder Messung wurden vier Wells pro Konzentration belegt. Zusätzlich wurden Lösungsmittelkontrollen (KLM; Zellen in Medium mit Lösungsmittel, jedoch ohne Substanz), unbehandelte Kontrollen (K; Zellen in Medium, jedoch ohne Substanz und Lösungsmittel) und Blanks (B; Medium mit Lösungsmittel, jedoch ohne Substanz und Zellen) mitgeführt.

Am Tag der Messung wurden die Zellen einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und mit MTT-Lösung ($500 \mu\text{l}/\text{Well}$) über 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten zentrifugiert ($5 \text{ min}/\text{RT}/1500 \times g$). Das Medium wurde entfernt und das Formazan mit $500 \mu\text{l}$ DMSO/Well durch gleichmäßiges leichtes Schütteln über 15 min gelöst. Die Farbreaktion wurde spektrometrisch mit einem Mikroplatten-Reader (Infinite M200) bei 570 nm Wellenlänge gemessen. Die Auswertung der Daten wurde mit dem Softwareprogramm EXCEL vorgenommen.

A) Kontrollen

	1	2	3	4	5	6
A	B	K	K	KLM	KLM	B
B	B	K	K	KLM	KLM	B
C	B	K	K	KLM	KLM	B
D	B	K	K	KLM	KLM	B

B) Substanz (LiCl) in sechs Konzentrationen

	1	2	3	4	5	6
A	4	12	37	111	333	1000
B	4	12	37	111	333	1000
C	4	12	37	111	333	1000
D	4	12	37	111	333	1000

Abb. 5 (A, B): Plattenbelegschema für den MTT-Test

Pro Testsubstanz wurden jeweils 2 Platten belegt (A und B). Platte A zeigt die Kontrollen: B = Blanks (Medium mit Lösungsmittel ohne Substanz und Zellen); K = Kontrollen (Zellen in Medium ohne Substanz und Lösungsmittel), KLM = Lösungsmittelkontrollen (Zellen in Medium mit Lösungsmittel ohne Substanz). Platte B zeigt als Beispiel die Messung von Lithiumchlorid (LiCl) in den getesteten sechs Konzentrationen ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

2.3.4 Statistik

Bei den vorgelegten Daten handelt es sich um Mittelwerte von mindestens zweifach durchgeführten unabhängigen Versuchen. Angegeben wird zudem die Abweichung von Mittelwert (bei $n = 2$) bzw. die Standardabweichung (bei $n \geq 3$).

Um signifikante Unterschiede zwischen den Methoden oder zwischen den einzelnen Endpunkten anhand der ermittelten ID_{50} (*50% inhibition of differentiation*)-Werten und IC_{50} (*50% inhibition of growth or cytotoxic effect*)-Werten bestimmen zu können, wurde geprüft, ob der Student's t-Test für die Bewertung der vorliegenden Daten geeignet war. Jedoch lag nicht in allen Stichproben eine Normalverteilung vor. Darum wurde der nicht-parametrische, zweiseitige Mann-Whitney-U-Test angewendet. Bei einem $p < 0,05$ (*) wurden die Unterschiede als signifikant eingestuft. Grundlage für die Durchführung des Tests waren die Ergebnisse (ID_{50} - oder IC_{50} -Werte) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Der statistische Test wurde mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 18 durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vorversuche zur Weiterentwicklung des EST – Analyse von molekularen Endpunkten für die Herzmuskelzellendifferenzierung

Im validierten EST wird für die Bestimmung des Endpunktes „Differenzierung“ die mikroskopische Analyse der Herzmuskelkontraktionen durchgeführt. Im Zuge der Weiterentwicklung des EST war das Ziel dieser Arbeit, die mikroskopische Analyse durch die Messung eines molekularen Endpunktes zu ersetzen, um eine bessere Quantifizierung der Ergebnisse und eine mögliche Verkürzung der Testdauer zu erzielen. Hierfür sollten potentiell geeignete herzmuskelzellspezifische molekulare Marker mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt und sodann mit den Ergebnissen zum validierten Endpunkt anhand von ausgewählten Substanzen verglichen werden, um die Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit des molekularen Endpunktes zu prüfen.

3.1.1 *Charakterisierung der Differenzierung zu Herzmuskelzellen*

Die mES Zellen wurden zunächst nach der beschriebenen Methode (Kap. 2.1.3) kultiviert und die Differenzierung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet sowie fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen.

In der Phasenkontrastaufnahme (Abb. 6; A) ist zu sehen, dass die D3 Zellen im undifferenzierten Zustand unter Zugabe von mLIF inselförmige Kolonien bildeten. Während der zweitägigen Kultivierung im hängenden Tropfen aggregierten die Zellen zu sogenannten „embryoid bodies“ (EBs). Diese wurden am dritten Tag auf bakterielle Petrischalen überführt und für weitere zwei Tage schwebend in Suspensionskultur gehalten (B). Die anschließende Überführung der EBs auf Gewebekulturschalen ermöglichte es den Zellen, Kontakt zur Matrixoberfläche des Schalenbodens aufzunehmen. Die Zellen wanderten aus den EBs heraus in die Peripherie und begannen zu differenzieren. Bereits am Tag 7 der Differenzierung waren in den Kulturen erste rhythmische Herzmuskelkontraktionen zu beobachten. Bei erfolgreicher Differenzierung waren spätestens am Tag 10 der Kultivierung aus jedem EB heraus rhythmisch kontrahierende Herzmuskelzellen gewachsen.

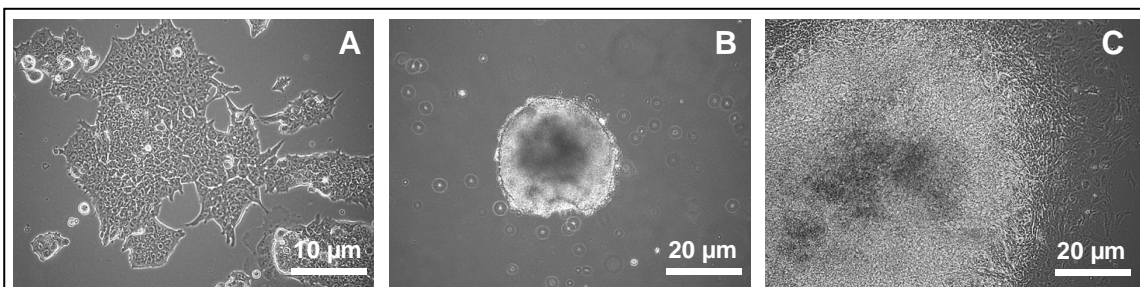
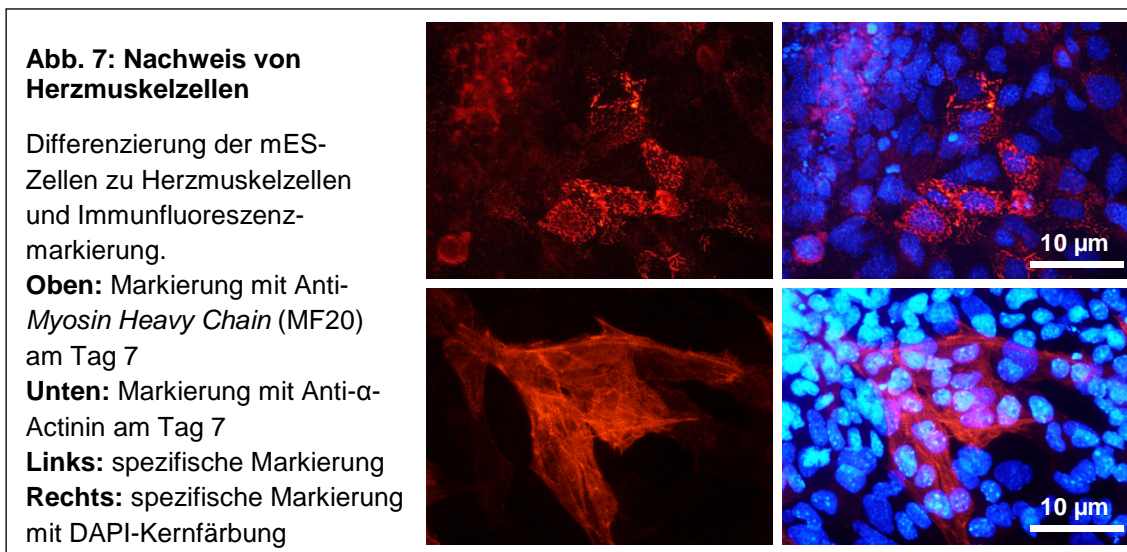


Abb. 6 (A-C): Murine ES Zellen der Linie D3 in der Phasenkontrastaufnahme

Undifferenzierte D3 Zellen (A), zu einem „embryoid body“ (EB) aggregierte Zellen am Tag 5 (B) und aus dem EB herausgewachsene und u.a. zu kontrahierenden Herzmuskelzellen differenzierte Zellen am Tag 10 der Differenzierung (C).

Die Immunfluoreszenzaufnahmen (Abb. 7) zeigen die immunzytochemische Anfärbung von Proteinen, die während der Herzmuskelzellentwicklung spezifisch gebildet wurden. Mit dem Antikörper MF20 wurde das sarcomere Strukturprotein MHC (*myosin heavy chain*) sichtbar. Die Anfärbung von α -Actinin gab die quergestreifte Morphologie der Muskelsarcomere wieder (B). Diese Struktureinheiten bestehen aus dem Filamentgerüst und den Z-Banden, die sich entlang der Myofibrillen periodisch alle 2 bis 3 μm wiederholen. Das Muskelprotein α -Actinin ist im Bereich der Z-Bande, am Kreuzpunkt der Aktinfilamente lokalisiert. Die Proteine MHC und α -Actinin werden sowohl in Herzmuskelzellen als auch in Skelettmuskelzellen gebildet. Jedoch konnte die Anwesenheit von Skelettmuskelzellen zu diesem Zeitpunkt der Differenzierung ausgeschlossen werden. Zum einen konnte mikroskopisch beobachtet werden, dass sich Skelettmuskelzellen - wenn überhaupt - erst nach ca. 3 bis 4 Wochen in der Kultur ausdifferenzierten. So waren sie morphologisch von den Herzmuskelzellen als langgestreckte Zellen mit mehreren Zellkernen deutlich zu unterscheiden. Auffällig war auch, dass die Skelettmuskelzellen sich nach 4 bis 6 Wochen zu gitternetzartigen Strukturen anordneten. Zum anderen zeigte die Anfärbung der Zellen mit dem spezifischen Antikörper My-32 gegen das skelettale Muskelzellprotein MHC zum Zeitpunkt der Herzmuskelzellkontraktionen (Tag 7 bis Tag 14) kein spezifisches Signal.



3.1.2 Quantitative Bestimmung der molekularen Marker

Zunächst war das Ziel zu prüfen, ob eine quantitative Bestimmung der herzmuskelzellspezifischen molekularen Marker mittels Messung im Durchflusszytometer möglich war. In Vorversuchen wurden dazu die einzelnen Schritte zur spezifischen intrazellulären Färbung erprobt. Dies beinhaltete das Ablösen der Zellen vom Schalenboden und die Vereinzelnung der Zellen sowie die Fixierung der Antigenstruktur für die Antikörper-Antigenreaktion. Auch wurden die Bedingungen zum Verhindern von unspezifischen Antikörperreaktionen durch eine geeignete Blockierungslösung mit Ziegen Serum und die Permeabilisierung der Zellwände mit Saponin sowie die Durchführung der Waschvorgänge mit Blick auf die spezielle Fragestellung - der durchflusszytometrischen Messung - optimiert. Anhand des entwickelten Protokolls wurden die Proteine α -Actinin (mit dem Antikörper α -Actinin) und MHC (mit dem Antikörper MF20) intrazellulär markiert und das Ergebnis der Färbung im Durchflusszytometer analysiert. Im Fokus standen dabei der Anteil an positiv markierten Zellen, eine ausreichende Menge an auszuwertenden Zellen insgesamt und ein möglichst früher Zeitpunkt der Bestimmung. So sollte der Mindestanteil der Marker ca. 5% betragen, ansonsten würde ein messbarer Substanzeffekt, sprich eine Abnahme an differenzierten Zellen und somit eine Abnahme des Anteils an positiv markierten Ereignissen (zur Definition siehe Kap. 2.2.2) mit der angedachten Methode womöglich schwierig auszuwerten sein. Zudem

sollte die Kultur am Auswertetag mindestens ein bis zwei Millionen Zellen enthalten, da bei der Aufarbeitung der Zellen immer mit Verlust zu rechnen war.

Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für den Testansatz wurden die Zellen über einen Zeitraum von 20 Tagen unter Differenzierungsbedingungen für Herzmuskelzellen kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden der Anteil gemessener Antigen-positiver Ereignisse mittels Durchflusszytometrie sowie die Zellzahl mittels CASY Zellzähler ermittelt. Da die EBs gemäß dem Differenzierungsprotokoll erst am Tag 5 auf die Gewebekulturschalen überführt wurden, konnte mit der ersten Analyse erst am Tag 6 der Differenzierung begonnen werden.

Das Ergebnis zeigt, dass der Anteil an MHC-positiven Ereignissen mit 17% von 10.000 gemessenen Ereignissen am Tag 7 der Differenzierung am höchsten war, am Tag 10 fiel der Anteil auf 6% wieder ab (Abb. 8). α -Actinin zeigte am Tag 7 ebenfalls einen Peak, der prozentuale Anteil war jedoch an allen Tagen um einiges geringer im Vergleich zu den Ergebnissen mit MHC. Am Tag 7 wurden lediglich 4% α -Actinin-positiv Ereignisse gemessen. Die Gesamtzellzahl betrug am Tag 7 ca. 10^6 Zellen. Das Wachstum stieg dann exponentiell an und erreichte am Tag 17 die stationäre Phase mit ca. 11×10^6 Zellen. Folglich war der Anteil der Herzmuskelzellen am Tag 7 in Bezug auf die Gesamtzellzahl am höchsten. In der exponentiellen Wachstumsphase wuchsen vor allem auch Zellen heran, die nicht MHC- oder α -Actinin-positiv waren.

Mit Blick auf das Testen von Substanzen waren demnach am Tag 7 der Differenzierung genügend Zellen vorhanden und der Anteil an MHC-positiven Ereignissen ausreichend hoch für eine Messung im Durchflusszytometer. Der Anteil an α -Actinin-positiven Ereignissen war dagegen knapp unter 5%. Da das Signal für α -Actinin im Durchflusszytometer aber gut auszuwerten war, wurde entschieden, diesen interessanten Endpunkt trotz geringem Anteil weiter zu verfolgen.

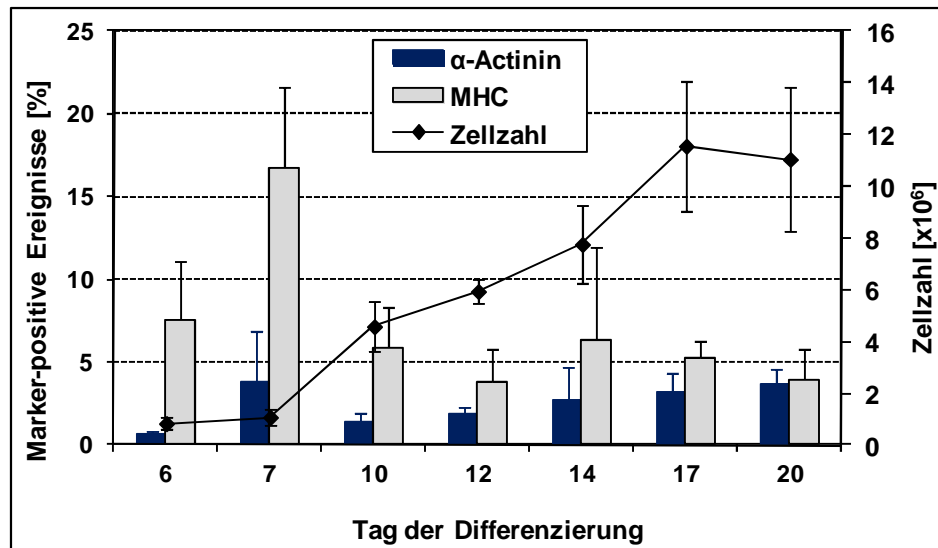


Abb. 8: Analyse von α -Actinin und Myosin Heavy Chain (MHC) sowie der Zellzahl im zeitlichen Verlauf

Die mES Zellen wurden über einen Zeitraum von bis zu 20 Tagen unter differenzierenden Bedingungen zu Herzmuskelzellen kultiviert. Die Auswertung der Markerproteine erfolgte an den angegebenen Tagen mittels Durchflusszytometrie, wobei pro Messpunkt jeweils 10.000 Ereignisse analysiert wurden. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mittels CASY-Zellzähler. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf drei unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Substanztests an Herzmuskelzellen

Anhand von Substanztestungen wurde geprüft, ob durch die Bestimmung eines molekularen Endpunktes die mikroskopische Analyse im EST ersetzt werden kann. Ausgewählt wurden dazu drei aus der Validierungsstudie bekannte Substanzen: 5-Fluorouracil, all-trans Retinsäure und Penicillin G. Im Folgenden geht es um den Vergleich der mikroskopischen Analyse (Tag 10) mit der molekularen Endpunktbestimmung anhand der Messung der Strukturproteine α -Actinin und MHC im Durchflusszytometer am Tag 7 der Differenzierung. Die Ergebnisse der Substanztests werden in den Abb. 9 bis Abb. 11 in Form von Konzentrations-Wirkungskurven halblogarithmisch dargestellt. Für jede Substanz wurden anhand der drei Endpunkte (Mikroskop, MHC, α -Actinin) drei unabhängige Experimente durchgeführt. Eine zusammenfassende Graphik gibt die aus den Kurven abgelesenen halbmaximalen Hemmkonzentrationen - die ID₅₀-Werte - für alle Endpunkte wieder (Abb. 12).

5-Fluorouracil (5-FU) ist im EST vielfach getestet und im Rahmen der Validierungsstudie als positive Standard-Testsubstanz vorgeschrieben worden (Genschow et al. 2002 und 2004). Für 5-FU wurden in der Studie ID₅₀-Werte zwischen 0,042 und 0,053 µg/ml ermittelt. In den vorliegenden Ergebnissen zeigen die Konzentrations-Wirkungskurven für die mikroskopische Analyse von 5-FU einen beinahe identischen Kurvenverlauf. Die ID₅₀-Werte liegen zwischen 0,051 und 0,064 µg/ml 5-FU (Abb. 9). Im Vergleich dazu zeigen die Kurven für die Markerproteine α -Actinin und MHC größere Schwankungen. Insbesondere weichen zwei Kurven - eine Messung mit MHC und eine Messung mit α -Actinin - von den anderen Kurven stark ab.

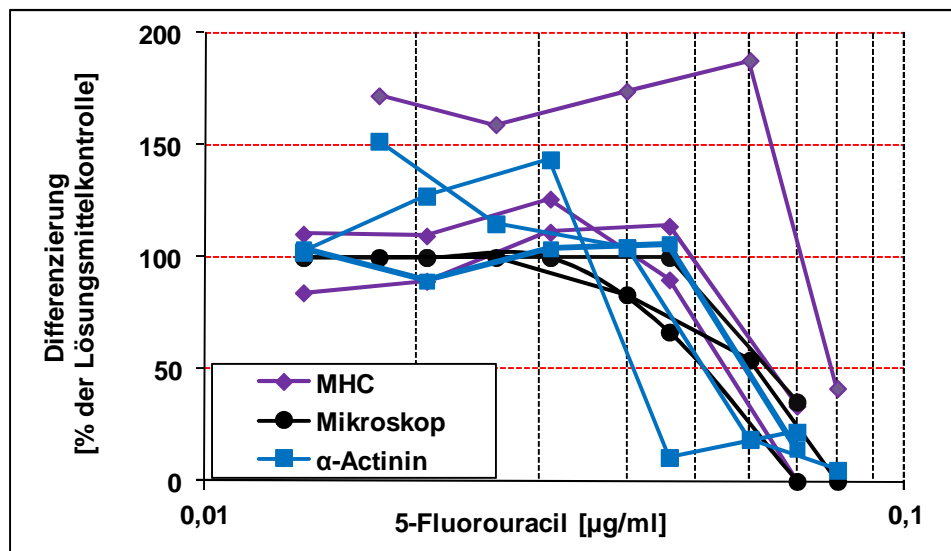


Abb. 9: Konzentrationsabhängiger Effekt von 5-Fluorouracil (5-FU) auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen

Die mES-Zellen wurden unter 5-FU-Exposition zu Herzmuskelzellen differenziert. Die Auswertung der Markerproteine MHC und α -Actinin erfolgte mittels Durchflusszytometrie am Tag 7 der Differenzierung. Für die mikroskopische Analyse wurden am Tag 10 der Differenzierung die Kontraktionen pro 24-Well-Platte ermittelt. Die Effekte beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrolle mit PBS (0,0045%). Jeder Endpunkt (MHC, Mikroskop, α -Actinin) wurde in drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Eine Erklärung für die Abweichungen könnte sein, dass die Streuung der Messdaten durch die weitaus komplexere Analysemethode verursacht wird. Im Vergleich zur mikroskopischen Auswertung müssen die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse zuvor in vielen Arbeitsschritten aufgearbeitet werden. Zudem handelt es sich bei der Detektion der Signale um einen weitaus empfindlicheren Messvorgang, der jedoch auch objektiver ist. Im Fall von 5-FU wurde zudem in einem sehr engen

Konzentrationsbereich gearbeitet, so dass hier eine Varianz in den Ergebnissen wohl kaum zu vermeiden ist. Die ID_{50} -Werte liegen für MHC zwischen 0,055 und 0,079 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU; für α -Actinin zwischen 0,041 und 0,052 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU. Folglich stimmen hinsichtlich der ID_{50} -Werte die molekularen Endpunkten mit dem mikroskopischen Endpunkt gut überein (siehe auch Abb. 12).

All-trans Retinsäure (RA) ist eine stark embryotoxische Substanz. Im Rahmen der Validierungsstudie wurden im EST für RA ID_{50} -Werte von 0,0002 bis 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ erzielt. Dieses Ergebnis kann durch die hier durchgeführte mikroskopische Analyse bestätigt werden. Alle ID_{50} -Werte liegen bei 0,0003 $\mu\text{g/ml}$ RA (Abb. 10). Bei der Analyse der Markerproteine ist in einigen Fällen ein Anstieg in den Kurven zu verzeichnen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass RA in geringen Konzentrationen einen stimulierenden Effekt auf die Herzmuskeldifferenzierung hat, wie er auch dosis- und zeitabhängig in den Arbeiten von Wobus et al. (1997 und 1991) und Hidaki et al. (2003) beschrieben wird. Die ID_{50} -Werte für die molekularen Marker liegen bei allen hier gemessenen Kurven zwischen 0,0001 und 0,0004 $\mu\text{g/ml}$.

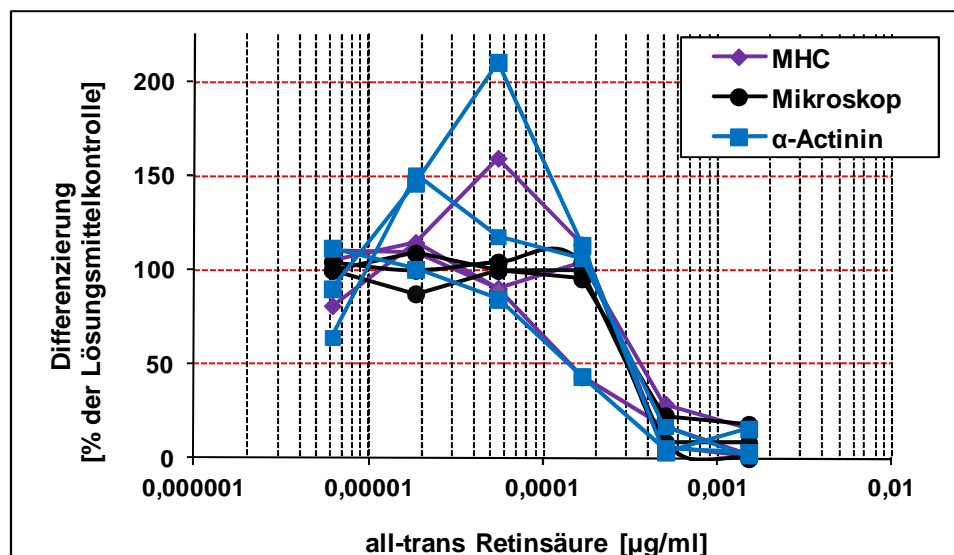


Abb. 10: Konzentrationsabhängiger Effekt von all-trans Retinsäure (RA) auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen

Die mES-Zellen wurden unter RA-Exposition zu Herzmuskelzellen differenziert. Die Auswertung der Markerproteine MHC und α -Actinin erfolgte mittels Durchflusszytometrie am Tag 7 der Differenzierung. Für die mikroskopische Analyse wurden am Tag 10 der Differenzierung die Kontraktionen pro 24-Well-Platte ermittelt. Die Effekte beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrolle mit EtOH (0,0005%). Jeder Endpunkt (MHC, Mikroskop, α -Actinin) wurde in drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Penicillin G (PenG) wurde im Rahmen der Validierungsstudie als nicht embryotoxische Substanz getestet (Genschow et al., 2002 und 2004). Ein Effekt von PenG auf die Differenzierung wurde in der Studie bei einem ID₅₀-Wert > 1000 µg/ml gemessen. Die in dieser Arbeit durchgeführte mikroskopische Analyse für PenG ergibt zwei beinahe identische Kurven, deren ID₅₀-Werte bei 1540 und 1650 µg/ml liegen (Abb. 11). Die dritte Kurve zeigt einen abweichenden Kurvenverlauf mit einem ID₅₀-Wert von 730 µg/ml PenG. Diese relativ großen Abweichungen zwischen den einzelnen ID₅₀-Werten sind auch bei der Bestimmung der molekularen Endpunkte zu verzeichnen. Bei der Analyse von MHC liegen die halbmaximalen Hemmkonzentrationen bei einem ID₅₀-Wert zwischen 580 und 1820 µg/ml; die Kurven der α-Actinin-Analysen zeigen ID₅₀-Werte zwischen 570 und 1270 µg/ml. Der Grund für die starke Varianz bei PenG könnte in den hohen Substanzkonzentrationen liegen, in denen auch unspezifische Effekte, wie beispielsweise eine Störung der Proteinbiosynthese auftreten und die Zellen in ihrem Wachstum und/oder bei der Differenzierung negativ beeinflussen können.

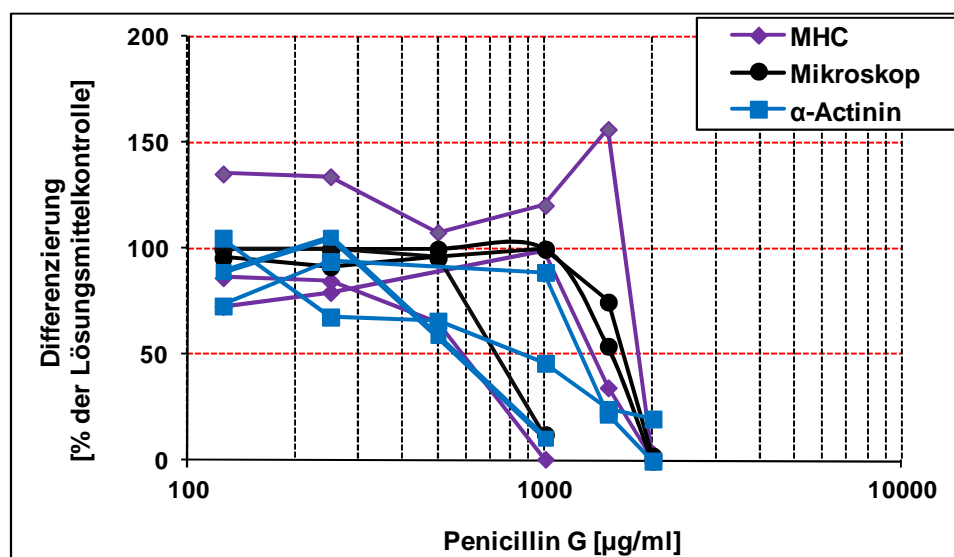


Abb. 11: Konzentrationsabhängiger Effekt von Penicillin G (PenG) auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen

Die mES-Zellen wurden unter PenG-Exposition zu Herzmuskelzellen differenziert. Die Auswertung der Markerproteine MHC und α-Actinin erfolgte mittels Durchflusszytometrie am Tag 7 der Differenzierung. Für die mikroskopische Analyse wurden am Tag 10 der Differenzierung die Kontraktionen pro 24-Well-Platte ermittelt. Die Effekte beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrolle mit PBS (0,67%). Jeder Endpunkt (MHC, Mikroskop, α-Actinin) wurde in drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

In Abb. 12 ist die Zusammenstellung aller ID_{50} -Werte auf einer halblogarithmischen Skala zu sehen. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Differenzierung zu Herzmuskelzellen durch die stark embryotoxische Substanz RA auch am stärksten gehemmt wurde. Den geringsten Effekt zeigte die nicht embryotoxische Substanz PenG. Um zu prüfen, ob die ID_{50} -Werte zwischen mikroskopischer Analyse und den einzelnen molekularen Markern MHC und α -Actinin signifikant voneinander abweichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ konnte keine signifikante Abweichung zwischen den Methoden (mikroskopische und durchflusszytometrische Methode) bzw. den Endpunkten (Mikroskop, MHC und α -Actinin) ermittelt werden.

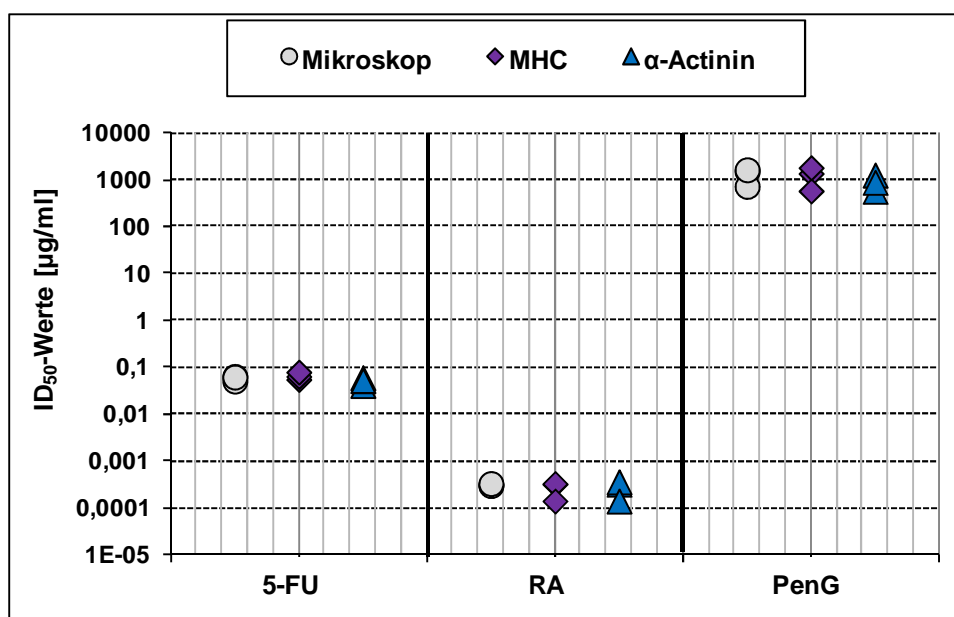


Abb. 12: Vergleich der mikroskopischen Analyse mit den molekularen Endpunkten MHC- und α -Actinin anhand der ID_{50} -Werte

Dargestellt sind die einzelnen ID_{50} -Werte für die Substanzen 5-Fluorouracil (5-FU), all-trans Retinsäure (RA) und Penicillin G (PenG). Jede Substanz wurde in jeweils drei unabhängigen Experimenten anhand der Endpunkte Mikroskop, MHC und α -Actinin getestet. Die ID_{50} -Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven abgelesen.

Die Rohdaten der hier genannten Untersuchungen zur Etablierung von molekularen Endpunkten für die Analyse der Herzmuskelzellendifferenzierung und den Vergleich der Endpunkte mit der validierten Methode sind in Seiler et al. (2004) publiziert worden. Darüber hinaus wurde im ZEBET-Labor die Datenbasis zur Evaluierung des molekularen FACS-EST durch Testung zusätzlicher Substanzen aus unterschiedlichen Substanzklassen und Substanzderivate aus einer Substanzklasse erweitert (Büsen et al., 2009; Riebeling et al., 2011).

3.2 Weiterentwicklung des EST – Analyse von molekularen Endpunkten für die Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Testsystems, dessen molekulare Endpunkte die neurale Differenzierung erfassen. Dazu wurde in einer ersten Versuchsphase geprüft, ob anhand der Differenzierungsmethode von Ying und Smith (2003) eine Differenzierung der im EST etablierten D3-Zellen zu Neuronen und Gliazellen möglich ist. Die Methode sieht vor, die mES Zellen am Tag 1 mit einer Zellzahl von $0,5 - 1,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ Zellen auf Gelatine-beschichteten Petrischalen auszusäen und im Neuronendifferenzierungsmedium (N2B27) zu differenzieren. Am achten Tag werden die Zellen abgelöst und auf Fibronectin-beschichtete Platten umgesetzt. Der Wachstumsfaktor bFGF wird am Tag des Umsetzens und bei jedem weiteren Mediumwechsel alle 2-3 Tage hinzugegeben. In Vorversuchen konnte im ZEBET-Labor ermittelt werden, dass mit dem Ying-Protokoll die neurale Differenzierung grundsätzlich auch mit D3 Zellen möglich war. Allerdings war es für die Durchführung von Substanztestungen notwendig, das Protokoll zu modifizieren, da der Schritt des Replattierens unter Substanzexposition Probleme verursachen kann. Zum einen können Testsubstanzen das Wiederanheften der Zellen stark beeinflussen. Hier besteht die Gefahr, dass es dabei zu einer Selektion bestimmter Subpopulationen kommt. Zum anderen können zytotoxische und/oder differenzierungshemmende Substanzen die Wachstumsbedingungen der Zellen so verändern, dass ein Replattieren unter gleichen Bedingungen nicht mehr möglich wäre. Aufgrund dessen wurde ausgehend von der Methode von Ying das **Gelatine-Protokoll** entwickelt (Kap. 2.1.4, Tab. 3). Über die Zeit haben weitere Optimierungsschritte zum **PLO-Protokoll** geführt (Kap. 2.1.4, Tab. 3). Das Ziel war es, ein stabiles Protokoll zu etablieren, welches die Substanztestung an Neuronen und Gliazellen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt erlaubt. Die molekularen Marker (Tab. 4) sollten dazu mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantitativ erfasst werden. Die Expression der Marker sollte auch hier einen Mindestanteil von ca. 5% Antigen-positiven Ereignissen betragen und die Zellzahl mindestens ein bis zwei Millionen Zellen. Eine wesentliche Voraussetzung für ein Testsystem stellt außerdem eine gut charakterisierte Differenzierung dar, die im Rahmen der Arbeit anhand unterschiedlicher Marker und Nachweismethoden erfolgt ist (Zusammenstellung in Tab. 4) und deren Ergebnisse in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden.

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Marker und Agonisten sowie der Nachweismethoden zur Charakterisierung der neuronalen Differenzierung

Die neurale Differenzierung von mES Zellen wurde anhand von Markern in Form von Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität gegen neurale Strukturproteine, Transkriptionsfaktoren und Neurotransmitter charakterisiert. Zudem wurden die neuronalen Zellen mit Hilfe von Agonisten auf die Ausbildung spezifischer Rezeptoren untersucht. Die Tabelle zeigt die Spezifität der Marker/Agonisten, die durchgeführten Nachweismethoden (Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM), Durchflusszytometrie (hier FACS = *Fluorescence Activated Cell Sorting*), Western-Blot (WB) oder Ca^{2+} -Imaging) und das Ergebnis für die Differenzierung nach dem Gelatine- und PLO-Protokoll ((+) Marker/Signal konnte nachgewiesen werden; (-) Marker/Signal konnte nicht nachgewiesen werden).

SPEZIFITÄT	MARKER/ AGONIST	NACHWEIS- METHODE	NACHWEIS: POSITIV (+) NEGATIV (-)	
			GELATINE	PLO
Strukturprotein - Vorläuferzellen	Nestin	IFM	+	+
Transkriptionsfaktor - Vorläuferzellen	Pax6	IFM	+	+
Strukturproteine - Neuronen	MAP2	IFM, FACS, WB	+	+
	β -Tubulin III	IFM, FACS, WB	+	+
	α -Internexin	IFM, FACS	+	+
Oligodendrozyten	O4	IFM	+	+
	CNPase	IFM, FACS, WB	+	+
Astrozyten	GFAP	IFM, FACS, WB	+	+
Radialgliazellen	RC2	IFM	+	+
Synaptische Vesikel	Synaptophysin	IFM	+	+
Oberflächenrezeptor	NCAM	IFM	+	+
Neurotransmitter	GABA	IFM	+	+
	Serotonin	IFM	+	+
	Tyrosin- Hydroxylase	IFM	+	+
	ChAT	IFM	-	-
Kernprotein	NeuN	IFM	+	+
Rezeptortyp	Glutamat	Ca^{2+} -Imaging	+	+
	Dopamin	Ca^{2+} -Imaging	+	+
	NMDA	Ca^{2+} -Imaging	+	+
	AMPA	Ca^{2+} -Imaging	+	+

3.2.1 Beschreibung der Differenzierung

3.2.1.1 Differenzierung nach dem Gelatine-Protokoll

In Abb. 13 (A bis F) ist die Differenzierung der mES Zellen auf Gelatine-beschichteten Petrischalen - wie sie mit dem Phasenmikroskop zu beobachten war - abgebildet. Nach dem Aussäen in Differenzierungsmedium waren die Zellen in den ersten zwei Tagen vereinzelt angewachsen (A). Zwischen dem zweiten und dem fünften Differenzierungstag war zu beobachten, dass sich viele Zellen vom Plattenboden ablösten und z.T. zu Aggregaten zusammenschlossen (B). Ebenfalls war in den ersten fünf Tagen im Differenzierungsmedium ein starkes Absterben von Zellen festzustellen, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die selektive Eigenschaft des Mediums sowie durch den Serumentzug ausgelöst wurde. Am siebten Tag wurden u.a. auch erste, sich differenzierende neuronale Vorläuferzellen, sogenannte Neuroblasten, sichtbar. Diese Zellen migrierten meist aus den Aggregaten heraus und waren vereinzelt anhand ihrer bipolaren Morphologie von anderen angewachsenen Zellen zu unterscheiden (C). Zum Teil formierten sich die Neuroblasten zu Rosetten (D; Pfeil), eine typische radiale Anordnung neuronaler Vorläuferzellen, wie sie bereits in mehreren Studien beschrieben wurde (Wilson und Stice, 2006; Ying et al., 2003). Am zwölften Tag waren bereits viele neuronale Fortsätze ausgebildet (E). Zunehmend bildete sich ein dichtes Netzwerk an neuronalen Zellen und etwa in der dritten Woche waren auch solche Zellen zu sehen, die morphologisch das Aussehen von Gliazellen hatten (F). Allerdings war zu erkennen, dass es sich bei den differenzierten Zellen um keine homogene Population handelte, sondern um eine heterogene Kultur mit ebenso vielen anderen, nicht neuronalen Zellen, die nicht näher charakterisiert wurden.

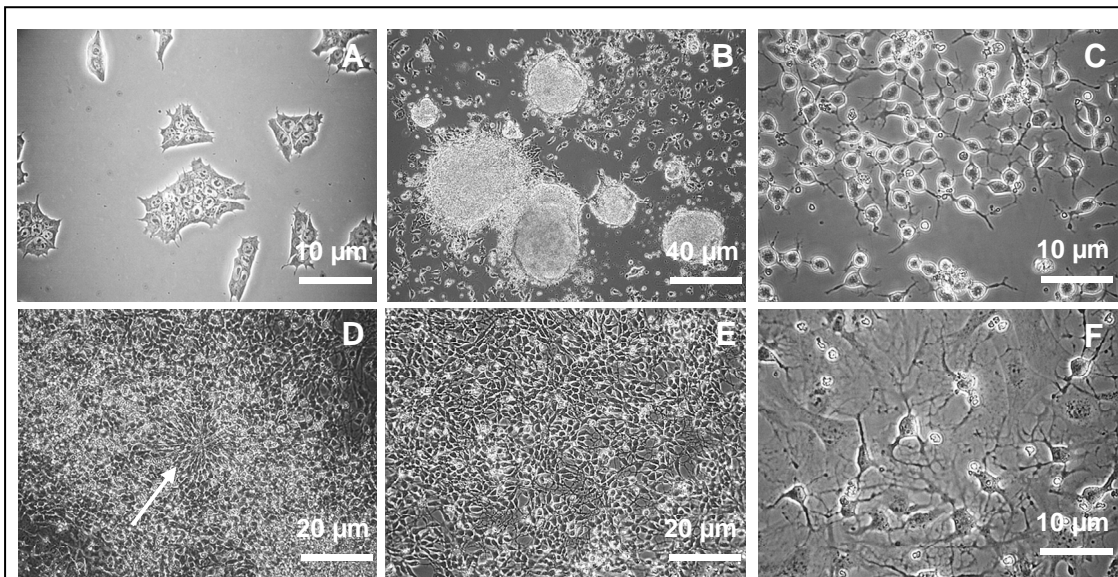


Abb. 13 (A-F): Differenzierung von mES Zellen zu Neuronen und Gliazellen auf Gelatine-beschichteten Platten

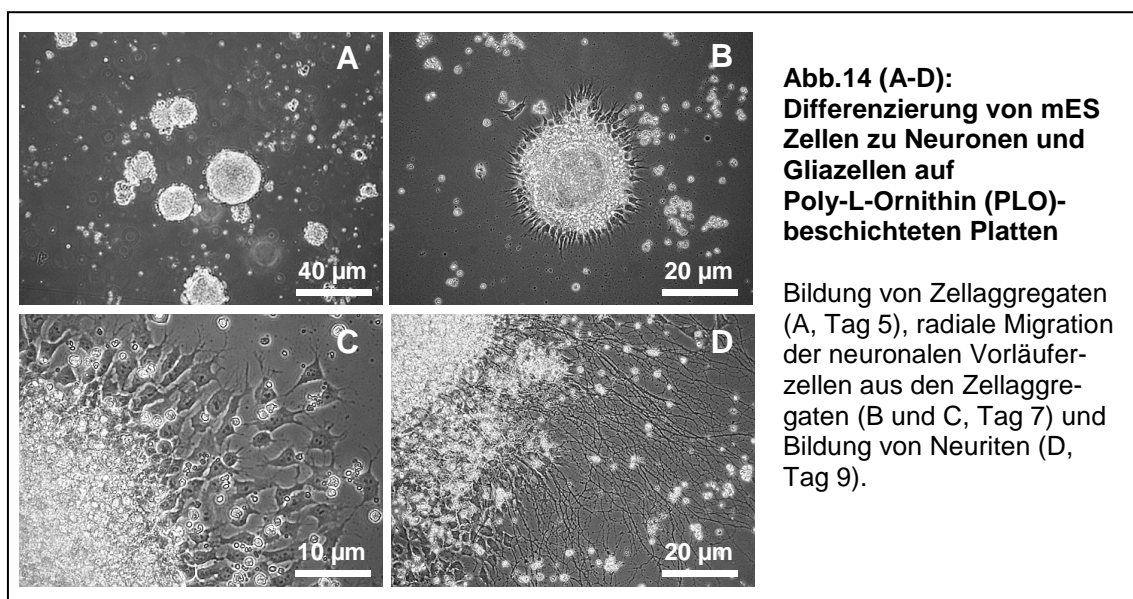
Anwachsen der mES Zellen (ATCC) am Tag 2 der Differenzierung (A), Neurosphären und vereinzelt angewachsene Zellen am Tag 5 (B), Neuroblasten am Tag 7 (C), Rosettenbildung am Tag 9 (D, Pfeil), Neuronen am Tag 12 (E) und Gliazellen am Tag 21 (F).

3.2.1.2 Differenzierung nach dem Poly-L-Ornithin-Protokoll

Um die Effizienz der Differenzierung der mES Zellen zu Neuronen möglichst zu erhöhen, wurde im Rahmen der Arbeit ein weiteres Differenzierungsprotokoll entwickelt (siehe auch Kap. 3.2). Analog zu den Untersuchungen von Goetz et al. (2006) wurden die Zellen anstatt auf Gelatine auf Poly-L-Ornithin (PLO)-beschichteten Petrischalen ausgesät. Dem Medium wurde vom ersten bis einschließlich siebten Tag 1 µg/ml Laminin zugesetzt.

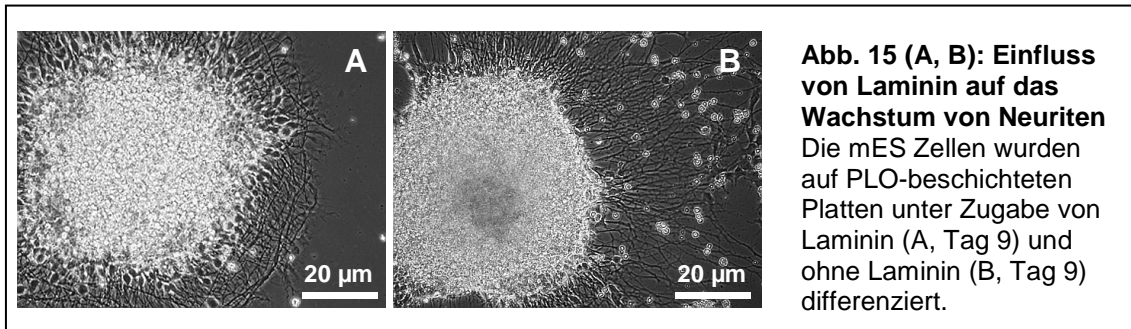
Im Vergleich zur Differenzierung auf Gelatine war zu beobachten, dass die mES Zellen auf der PLO-beschichteten Matrix nur über die Bildung von Aggregaten differenzierten (Abb. 14/A). Die restlichen vereinzelt kugelten sich innerhalb der ersten fünf Tage ab und gingen bei den folgenden Medienwechseln nach und nach verloren. So ist davon auszugehen, dass im Vergleich zur Kultivierung auf Gelatine, auf der PLO-beschichteten Matrix eine noch stärkere Selektion von Zellen stattfand. Nach einigen Vorversuchen stellte sich heraus, dass durch die einmalige Zugabe von 0,2% FCS beim Aussäen der Zellen am Tag 1 das Zusammenlagern zu Zellaggregaten und somit das Überleben und Anwachsen der Zellen erleichtert wurde. Eine weitere Erhöhung der FCS-Konzentration verbesserte die Anheftung, was jedoch mit einem starken

Verlust an differenzierten Neuronen einherging, so dass im Protokoll der niedrigere FCS-Gehalt beibehalten wurde. Während der ersten fünf Tage waren die Zellaggregate nur lose am Plattenboden angewachsen. Dies änderte sich um den fünften Tag herum und die Zellen in den Zellaggregaten begannen, sich fest an der Matrixoberfläche zu verankern. Am siebten Tag war zu beobachten, dass die Zellen aus dem Zellverband radial heraus wanderten und stark proliferierten (B). Zunächst wurden an den Zellen kurze Zellfortsätze sichtbar, die sich zunehmend zu längeren Neuriten entwickelten (B bis D). Zum Teil lagerten sich die Neuriten zusammen und traten gebündelt aus den Neurosphären hervor. Deutlich waren Wachstumskegel mit Lamellipodien und Filopodien am Ende der Neuriten sichtbar (C). Über diese wurden zwischen den Zellen der Zellaggregate zunehmend Kontakte geknüpft. Nach ca. zwei Wochen entstand auch auf der PLO-Matrix ein dichtes Netzwerk an neuronalen Verbindungen. Ebenso traten auch auf PLO-beschichteten Zellkulturplatten nach ca. drei Wochen Zellen auf, die in ihrer Morphologie Gliazellen ähnelten.



Des Weiteren wurde der Einfluss von Laminin auf das Wachstum der mES Zellen auf PLO-beschichteten Petrischalen untersucht. Laminin ist ein Glycoprotein der extrazellulären Matrix der Basallamina, welches das Wachstum von Axonen stimuliert. Im Gehirn befindet sich die Basallamina in den Zellzwischenräumen neuraler Zellen. Über Oberflächenmoleküle, wie z.B. Zelladhäsionsmoleküle (NCAM), Integrine und

Cadherine, treten die wachsenden Axone mit den extrazellulären Matrixproteinen in Wechselwirkung (Chien, 2005). Dies konnte auch in den Kulturen beobachtet werden (Abb. 15/A und B). Wurden die mES Zellen auf PLO-beschichteten Petrischalen in dem Neuronendifferenzierungsmedium ohne die Zugabe von Laminin differenziert, zeigten die Neuriten z.T. ein weniger starkes und stringentes radiales Wachstum (A) als bei Zugabe von Laminin (B).



3.2.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Charakterisierung

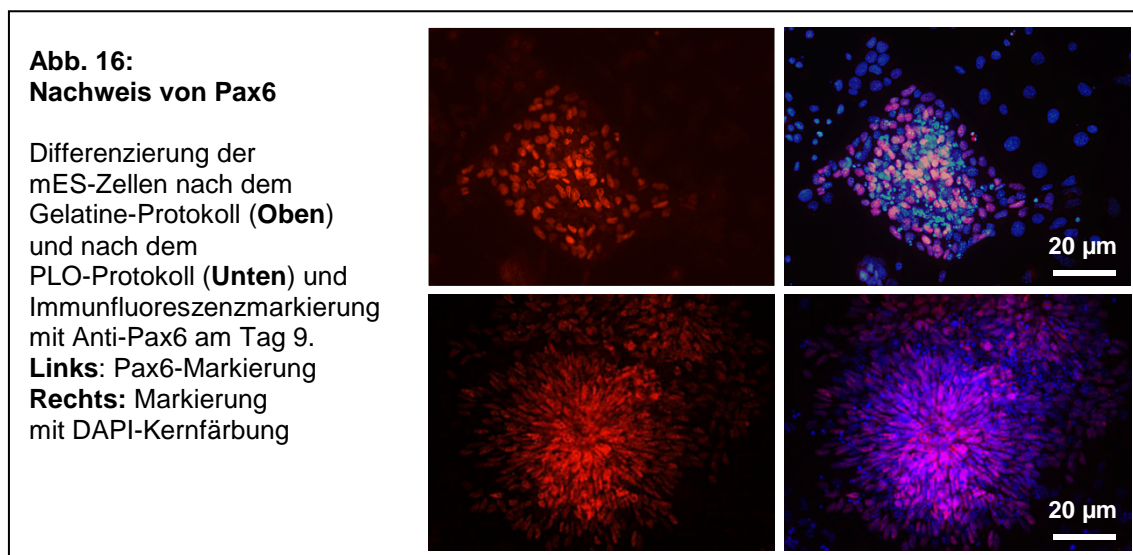
Zur Charakterisierung der Differenzierung wurden mittels Antikörper entwicklungsspezifische Proteine und Neurotransmitter immunozytochemisch fluoreszenzmarkiert und die Markierung mittels Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Zellen - unabhängig ob sie auf Gelatine-beschichteten oder auf PLO-beschichteten Platten kultiviert wurden – ein gleiches Markerprofil zeigten. Waren Unterschiede in der Morphologie der Zellen zu beobachten, werden diese in den nachfolgenden mikroskopischen Bildern herausgestellt.

Grundsätzlich lässt sich anhand der mikroskopischen Analyse die voranschreitende Differenzierung schematisch in drei Stufen aufteilen, deren Übergänge fließend und in Bezug auf die einzelnen Zellen nicht simultan verliefen:

1. Stufe: Differenzierung zu Progenitorzellen
2. Stufe: Migration und Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen
3. Stufe: Bildung von synaptischen Vesikeln und Neurotransmittern

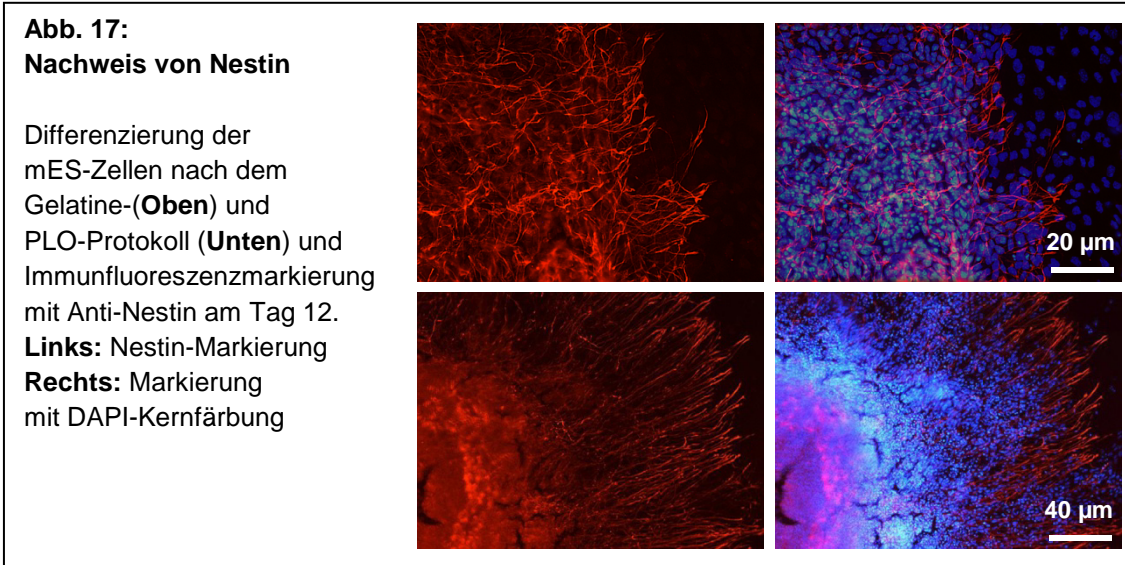
1. Stufe: Differenzierung zu Progenitorzellen

Der Transkriptionsfaktor **Pax6** (*paired box transcription factor 6*) ist u.a. ein Marker für Neuroepithelialzellen und Radialgliazellen. Als Regulator für die Genexpression in Downstream-Prozessen, die bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Adhäsion und Musterbildung beteiligt sind, spielt Pax6 während der Entwicklung des ZNS eine zentrale Rolle (Osumi et al., 2008). Im frühen Differenzierungsstadium der mES Zellen (beobachtet ab Tag 7) war Pax6 in einem Großteil der Zellen nachzuweisen (Abb. 16). Der Marker zeigte sich in den Zellen der Neurosphären, in vereinzelt Zellen und insbesondere in solchen Zellen, die in Form von Rosetten vorlagen. Letztgenannte charakteristische Markierung wurde auch in den Arbeiten von Wilson und Stice (2006) und Elkabetz et al. (2008) mit humanen ES Zellen beobachtet.



Das Intermediärfilamentprotein **Nestin** wird in vielen unterschiedlichen embryonalen und fetalen Zellen gebildet, welche charakteristische Eigenschaften von Vorläuferzellen zeigen, wie z.B. Multipotenz und eine hohe Proliferationsrate. Während der Differenzierung von ES Zellen zu Neuronen und Gliazellen, wird Nestin in den neuronalen Vorläuferzellen synthetisiert und bei der terminalen Differenzierung zu spezialisierten Zellen wieder herunter reguliert (Wiese et al., 2004). Bei den hier differenzierten mES Zellen wurde Nestin ebenfalls bereits im frühen Stadium der Differenzierung in beinahe allen Zellen nachgewiesen (beobachtet ab Tag 7). Das

Protein ließ sich im Zellkörper und in den Neuriten nachweisen (Abb. 17). Mittels Anfärbung mit Anti-Nestin war deutlich ein Unterschied zwischen den Zellen, die nach dem Gelatine-Protokoll und den Zellen, die nach dem PLO-Protokoll kultiviert wurden, zu beobachten. Auf PLO zeigten die markierten Neuriten eine weitaus stringenter radiale Anordnung (Abb. 17; Unten). Nestin-positive Zellen waren auch zu späteren Zeitpunkten in den Kulturen zu beobachten, was u.a. auch damit zu begründen ist, dass die Differenzierung der Zellen nicht synchron verlief.

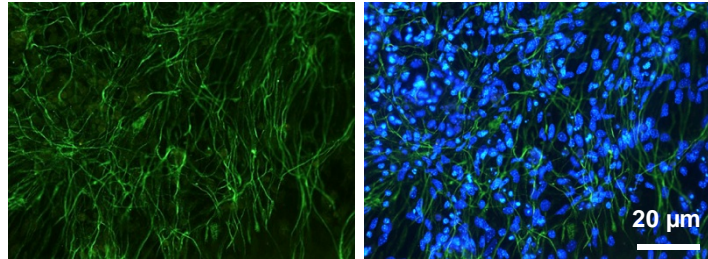


Radialgliazellen sind neurale Vorläuferzellen und besitzen die Fähigkeit, sich sowohl in Astrozyten als auch in Neuronen zu differenzieren. Des Weiteren spielen sie bei der Migration von neuronalen Vorläuferzellen eine wichtige Rolle. Sie bilden lange Fortsätze, an denen Neuroblasten entlangwandern können (Malatesta et al., 2008). In der dritten Woche der Differenzierung waren sehr viele langgestreckte RC2 (*radial glial cells 2*) - positive Zellen in den Kulturen zu beobachten (Abb. 18). Die Anfärbung zeigte ein typisch faseriges Muster. Dies lag daran, dass nur die Zellfortsätze mittels RC2 angefärbt werden.

Abb. 18: Nachweis von Radialgliazellen

Differenzierung der mES Zellen nach dem PLO-Protokoll und Immunfluoreszenzmarkierung mit Anti-RC2 am Tag 19.

Links: RC2-Markierung
Rechts: Markierung mit DAPI-Kernfärbung

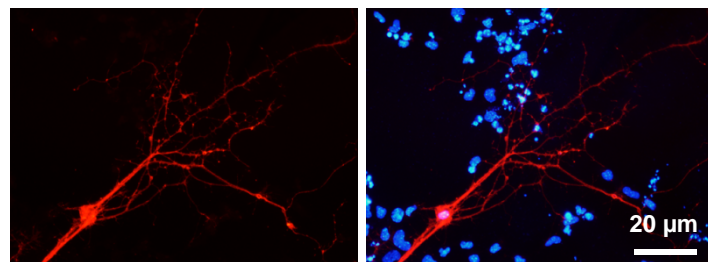


Das neurale Zelladhäsionsmolekül **NCAM** (*neural cell adhesion molecule*) ist bei der Anheftung der Zellen an andere Zellen sowie an der extrazellulären Matrix beteiligt (Hansen et al., 2008). Der Marker wurde im Zellkörper und in den Neuriten bis hin zu deren feinen Verästelungen bereits im frühen Stadium der Differenzierung (Tag 9, Abb. 19) nachgewiesen.

Abb. 19: Nachweis von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen

Differenzierung der mES-Zellen nach dem PLO-Protokoll und Immunfluoreszenzmarkierung am Tag 9.

Links: NCAM-Markierung
Rechts: Markierung mit DAPI-Kernfärbung

2. Stufe: Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen

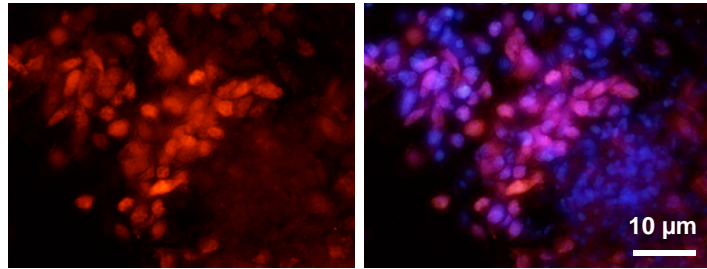
Das DNA-bindende, Neuronen-spezifische nukleäre Protein **NeuN** (*neuronal nuclei*) ist ein Marker für differenzierte, postmitotische neuronale Zellen des Gehirns (Sarnat et al., 1998). NeuN-positive Zellen waren ab dem Tag 9 der Differenzierung der mES Zellen zu beobachten. Deutlich zeigte sich die Markierung in den Zellkernen (Abb. 20).

Abb. 20: Nachweis von neuronalen Kernproteinen

Differenzierung der mES- Zellen nach dem PLO-Protokoll und Immunfluoreszenzmarkierung mit Anti-NeuN am Tag 9.

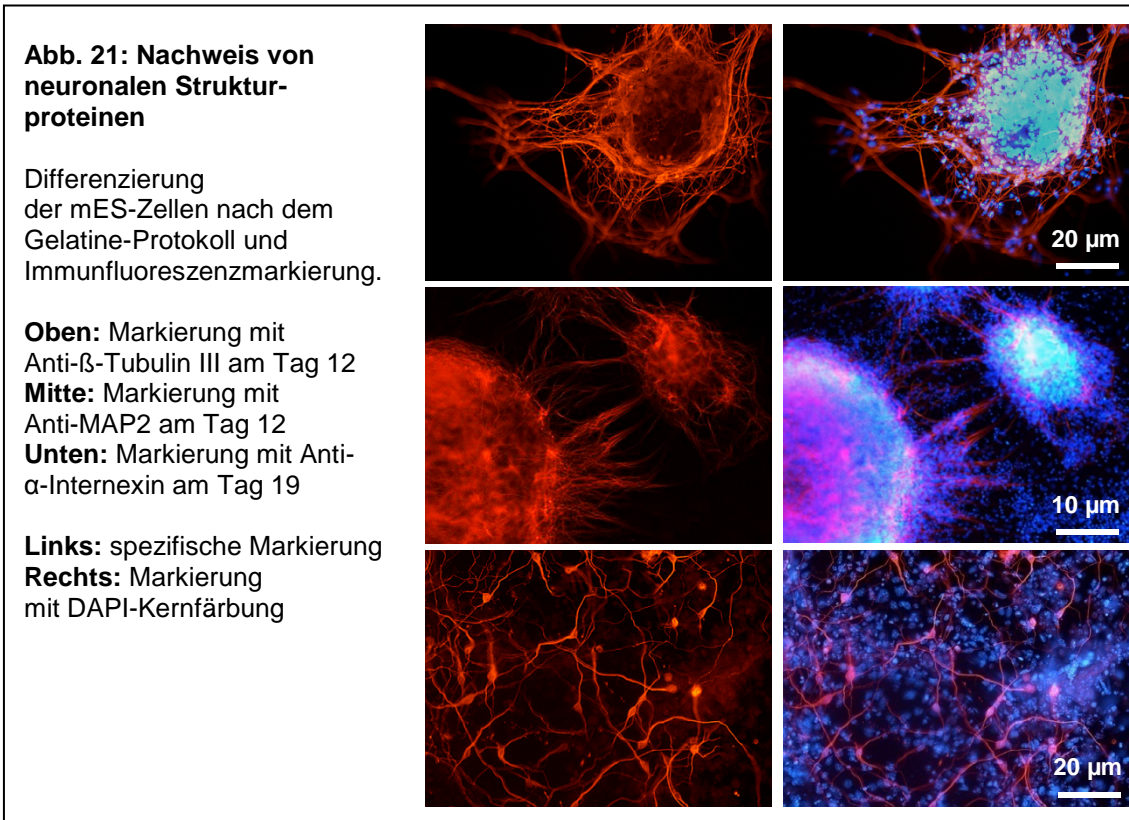
Links: NeuN-Markierung

Rechts: Markierung mit DAPI-Kernfärbung

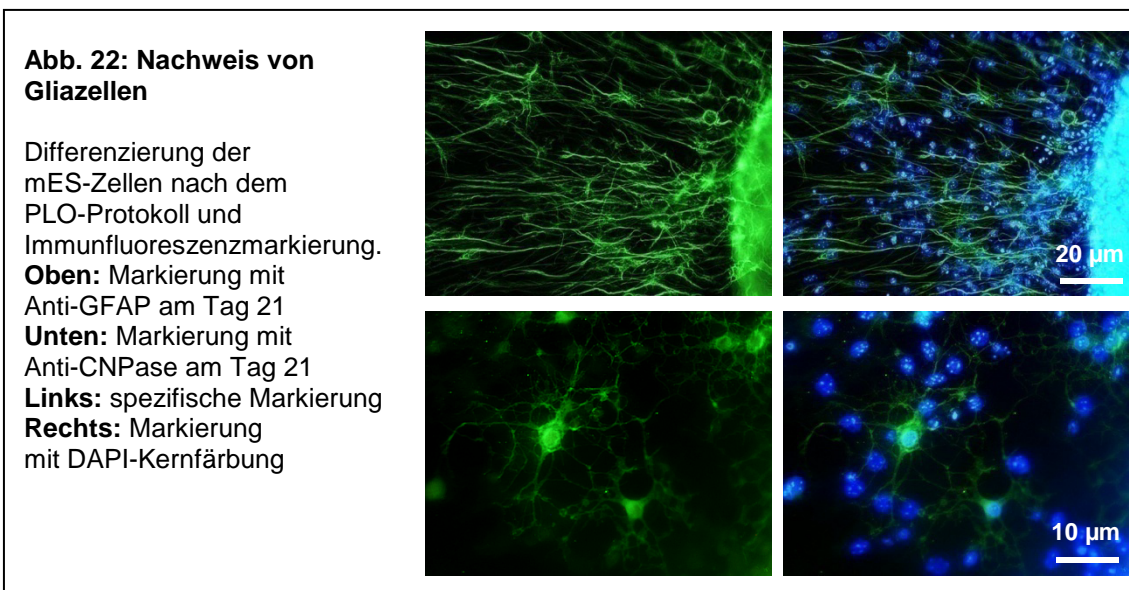


Die drei Zytoskelettproteine β -Tubulin III, MAP2 (Mikrotubulin-assoziiertes Protein 2) und α -Internexin sind in erster Linie Marker für adulte neuronale Zellen. Das Mikrotubulinprotein **β -Tubulin III** (β -Tubulin, Isoform III) wird vorzugsweise in Neuronen gebildet und ist in den Dendriten und Axonen mit MAPs (Mikrotubulin-assoziierten Proteinen) assoziiert. **MAP2** kommt in drei Isoformen (MAP2a, MAP2b und MAP2c) vor, wobei MAP2b und MAP2c in frühen Stadien der Reifung von Neuronen gebildet werden. Letztgenannte Isoform wird jedoch wieder herunter reguliert und von MAP2a im späten Reifungsstadium abgelöst. Der hier eingesetzte Antikörper-Klon war gegen die Isoformen MAP2a und MAP2b gerichtet. MAP2-Proteine werden zunächst in den Neuriten gebildet, im reifen Stadium sind sie im Zellkörper und den Dendriten, nicht aber in den Axonen exprimiert. MAP2 ist neuronenspezifisch und vor allem wichtig für die Stabilisierung des Zytoskeletts und die Neuritenaktivität (Dehmelt und Halpain, 2004). Das neuronale Intermediärfilamentprotein **α -Internexin** wird während der frühen Entwicklung in Neuroblasten, später auch in adulten Neuronen gebildet (Lariviere und Julien, 2003).

Alle drei Proteine ließen sich zu allen beobachteten Zeitpunkten (Tag 7 bis Tag 30) der Differenzierung nachweisen. Anfangs - ab Tag 7 - waren die Proteine nur in vereinzelter Zellen nachzuweisen; ab Tag 9 nahm die Markierung der Zellen stark zu. Mit den Antikörpern gegen MAP2 und β -Tubulin III wurden vor allem die neuronalen Fortsätze markiert (Abb. 21/Oben und Mitte). Anhand der Anfärbung von MAP2 ließ sich gut erkennen, dass sich die Neuriten zusammenlagerten und gebündelt aus den Neurosphären herauswuchsen (Abb. 21/Mitte). Bei α -Internexin war eine deutliche Anfärbung der Zellkörper und der Neuriten zu beobachten (Abb. 21/Unten).

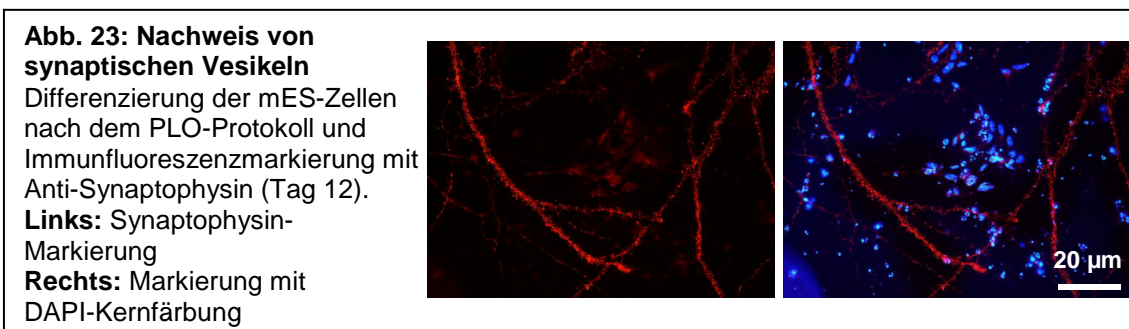


Das saure gliale Faserprotein **GFAP** (*glial fibrillary acidic protein*) gehört zur Familie der Neurofilamentproteine und wird spezifisch in faserigen Astrozyten synthetisiert (Levinson et al., 2005). GFAP-markierte Zellen ließen sich in der dritten Woche der Differenzierung vielfach nachweisen (Abb. 22/Oben). Meist kamen die GFAP-markierten Zellen in Zellgruppen vor. Auch hier war zu beobachten, dass die Astrozyten radial aus den Zellaggregaten migrierten. Mit einem Antikörper gegen das Oligodendrozyten spezifische Enzym 2',3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (**CNPase**) wurden nur wenige vereinzelte Zellen ab dem Tag 21 der Differenzierung nachgewiesen (Abb. 22/Unten). Ebenso verhielt es sich mit dem Antikörper O4 gegen das Oligodendrozyten spezifische Oberflächenantigen O4, was bekräftigte, dass sich innerhalb des Untersuchungszeitraums von 30 Tagen nur ein geringer Prozentsatz an Zellen zu Oligodendrozyten differenzierte.

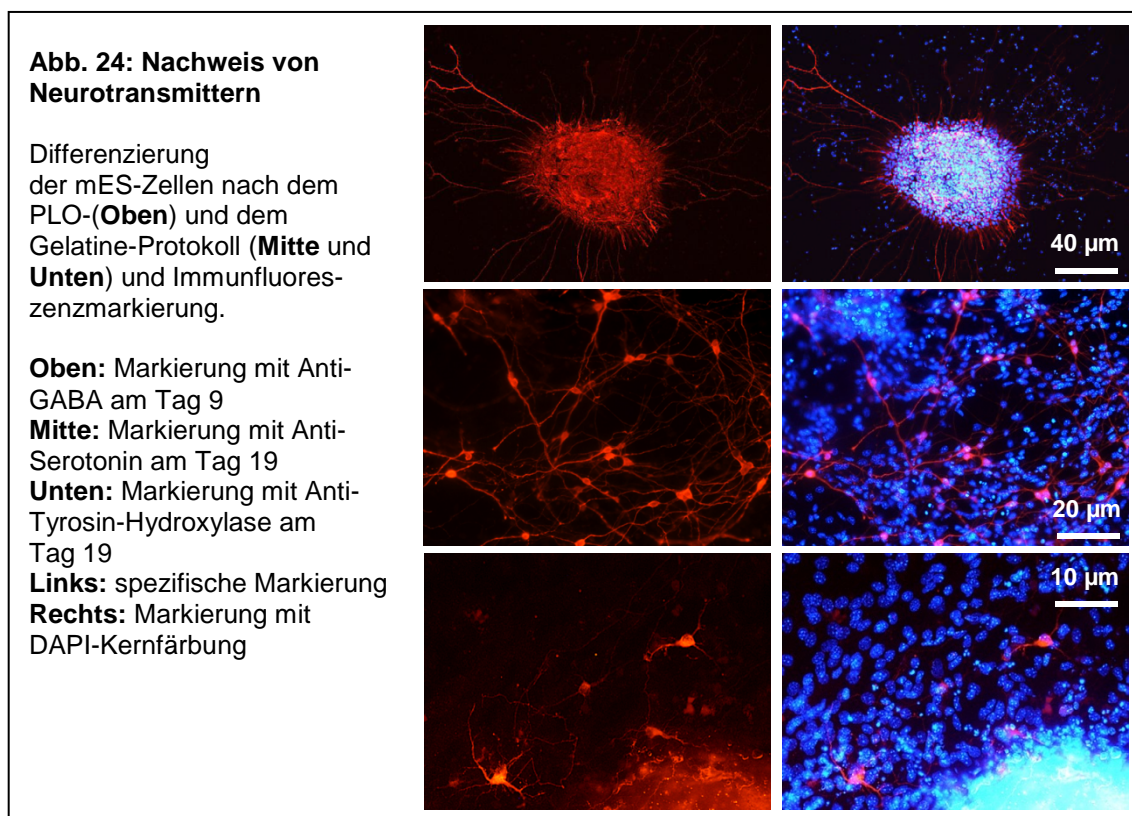


3. Stufe: Bildung von synaptischen Vesikeln und Neurotransmittern

Das Glycoprotein **Synaptophysin** ist ein integrales Membranprotein, welches in synaptischen Vesikeln neuronaler Zellen vorkommt. Die Markierung von Synaptophysin-positiven Zellen war anhand der gekörnten Struktur innerhalb der Fortsätze deutlich von den nicht markierten Zellen zu unterscheiden (Abb. 23).



GABA (γ -Aminobuttersäure) ist der vorherrschende Neurotransmitter inhibitorischer Synapsen des Gehirns. Der Neurotransmitter kommt im Zellsoma, dem Axonhügel und in den Dendriten vor. GABA-positive Neuronen ließen sich bereits am Tag 9 der Differenzierung beobachten (Abb. 24/Oben). Der Aminoneurotransmitter **Serotonin** – auch 5-Hydroxytryptamin (5-HAT) genannt - ist u.a. ein wichtiger regulatorischer Neurotransmitter bei der Entwicklung des Gehirns (Nguyen et al., 2001). Während der Differenzierung von mES Zellen ließen sich Serotonin-markierte Zellen ebenfalls früh detektieren (beobachtet ab Tag 9). Wie in Abb. 24/Mitte zu sehen, war der Neurotransmitter im Zellsoma und den Fortsätzen nachzuweisen. Das Enzym **Tyrosin-Hydroxylase** ist an der Biosynthese von Catecholamintransmittern beteiligt und somit ein Marker für dopaminerge und adrenerge neuronale Zellen. Tyrosin Hydroxylase-positive Zellen waren vereinzelt zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung zu beobachten (ab Tag 19, Abb. 24/Unten). Auch hier war zu erkennen, dass sie sich aus den Zellen der Neurosphären heraus entwickelten. Nach Inkubation der Zellen mit dem Antikörper gegen Cholin-Acetyltransferase (ChAT) konnten keine cholinergen Neuronen in den Kulturen detektiert werden.



3.2.3 Funktioneller Nachweis mittels Erfassung von Calcium-Signalen

Während der Synaptogenese bildet sich ein neuronales Verschaltungsmuster, in dem die Axone über die Synapsen mit den ausgewählten Zielzellen in Kontakt treten. Als Botenstoffe dienen die Neurotransmitter, welche in Vesikeln gebildet werden und aufgrund von Ca^{2+} -Signalen durch Exozytose in den synaptischen Spalt entlassen werden. Zugleich werden in den Zellen in diesem Reifestatus spezifische Rezeptoren für den Signalempfang und die Signalweiterleitung ausgebildet. Um zu ermitteln, ob die differenzierten neuronalen Zellen in den mES Zellkulturen eine funktionelle Reifung erlangt hatten, wurden zur weiteren Charakterisierung Ca^{2+} -Imaging Untersuchungen durchgeführt. Ziel war es, die Ausbildung und Funktionalität einiger wichtiger Rezeptoren, die während der Reifung der neuronalen Zellen und der Synaptogenese gebildet werden, nachzuweisen.

Für diese Untersuchungen wurden die mES Zellen auf spezielle Kulturplatten mit Glasbodeneinsatz nach dem Gelatine-Protokoll (Kap. 2.1.3) und nach dem PLO-Protokoll (Kap. 2.1.4) zu Neuronen und Gliazellen differenziert. Am Tag 20 der Differenzierung wurden die Zellen mit dem Ca^{2+} -Sensor Fluo-4 AM beladen und die Ca^{2+} -Signale mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskop Systems aufgezeichnet. Zuerst erfolgte immer die Aufzeichnung der Kontrolle ohne die Zugabe eines Agonisten. In den Kontrollen war zu erkennen, dass einige wenige Zellen ein permanentes Ca^{2+} -Signal aufwiesen. Bei diesen handelte es sich vermutlich um degenerierte Zellen, die zur Aufrechterhaltung einer intakten Ca^{2+} -Homöostase nicht mehr fähig waren. Zu beobachten war ebenso, dass in unregelmäßigen Abständen in unterschiedlichen, vereinzelt Zellen spontan Ca^{2+} -Signale auftraten. Womöglich wurden diese durch zellinterne Regulationsmechanismen, in denen beispielsweise Ca^{2+} -Signale als Second Messenger aktiviert werden, hervorgerufen. Jedoch könnte es sich bei diesen Signalen auch um spontane Aktivitäten zwischen den Neuronen handeln. Im Anschluss der Kontrollmessung wurde mit jeweils einem Agonisten stimuliert. Zur Dokumentation der Ergebnisse werden im Folgenden jeweils die Kontrolle (I), das Ca^{2+} -Signal (II) und die grafische Darstellung der ROI-Analyse gezeigt (III).

Glutamat ist der wichtigste exzitatorisch wirkende Neurotransmitter im Gehirn. Er bindet sowohl an ionotrope Rezeptoren, wodurch direkt Ionenkanäle geöffnet werden, als auch an metabotrope Rezeptoren, wodurch die Signale über Second Messenger weiterleitet werden. In den meisten Fällen kommt es mit der Signalweiterleitung über

die unterschiedlichen Rezeptoren zu einem Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma. Der Ca^{2+} -Einstrom erfolgt hauptsächlich aus dem Interzellularraum über die Zellmembran und/oder aus intrazellulären Ca^{2+} -Reservoiren, wie z.B. aus dem ER und den Mitochondrien. In den Beispielen in Abb. 25 (A und B) wird die Stimulierung von L-Glutamat auf Zellen, die auf Gelatine und solche, die auf PLO kultiviert wurden, dargestellt. Die Bilder zeigen unter I (A und B) nicht stimulierte Zellen (Kontrolle) und im Vergleich dazu im gleichen Bildausschnitt unter II Zellen nach der Stimulierung mit L-Glutamat. Für die graphische Darstellung der Signale unter III wurde bei jeweils drei Zellen (siehe Umkreisung der Zellen) die Signalstärke (in RFU) gemessen und gegen die Zeit aufgetragen.

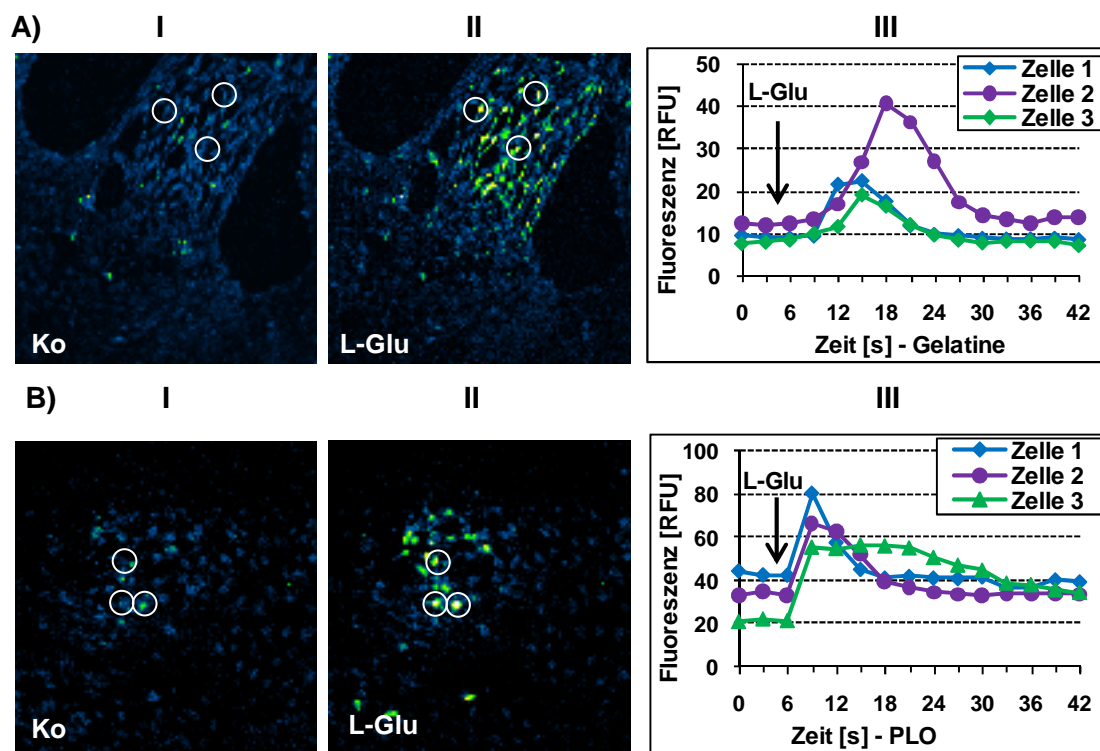
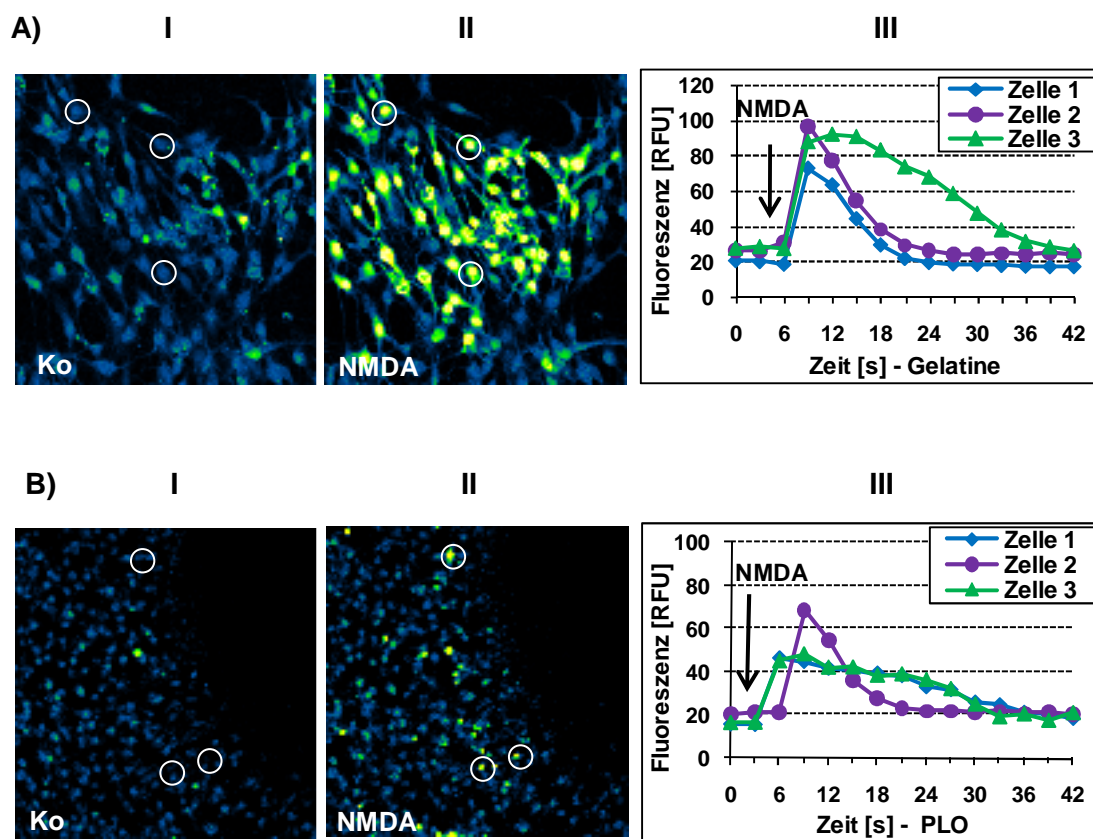


Abb. 25 (A, B): Ca^{2+} -Antwort nach Stimulierung mit L-Glutamat

Die mES Zellen wurden unter differenzierenden Bedingungen auf Gelatine (A, I-III) und PLO (B, I-III) kultiviert. Die Beladung der Zellen erfolgte am Tag 20 mit Fluo-4 AM. Dargestellt sind die Aufzeichnungen von der Kontrolle (Ko, I), das Signal nach der Stimulierung mit L-Glutamat (L-Glu, II) und das Ergebnis der ROI-Analysen (III) für die jeweils drei ausgewählten Zellen (siehe Umkreisung). RFU = *relative fluorescence units*

NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) aktiviert NMDA-Rezeptoren, eine Untergruppe der ionotropen Glutamat-Rezeptoren, welche sowohl für Ca^{2+} als auch für Na^+ und K^+ permeabel sind. Durch Zugabe von NMDA wurden in allen Untersuchungen Ca^{2+} -Signale in Zellen erzeugt, wie in den Beispielen in Abb. 26 (A; B) zu sehen ist. Wurden die Rezeptoren zuvor spezifisch mit **AP5** (D(-)-2-Amino-5 Phosphonopentansäure) gehemmt, waren nach erneuter Stimulierung mit NMDA keine Ca^{2+} -Signale mehr zu beobachten (siehe Beispiel in Abb. 26/C). Die Bilder zeigen unter **I** (A und B) nicht stimulierte Zellen (Kontrolle) und im Vergleich dazu im gleichen Bildausschnitt unter **II** (A - C) Zellen nach der Stimulierung mit NMDA. Für die graphische Darstellung der Signale unter **III** wurde bei jeweils drei Zellen (siehe Umkreisung der Zellen) die Signalstärke (in RFU) gemessen und gegen die Zeit aufgetragen.



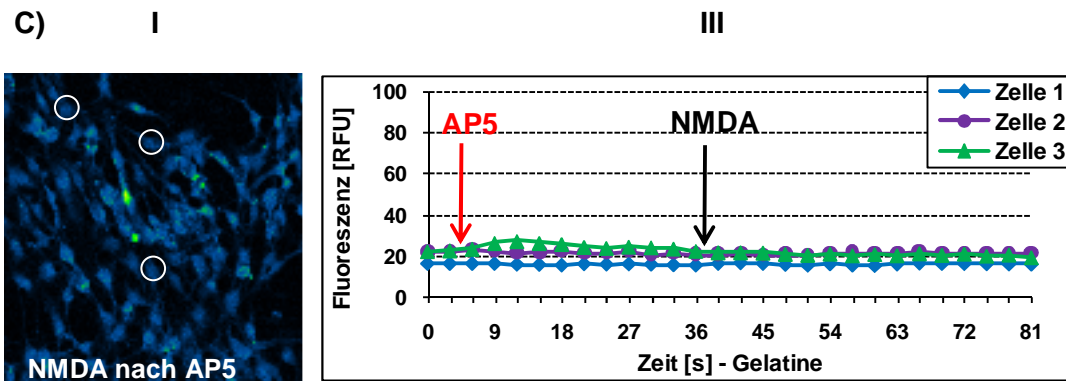


Abb. 26 (A-C): Ca^{2+} -Antwort nach Stimulierung mit NMDA

Die mES Zellen wurden unter differenzierenden Bedingungen auf Gelatine (A) und PLO (B) kultiviert. Die Beladung der Zellen erfolgte am Tag 20 mit Fluo-4 AM. Dargestellt sind die Aufzeichnungen von der Kontrolle (Ko) (I), das Signal nach der Stimulierung mit NMDA (II) und das Ergebnis der ROI-Analysen (III) für die jeweils drei ausgewählten Zellen (siehe Umkreisung). Im Gelatine-Ansatz wurden die NMDA-Rezeptoren in einer weiteren Untersuchung vor der erneuten Zugabe von NMDA mit AP5 blockiert (C). RFU = *relative fluorescence units*

AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure) aktiviert non-NMDA-Rezeptoren, ebenfalls eine Untergruppe der ionotropen Glutamat-Rezeptoren. Es sind vier verschiedene Subtypen (GluR1 - GluR4) von AMPA-Rezeptoren bekannt. Ca^{2+} -Signale werden nur von solchen AMPA-Rezeptoren erzeugt, deren Untereinheiten kein GluR2 enthalten (Cull-Candy et al., 2006). Wie im Beispiel dargestellt, zeigten viele Zellen Ca^{2+} -Signale nach Stimulierung mit AMPA (Abb. 27/A und B).

Wurden die Rezeptoren zuvor mit **NBQX** (1,2,3,4-Tetrahydro-6-Nitro-2,3-Dioxobenzo-[f]quinoxalin-7-Sulfonamid Dinatriumsalz) spezifisch blockiert, waren nach der erneuten Zugabe von AMPA in den zuvor aktivierten Zellen keine spezifischen Ca^{2+} -Signale mehr detektierbar (Abb. 27/C). Die Bilder zeigen unter I (A und B) nicht stimulierte Zellen (Kontrolle) und im Vergleich dazu im gleichen Bildausschnitt unter II (A-C) Zellen nach der Stimulierung mit AMPA. Für die graphische Darstellung der Signale unter III wurde bei jeweils drei Zellen (siehe Umkreisung der Zellen) die Signalstärke (in RFU) gemessen und gegen die Zeit aufgetragen.

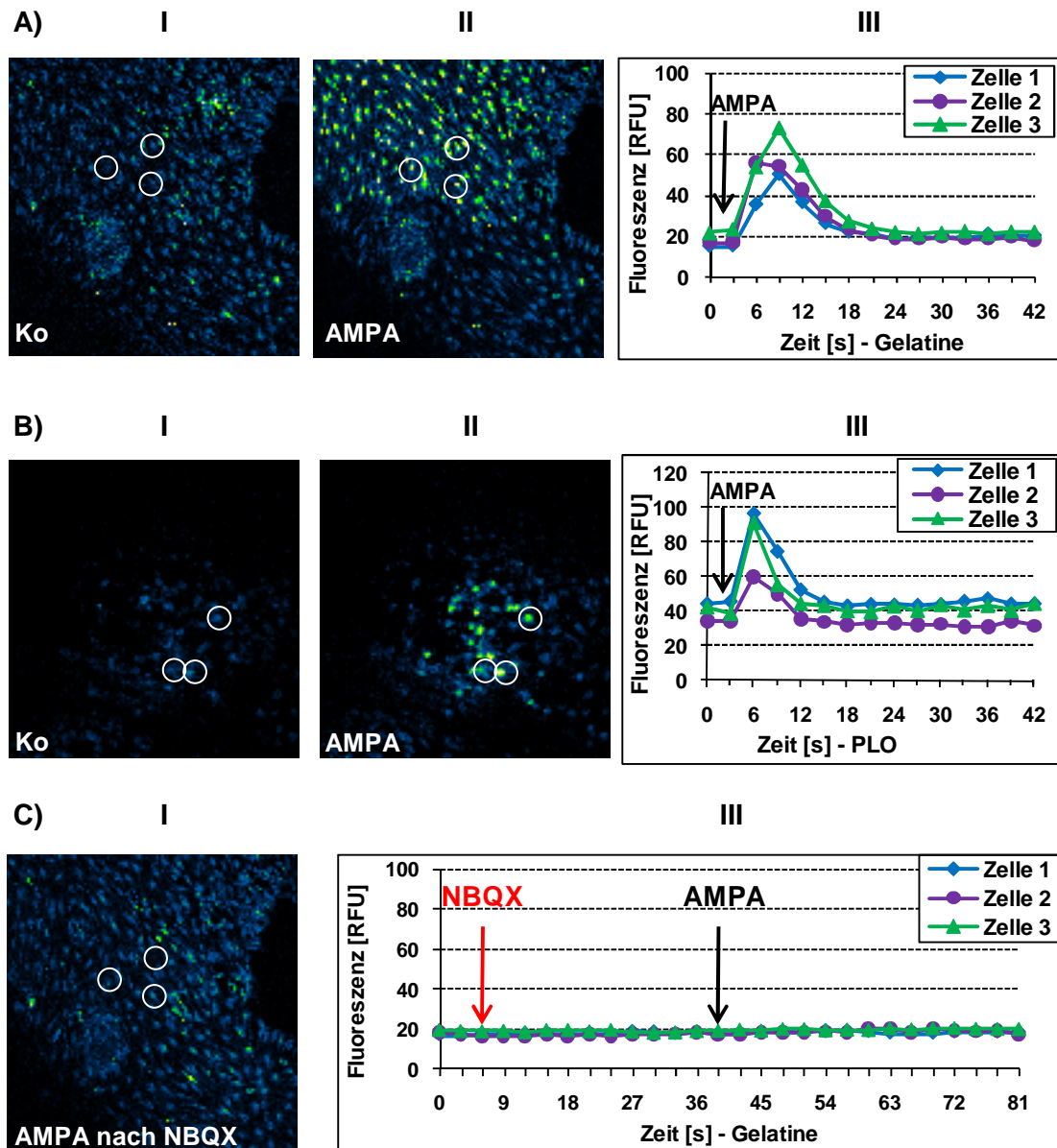


Abb. 27 (A-C): Ca^{2+} -Antwort nach Stimulierung mit AMPA

Die mES Zellen wurden unter differenzierenden Bedingungen auf Gelatine (A) und PLO (B) kultiviert. Die Beladung der Zellen erfolgte am Tag 20 mit Fluo-4 AM. Dargestellt sind die Aufzeichnungen von der Kontrolle (Ko) (I), das Signal nach der Stimulierung mit AMPA (II) und das Ergebnis der ROI-Analysen (III) für die jeweils drei ausgewählten Zellen (siehe Umkreisung). Im Gelatine Ansatz wurden die AMPA-Rezeptoren in einer weiteren Untersuchung vor der erneuten Zugabe von AMPA mit NBQX blockiert (C). RFU = *relative fluorescence units*

Dopamin bindet an metabotrope Dopamin-Rezeptoren, welche zu der α -Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Es sind 5 unterschiedliche Rezeptor-Typen bekannt (D1 – D5), die sich strukturell und/oder funktionell voneinander unterscheiden. Sie werden in zwei Subtypen D1 (D1 und D5) und D2 (D2, D3 und D4)

unterteilt, aktivieren unterschiedliche Signalwege und können je nach Rezeptortyp stimulatorisch (D1-Subtyp) oder inhibitorisch (D2-Subtyp) wirken (Zeng et al., 2008). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kontrollieren die Aktivität vieler Ca^{2+} -Kanäle aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und können ebenso über weitere Signalwege eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren bewirken. Wie im Beispiel in Abb. 28 (A und B) zu sehen, waren nach Zugabe von Dopamin in beiden unterschiedlichen Ansätzen (d.h. auf Gelatine- und PLO-beschichteten Kulturschalen) Ca^{2+} -Signale in den Zellen zu beobachten. Im Vergleich zu den Untersuchungen mit AMPA und NMDA war die Stärke der Ca^{2+} -Signale nach der Dopamin-Stimulation weniger stark ausgeprägt.

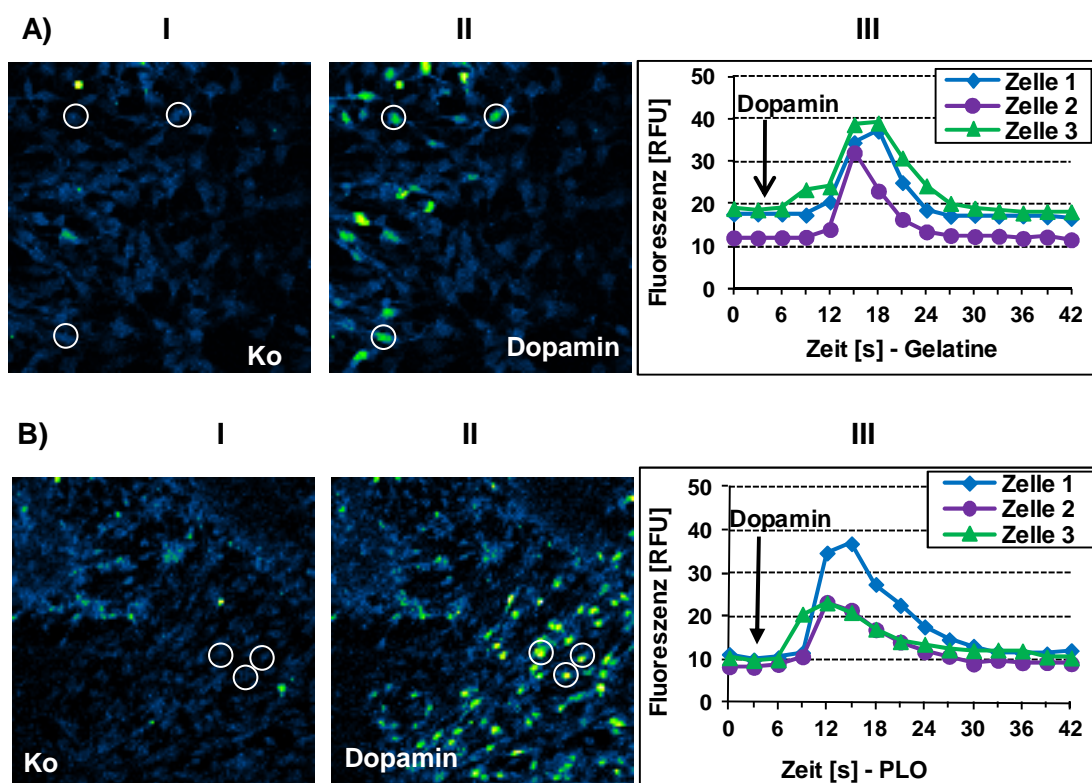


Abb. 28 (A, B): Ca^{2+} -Antwort nach Stimulierung mit Dopamin

Die mES Zellen wurden unter differenzierenden Bedingungen auf Gelatine (A) und PLO (B) kultiviert. Die Beladung der Zellen erfolgte am Tag 20 mit Fluo-4 AM. Dargestellt sind die Aufzeichnungen von der Kontrolle (Ko) (I), das Signal nach der Stimulierung mit Dopamin (Dopamin, II) und das Ergebnis der ROI-Analysen (III) für die jeweils drei ausgewählten Zellen (siehe Umkreisung). RFU = *relative fluorescence units*

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auf alle hier getesteten Agonisten L-Glutamat, AMPA, NMDA und Dopamin eine Antwort in Form von Ca^{2+} -Signalen in den differenzierten Zellen beobachtet wurde. Meist antworteten die jeweiligen Zellen synchron in Clustern und oftmals waren auch leicht zeitversetzte Antworten in benachbarten Zellen zu beobachten. Die Antwort – eine häufig starke Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Signals - erfolgte in der Regel gleich nach der Zugabe der Agonisten. Deutlich war im Zellsoma und oftmals auch in den neuronalen Fortsätzen die Fluoreszenz zu erkennen. In den meisten Untersuchungen dauerten die Ca^{2+} -Signale ca. 9 bis 15 sec an und die Zellen kehrten anschließend zu ihrem Ausgangslevel zurück. Einige Zellen zeigten auch länger andauernde Ca^{2+} -Signale (z.B. nach Stimulation mit NMDA vgl. Abb. 26/A, B). In einem Fall nach Stimulation mit L-Glutamat zeigten die Zellen nach dem Absinken des Ca^{2+} -Signals einen leicht erhöhten Ca^{2+} -Level im Vergleich zur Ausgangssituation (Abb. 25/B). Es ergaben sich auch leichte Schwankungen in Bezug auf den Beginn der Reaktion. Diese könnten auf rezeptorspezifische Einflüsse hindeuten. Da jedoch bei den Messungen die Zugabe der Agonisten manuell erfolgt war und nicht mit einem Durchflusssystem gearbeitet wurde, lassen sich hieraus keine weiteren Rückschlüsse ableiten.

Am Ende der Untersuchungen wurden die Zellen mit KCl stimuliert. Dies führte dazu, dass in allen Zellen Ca^{2+} -Signale detektiert wurden. Die K^+ -induzierte Depolarisation dient als Hinweis, dass sich die meisten differenzierten Zellen in einem vitalen Zustand befanden.

3.2.4 Quantitative Bestimmung der molekularen Marker

3.2.4.1 Gelatine-Protokoll

3.2.4.1.1 Messung der molekularen Marker über die Zeit

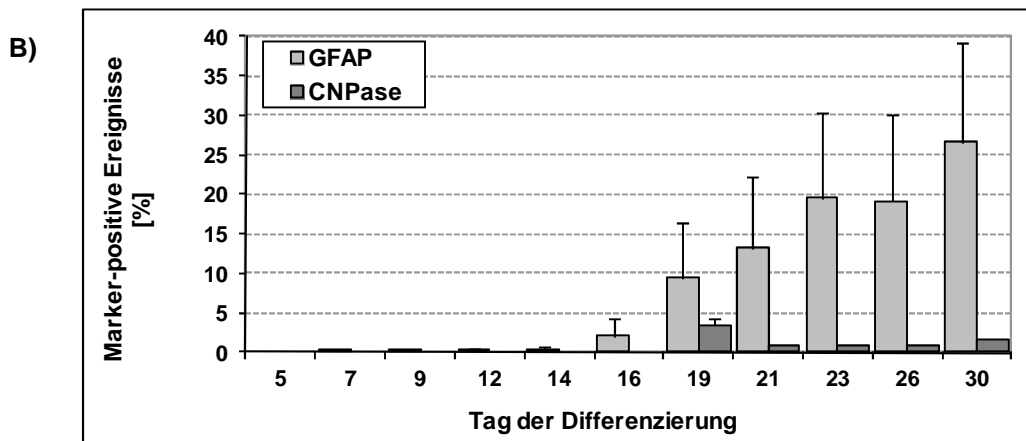
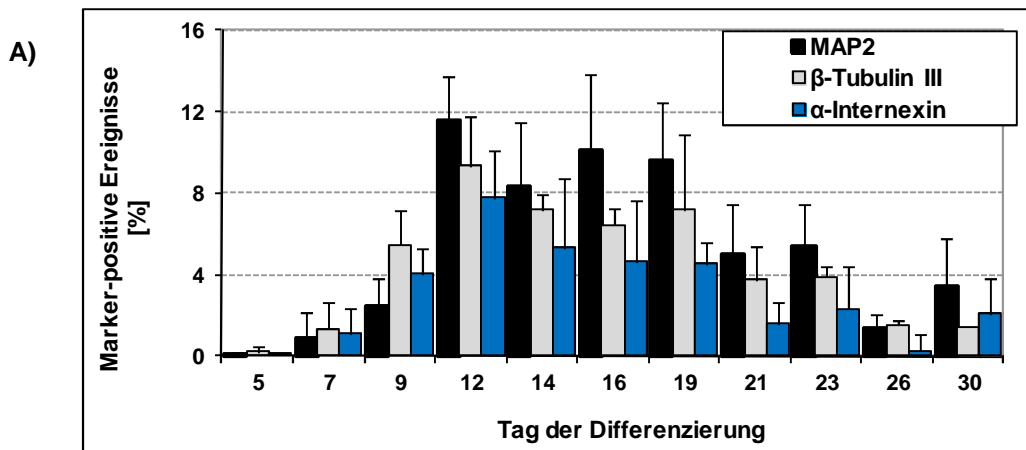
Analog zur Herzmuskelzellendifferenzierung sind auch für die Neuronen und Gliazellen die optimalen Marker und Zeitpunkte für die Entwicklung eines Testprotokolls zur Messung von Substanzeffekten ermittelt worden. Dazu wurde die Differenzierung über die Zeit quantitativ mittels Durchflusszytometrie untersucht.

In Abb. 29 (A) ist der zeitliche Verlauf der Differenzierung in Neuronen anhand der Messung von MAP2, α -Internexin und β -Tubulin III dargestellt. Ein erstes Maximum an Antigen-positiven Ereignissen wurde bei allen drei Markern am Tag 12 gemessen. MAP2 zeigte hier mit ca. 12% Antigen-positiven Ereignissen (von 10.000 gemessenen Ereignissen; zur Definition siehe Kap. 2.2.2) den höchsten Anteil, gefolgt von β -Tubulin III mit 10% Antigen-positiven Ereignissen. Der relative Gehalt an α -Internexin-positiven Ereignissen war, bis auf den Tag 9, geringer im Vergleich zu den anderen Proteinen. Zudem ließ sich das α -Internexin-Signal im Vergleich zu den beiden erstgenannten bei der Auswertung im Dot-Plot-Fenster weniger gut vom Hintergrundsignal abtrennen. Des Weiteren wurden anhand der Marker Schwankungen in der Differenzierung über die Zeit sichtbar. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass eine erste Neuronenpopulation heranwächst, Zellen wieder abgebaut werden, sich zeitlich versetzt die nächste Neuronenpopulation entwickelt und weitere Zellen abgebaut werden usw. Auch gab es z.T. große Abweichungen zwischen den unabhängigen Experimenten. Da ein Substanzeffekt immer in Bezug auf die Kontrolle ausgewertet wird, konnten die Schwankungen akzeptiert werden. Des Weiteren nahm der Anteil aller drei neuronalen Markerproteine über die Zeit ab, trotz nahezu gleichbleibenden Zellzahlen zwischen den Differenzierungstagen 19 und 30. Dies kann dadurch erklärt werden, dass zunehmend die differenzierten Neuronen wieder abstarben und gleichzeitig andere Zellen - wie z.B. Gliazellen - ausdifferenzierten.

Abb. 29 (B) zeigt den Anteil an Gliazellen, gemessen anhand des Markers GFAP der Astrozyten und eines spezifischen Enzyms der Oligodendrozyten (CNPase). Der Anteil an Astrozyten nahm um den Tag 16 deutlich zu. Am Tag 30 waren 27% der gemessenen Zellen in der Kultur GFAP-positive Astrozyten. Die Differenzierung zu Oligodendrozyten war gleichbleibend gering. Der Marker CNPase kam nicht über 3%

Antigen-positive Ereignisse und der Anteil war somit zu gering für eine valide Messung von Substanzeffekten mittels der Durchflusszytometrie.

Das Wachstum der Zellen in der Kultur nahm zwischen Tag 5 und Tag 16 stetig zu (Abb. 29/C). Zwischen Tag 19 und Tag 30 erreichte das Wachstum die stationäre Phase bei ca. fünf Millionen Zellen.



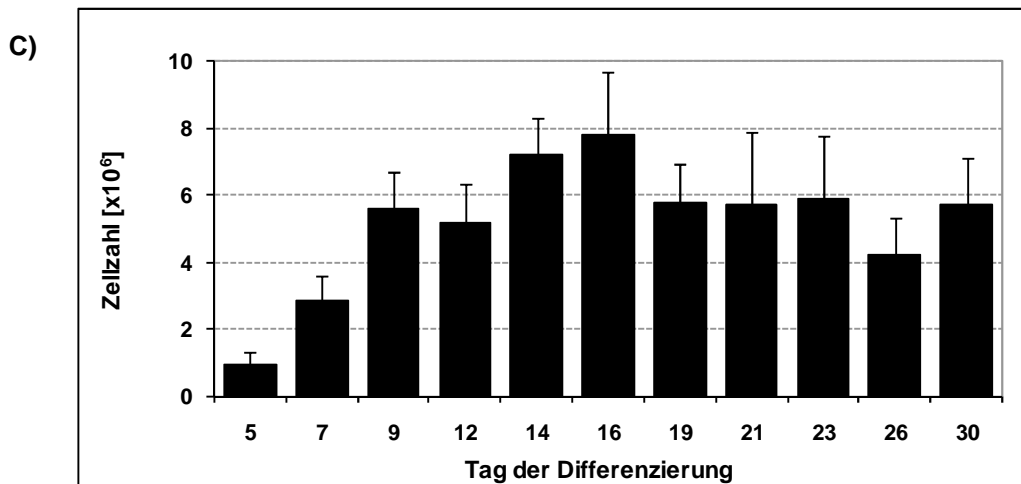


Abb. 29 (A-C): Zeitlicher Verlauf der Differenzierung von mES Zellen zu Neuronen und Gliazellen auf Gelatine-beschichteten Platten, gemessen anhand von Markerproteinen und der Zellzahl

Die mES-Zellen wurden über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen zu Neuronen und Gliazellen nach dem Gelatine-Protokoll differenziert. Die Auswertung der Markerproteine erfolgte an den angegebenen Tagen mittels Durchflusszytometrie, wobei pro Messpunkt jeweils 10.000 Ereignisse analysiert wurden. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mittels CASY-Zellzähler. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf drei unabhängigen Experimenten mit allen Markern bis auf CNPase, welcher nur zweimal gemessen wurde.

Aus dem Resultat der Zeitanalysen war zu erkennen, dass die neuronalen Marker MAP2 und β -Tubulin III am besten geeignet sind, um für die Messung von Substanzeffekten mittels Durchflusszytometer eingesetzt zu werden. Beide Marker zeigten einen ausreichend hohen Anteil an Antigen-positiven Ereignissen im Durchflusszytometer. Ein möglichst früher Zeitpunkt zur Bestimmung der Endpunkte ist der Tag 12. Um mögliche Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen, die einen Substanzeffekt beeinflussen könnten, herauszufiltern, sollte auch zum Zeitpunkt der Kokultur ein Substanzeffekt gemessen werden. Gemäß den Ergebnissen der Zeitanalysen ist eine gleichzeitige Messung von Neuronen und Gliazellen zwischen Tag 19 und Tag 23 möglich. An diesen Tagen lagen beide Marker MAP2 und GFAP bei einem Anteil über 5% Antigen-positiven von 10.000 analysierten Ereignissen und würden sich demnach an diesen Tagen gut im Durchflusszytometer bestimmen lassen. Auch GFAP eignet sich für die Messung von Substanzeffekten, da der Marker in ausreichender Stärke gebildet wurde und das Signal gut vom Hintergrund zu trennen war.

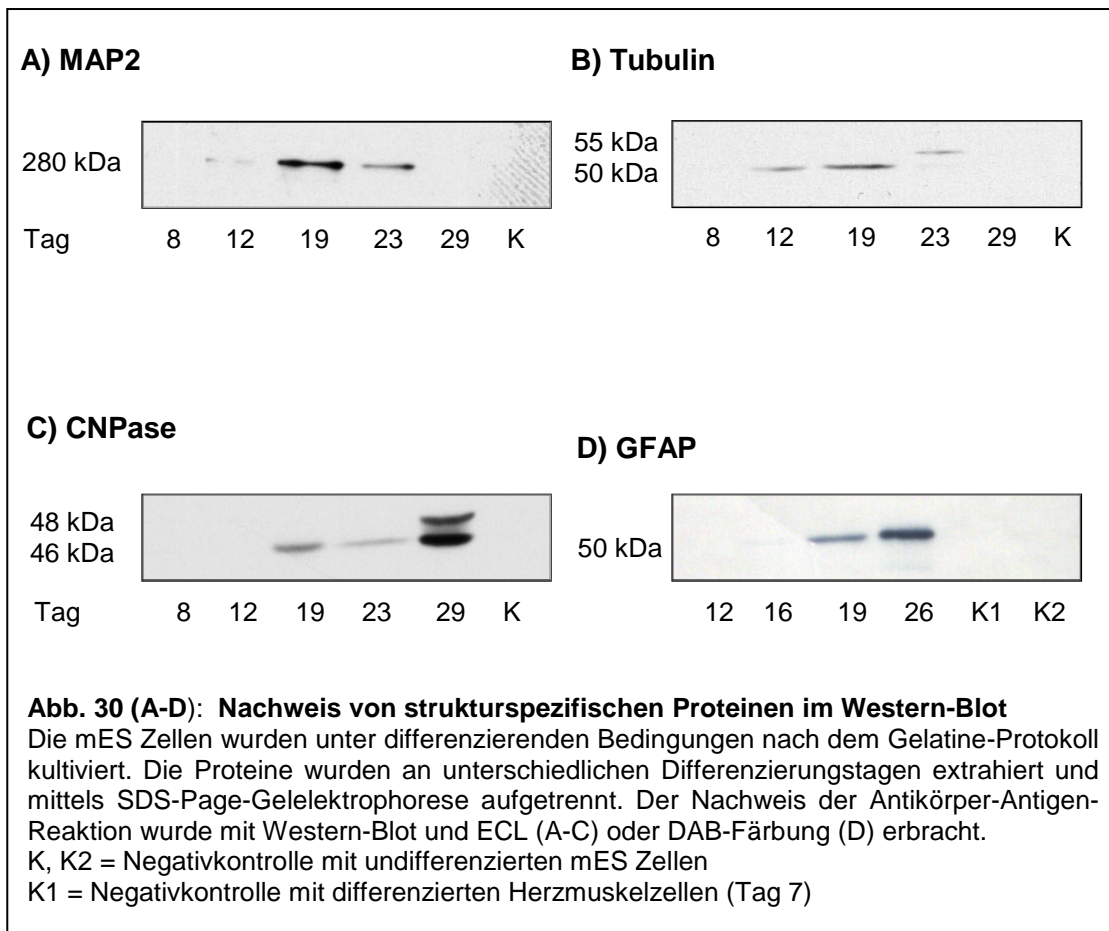
Für die wichtigsten Marker für die Neuronen und Gliazellen wurde ein zusätzlicher qualitativer Nachweis im Western-Blot-Verfahren erbracht. Dazu wurden die mES Zellen nach dem Gelatine-Protokoll differenziert und die Proteine an unterschiedlichen Differenzierungstagen extrahiert. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurden diese auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und spezifisch mit den Antikörpern gegen MAP2, β -Tubulin III, CNPase und GFAP angefärbt.

Der Antikörper Anti-MAP2 vom Klon AP-20 erkennt die Isoformen MAP2 a und b, welche in Neuronen reiferen Stadiums gebildet werden. An den Differenzierungstagen 12, 19 und 23 waren die sichtbaren Banden bei einer Molekülmasse von ca. 280 kDa, welche den o.g. Isoformen entspricht, zu erkennen (Abb. 30/A/MAP2). Am stärksten war das MAP2-Signal am Tag 19 der Differenzierung zu erkennen. Am Tag 8 und am Tag 29 waren keine MAP2-Banden sichtbar.

Der Antikörper gegen β -Tubulin III zeigte eine spezifische Immunreaktion an den Tagen 12, 19 und 23 (Abb. 30/B/Tubulin). An den beiden erstgenannten Tagen 12 und 19 erschienen die Banden bei 50 kDa, wie sie auch für das neuronenspezifische Protein beschrieben werden. Am Tag 23 war bei 50 kDa nur noch eine schwache Bande zu sehen und es zeigte sich eine weitere Bande bei ca. 55 kDa. Dies könnte darauf hinweisen, dass das Protein in einem späteren Reifestadium der Zellen posttranslational modifiziert wird.

Nach Anfärbung mit dem Antikörper gegen das Oligodendrozyten-spezifische Enzym CNPase waren am Tag 8 und 12 keine Banden zu sehen. Diese zeichneten sich deutlich am Tag 19, 23 und 29 bei einer Molekülmasse von ca. 46 kDa ab (Abb. 30/C/CNPase), welcher der Isoform CNP1 entspricht. Am Tag 29 zeigte sich zusätzlich eine zweite Bande bei ca. 48 kDa, bei der es sich sehr wahrscheinlich um die Isoform CNP2 handelt. Das im Vergleich zur durchflusszytometrischen Analyse deutlich sichtbare CNPase-Signal im Western-Blot könnte diese Analyse zur Methode der Wahl machen, wenn es darum geht, Substanzeffekte speziell auf die Differenzierung von Oligodendrozyten zu erfassen.

Die Anfärbung mit Anti-GFAP zeigte am Tag 12 kein Signal. Eine leichte Bande konnte ab dem 16. Tag beobachtet werden. Die Intensität des Signals nahm bis zum 26. Tag sichtlich zu (Abb. 30/D/GFAP). Die Banden waren bei einer Molekülmasse von ca. 50 kDa zu sehen, welche mit der Molekülmasse des GFAP-Proteins übereinstimmt.



3.2.4.1.2 Untersuchungen zur Protokolloptimierung

Für das Gelatine-Protokoll war es notwendig, die optimale Zellzahl bei der Aussaat der Zellen am Tag 1 zu ermitteln. Eine zu hohe Zellaussaat würde bewirken, dass die Kulturen mit Blick auf den zwölf-tägigen Kultivierungszeitraum ohne Replattieren sehr schnell sehr dicht wachsen würden. Dies würde sehr wahrscheinlich zu einem verfrühten Arrest der Proliferation führen. Zudem kann es in dicht gewachsenen Kulturen zu einer erhöhten Ausschüttung an autokrinen Wachstumsfaktoren kommen, die wiederum bewirken, dass Vorläuferzellen im undifferenzierten Zustand gehalten werden (Ying und Smith, 2003). Eine zu geringe Zellaussaat hingegen könnte die Anheftung und Vitalität der Zellen beeinträchtigen. Es erwies sich demnach als günstig, die Differenzierung am Tag 1 mit einer Zellzahl von 7×10^4 pro 6 cm Plattendurchmesser zu starten. Der MAP2-Gehalt – im Beispiel gemessen am Tag 12

– war dann höher als mit 3×10^5 oder 1×10^5 Zellen pro 6 cm Plattenformat (Abb. 31/A).

Im Verlauf der Arbeit wurde ein Wechsel von ATCC-Zellen auf Kemler-Zellen des gleichen Zellstammes und Klons notwendig, da nach einiger Zeit zu beobachten war, dass die Differenzierung der ATCC-Zellen zu Neuronen und Gliazellen zu stark schwankte und über die Zeit schwächer wurde. Die Kemler-Zellen erwiesen sich in der Differenzierung als stabiler und zeigten die gleiche Tendenz zur neuronalen Differenzierung - hier gemessen am MAP2-Gehalt am Tag 12 - nach unterschiedlicher Zellaussaat am Tag 1 (Abb. 31/B).

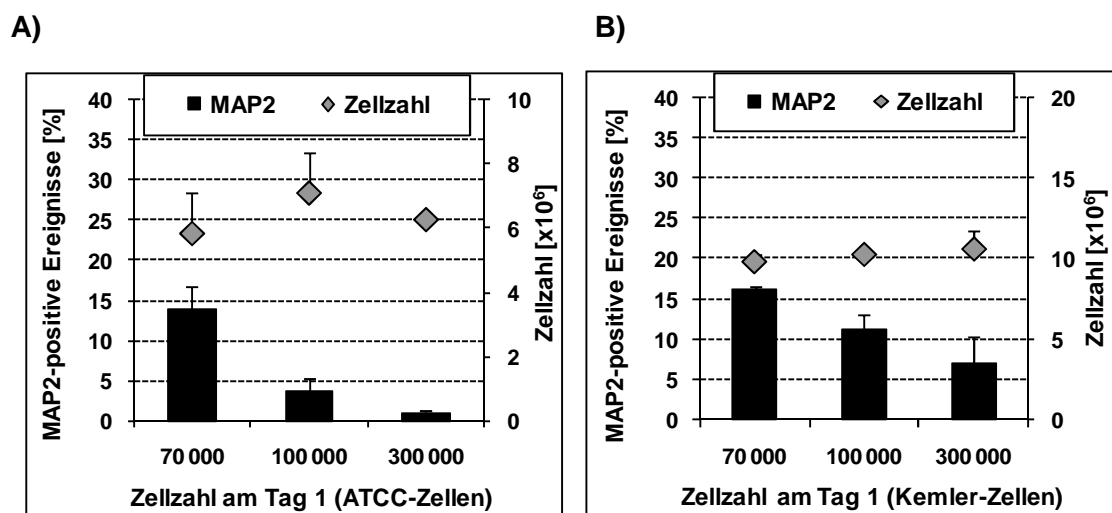


Abb. 31 (A, B): Einfluss der Zellaussaat am Tag 1 auf die Differenzierung zu Neuronen auf Gelatine-beschichteten Platten - Vergleich ATCC-Zellen (A) mit Kemler-Zellen (B)

Die mES-Zellen wurden unter differenzierenden Bedingungen nach dem Gelatine-Protokoll kultiviert. Am Tag 1 der Differenzierung wurden unterschiedliche Zellzahlen ausgesät. Die Auswertung der MAP2-positiven Ereignisse erfolgte mittels Durchflusszytometrie am Tag 12 der Differenzierung. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mittels CASY-Zellzähler. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf drei unabhängigen Experimenten mit ATCC-Zellen (A) und zwei unabhängigen Experimenten mit Kemler-Zellen (B).

Das Wachstumshormon bFGF ist ein mitogener Faktor, der u.a. die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen stimuliert (Kim et al., 2003; Rolletschek et al., 2001; Lee et al., 2000; Okabe et al., 1996). In einigen Arbeiten wurde beschrieben, dass die terminale Differenzierung in Neuronen durch den Entzug von bFGF gefördert wird (Nakayama et al., 2004, Rolletschek, et al., 2001, Lee et al., 2000). Eine andere Arbeit zeigte, dass bFGF die terminale Differenzierung zu Astrozyten fördert (Levinson et al., 2005). Das Protokoll von Ying sieht vor, bFGF ab dem Tag 8 der Differenzierung nach Replattieren der Zellen auf Fibronectin-beschichteten Schalen zuzugeben.

Im ZEBET-Labor wurde in Vorversuchen festgestellt, dass eine frühere Zugabe von bFGF im modifizierten Gelatine-Protokoll die Ausbeute an MAP2-positiven Ereignissen nicht erhöht. Ohne Zugabe von bFGF war der Anteil an MAP2-positiven Ereignissen - ausgewertet am Tag 12 – am geringsten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss einer einmaligen Zugabe von bFGF am Tag 8 und einer Zugabe von bFGF ab dem Tag 8 bis zum Auswertetag untersucht (Abb. 32/A und B). Ermittelt wurde der Anteil an MAP2-positiven Ereignissen am Auswertetag 12 (A) bzw. an MAP2- und GFAP-positiven Ereignissen am Auswertetag 21 (B). Das Ergebnis zeigte, dass am Tag 12 zwischen beiden Versuchsbedingungen kein Unterschied zu erkennen war: nach einer einmaligen Zugabe von bFGF wurden ca. 15% und nach der Zugabe von bFGF bis zum genannten Auswertetag ca. 13% MAP2-positive Ereignisse gemessen. Wurden die Zellen bis zum Auswertetag 21 mit dem Hormon stimuliert, ergab sich ein anderes Bild. Im Vergleich zur einmaligen Zugabe, war nach der kontinuierlichen Zugabe der Gehalt an MAP2- und GFAP-positiven Ereignissen nahezu doppelt so hoch. Um eine Kokultur von Neuronen und Gliazellen zu begünstigen, war demnach eine kontinuierliche Stimulierung mit dem Hormon von Vorteil.

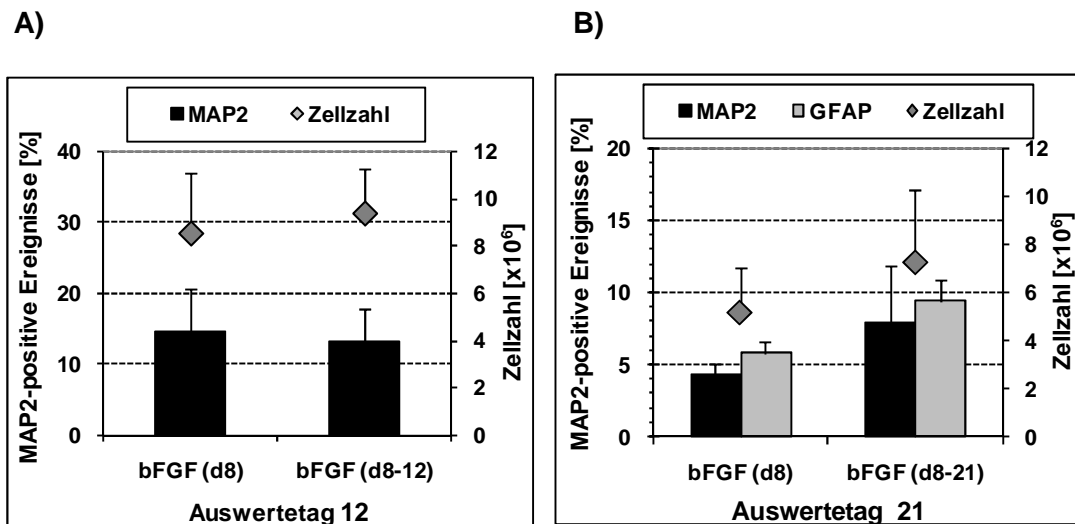


Abb. 32 (A, B): Einfluss von bFGF auf die Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen auf Gelatine-beschichteten Platten

Die mES-Zellen wurden unter differenzierenden Bedingungen nach dem Gelatine-Protokoll kultiviert. Die Zugabe von bFGF erfolgte entweder einmalig am Tag 8 der Differenzierung (bFGF/d8) oder mit jedem Mediumwechsel bis zu den Auswertetagen 12 (bFGF/d8-12) und 21 (bFGF/d8-21). Die Auswertung der Antigen-positiven Ereignisse erfolgte am Tag 12 (A; MAP2) und am Tag 21 (B; MAP2 und GFAP) mittels Durchflusszytometrie. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte an den gleichen Auswertetagen mittels CASY-Zellzähler. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf drei unabhängigen Experimenten.

3.2.4.2 Poly-L-Ornithin-Protokoll

3.2.4.2.1 Messung der molekularen Marker über die Zeit

Bei den mES Zellen, die nach dem PLO-Protokoll differenziert wurden, wurde der zeitliche Verlauf der Differenzierung anhand der Marker MAP2, GFAP und CNPase untersucht. Es zeigte sich, dass MAP2 am Tag 12 mit 22% positiven Ereignissen (von 10.000 registrierten Ereignissen) in den Kulturen, die nach dem PLO-Protokoll differenziert wurden (Abb. 33/A), deutlich stärker präsent war als in den Kulturen, die nach dem Gelatine-Protokoll differenziert wurden (12% MAP2-positive Ereignisse, vgl. Abb. 29/A). Die Astrozyten, gemessen am Anteil an GFAP-positiven Ereignissen, erreichten erst am Tag 19 die 5%-Hürde und waren im Vergleich zum Gelatine-Ansatz über den gesamten Untersuchungszeitraum weniger stark vertreten. Am Tag 30 waren 16% GFAP-positive Ereignisse im PLO-Ansatz erreicht (Abb. 33/A), im Vergleich zu 27% GFAP-positiven Ereignissen im Gelatine-Ansatz (Abb. 29/B). Der Anteil an Oligodendrozyten - gemessen mit dem Marker CNPase - war auch im PLO-Ansatz gleichbleibend niedrig. Der Marker kam nicht über 2% Antigen-positiven Ereignisse

hinaus und war somit auch nach diesem Protokoll zu schwach ausgeprägt für eine Messung von Substanzeffekten mittels der Durchflusszytometrie.

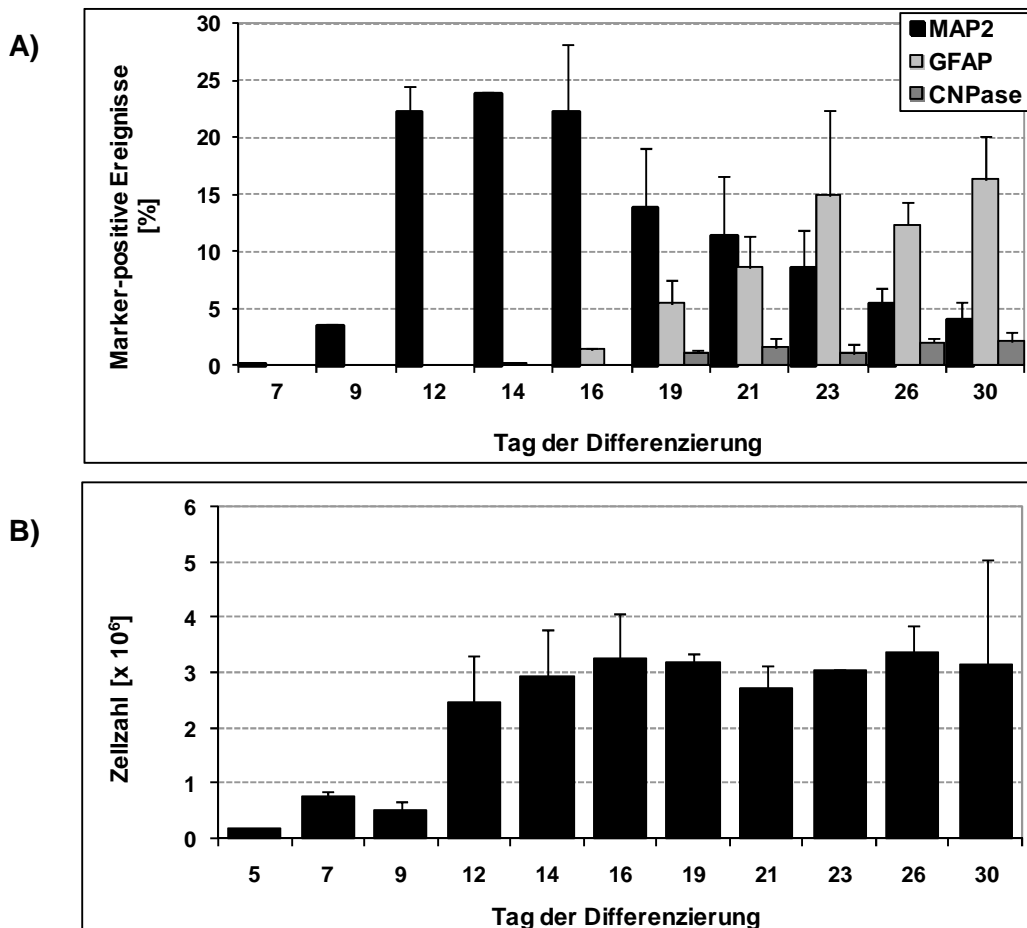


Abb. 33 (A, B): Zeitlicher Verlauf der Differenzierung von mES Zellen zu Neuronen und Gliazellen auf PLO-beschichteten Platten, gemessen anhand von Markerproteinen und der Zellzahl

Die mES-Zellen wurden über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen zu Neuronen und Gliazellen nach dem PLO-Protokoll differenziert. Die Auswertung der Markerproteine erfolgte an den angegebenen Tagen mittels Durchflusszytometrie, wobei pro Messpunkt jeweils 10.000 Ereignisse analysiert wurden. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mittels CASY-Zellzähler. Die Daten sind als Mittelwerte mit Abweichung vom Mittelwert dargestellt und basieren auf zwei unabhängigen Experimenten.

Die Zellzahl nahm in der Kultur zwischen Tag 9 und Tag 12 um das 5-fache zu und erreichte am Tag 12 über zwei Millionen Zellen (Abb. 33/B). Zwischen Tag 14 und Tag 30 erreichte das Wachstum die stationäre Phase und die Zellzahl bewegte sich bei ca. drei Millionen Zellen. Demnach waren auf den PLO-beschichteten Zellkulturplatten weniger Zellen angewachsen als auf den Gelatine-beschichteten Zellkulturplatten.

Aus diesen Ergebnissen war abzuleiten, dass der geeignete Zeitraum für die Messung von Substanzeffekten auf Neuronen, die auf PLO-beschichteten Platten differenziert wurden, zwischen Tag 12 und Tag 16 liegt. Zwischen Tag 21 und Tag 23 sind ausreichend MAP2-positive und GFAP-positive Ereignisse für eine zeitgleiche Messung beider Endpunkte vorhanden.

3.2.4.2.2 Untersuchungen zur Protokolloptimierung

Im PLO-Protokoll war es notwendig, die Zellzahl bei der Aussaat am Tag 1 zu erhöhen, da es unter einem Wert von 10^5 Zellen nicht möglich war, die Zellen zu kultivieren. Offensichtlich benötigten die Zellen eine gewisse Dichte, um sich zu Aggregaten zusammenschließen zu können. Dies wurde auch durch weiterführende laborinterne Untersuchungen, bei denen die Zellen in kleineren Formaten differenziert wurden, bestätigt. In den hier gezeigten Ergebnissen zur Bestimmung der Zellzahl für die Zellaussaat am Tag 1 der Differenzierung (Abb. 34/A) zeigte es sich, dass zwischen der Aussaat von 1×10^5 , $1,5 \times 10^5$ und 2×10^5 Zellen/ 6 cm Platte nur geringe Unterschiede zwischen den Ansätzen zu sehen waren, gemessen am Anteil an MAP2-positiven Ereignissen am Tag 12 der Differenzierung. Bei 3×10^5 Zellen sank der Anteil an MAP2-positiven Ereignissen von 18% auf 15% MAP2-positive Ereignisse. Für das PLO-Protokoll wurde eine Aussaat von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 6 cm Plattenformat festgelegt. Ungewöhnlich hoch waren jedoch in dieser Versuchsreihe die Gesamtzellzahlen am Tag 12 der Differenzierung. Sie bewegten sich bei 10×10^6 Zellen. Daraus lässt sich erkennen, dass die Gesamtzellzahl am Tag 12 der Differenzierung auf PLO-beschichteten Platten durchaus zwischen 2 und 10 Mio. Zellen ohne deutlich erklärbaren Grund schwanken kann. Hier liegt die Vermutung nahe, dass der elementare Schritt - die Aggregation der Zellen - zu großen Varianzen bei der Anzahl der Zellen, die in den Kulturen heranwachsen, führen kann.

Das N2B27-Neuronendifferenzierungsmedium besteht in einem Verhältnis von 1:1 aus DMEM/F12 Medium mit N2 Supplementen (kurz: N2-Anteil) und dem Neurobasalmedium mit B27 Supplementen (kurz: B27-Anteil). In der Arbeit von Ying und Smith (2003) wird der Einfluss der beiden Komponenten auf die dort genannte „Monolayerdifferenzierung“ beschrieben. Eine Erhöhung des N2-Anteils fördert die

neuronale Differenzierung, während eine Erhöhung des B27-Anteils die Zelladhäsion und Zellviabilität begünstigt.

Um zu testen, ob eine Änderung des Verhältnisses von N2 zu B27 auch bei den D3 Zellen einen Einfluss auf die Differenzierung und die Zellzahl ausübt, wurde der N2-Anteil von 40% bis 70% in 10%-Schritten variiert. Entsprechend änderte sich der B27-Anteil von 60% auf 30%. Am Tag 1 der Differenzierung wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Am Auswertetag 12 wurden der Anteil an MAP2-positiven Ereignissen und die Zellzahl ermittelt. Das Resultat zeigte, dass der Anteil an Neuronen mit zunehmenden N2-Konzentration leicht anstieg (Abb. 34/B). Jedoch waren in dieser Versuchsreihe die Standardabweichungen sehr hoch. Die Zellzahl stieg ebenfalls an und erreichte im letzten Ansatz mit 70% N2 und 10×10^6 Zellen eine Verdoppelung im Vergleich zu den Ansätzen mit 40% N2. Hier stiegen die Zellzahlen, ebenfalls gemessen am Tag 12 der Differenzierung, mit der Erhöhung des N2-Anteils von ca. 5 Mio. (40% N2) auf ca. 10 Mio. (70% N2) an. Dies spricht für einen positiven Einfluss von DMEM/F12 Medium mit N2 Supplementen sowohl auf die Differenzierung als auch auf das Wachstum der sich differenzierenden D3 Zellen.

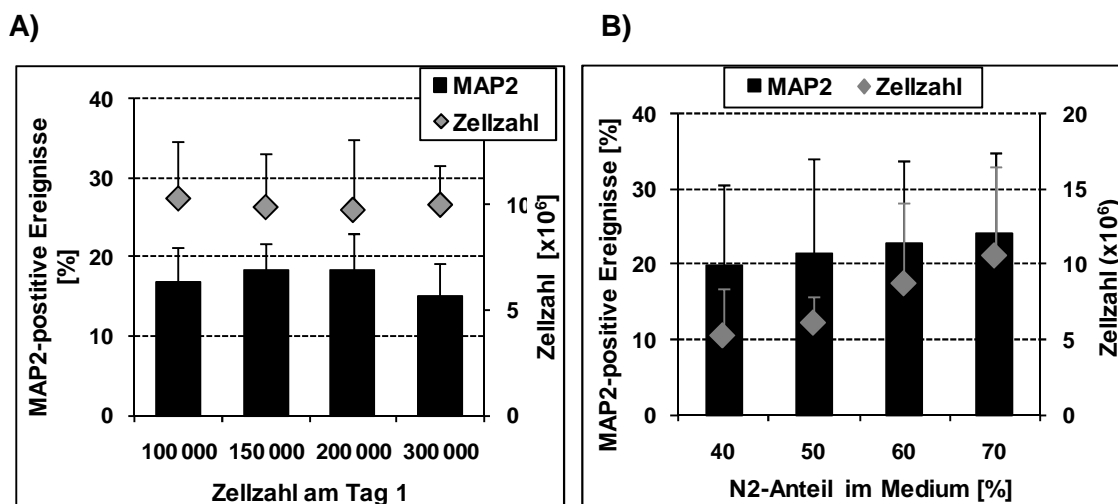


Abb. 34 (A, B): Einfluss der Zellaussaat am Tag 1 (A) und des N2-Anteils im Medium (B) auf die Differenzierung zu Neuronen auf PLO-beschichteten Platten

Die mES-Zellen wurden unter differenzierenden Bedingungen nach dem PLO-Protokoll kultiviert.

Untersucht wurden in (A) unterschiedliche Zellzahlen bei der Zellaussaat am Tag 1 der Differenzierung (A) und in (B) ein unterschiedlicher N2-Anteil im Medium. Die Auswertung erfolgte jeweils am Tag 12 der Differenzierung. Die Messung der MAP-2 positiven Ereignisse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mittels CASY-Zellzähler. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf je drei unabhängigen Experimenten.

Analog zu den Untersuchungen mit den auf Gelatine-beschichteten Zellkulturplatten kultivierten mES Zellen, wurde auch bei den Zellen, die auf PLO-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert wurden, der Einfluss von bFGF auf die neuronale Differenzierung geprüft. Das Wachstumshormon wurde entweder nur einmalig am Tag 8 der Kultivierung (bFGF/d8) und im Vergleich dazu ab dem Tag 8 und bei jedem weiteren Mediumwechsel (bFGF/d 8-12 oder bFGF/d 8-21) dem Medium zugegeben. Das Ergebnis der Differenzierung wurde am Tag 12 anhand der Messung der MAP2-positiven Ereignissen und am Tag 21 anhand der Messung der MAP2- und GFAP-positiven Ereignissen (von jeweils 10.000 gemessenen Ereignissen) im Durchflusszytometer bestimmt. Parallel dazu wurden auch die Zellzahlen an den Tagen 12 und 21 ermittelt. Das Ergebnis am Tag 12 zeigt, dass zwischen den beiden Ansätzen kein relevanter Unterschied in Hinblick auf den Anteil an MAP2-positiven Ereignissen zu quantifizieren war (Abb. 35/A). Dagegen wirkte sich die kontinuierliche Zugabe des mitogenen Faktors bis zum Auswertetag 21 sowohl auf den Anteil an MAP2-positiven Ereignissen als auch auf den Anteil an GFAP-positiven Ereignissen und auf die Gesamtzellzahl positiv aus (Abb. 35/B). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in den Untersuchungen mit Zellen, die auf Gelatine-beschichteten Platten differenziert wurden, erzielt (vgl. Abb. 32/A und B).

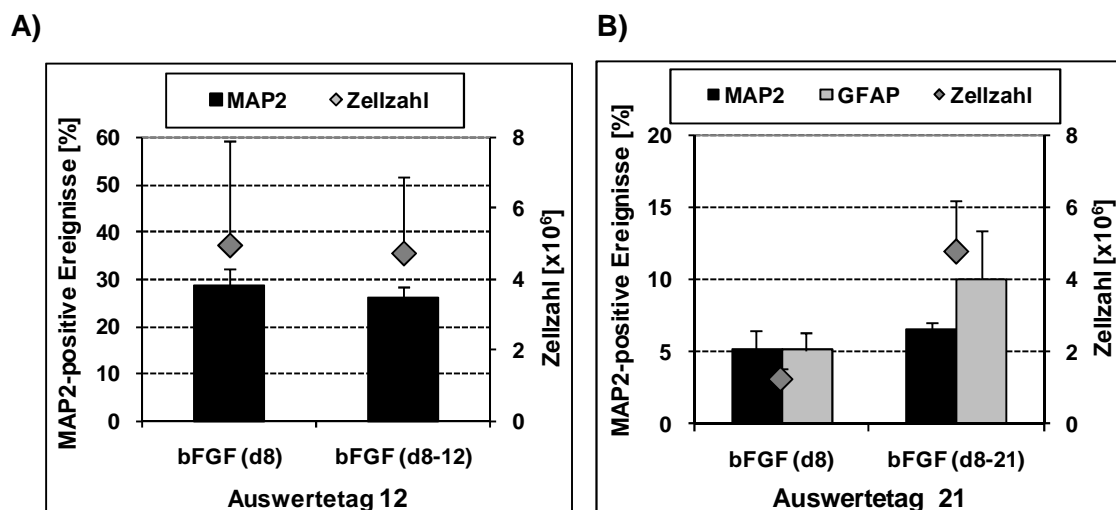


Abb. 35 (A, B): Einfluss von bFGF auf die Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen auf PLO-beschichteten Platten

Die mES-Zellen wurden unter differenzierenden Bedingungen nach dem PLO-Protokoll kultiviert. Die Zugabe von bFGF erfolgte entweder einmalig am Tag 8 der Differenzierung (bFGF/d8) oder mit jedem Mediumwechsel bis zu den Auswertetagen 12 (bFGF/d8-12) und 21 (bFGF/d8-21). Die Auswertung der Antigen-positiven Ereignisse erfolgte am Tag 12 (A; MAP2) und am Tag 21 (B; MAP2 und GFAP) mittels Durchflusszytometrie. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte an den gleichen Auswertetagen mittels CASY-Zellzähler. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf drei unabhängigen Experimenten.

In den Arbeiten von Andresen et al. (2005) und Goetz et al. (2006) wurde ein positiver Effekt des Glycoproteins Fibronectin, welches ebenfalls ein Protein der extrazellulären Matrix ist, auf die Differenzierung von neuronalen Zellen beschrieben. Eigene Untersuchungen mit den ATCC-Zellen ergaben, dass die Zugabe von Fibronectin das Wachstum der Zellen insgesamt verbesserte, was aber dazu führte, dass der Anteil an MAP2-positiven Ereignissen, gemessen am Tag 12 der Differenzierung, stark sank (Abb. 36/A). In einem weiteren Versuch mit Kemler-Zellen sank der gemessene MAP2-Anteil ohne einen positiven Effekt auf das Zellwachstum (Abb. 36/B).

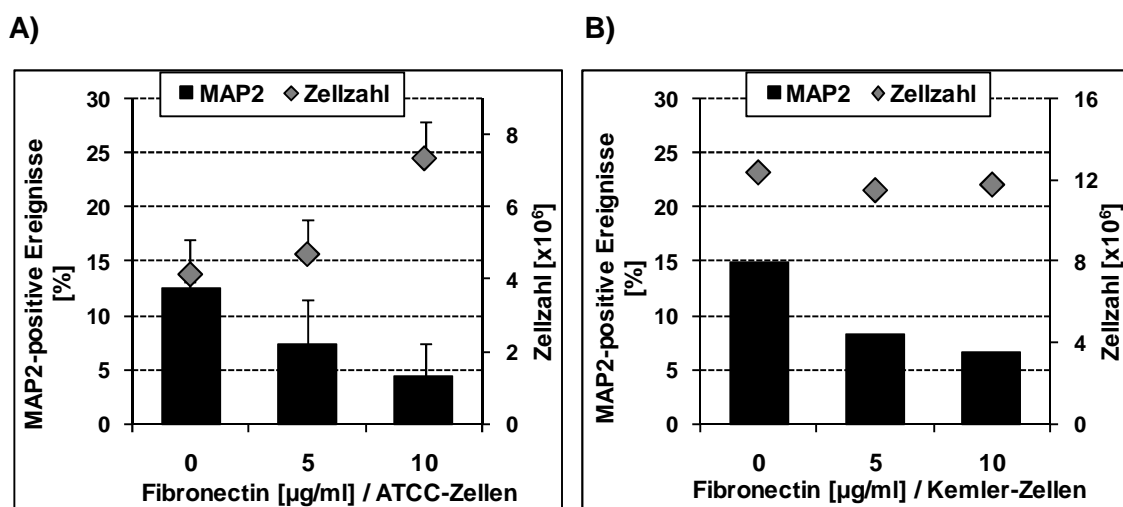


Abb. 36 (A, B): Einfluss von Fibronectin auf die Differenzierung von ATCC-Zellen (A) und Kemler-Zellen (B) zu Neuronen auf PLO-beschichteten Platten

Die mES-Zellen wurden unter differenzierenden Bedingungen nach dem PLO-Protokoll kultiviert. Die Auswertung von MAP2 erfolgte mittels Durchflusszytometrie am Tag 12 der Differenzierung. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mittels CASY-Zellzähler. Die Daten sind z.T. als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und basieren auf drei unabhängigen Experimenten mit ATCC-Zellen (A) und einem Experiment mit Kemler-Zellen (B).

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Erhöhung des Transferringehaltes im Neuronendifferenzierungsmedium einen stimulatorischen Einfluss auf die Differenzierung hat, wie sie in der Arbeit von Aizenman und de Vellis (1987) beschrieben wird. Eine weitere Zugabe von Transferrin (50 $\mu\text{g/ml}$) führte dazu, dass die Anheftung der Zellen sich stark verschlechterte und die Differenzierung der Zellen eingeschränkt war, so dass keine quantitative Bestimmung mehr möglich war.

Die Zugabe der beiden Faktoren Fibronectin und Transferrin hatte sich demzufolge für die Differenzierung mit D3 Zellen als nicht günstig erwiesen.

3.2.5 Substanztestung

3.2.5.1 Substanztests an Neuronen

Im Folgenden galt es zu prüfen, ob anhand der molekularen Marker konzentrationsabhängige Substanzeffekte bestimmbar sind. Zugleich sollte der Effekt auf die Differenzierung mit dem zytotoxischen Effekt der Substanzen auf die sich differenzierenden Zellen verglichen werden. Der Differenzierungstest erfolgte mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Antigen-positiven Ereignisse am Tag 12 der Differenzierung. Der zytotoxische Effekt wurde mittels Messung der Viabilität im MTT-Test erfasst. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen auf Gelatine-beschichteten 6 cm Platten, für den MTT-Test auf Gelatine-beschichteten 24-Well-Platten ausgesät und nach dem Gelatine-Protokoll kultiviert. Anhand einer Substanz (Valproinsäure) wurde zudem geprüft, ob konzentrationsabhängige Substanzeffekte auch mit Zellen, die nach dem PLO-Protokoll differenziert werden, messbar sind. Die Substanzen wurden mit Beginn der Differenzierung und bei jedem folgenden Mediumwechsel bis zum Auswertetag 12 in unterschiedlichen Konzentrationen in das Kulturmedium gegeben.

Die Ergebnisse der Substanztests werden in den Abb. 37 bis Abb. 42 in Form von Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt. Eine zusammenfassende Graphik in Abb. 43 gibt die aus den Kurven abgelesenen halbmaximalen Hemmkonzentrationen – die ID_{50} -Werte und die IC_{50} -Werte - wieder.

Anhand der Substanzen 5-Fluorouracil (5-FU), Penicillin G (PenG), Lithiumchlorid (LiCl) und Valproinsäure (VPA) wurden zunächst die Marker MAP2 und β -Tubulin III auf ihre Einsatzfähigkeit als molekulare Endpunkte verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden Endpunkte in den Differenzierungstests identische Ergebnisse lieferten (Abb. 37/A-D). Zu sehen ist auch, dass Schwankungen in den Kurven auftreten, die bei der Betrachtung der einzelnen Substanzuntersuchungen näher beleuchtet werden.

Da gemäß der zeitlichen Analyse (siehe Kap. 3.2.4.1.1) am Tag 12 der Differenzierung der Anteil an MAP2-positiven Ereignissen am höchsten war, wurde dieser Marker als molekularer Endpunkt für die Durchführung von weiteren Substanztests ausgewählt.

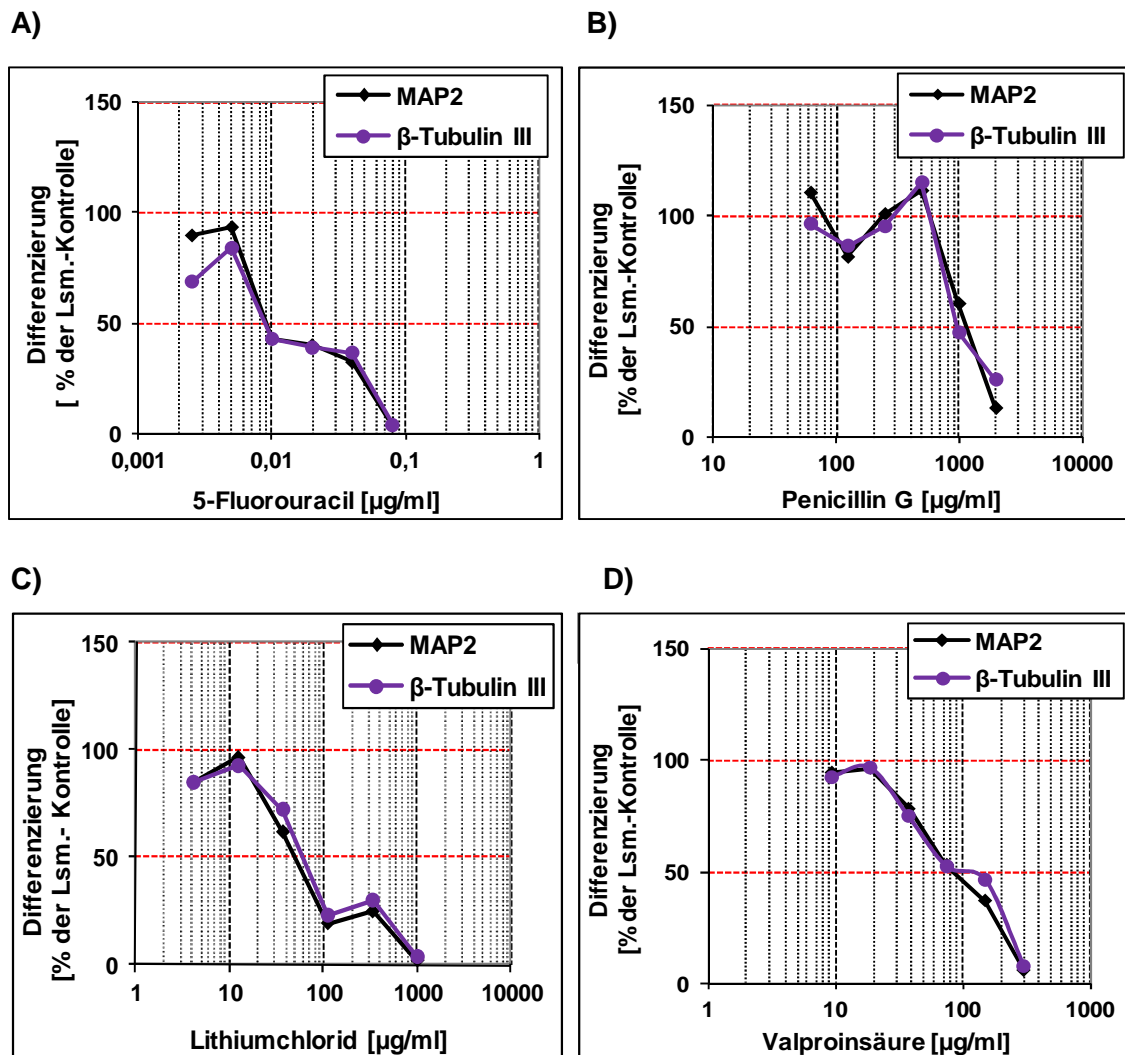


Abb. 37 (A-D): Vergleich der beiden Endpunkte MAP2 und β -Tubulin III anhand von Konzentrations-Wirkungskurven der Testsubstanzen

Die mES Zellen wurden unter Substanzeinfluss bis zum Auswertetag 12 nach dem Gelatine-Protokoll differenziert. Die Auswertung der Effekte auf die Differenzierung zu Neuronen (in % der Lösungsmittelkontrolle) basiert auf die Messung der MAP2 und β -Tubulin III-positiven Ereignissen mittels Durchflusszytometrie. Folgende Testsubstanzen wurden untersucht: 5-Fluorouracil (A; gelöst in 0,0036% PBS), Penicillin G (B; gelöst in 0,1% PBS), Lithiumchlorid (C; gelöst in 0,199% PBS), und Valproinsäure (D; gelöst in 0,075% DMSO).

Mit **5-Fluorouracil (5-FU)** wurden sowohl im Differenzierungstest, als auch bei der Viabilitätsbestimmung reproduzierbare Kurvenverläufe erzielt (Abb. 38). Die Differenzierung - gemessen anhand der MAP2-positiven Ereignisse - wurde bei einer 5-FU-Exposition von 0,009 bis 0,03 $\mu\text{g/ml}$ (ID_{50}) gehemmt. Der zytotoxische Effekt, bei dem die Viabilität von 50% der Zellen beeinträchtigt war (IC_{50}), lag zwischen 0,03 und 0,07 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU. Demnach reagierten die Zellen in der Differenzierung leicht empfindlicher auf 5-FU.

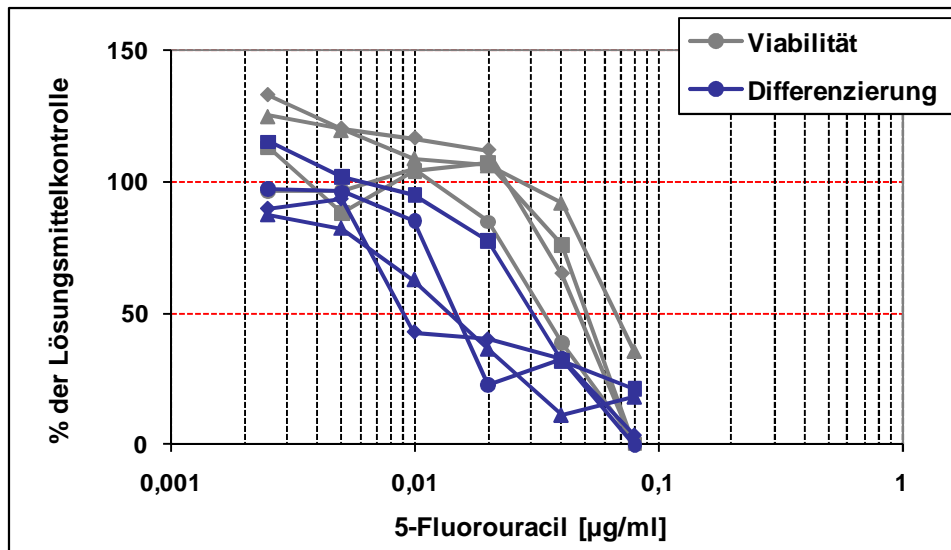


Abb. 38: Konzentrationsabhängiger Effekt von 5-Fluorouracil (5-FU) auf die neuronale Differenzierung und Viabilität

Die mES-Zellen wurden unter 5-FU-Exposition bis zum Auswertetag 12 nach dem Gelatine-Protokoll differenziert. Die Auswertung der Differenzierung zu Neuronen erfolgte anhand der Messung der MAP2-positiven Ereignisse mittels Durchflusszytometrie. Die Viabilität der Zellen wurde im MTT-Test gemessen. Die Effekte beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrollen mit PBS (0,0036%). Jeder Endpunkt (Differenzierung, Viabilität) wurde in vier unabhängigen Experimenten untersucht.

Für die *in vivo* nicht-embryotoxische Substanz **Penicillin G (PenG)** ergab der Differenzierungstest ID_{50} -Werte zwischen 840 und 1900 µg/ml (Abb. 39). Hier war eine Zunahme der Differenzierung bei höheren Substanzkonzentrationen zu beobachten. Bei einer ersten Messung stieg der Anteil an MAP2-positiven Ereignissen bei 1.000 µg/ml PenG bis knapp über 200% an, ohne einen weiteren erkennbaren Zusammenhang. Um eine potenzielle Fehlmessung auszuschließen, wurde ein weiteres unabhängiges Experiment durchgeführt. Auch hier war ein starker Anstieg der Kurve, allerdings bei 500 µg/ml, zu erkennen. Jedoch sank bei diesem Versuch und der genannten Konzentration die Zellzahl um ca. 50%, so dass davon auszugehen ist, dass es sich hier womöglich um eine Fehlmessung handelte. Die Viabilitätstests ergaben gleichmäßige Kurven, deren IC_{50} -Werte sich zwischen 360 und 680 µg/ml bewegten. Im Vergleich mit den Ergebnissen der anderen Substanztests zeigten die Zellen gegenüber PenG sowohl in der Differenzierung als auch in der Viabilität vor allem bezüglich der ID_{50} und IC_{50} -Werten eine starke Streuung. Diese wurde auch bei den Differenzierungstests mit den Herzmuskelzellen beobachtet (vgl. Abb. 11). Wie dort bereits diskutiert, könnte in den hohen Substanzkonzentrationen das Auftreten von

unspezifischen Effekten, die die Zellen im Wachstum und/oder Differenzierung beeinträchtigen, die Ursache für die starken Streuungen sein.

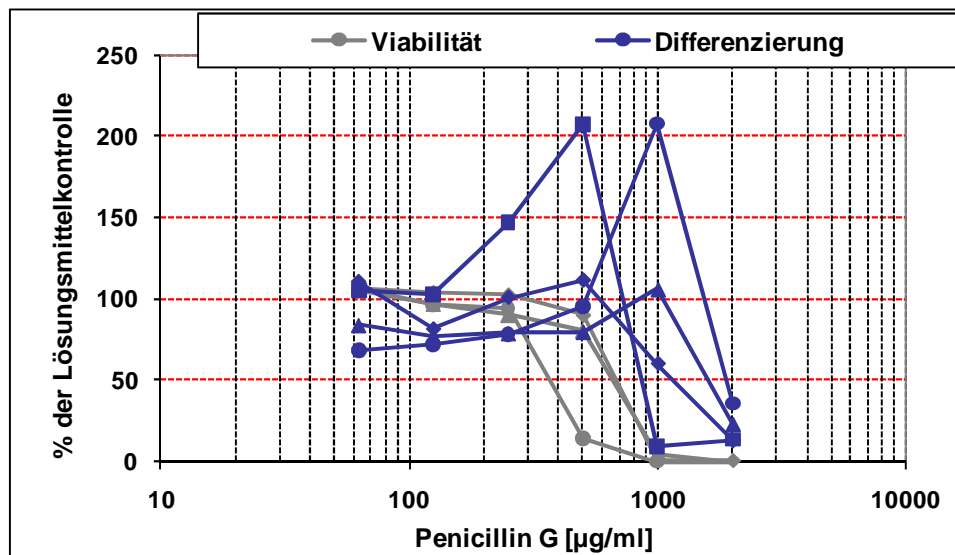


Abb. 39: Konzentrationsabhängiger Effekt von Penicillin G (PenG) auf die neuronale Differenzierung und Viabilität

Die mES Zellen wurden unter PenG-Exposition bis zum Auswertetag 12 nach dem Gelatine-Protokoll differenziert. Die Auswertung der Differenzierung zu Neuronen erfolgte anhand der Messung der MAP2-positiven Ereignisse mittels Durchflusszytometrie. Die Viabilität der Zellen wurde im MTT-Test gemessen. Die Effekte beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrollen mit PBS (0,1%). Der Endpunkt „Differenzierung“ wurde in vier, der Endpunkt „Viabilität“ in drei unabhängigen Experimenten untersucht.

Mit **Lithiumchlorid (LiCl)** wurden reproduzierbare Kurven erzielt, die sich in Bezug auf den Einfluss auf die Differenzierung deutlich von dem Einfluss auf die Viabilität unterschieden. Die ID_{50} -Werte lagen zwischen 40 und 150 µg/ml, die IC_{50} -Werte zwischen 540 und 740 µg/ml LiCl (Abb. 40). Bei der Erfassung der Viabilität stiegen die Kurven in drei von vier Fällen bis auf 140% in der vorletzten Konzentration bei 333 µg/ml LiCl an. Dies könnte auf einen wachstumsfördernden Effekt von LiCl auf die sich differenzierenden Zellen hindeuten. Ein Zusammenhang zwischen diesem Effekt und dem relativen Anteil der Neuronen in der Kultur – gemessen anhand der MAP2-positiven Ereignisse - konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass LiCl bei anderen, nicht neuronalen Zellen, wie z.B. neuralen Progenitorzellen, einen Effekt auf die Viabilität ausübt. Nicht auszuschließen ist, dass dadurch ein zytotoxischer Effekt speziell auf die Neuronen in niedrigeren Konzentrationen verdeckt

wird. Allerdings konnte bei der Ermittlung der Gesamtzellzahlen in den Differenzierungstests keine Zunahme der Zellzahl bei entsprechender Konzentration von 333 $\mu\text{g/ml}$ LiCl festgestellt werden.

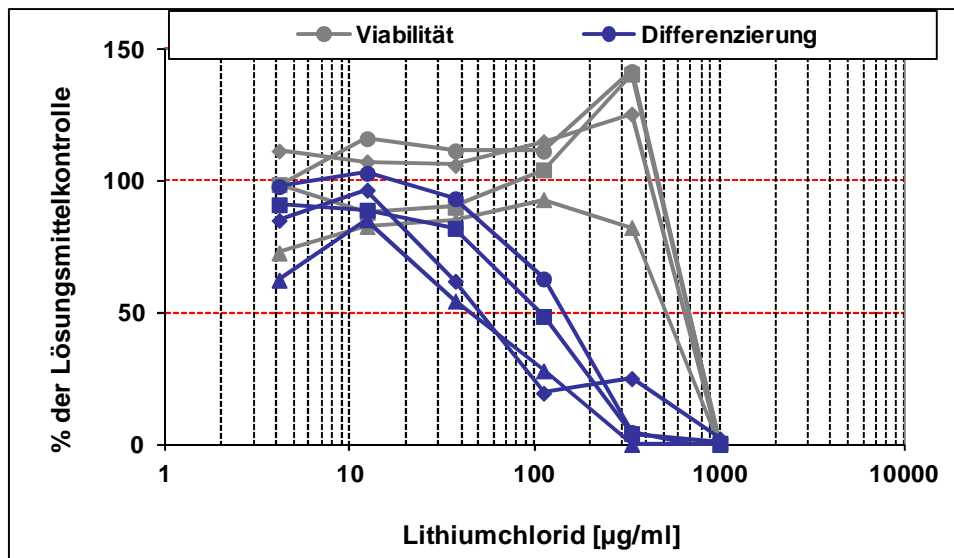


Abb. 40: Konzentrationsabhängiger Effekt von Lithiumchlorid (LiCl) auf die neuronale Differenzierung und Viabilität

Die mES-Zellen wurden unter LiCl-Exposition bis zum Auswertetag 12 nach dem Gelatine-Protokoll differenziert. Die Auswertung der Differenzierung zu Neuronen erfolgte anhand der Messung der MAP2-positiven Ereignisse mittels Durchflusszytometrie. Die Viabilität der Zellen wurde im MTT-Test gemessen. Die Effekte beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrollen mit PBS (0,199%). Jeder Endpunkt (Differenzierung, Viabilität) wurde in vier unabhängigen Experimenten untersucht.

Nachdem im ersten Versuch mit **Methylazoxymethanolacetat (MAM)** eine 1:2 Verdünnung der Substanz den aktiven Konzentrationsbereich nicht ausreichend abdeckte, wurde in den beiden anschließenden Versuchen und in allen MTT-Tests eine 1:3-Verdünnung mit MAM durchgeführt. Die Kurven zeigten im Differenzierungstest ID_{50} -Werte zwischen 3 und 35 $\mu\text{g/ml}$ MAM (Abb. 41). Im MTT-Test werden 50% Zellen bei 5 bis 17 $\mu\text{g/ml}$ in ihrer Viabilität gehemmt. Somit war kein Unterschied zwischen dem Effekt auf die neuronale Differenzierung und dem Effekt auf die Viabilität zu erkennen. Bei MAM war insbesondere auch in der niedrigsten getesteten Konzentration eine relativ große Streuung zu verzeichnen.

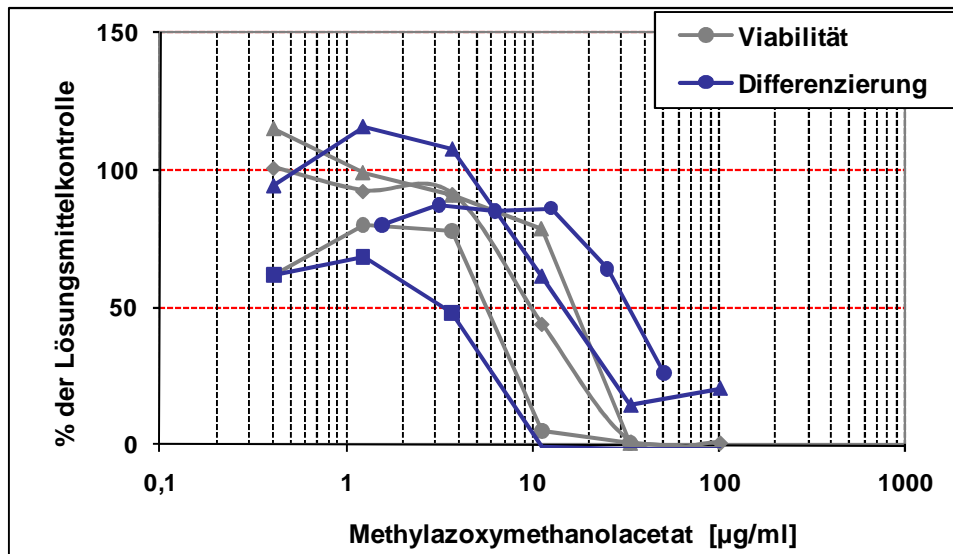


Abb. 41: Konzentrationsabhängiger Effekt von Methylazoxymethanolacetat (MAM) auf die neuronale Differenzierung und Viabilität

Die mES Zellen wurden unter MAM-Exposition bis zum Auswertetag 12 nach dem Gelatine-Protokoll differenziert. Die Auswertung der Differenzierung zu Neuronen erfolgte anhand der Messung der MAP2-positiven Ereignisse mittels Durchflusszytometrie. Die Viabilität der Zellen wurde im MTT-Test gemessen. Die Effekte beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrollen mit PBS (0,1%). Jeder Endpunkt (Differenzierung, Viabilität) wurde in drei unabhängigen Experimenten untersucht.

Mit **Valproinsäure (VPA)** ergaben sich reproduzierbare Kurven mit ID_{50} -Werten zwischen 80 und 190 µg/ml (Abb. 42/A). Im Viabilitätstest lagen die IC_{50} -Werte bei 50 bis 90 µg/ml VPA. Im Vergleich dazu wurden auch Zellen mit VPA getestet, die nach dem PLO-Protokoll differenziert wurden. Hier lagen die ID_{50} -Werte zwischen 70 und 180 µg/ml und die IC_{50} -Werte zwischen 45 und 90 µg/ml VPA (Abb. 42/B). Somit kamen die Substanztests, trotz unterschiedlicher Protokoll-Varianten, in Bezug auf die ID_{50} - und IC_{50} -Werten zu ähnlichen Ergebnissen. Ein spezifischer differenzierungshemmender Effekt auf die Neuronen kann bei VPA nicht von einem zytotoxischen Effekt abgegrenzt werden. In der niedrigsten Substanzkonzentration war auch bei VPA eine starke Streuung in den Messergebnissen zu erkennen.

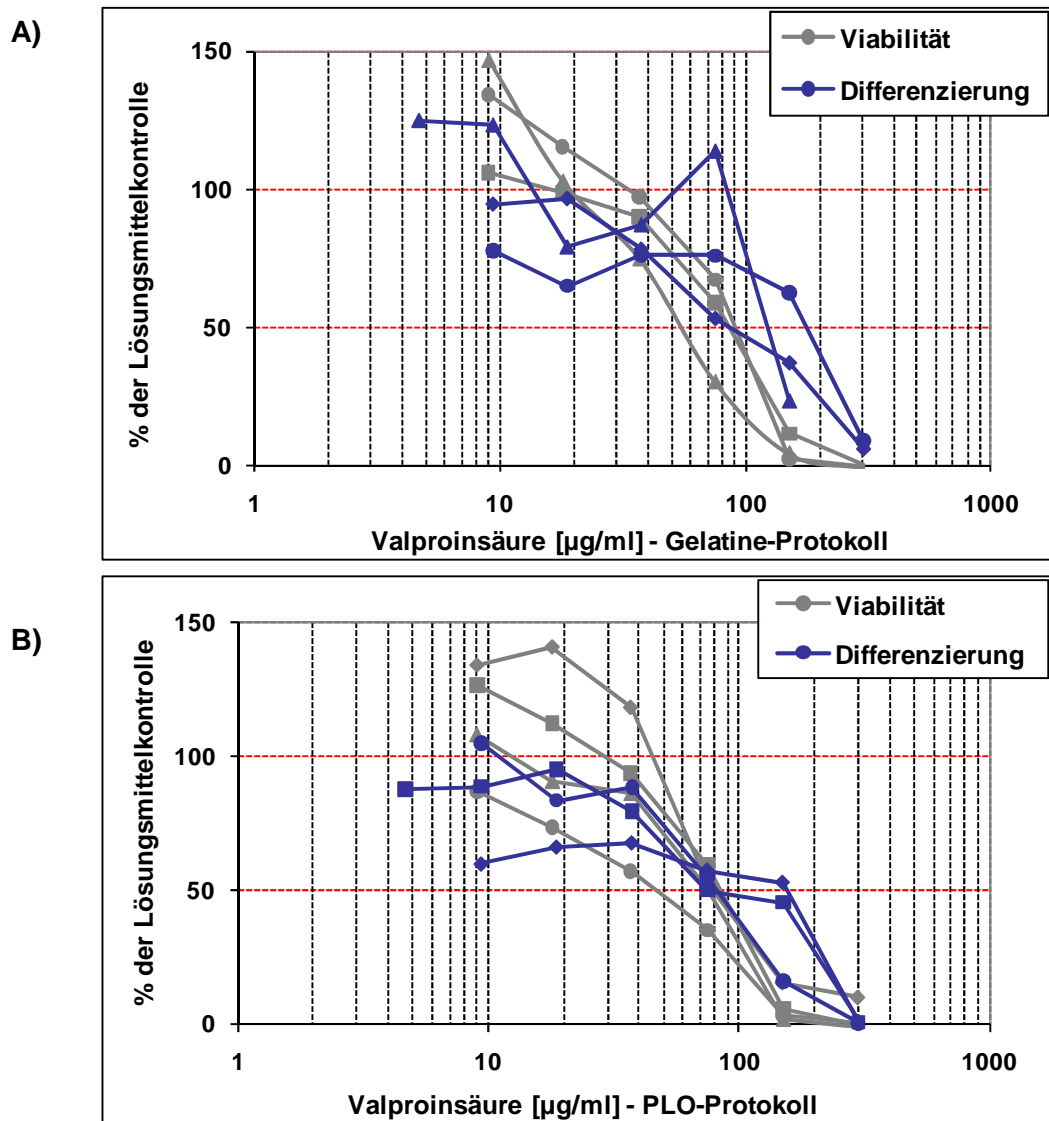


Abb. 42 (A, B): Konzentrationsabhängiger Effekt von Valproinsäure (VPA) auf die neuronale Differenzierung und Viabilität

Die mES Zellen wurden unter VPA-Exposition bis zum Auswertetag 12 nach dem Gelatine-Protokoll (A) und nach dem PLO-Protokoll (B) differenziert. Die Auswertung der Differenzierung zu Neuronen erfolgte anhand der Messung der MAP2-positiven Ereignisse mittels Durchflusszytometrie. Die Viabilität der Zellen wurde im MTT-Test gemessen. Die Effekte beziehen sich auf die Lösungsmittelkontrollen mit DMSO (0,075%). Jeder Endpunkt (Differenzierung, Viabilität) wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten untersucht.

Die Abb. 43 zeigt die Zusammenstellung aller ID_{50} -Werte und IC_{50} -Werte auf einer halblogarithmischen Skala. Die Substanzen sind in Bezug auf die Stärke des Effektes angeordnet. Die Differenzierung zu Neuronen wurde durch 5-FU am stärksten gehemmt. Den geringsten Effekt zeigte PenG.

Um zu prüfen, ob die ID_{50} -Werte sich signifikant von den IC_{50} -Werten unterscheiden, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde bei den Substanzen 5-FU und LiCl ein signifikanter Unterschied zwischen dem Einfluss auf die Differenzierung und dem Einfluss auf die Viabilität festgestellt. Dagegen war bei den Substanzen MAM, VPA und PenG keine signifikante Abweichung zwischen den beiden Endpunkten zu verzeichnen.

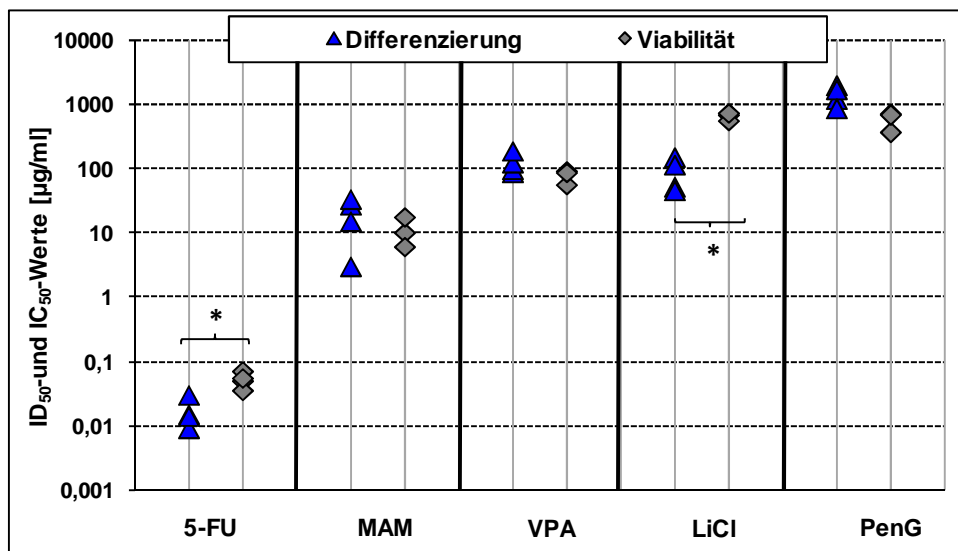


Abb. 43: Vergleich des Endpunktes Differenzierung mit dem Endpunkt Viabilität anhand der ID_{50} - und IC_{50} -Werte

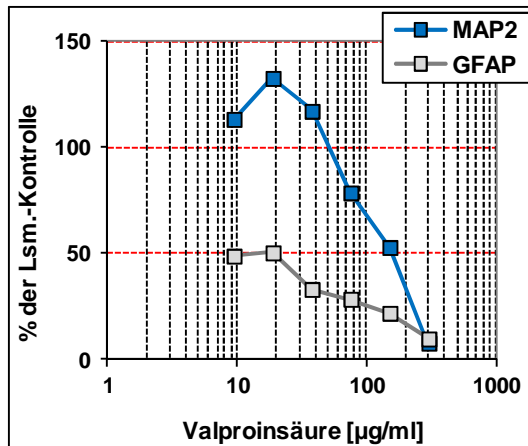
Dargestellt sind die ID_{50} - und IC_{50} -Werte für die Substanzen 5-Fluorouracil (5-FU), Methylazoxymethanolacetat (MAM), Valproinsäure (VPA), Lithiumchlorid (LiCl) und Penicillin G (PenG). Jede Substanz wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten anhand der Endpunkte Differenzierung (MAP2) und Viabilität getestet. Die ID_{50} -Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven abgelesen.

* Signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,05$)

3.2.5.2 Substanztests an Neuronen und Gliazellen in Kokultur

Im Nervenzellgewebe des Gehirns bilden die Neuronen mit den Gliazellen ein interaktives Netzwerk, in dem die Gliazellen nicht nur bei der strukturellen Organisation und Myelinisierung von Neuronen, sondern auch bei der Signal- und Informationsverarbeitung sowie am Transport und Stoffwechsel von Substanzen beteiligt sind. Um die interessante Frage zu klären, ob die Neuronen in Gegenwart von Gliazellen eine veränderte Empfindlichkeit gegenüber einer Substanz aufweisen, wurde der Substanzeffekt zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung gemessen. Für die Erfassung solcher Effekte in der Kokultur war es von wesentlicher Bedeutung, den optimalen Zeitpunkt für die Messung im Durchflusszytometer zu ermitteln. Neuronen sollten noch in ausreichender Anzahl vorhanden sein, außerdem sollten sich bereits ausreichend Gliazellen entwickelt haben. Nach einigen Vorversuchen stellte sich heraus, dass der optimale Zeitpunkt der Tag 21 war. An diesem Tag lag der Anteil beider Marker zuverlässig über 5% von 10.000 gemessenen Ereignissen (vgl. Abb. 29). Getestet wurde anhand der Substanz Valproinsäure. Ein erster Versuch zeigte ein erstaunliches Resultat. Bereits in der ersten Konzentration bei 9,38 µg/ml VPA zeigte der Astrozyten-Marker GFAP eine 50%ige Hemmung (Abb. 44/A). Dagegen lag MAP2 in der ersten Konzentration noch bei 100% und stieg in der zweiten Konzentration bei 18,75 µg/ml VPA leicht an. Der ID₅₀-Wert lag bei 140 µg/ml und somit im Bereich der ermittelten ID₅₀-Werte am Tag 12 der Differenzierung. Weitere Wiederholungen des Versuches ergaben z.T. ein ähnliches Bild (Abb. 44/B). In zwei von drei Fällen erreichte der Marker GFAP bereits in der ersten Konzentration nur knapp die 50%-Grenze. Dagegen war MAP2 immer stärker ausgebildet. In einem Fall erreichte GFAP die 100% in der niedrigsten Konzentration, jedoch lag der dazugehörige MAP2-Wert über 160%. Bei dieser Kurve war zusätzlich eine starke Streuung der Einzelwerte zu beobachten. Das Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass die Differenzierung zu Astrozyten schon bei geringeren VPA-Konzentrationen stärker gehemmt wurde als die zu Neuronen und sich somit in der Kultur deutlich mehr MAP2-positive Neuronen entwickeln konnten. Die ID₅₀-Werte für die Neuronen in der Kokultur, gemessen am Tag 21, liegen im Bereich von 30 bis 250 µg/ml und streuen demnach stärker im Vergleich zu den ID₅₀-Werten, die am Tag 12 gemessen wurden.

A)



B)

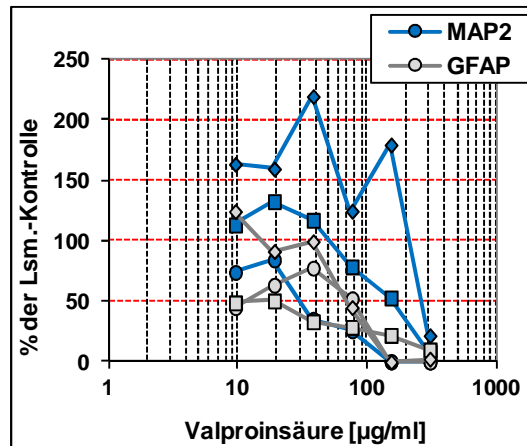


Abb. 44 (A, B): Konzentrationsabhängiger Effekt von Valproinsäure (VPA) auf die Differenzierung zu Neuronen und Astrozyten

Die mES Zellen wurden unter VPA-Exposition nach dem Gelatine-Protokoll bis zum Auswertetag 21 differenziert. Die Auswertung der Neuronen erfolgte anhand der Messung der MAP2-positiven Ereignisse, die der Astrozyten anhand der Messung der GFAP-positiven Ereignisse mittels Durchflusszytometrie. Die Effekte beziehen sich auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle mit DMSO (0,075%). Darstellung eines Experimentes (A) und aller drei unabhängigen Experimente (B).

4 DISKUSSION

Standardisierte *in vitro* Testverfahren werden dringend benötigt, um die Risikobewertung von industriell hergestellten Substanzen - beispielsweise von Pharmazeutika oder Chemikalien - voranzutreiben. Speziell im Bereich der Reproduktionstoxikologie stützen sich die Sicherheitsbewertungen auf eine hohe Anzahl von Tierversuchen, die zudem zeit- und kostenintensiv sind. Schließlich handelt es sich bei der Abschätzung der toxikologischen Wirkung auf Fruchtbarkeit und Entwicklung um die Erfassung von äußerst komplexen Endpunkten. Diese lassen sich nicht durch einzelne *in vitro* Testsysteme ersetzen. Vielmehr müssen grundlegende Mechanismen bestimmt werden, anhand derer toxikologisch relevante Angriffspunkte standardisiert erfasst werden können. In diesem Bereich besteht großer Forschungsbedarf, da sich erst durch eine intelligente Kombination verschiedener Endpunkte in einem integrierten Testsystem zuverlässige Vorhersagen zu den entwicklungstoxikologischen Eigenschaften von Substanzen ableiten lassen.

Der validierte Embryonale Stammzelltest (EST) ist als Testsystem entwickelt worden, um embryotoxische Substanzen anhand der Kombination der Endpunkte „Hemmung der kardialen Differenzierung“ und „Zytotoxizität“ zu erfassen. Mit Hilfe eines eigens dafür entwickelten biostatistischen Prädiktionsmodells kann anhand des EST eine Einstufung von Substanzen in die drei Embryotoxizitätsklassen „nicht“, „schwach“ und „stark embryotoxisch“ vorgenommen werden.

Das Ziel der Arbeit war es, den EST durch die Etablierung von molekularen Endpunkten weiter zu entwickeln.

Zunächst wurde in Vorversuchen der herkömmliche Endpunkt im EST - die mikroskopische Erfassung der Herzmuskelzellkontraktionen - um einen für Herzmuskelzellen spezifischen molekularen Endpunkt ergänzt, um so einen „objektiveren“ Endpunkt in das Testsystem zu integrieren.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag dann in der Etablierung eines neuen molekularen Endpunktes zur Erfassung von Substanzeffekten auf die neurale Differenzierung. Hierzu gehörte die Entwicklung eines standardisierbaren Differenzierungsprotokolls mit den im EST eingesetzten ES Zellen der Mauslinie D3 und die Charakterisierung der sich differenzierenden neuronalen Zellen anhand ihrer morphologischen, zellspezifischen und funktionellen Eigenschaften.

Schließlich wurden die molekularen Endpunkte für die Erfassung der kardialen und neuralen Differenzierung anhand von Referenzsubstanzen auf ihre potenzielle Einsatzmöglichkeit zur Erfassung von Substanzeffekten geprüft. Die molekularen Endpunkte mussten folgende Kriterien erfüllen: Erstens sollte der Endpunkt den jeweiligen Zielzelltyp repräsentieren, bei dem ein Substanzeffekt zu erwarten ist. Zweitens sollte es sich um einen stabilen Endpunkt handeln, der mittels Durchflusszytometrie quantitativ zu bestimmen ist. Drittens sollte anhand des molekularen Endpunkts ein Substanzeffekt in Form von reproduzierbaren Konzentrations-Wirkungskurven gemessen werden. In Bezug auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen sollte geklärt werden, ob der ausgewählte molekulare Endpunkt vergleichbare Werte zur mikroskopischen Analyse der Differenzierung im validierten EST liefert. Bei der Etablierung eines Endpunktes zur Erfassung der neuralen Differenzierung sollte die Frage geklärt werden, ob der molekulare Endpunkt für die Differenzierung von einem zytotoxischen Effekt auf die Differenzierung zu unterscheiden ist.

4.1 Weiterentwicklung des EST: Endpunkt Herzmuskelzellendifferenzierung

4.1.1 Analyse von molekularen Markern zur Erfassung der Differenzierung zu Herzmuskelzellen

Die Differenzierung von mES Zellen zu Herzmuskelzellen wurde nach der Methode, wie sie im validierten EST beschrieben wird, durchgeführt. In diesem Fall war keine weitere Protokollentwicklung notwendig. Die sich entwickelnden Herzmuskelzellen wurden anhand der skelettalen Muskelzellproteine MHC (*myosin heavy chain*) und α -Actinin immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen und der Anteil der Markerproteine im Durchflusszytometer über eine Zeit von bis zu 20 Tagen bestimmt. Während die Herzmuskelzellkontraktionen z.T. erst am zehnten Tag der Differenzierung mikroskopisch zu beobachten waren, ließen sich beide Markerproteine bereits am sechsten Differenzierungstag gut im Durchflusszytometer quantitativ bestimmen. Am stärksten ausgeprägt war das sarkomere MHC, gemessen anhand des Anteils an MHC-positiven von jeweils 10.000 registrierten Ereignissen (Abb. 8). α -Actinin wurde dagegen über die gesamte Analysezeit nur von einem geringeren Anteil an Zellen gebildet. Auf Grund der guten Auswertbarkeit

wurde entschieden, beide Marker als molekulare Endpunkte für die Substanztests einzusetzen. Der optimale Zeitpunkt für die Erfassung von Substanzeffekten war der Tag 7, an dem 17% MHC-positive Ereignisse und 4% α -Actinin-positive Ereignisse vorlagen. Das sarkomere MHC wurde auch in der Studie von Pellizer et al. (2004) als Endpunkt für die Messung von Substanzeffekten auf die Herzmuskelzellendifferenzierung eingesetzt. Hier wurden mittels RT-PCR-Analysen die Hemmung der Expression der Markergene α -MHC und Nkx2.5 durch teratogene Substanzen erfasst.

Die Differenzierung von mES Zellen zu Herzmuskelzellen wurde in vielen Arbeiten beschrieben. Mit Hilfe von elektrophysiologischen Methoden und dem Nachweis spezifischer Gene konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die differenzierten Kardiomyocyten charakteristische Eigenschaften von atrialen, ventrikulären, Purkinje- und Schrittmacherzellen aufweisen (Sachinidis et al., 2003; Wobus et al., 1997; Hescheler et al., 1997; Maltsev et al., 1994). Sarkomere Proteine, wie sie hier anhand der molekularen Marker MHC und α -Actinin nachgewiesen wurden, werden auch in Skelettmuskelzellen gebildet. Jedoch konnte die Differenzierung zu Skelettmuskelzellen an dem gemessenen Differenzierungszeitpunkt (Tag 7) ausgeschlossen werden. Zum einen konnten Skelettmuskelzellen zum Zeitpunkt der Herzmuskelzellkontraktionen (Tag 7 bis 14) mit einem spezifischen Antikörper My-32 gegen das skelettale Muskelzellprotein MHC nicht nachgewiesen werden. Zum anderen waren Skelettmuskelzellen - wenn sie überhaupt differenzierten - morphologisch erst nach ungefähr drei Wochen der Differenzierung in den Kulturen zu beobachten. Dieser Zeitpunkt stimmt gut mit der Untersuchung von Guan et al. (1999) überein, in der quantitative Analysen zur Differenzierung von Skelettmuskelzellen mit mES Zellen der Mauslinie D3 durchgeführt wurden.

4.1.2 Evaluierung der Endpunkte für die Herzmuskelzellendifferenzierung anhand von Substanztests

Für die standardpositive Substanz **5-Fluorouracil (5-FU)** wurden mit den molekularen Markern MHC und α -Actinin ID_{50} -Werte im Bereich von 0,041 - 0,079 $\mu\text{g/ml}$ (0,3 - 0,6 μM) ermittelt (Abb. 9). Im gleichen Konzentrationsbereich lagen auch die hier gemessenen ID_{50} -Werte für die mikroskopische Analyse der Herzmuskelzellen. Sie stimmen mit den Daten aus der EST-Validierungsstudie

überein (Genschow et al., 2004; 2002). Werden die ID₅₀-Werte für die molekularen Endpunkte gemittelt und mit den im ZEBET-Labor im EST gewonnenen Ergebnissen der Zytotoxizitätstests für D3 und 3T3 (IC₅₀-Werte D3 und 3T3) mit Hilfe des Prädiktionsmodells berechnet, ergibt sich für 5-FU die korrekte Einstufung „stark embryotoxisch“ (veröffentlicht in Seiler et al., 2004). 5-FU wirkt als Zytostatikum *in vivo* primär zytotoxisch und führt während der Embryogenese zu diversen entwicklungshemmenden Effekten (Lau et al., 2001; Shuey et al., 1994).

Für die stark embryotoxische Substanz **all-trans Retinsäure (RA)** wurden anhand der molekularen Endpunkte ID₅₀-Werte zwischen 0,1 und 0,4 ng/ml (3,32 - 13,31 x 10⁻⁷ mM) Substanz ermittelt (Abb. 10). Sie unterschieden sich ebenfalls nicht von den ID₅₀-Werten, die mittels der mikroskopischen Analyse bestimmt wurden. Auch stimmten sie mit den Daten aus der EST-Validierungsstudie überein (Genschow et al., 2004; 2002). Unter Einbeziehung der im ZEBET-Labor gemessenen IC₅₀-Werte anhand der Zytotoxizitätstests für D3 und 3T3, wird RA mittels Prädiktionsmodell korrekt in die Embryotoxizitätsklasse „stark embryotoxisch“ eingestuft (veröffentlicht in Seiler et al., 2004). Am Beispiel der Messung von RA lässt sich erkennen, dass anhand der molekularen Endpunkte auch stimulierende Effekte erfassbar sind. Hier zeigten die Kurven für die molekularen Endpunkte MHC und α-Actinin z.T. einen Anstieg bei RA-Konzentrationen zwischen 0,02 und 0,06 ng/ml (0,09 – 0,18 nM). Im gleichen Konzentrationsbereich wurde ein solcher Effekt auch in einer Studie mit mES Zellen anhand der Messung der herzmuskelzellspezifischen MHC und MLC-2v (*myosin light chain 2v*) mRNA beobachtet, welcher mit einer Stimulierung der Differenzierung von ventrikulären Herzzellen in Zusammenhang gebracht wurde (Wobus et al., 1997). Auch einige andere Untersuchungen mit ES Zellen zeigten, dass RA die Herzmuskelzeldifferenzierung dosis- und zeitabhängig moduliert (Gassanov et al., 2008; Hidaki et al., 2003; Rohwedel et al., 1999). Darüber hinaus wurden dosis- und zeitabhängige RA-Effekte auch *in vivo* u.a. bei der embryonalen Entwicklung des Hühnerherzens beschrieben (Sinning, 1998; Dickman and Smith, 1996; Osmond et al., 1991). Sie reichen vom Einfluss auf die Kardiomyozyten-differenzierung bis hin zu Störungen bei der Entwicklung von Herzschleife und Herzkammern.

Bei der nicht embryotoxischen Substanz **Penicillin G (PenG)** streuten die ID₅₀-Werte für die molekularen Endpunkte MHC und α-Actinin zwischen 500 und 1800

$\mu\text{g/ml}$ (1,4 - 5 μM ; Abb. 11). Diese Streuung der Daten zeigte sich auch bei der mikroskopischen Analyse, jedoch wich hier nur ein Versuch mit 730 $\mu\text{g/ml}$ von den beiden anderen, welche bei Werten um die 1600 $\mu\text{g/ml}$ lagen, stark ab. Eine Ursache für die Varianz könnte darin liegen, dass die Zellen in solch hohen Substanzkonzentrationen zusätzlich durch andere, weniger spezifische Effekte, wie z.B. eine Störung der Proteinbiosynthese beeinflusst wurden. In der EST-Validierungsstudie wurden anhand der mikroskopischen Analyse ID_{50} -Werte > 1000 $\mu\text{g/ml}$ PenG gemessen. Auch in neueren Studien zum EST wurden sowohl für den molekularen Endpunkt MHC als auch für die mikroskopische Auswertung niedrigere Varianzen sowie keine Effekte unter 1000 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet (Buesen et al., 2009; Peters et al., 2008). Werden die hier ermittelten Werte für die molekularen Endpunkte gemittelt und mit den Ergebnissen aus den Zytotoxizitätstests für D3 und 3T3 (IC_{50} -Werte für D3 und 3T3) nach dem Prädiktionsmodell berechnet, ergibt sich für PenG die korrekte Einstufung in die Klasse „nicht embryotoxisch“ (veröffentlicht in Seiler et al., 2004). Das Antibiotikum ist plazentagängig, jedoch wurden bislang weder beim Menschen noch im Tierversuch mit PenG teratogene Effekte beobachtet (Nahum et al., 2006; Brown, 2002).

4.1.3 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit den molekularen Endpunkten für die Herzmuskelzellendifferenzierung meist vergleichbare Konzentrations-Wirkungskurven und in allen Fällen gut übereinstimmende ID_{50} -Werte zum Endpunkt der mikroskopischen Analyse erzielt werden. Vorteilhaft ist hier die Reduktion der Testdauer von zehn Tagen für den validierten EST auf sieben Tage für den molekularen Endpunkt. Darauf aufbauend wurden im ZEBET-Labor weitere Substanzen, wie z.B. 6-Amino-Nicotinamid, Cytosin- β -D-Arabinofuranosid, 5,5-Diphenylhydantoin und Lithiumchlorid zur Erweiterung der Datenbasis getestet und das hier beschriebene Ergebnis bestätigt (Büsen et al., 2009).

Der Vorteil für den Einsatz von molekularen Endpunkten liegt in der Möglichkeit zur objektiveren Quantifizierung der Versuchsergebnisse und einem möglichen Einsatz im Hochdurchsatzverfahren. Zudem lassen sich neben hemmenden auch stimulierende Substanzeffekte quantitativ erfassen. Ähnliche Bemühungen zur Standardisierung des EST wurden auch in anderen weiterführenden Studien verfolgt. So wurde als molekularer Marker die Expression der

herzmuskelspezifischen Gene MesP1 und MLC1 mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Anhand von 11 Substanzen konnte gezeigt werden, dass mit den molekularen Endpunkten bis auf wenige Ausnahmen eine ähnliche Sensitivität im Vergleich zur mikroskopischen Auswertung erreicht wurde (Kaltenhäuser, 2006). Peters et al. (2008) konnten zeigen, dass auch eine automatisierte mikroskopische Erfassung und Berechnung der kontraktile Fläche sowie Frequenz der Herzmuskelzellkontraktionen die herkömmliche mikroskopische Erfassung ersetzen kann.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass eine direkte Extrapolation der *in vitro* Daten auf Ergebnisse aus dem Tierversuch und die Übertragung der Daten auf den Menschen nur eingeschränkt möglich ist. Meist werden die Substanzen für *in vitro* Versuche in serumhaltigem Medium gelöst, wie z.B. im EST in Medium mit 15% FCS. Je nach Eigenschaft liegen die Substanzen dann unterschiedlich stark an Serumproteine gebunden vor und sind somit für die Zellen unterschiedlich gut verfügbar. Auch im Tierversuch oder im menschlichen Organismus werden Substanzen je nach Eigenschaft unterschiedlich an Gewebe und Blutplasmae Proteine gebunden. Zudem müssen für den Gesamtorganismus weitere toxikokinetische Aspekte, wie z.B. die Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung der Substanzen berücksichtigt werden. Schließlich spielen auch die Speziesunterschiede, wie z.B. die Dauer der Embryonalentwicklung und die unterschiedliche Ausstattung an metabolischen Systemen bei der Extrapolation von *in vitro* auf *in vivo* Daten eine wichtige Rolle.

Um diesen Unsicherheiten zu begegnen, werden für *in vitro* Testsysteme Vorhersagemodelle entwickelt und zur Überbrückung von Speziesunterschieden, insbesondere für die Vorhersage auf den Menschen, Sicherheitsfaktoren in die Kalkulationen einbezogen. Einen interessanten Modellansatz schlagen Verwei et al. (2006) zur Extrapolation der *in vitro* Daten aus dem EST auf die *in vivo* Situation vor. Diese wird in einem zweistufigen Prozess durchgeführt: Im ersten Schritt wird die relevante ungebundene Plasmakonzentration - welche mit dem *in vitro* Effekt im Zusammenhang steht - nach dem Extrapolationsmodell von Gülden und Seibert (2003) ermittelt. Zu diesem Zweck werden die Substanzen in Abhängigkeit ihrer *in vitro* Embryotoxizität („niedrig“ bei $ID_{50} > 1000$ oder „hoch“ bei $ID_{50} < 1000$) und lipophilen Eigenschaft („niedrig“ bei $\log_{Kow} < 2$ oder „hoch“ bei $\log_{Kow} > 2$) in vier Gruppen eingestuft. Zu jeder Gruppe gehört eine spezifische Extrapolations-Regel. So werden die ID_{50} -Werte für die Substanzen aus dem EST nach jeweils einer von den vier Extrapolations-Regeln korrigiert, welche z.B. eine Korrektur der

Lipidfraktion des Mediums und/oder des Albumin-gebundenen Anteils einbezieht. Im zweiten Schritt werden die daraus resultierenden Daten für die Plasmakonzentration (ECplasma) mittels computergestützter Simulation nach einem physiologisch basierten pharmakokinetischen Model (PBPK-Model) umgerechnet und können dann mit den Ergebnissen aus den Tierstudien direkt verglichen werden. Dieses Extrapolationsmodell wurde in der Arbeit von Verwei et al. (2006) für sieben im EST getesteten Substanzen angewendet. Für die meisten Substanzen, wie z.B. für RA und Methotrexat führte die *in vitro* - *in vivo* Extrapolation zu korrekten Vorhersagen. Zwei Substanzen wurden aufgrund der fehlenden metabolischen Kapazität des EST unterbewertet (2-Methoxyethanol und 2-Ethoxy-methanol). 5-FU wurde jedoch überbewertet. In diesem Zusammenhang schlagen die Autoren vor, das Modell um die Berücksichtigung von weiteren möglichen Einflussfaktoren, wie z.B. die Folatkonzentration des Mediums, zu erweitern.

4.2 Weiterentwicklung des EST: Endpunkt neurale Differenzierung

4.2.1 Entwicklung eines standardisierbaren Protokolls

Im Fokus der Arbeit zum Endpunkt neuronale Differenzierung stand zunächst die Entwicklung eines möglichst einfachen, standardisierbaren Differenzierungsprotokolls, welches sich als Grundlage zum Testen von Substanzen eignet. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Differenzierung ein Prozess ist, welcher stark von extrinsischen Faktoren, wie z.B. Medium, Wachstumsfaktoren und der extrazellulären Matrix abhängig ist. Ausgehend von der Methode von Ying et al (2003) zur Monolayerdifferenzierung wurde im Rahmen der Arbeit zunächst das Gelatine-Protokoll entwickelt, anhand dessen auch die meisten Substanztests durchgeführt wurden. Über die Zeit haben Optimierungsschritte zu einem weiteren Protokoll, dem PLO-Protokoll geführt, welches zu einer Verbesserung der Ausbeute an neuronalen Zellen führte.

Eine wichtige Voraussetzung bei der Etablierung eines geeigneten Protokolls für die Erfassung von Substanzeffekten auf die Differenzierung war, die Zellen während der Differenzierung unter Substanzzugabe nicht mehr enzymatisch abzulösen und auf neue Zellkulturplatten umzusetzen. Das Protokoll sollte einen möglichst

störungsfreien Testablauf garantieren, da ein Umsetzen der Zellen den Differenzierungsprozess beeinflusst und so den Substanzeffekt maskieren kann. Allerdings wird bei den meisten Differenzierungsprotokollen eine Replattierung der Zellen zur Selektion und Expansion sowie zur Unterstützung der neuronalen Differenzierung empfohlen. In den Protokollen von Okabe et al. (1996) und Ying et al. (2003) beispielsweise werden die Zellen nach 6 - 8 Tagen dissoziiert und in verminderter Zellzahl neu ausgesät, entweder auf Poly-Ornithin/Laminin-beschichteten Platten und unter Zugabe von bFGF (Okabe) oder auf Fibronectin-beschichteten Platten (Ying). Im ersteren Fall diente die Replattierung der Expansion von neuronalen Progenitorzellen, im letzteren Fall der terminalen Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen. Um auf ein Umsetzen der Zellen verzichten zu können, galt bei der Protokollentwicklung den Einflussfaktoren ausgesäte Zellzahl, Mediumzusammensetzung und Beschichtungsform eine besondere Aufmerksamkeit.

a) Einfluss der Zellzahl

Ein entscheidender Faktor für eine effektive Differenzierung ist die ausgesäte Zellzahl zu Beginn der Differenzierung. Demnach war es notwendig, unter Berücksichtigung der Differenzierungsdauer, die optimale Zellzahl für die Zellaussaat am Tag 1 der Differenzierung zu ermitteln. Eine zu hohe Zelldichte führte sehr bald zu konfluent bewachsenen Platten und es zeigte sich, dass dann die Ausbeute an MAP2-positiven Neuronen deutlich sank. Dieses Wachstumsverhalten machte sich vor allem bei den Zellen bemerkbar, die auf Gelatine-beschichteten Plattenböden ausgesät wurden (Abb. 31/A, B). Dass eine zu hohe Zelldichte eine erhöhte Ausschüttung mitogener Faktoren und zu enge Zell-Zellkontakte eine Hemmung der Differenzierung nach sich ziehen können, haben auch Ying et al. (2003) beschrieben. Ein entscheidender kontaktregulierter Prozess der Neurogenese ist beispielsweise der Wnt/ β -Catenin Signalweg. Wird die neurale Differenzierung bei hoher Zelldichte induziert, kommt es zur Inhibierung des Signalwegs und zur Hemmung der neuronalen Differenzierung (Otero et al., 2004). Eine zu gering ausgesäte Zellzahl hingegen verhinderte die Bildung von Aggregaten. Dies wurde vor allem bei den Zellen beobachtet, die auf PLO-beschichteten Plattenböden ausgesät wurden. Offensichtlich war eine minimale Dichte notwendig, damit die Zellen aggregieren konnten (Auf die Bedeutung des

Aggregierens wird in Kapitel 4.2.2 näher eingegangen). Schließlich wurden am Tag 1 der Differenzierung für das Gelatine-Protokoll $3,6 \times 10^3$ Zellen/cm² und für das PLO-Protokoll $7,7 \times 10^3$ Zellen/cm² ausgesät. Da jedoch das Wachstum von mES Zellen während der Differenzierung je nach Zellklon und Zelltyp unterschiedlich ausfallen kann, sollte bei der Etablierung eines solchen Testsystems in anderen Laboren immer zunächst die optimale Zellzahl für die Zellaussaat empirisch ermittelt werden.

b) Einfluss der Beschichtung

Von wesentlicher Bedeutung für den Erfolg der neuronalen Differenzierung war die Beschichtungsform der Zellkulturplatten. In den vorliegenden Untersuchungen zeigte es sich, dass die mES Zellen auf Gelatine-beschichteten Platten sowohl in Form von Aggregaten, als auch als Einzelzellen sehr gut anwachsen konnten. Mikroskopische Beobachtungen ließen die Vermutung zu, dass auf Gelatine auch viele nicht-neuronale Zellen in den Kulturen vorhanden und diese demnach sehr heterogen waren. Die durchflusszytometrische Analyse bestätigte dies. Während der Kultivierung der Zellen nach dem Gelatine-Protokoll über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen wurde bei keinem der neuronalen Marker MAP2, β -Tubulin III und α -Internexin der Anteil von 15% Antigen-positiven von 10.000 gemessenen Ereignissen im Durchflusszytometer überschritten (Abb. 29/A). Dagegen ermittelten Okabe et al. (1996) nach dem Replattieren von mES Zellen der Linie J1 zwischen den Differenzierungstagen 7 und 11 mehr als 60% MAP2-positive Zellen. Auch Ying et al. (2003) fanden nach dem Replattieren von transgenen mES Zellen (Sox1-GFP) ~60% Tau-GFP-positive Zellen. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten ab Tag 16 eine deutliche Zunahme von Astrozyten in den Kulturen, die auf Gelatine-beschichteten Platten differenziert wurden. Am Tag 30 lag der Anteil an GFAP-positiven Zellen bereits über 25% (Abb. 29/B). Das deutet darauf hin, dass sich zum Zeitpunkt der neuronalen Differenzierung gleichzeitig auch Astrozyten-Vorläuferzellen entwickelt hatten. Das Vorhandensein von Radialgliazellen, wie sie in den Kulturen detektiert wurden (Abb. 18), bestätigt diese Annahme. Radialgliazellen können sich sowohl in Neuronen als auch in faserige Astrozyten des Typs 1 ausdifferenzieren (Malatesta et al., 2008; Levinson et al., 2005). Sie sind nicht durch die Bildung der Strukturproteine MAP2, β -Tubulin III oder α -Internexin charakterisiert, jedoch durch die Vorläuferzellmarker Nestin und Pax6 (Götz und Barde, 2005). Diese Marker wurden auch in den hier untersuchten Kulturen, die

sowohl auf Gelatine-beschichteten als auch auf PLO-beschichteten Platten kultiviert wurden, nachgewiesen (Abb. 16 und 17). Dies lässt vermuten, dass die Heterogenität der Kulturen auf den Gelatine-beschichteten Platten vor allem aus dem Vorhandensein von diversen Vorläuferzellen (Neuroepithelialzellen, Radialgliazellen) sowie reifenden neuronalen Zellen resultiert. Ab dem Tag 16 entwickelten sich schließlich aus den Vorläuferzellen zunehmend die Astrozyten und zu einem geringen Anteil die Oligodendrozyten (Abb. 22, 39/B und 33/A).

In mehreren Arbeiten wurde der Einfluss unterschiedlicher matrixgebender Substrate, insbesondere von Gelatine, PLO, Laminin und Fibronectin auf die Differenzierung von mES Zellen untersucht (Goetz et al., 2006; Andressen et al., 2005; Ying et al., 2003; Okabe et al., 1996). Daran anlehnend wurden auch im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten zur Protokollentwicklung neben Gelatine weitere Beschichtungsformen erprobt. Die Aussaat der Zellen auf PLO-beschichteten Platten und Zugabe von Laminin brachte dabei eine deutliche Verbesserung für die neuronale Differenzierung. Mikroskopisch war zu erkennen, dass auf PLO eine stärkere Selektion von Zellen stattfand. Nur die Zellen, die Aggregate bildeten, konnten sich auf PLO-beschichteter Matrix weiterentwickeln (Abb. 14). Dies schränkte das Wachstum einer Vielzahl an nicht-neuronalen Zellen weiter stark ein. Zudem steigerte ein geringer Prozentsatz an Serum (0,2%) im Medium am ersten Tag der Differenzierung den Erfolg der Aggregatbildung deutlich. Unter der Zugabe von Laminin zwischen Tag 1 und Tag 7 zeigten die Neuriten ein stringenteres, radial ausgerichtetes Längenwachstum (Abb. 15). Die quantitative Analyse zwischen Tag 12 und Tag 16 der Differenzierung ergab einen Gehalt von über 20% MAP2-positiven Ereignissen (Abb. 33/A). Allerdings entwickelten sich zum späteren Zeitpunkt auf PLO-beschichteten Platten weniger Gliazellen. In einer weiteren Untersuchung unter Zugabe von Fibronectin als Substrat konnte gezeigt werden, dass zwar das Wachstum der Zellen durch Fibronectin insgesamt verbessert wurde, jedoch der relative Gehalt an MAP2-positiven Ereignissen mit Zunahme der Fibronectin-Konzentration stark abnahm. Bei 5 µg/ml Fibronectin sank der MAP2-Gehalt am Tag 12 auf unter 10%, bei 10 µg/ml auf unter 5% (Abb. 36).

Festzustellen bleibt, dass beide Protokoll-Varianten, Gelatine- und PLO-Beschichtung, die Differenzierung der mES Zellen zu Neuronen- und Astrozyten fördern. Jedoch unterstützt das Gelatine-Protokoll mehr die Differenzierung zu Astrozyten, während das PLO-Protokoll die neuronale Differenzierung fördert. In Bezug auf die Subtyppendifferenzierung konnte jedoch anhand der immunfluores-

zenzmikroskopischen Untersuchungen kein qualitativer Unterscheid zwischen den beiden Protokollvarianten ermittelt werden. Auch konnte anhand der Substanztests mit VPA gezeigt werden, dass beide Protokolle zu gleichen ID₅₀-Werte für VPA führten (Abb. 42).

Die Beobachtungen bezüglich des Einflusses der Beschichtung stimmen weitgehend mit den Ergebnissen anderer Arbeiten überein. In den Untersuchungen von Goetz et al. (2006) mit mES Zellen der Linie R1 wurde systematisch der Effekt unterschiedlicher Substrate auf die Differenzierung von neuronalen Progenitorzellen sowie von Neuronen und Gliazellen untersucht. Die höchste Zelldichte an neuronalen Vorläuferzellen wurde auf PLO/Laminin-Substrat erzielt. Auf Plastik-, Gelatine und Fibronectin-Substrat entwickelten sich mehr nicht-neuronale Phänotypen. Die neuronale Differenzierung wurde ebenfalls durch die Kombination PLO/Laminin unterstützt. Gelatine verstärkte die gliale Differenzierung um das Zweifache im Vergleich zur Differenzierung auf PLO/Laminin. Andere Untersuchungen mit D3 Zellen - welche zunächst in Form von EBs kultiviert und anschließend auf unterschiedliche Substrate ausgesät wurden - zeigten, dass die Substrate Laminin und Fibronectin im Vergleich zu Gelatine die Migration und Differenzierung von neuronalen Zellen deutlich erhöhten. Dies geschieht hauptsächlich durch die Interaktion mit der extrazellulären Matrix über das β 1-Integrin Rezeptormolekül der Zellen und den daran gekoppelten Signalmechanismen (Andressen, 2005). Ein weiteres wichtiges Oberflächenmolekül, welches an der Interaktion der Zellen mit der Matrixoberfläche sowie angrenzenden Zellen beteiligt ist, ist das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM. Eigene Untersuchungen zeigten, dass die differenzierten Zellen NCAM bildeten (Abb. 19). Im sich entwickelnden Gehirn ist NCAM an der Migration, dem Axonwachstum und der Axon-Faszikulierung beteiligt (Hansen et al., 2008; Kunz et al., 1996). Letzteres bedeutet, dass sich wachsende Axone beim Entlangwandern auf bestimmten, durch permissive Substrate wie z.B. Laminin gebildeten Bahnen durch NCAM-Moleküle miteinander verbinden. Dieses Phänomen konnte auch bei den sich hier differenzierenden mES Zellen beobachtet werden. Deutlich traten gebündelte neuronale Zellfortsätze aus den Zellaggregaten hervor (Abb. 21).

C) Einfluss des Mediums und des Wachstumsfaktors bFGF

Für die Differenzierung wurde ein Medium verwendet, welches zu gleichen Teilen aus DMEM/F12 mit N2 Supplementen und Neurobasalmedium mit B27-Supplementen zusammensetzt war. Diese Medienkomponenten wurden bereits in vielen Arbeiten für die neurale Differenzierung mit unterschiedlichen Zellsystemen eingesetzt (Otero et al., 2004; Nakayama et al., 2004; Ying et al., 2003; Kim et al., 2003; O'Shea, 2002). Unter anderem wurde festgestellt, dass der N2-Anteil mehr die neuronale Differenzierung und der B27-Anteil mehr die Zellviabilität und die Zelladhäsion fördert (Ying et al., 2003). Eigene Untersuchungen mit Zellen, die auf PLO-beschichteten Platten differenziert wurden haben ergeben, dass ein Anstieg des N2-Anteils auf 70% und somit eine Reduktion des B27-Anteils auf 30% sowohl auf die Differenzierung als auch auf das Wachstum einen positiven Einfluss haben könnte (Abb. 34/B). Dieses konnte im Rahmen der Arbeit jedoch nicht mehr weiter untersucht und im Differenzierungsprotokoll berücksichtigt werden, könnte jedoch für nachfolgende Testoptimierungen von Interesse sein.

Da auf ein Replattieren der Zellen verzichtet wurde, war es notwendig, die Proliferation von Vorläuferzellen durch die Zugabe des Wachstumshormons bFGF ab Tag 8 der Differenzierung zu stimulieren (Okabe et al., 1996). In einigen Arbeiten wurde jedoch eine hemmende Wirkung des Wachstumsfaktors auf die terminale neuronale Differenzierung beschrieben (Zhang et al., 2006; Okabe et al., 1996). In Vorversuchen konnte im ZEBET-Labor durch die Zugabe von bFGF am achten Tag der Differenzierung (bFGF/d8) ein positiver Effekt auf die Proliferation der Vorläuferzellen beobachtet werden. Darüber hinaus zeigen die hier dargestellten Untersuchungen anhand beider Protokollvarianten (Gelatine- und PLO-Protokoll), dass eine kontinuierlichen Zugabe von bFGF von Tag 8 an bis zum Auswertetag 12 (bFGF/d8-12) im Vergleich zu einer einmaligen Zugabe von bFGF (bFGF/d8) auf die Differenzierung von MAP2-positiven Neuronen keinen relevanten Einfluss hatte. Wurden die Zellen jedoch mit bFGF von Tag 8 an bis zum Auswertetag 21 (bFGF/d8-21) stimuliert, wirkte sich die Zugabe sowohl auf den gemessenen Anteil an MAP2- als auch an GFAP-positiven Ereignissen positiv aus. Im Vergleich zur einmaligen Stimulation mit bFGF (bFGF/d8) wurden nach der kontinuierlichen Zugabe von bFGF (bFGF/d8-21) am Auswertetag 21 ca. doppelt so viele Neuronen und Gliazellen in den Kulturen gemessen (Abb. 32 und Abb. 35). Eine Erklärung könnte sein, dass in diesem Zellsystem die Differenzierung zu Neuronen verstärkt über die Differenzierung von Radialgliazellen stattfand. Ein Hinweis darauf lässt sich

der Arbeit von Conti et al. (2005) entnehmen. Die Differenzierung der mES Zellen zu Progenitorzellen erfolgte hier über die Bildung von frei schwebenden Neurosphären und unter kontinuierlicher Zugabe der Wachstumsfaktoren FGF2 (*fibroblast growth factor 2*, auch bFGF genannt) und EGF (*epidermal growth factor*). Die so expandierten Radialgliazellen behielten auch über eine längere Zeit hinweg die Eigenschaft, in hohem Maße zu Neuronen und Gliazellen zu differenzieren. Dass bFGF die Differenzierung sowohl zu Astrozyten als auch zu Oligodendrozyten fördert, wurde auch in einigen Übersichtsarbeiten beschrieben (Levinson et al., 2005; Deng et al., 2003).

Abschließend bleibt zur Protokollentwicklung zu erwähnen, dass die Differenzierung der mES Zellen einerseits durch die Medienzusammensetzung und die Überführung der Zellen auf speziell beschichtete Kulturplatten und andererseits auch durch den Entzug von LIF und Serum eingeleitet wurde. Unter dem so entstandenen Selektionsdruck kam es in den Kulturen während der ersten Differenzierungstage zum erwarteten Absterben vieler nicht differenzierender Zellen. Am stärksten war der Effekt bei den mES Zellen, die auf PLO-beschichteten Plattenböden ausgesät wurden. Dass die neurale Differenzierung von einem hohen Zellsterben begleitet wird, wurde auch in der Arbeit von Ying et al. (2003) beschrieben. Weiterführende laborinterne Untersuchungen mit mES Zellen, die nach dem PLO-Protokoll differenziert wurden, haben auch gezeigt, dass über die gesamte Entwicklungszeit (gemessen zwischen 9 und 19 Tagen) eine hohe Apoptoserate – erfasst anhand der Caspaseaktivität – in den Kulturen vorherrschte (Sittner, 2008).

4.2.2 Analyse der Differenzierung

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich während der voranschreitenden neuralen Differenzierung sukzessiv und zeitlich gestaffelt zuerst Progenitorzellen, dann Neuronen und zuletzt Gliazellen bildeten, analog zu den Prozessen der Neurogenese im Gehirn. Auch während der Entwicklung des Gehirns erfolgt die Differenzierung von Vorläuferzellen und reifen Gehirnzellen nach einem zeitlich und örtlich fein regulierten, aufeinander abgestimmten und abgestuften Muster. So differenzieren sich beispielsweise Progenitorzellen nicht simultan, sondern werden u.a. durch eine sog. „*Feedback Autoregulation*“ lateral inhibiert (Vetter et al., 2005).

Der Übergang von undifferenzierten D3 mES Zellen zu neuronalen Zellen geschah vor allem über die spontane Bildung von Zellaggregaten, was im Gegensatz zu der beschriebenen Monolayerkultur steht (Ying et al., 2003). Die Aggregatbildung scheint bei den hier verwendeten D3-Zellen ein elementarer Vorgang für die neurale Differenzierung zu sein und wurde vor allem durch die PLO-Matrix stärker begünstigt. Wenn aus den Aggregaten neurale Zellen herauswachsen, wie in dieser Arbeit mikroskopisch zu beobachten war (Abb. 14), werden die Aggregate auch als „Neurosphären“ bezeichnet. Über die Rolle von Zell-Zell-Kontakten in den Neurosphären wurde bereits viel diskutiert. Man vermutet, dass Neurosphären wie eigenständige Ökosysteme eine Nische für eine spezielle Umwelt bilden, in der die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen stattfinden kann (Armando et al., 2007). Es handelt sich dabei um heterogene Strukturen von sowohl undifferenzierten, wie auch differenzierten neuronalen Zellen. Sie sind reich an Oberflächenmolekülen, β 1-Integrinen, EGFR (*epidermal growth factor receptor*) und Cadherinen, die für eine verstärkte Aufnahme von auto- und parakrinen Faktoren sprechen. Jedoch sind die genauen Regulationsmechanismen weitgehend unbekannt (Armando et al., 2007; Campos, 2004). In dieser Arbeit konnte anhand immunfluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen gezeigt werden, dass in den Neurosphären Nestin- und Pax6-positive Zellen vorhanden waren (Abb. 16 und 17). Hierbei handelt es sich um Marker, die sowohl in neuroepithelialen Zellen, als auch in Radialgliazellen gebildet werden (Osumi et al., 2008; Bibel et al., 2004). Letzterer Vorläufertyp konnte in den hier differenzierten Kulturen auch durch den Antikörper RC2 immunfluoreszenzmikroskopisch am Tag 19 der Differenzierung nachgewiesen werden (Abb. 18). Laborinterne Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass RC2-positive Zellen bereits am achten Tag der Differenzierung nachzuweisen sind. Neuronale Vorläuferzellen spielen bei der Entwicklung des Gehirns eine zentrale Rolle. Sie sind multipotent und können sich in Abhängigkeit von Ort und Zeit sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch teilen. Untersuchungen mit neuronalen Stammzellen haben ergeben, dass bei der symmetrischen Teilung beide Tochterzellen Nestin-positiv sind. Erfolgt die Teilung asymmetrisch, so ist die identische Tochterzelle Nestin-positiv und die andere, nichtidentische Tochterzelle Nestin-negativ (Campos, 2004). Der Transkriptionsfaktor Pax6 fördert die asymmetrische neurogenetische Zellteilung (Götz et al., 2005). Er gilt als wichtiger Regulator für die Genexpression in Downstream-Prozessen, die bei der Gehirnentwicklung u.a. bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Adhäsion

beteiligt sind (Osumi et al., 2008). In den hier durchgeführten Experimenten waren um den Tag 9 herum Zellen zu beobachten, die typische Rosettenstrukturen bildeten und durch Pax6 angefärbt wurden (Abb. 16). Dies zeigte sich auch in anderen Arbeiten bei der Differenzierung von humanen und Maus ES Zellen (Elkabetz et al., 2008; Wilson und Stice, 2006; Ying et al., 2003).

Die Bildung der Neurosphären war entscheidend von der Zellaussaat am Tag 1 der Differenzierung abhängig. Jedoch variierten Anzahl und Größe der Aggregate trotz gleichbleibender Zellzahl bei der Aussaat am Tag 1. Weiterführende Untersuchungen im ZEBET-Labor haben ergeben, dass die Aggregatbildung auf kleineren Plattenformaten einheitlicher verläuft. Eine mögliche Erklärung könnte eine verminderte Beweglichkeit der Aggregate und eine günstigere Verteilung auto- und parakriner Faktoren sein (Sittner, 2008). Zudem würden kleinere Plattenformate die Messung im Hochdurchsatzverfahren wesentlich erleichtern.

Terminal differenzierte Neuronen wurden anhand der neuronalen Strukturproteine MAP2, β -Tubulin III, α -Internexin (Abb. 21) und des nukleären Proteins NeuN immunfluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht (Abb. 20). Quantitativ ließen sich die Strukturproteine bereits am siebten Tag der Differenzierung bestimmen. Gliazellen entwickelten sich ab Tag 16 der Differenzierung, wobei die Entwicklung zu Astrozyten dominierte und nur ein sehr geringer Prozentsatz während des Beobachtungszeitraums von 30 Tagen zu Oligodendrozyten differenzierte. Anhand von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen war es möglich, unterschiedliche neuronale Subtypen in den sich differenzierenden Kulturen zu detektieren. Bereits am Tag 9 der Differenzierung wurden viele GABA-positive neuronale Zellen identifiziert (Abb. 24, Oben). Etwas später entwickelten sich auch Serotonin-bildende Neuronen (Abb. 24, Mitte). Nur vereinzelt waren Tyrosin Hydroxylase-positive Neuronen nachzuweisen (Abb. 24, Unten), die darauf schließen ließen, dass wenige Dopamin-bildende Neuronen in den Kulturen differenzierten. Diese Ergebnisse wurden mit beiden Protokollvarianten erzielt. Ein ähnliches Subtyppendifferenzierungsmuster wurde auch in der Arbeit von Ying et al. (2003) beschrieben. Eine Erklärung könnte sein, dass FGF2 die Proliferation von GABAergen Progenitorzellen fördert und die Proliferation von Dopamin-bildenden Neuronen hemmt (Zhang et al., 2006).

Folgende Resultate wiesen darauf hin, dass die differenzierten neuronalen Zellen eine funktionale Reife erlangten: die Zellen bildeten synaptische Vesikel, exprimierten unterschiedliche Neurotransmitter und reagierten nach Stimulierung durch unterschiedliche Agonisten mit einem kurzzeitigen Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} , welches auf das Vorhandensein spezifischer Rezeptoren hindeutete. Durch deren Aktivierung kommt es entweder direkt über den Rezeptor (transmitterabhängige Ionenkanäle) oder indirekt über Rezeptor-gekoppelte Signalwege (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) zu einem Einstrom von Ca^{2+} in den zytoplasmatischen Raum und somit zu einem kurzzeitigen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen. Im Allgemeinen sind Ca^{2+} -Signale bei der Informationsweiterleitung zum Zellkern beteiligt und spielen auch bei der Freisetzung von Neurotransmittern eine wichtige Rolle.

Um zu prüfen, ob die Zellen spezifisch auf Neurotransmitter reagierten, wurden am Tag 20 der Differenzierung anhand von Ca^{2+} -Imaging Untersuchungen intrazelluläre Ca^{2+} -Antwortsignale gemessen. Wie erwartet wurden spontane Ca^{2+} -Signale in Einzelzellen beobachtet, da Ca^{2+} ein ubiquitärer Second Messenger ist. Insbesondere intrazelluläre Differenzierungsvorgänge gehen mit der Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskaden einher (Spitzer et al., 2006). Zeigen neuronale oder gliale Zellen spontan Ca^{2+} -Signale, dann stammt das Ca^{2+} aus der Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (Trinh et al., 2006; Fiacco und McCarthy, 2006; Spitzer et al., 2004). Auch in undifferenzierten mES Zellen wurden spontane Ca^{2+} -Oszillationen gemessen, die durch Zellzyklusvorgänge verursacht wurden und deren Ca^{2+} aus intrazellulären Kompartimenten freigesetzt wurde (Kapur et al., 2007). Neben den beobachteten spontanen Ca^{2+} -Signalen zeigten hier die Zellen nach der Zugabe eines Agonisten synchrone Ca^{2+} -Antwortsignale. So waren in allen durchgeführten Versuchen Subpopulationen zu beobachten, die auf Glutamat, NMDA, AMPA oder Dopamin mit einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg reagierten (Abb. 25-28). Die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren generiert jedoch nur dann Ca^{2+} -Signale, wenn den Rezeptoren die Untereinheit GluR2 fehlt (Cull-Candy et al., 2006). Wurden die NMDA- oder AMPA-Rezeptoren - beides Subtypen der Glutamat-Rezeptoren - zuvor spezifisch gehemmt, dann blieb das Ca^{2+} -Signal in den entsprechenden Zellen aus (Abb. 26 und 27). Demnach hatten sich in den hier differenzierten Kulturen funktionell heterogene neurale Zellpopulationen entwickelt, unabhängig davon, ob die Zellen nach dem Gelatine-Protokoll oder nach dem PLO-Protokoll differenziert wurden. Ähnlich heterogene Populationen wurden bei

differenzierten transfizierten mES Zellen (Lang et al., 2004) und bei mES Zellen beschrieben, die zu dopaminergen Neuronen differenziert wurden (Raye et al., 2007). Zu erwähnen ist, dass es sich bei den Zellen, die in dieser Untersuchung spezifisch auf die Agonisten und Antagonisten mit Ca^{2+} -Signalen reagiert haben, auch um differenzierte Gliazellen handeln könnte, da nicht nur Neuronen NMDA und AMPA-Rezeptoren ausbilden, sondern auch Astrozyten (Verkhatsky and Kirchoff, 2007; Fiacco and McCarthy, 2006) und Oligodendrozyten (Butt, 2006).

4.2.3 Analyse der molekularen Marker zur Erfassung der Differenzierung von Neuronen und Gliazellen

Zur Bestimmung eines molekularen Endpunktes für die neuronale Differenzierung kamen die beiden Zytoskelettproteine MAP2 und β -Tubulin III in die nähere Auswahl. Mit beiden molekularen Markern konnten die neuronalen Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch morphologisch sichtbar gemacht werden. Des Weiteren konnten die Proteine im Western-Blot nachgewiesen werden. Sie ließen sich in der durchflusszytometrischen Analyse adäquat quantifizieren und zeigten bereits am Tag 12 der Differenzierung ein ausreichend hohes Signal für die Messung von Substanzeffekten. Beide Marker wurden bereits in toxikologischen Studien, beispielsweise mit Methylquecksilber (MeHg^+ ; Hunter and Brown, 2000; Graff et al., 1997) und Kokain (Nassogne et al., 1995), eingesetzt. In einer neueren Studie zur Entwicklungsneurotoxizität mit einer humanen Teratokarzinom-Zelllinie wurde β -Tubulin III als Endpunkt in der Western-Blot-Analyse eingesetzt, um die Effekte von verschiedenen teratogenen Substanzen zu untersuchen (Hill et al., 2008). In einer weiteren Studie mit mES Zellen der Linie D3 wurde gezeigt, dass auch anhand der Messung der β -Tubulin III und MAP2 mRNA Expression konzentrationsabhängige Effekte von MeHg^+ erfasst werden konnten (Stummann et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide neuronale Marker bei der Ermittlung von Substanzeffekten nahezu identische Konzentrations-Wirkungskurven ergaben (Abb. 37). Da MAP2 in der durchflusszytometrischen Analyse ein besser abzugrenzendes Signal zeigte, wurde dieser Marker für die Durchführung von Wiederholungsversuchen ausgewählt.

Zusätzlich wurde untersucht, ob auch eine durchflusszytometrische Messung von Gliazellen möglich war, um deren potentiellen Einfluss im Testsystem zu erfassen.

Schließlich werden während der Entwicklung des Nervenzellgewebes von Mensch und Tier in fortgeschrittenen Stadien auch Gliazellen differenziert. Diese sind nicht nur bei der Entwicklung, bei De- und Regenerationsvorgängen sowie bei der strukturellen Organisation und Myelinisierung von Neuronen beteiligt, sondern übernehmen auch wichtige Transport- und Stoffwechselfunktionen und sind bei der Signal- und Informationsverarbeitung von Nervenzellen aktiv. Des Weiteren weisen sie neuroprotektive Eigenschaften auf und können selbst Angriffsziele für entwicklungsneurotoxische Substanzen sein (Benarroch, 2005; Deng und Poretz, 2003; Aschner et al., 1999). Demnach käme ein Testen von Substanzeffekten auf Neuronen in Kokultur mit Gliazellen den realen Bedingungen sehr nahe. Als molekularer Endpunkt für Astrozyten eignete sich das Zytoskelettprotein GFAP. Der Marker war in ausreichender Stärke in der Kultur im Durchflusszytometer nachzuweisen. Der Tag 21 der Differenzierung erwies sich sowohl für das Gelatine-Protokoll als auch für das PLO-Protokoll als optimaler Zeitpunkt, an dem in ausreichender Stärke sowohl MAP2- als auch GFAP-positive Ereignisse im Durchflusszytometer gemessen werden konnten. GFAP wurde bereits in toxikologischen Studien, beispielsweise zur Erfassung von Alkaloid-Effekten auf primäre Astrozyten (Barreto et al., 2008) oder zur Bestimmung der Pestizidwirkung auf die Differenzierung von primären cerebralen Rattenzellen (Hogberg et al., 2009) als Endpunkt eingesetzt. Die Oligodendrozyten waren in diesem Zellsystem - unabhängig von der Protokollvariante – für durchflusszytometrische Analysen zu schwach abgebildet. Der CNPase-Anteil kam während der Analysedauer von 30 Tagen nicht über einen Anteil von 3% Antigen-positiven Ereignissen (von 10.000 registrierten Ereignissen) pro erfasstem Differenzierungszeitpunkt hinaus (Abb. 29 und 33). Auch wurden immunfluoreszenzmikroskopisch im Vergleich zu den Astrozyten viel weniger Oligodendrozyten detektiert. Jedoch stellte es sich heraus, dass die Western-Blot-Analyse ein stark ausgebildetes CNPase-Signal zeigte (Abb. 30). Womöglich könnte diese Methode für weiterführende Fragestellungen bezüglich der Messung von Oligodendrozyten geeigneter sein. Einen Endpunkt für Oligodendrozyten zu etablieren wäre interessant, da bereits gezeigt wurde, dass diese während der Myelinisierung empfindlich gegenüber einer Reihe von Metallen und Metalloiden, wie z.B. Blei und Tellur, sowie Xenobiotika, wie z.B. Ethidiumbromid und Cyclosporin, reagieren (Deng and Poretz, 2003).

4.2.4 Evaluierung des Endpunktes für die neuronale Differenzierung anhand von Substanztests

Mit **5-FU** wurden sowohl im Differenzierungstest als auch im MTT-Test reproduzierbare Konzentrations-Wirkungskurven erzielt (Abb. 38). Die neuronale Differenzierung wurde bei 0,009 – 0,03 µg/ml (0,07-0,23 µM) Substanz zu 50% gehemmt. Der zytotoxische Effekt lag in einem etwas höheren Konzentrationsbereich, zwischen 0,03 und 0,07 µg/ml 5-FU und unterschied sich signifikant von dem der Differenzierung (Abb. 43; Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,05$). Da jedoch die Substanz primär zytotoxisch wirkt und der hier gemessene Unterschied gering war, ist zu vermuten, dass sich dieser durch weitere Wiederholungsversuche relativieren würde.

Die ID_{50} -Werte nach Exposition der Zellen mit der nicht embryotoxischen Substanz **PenG** lagen bei 840 - 1900 µg/ml (2,36 – 5,33 µM; Abb. 39). Im Viabilitätstest lagen die IC_{50} -Werte z.T. leicht darunter, waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Somit wurden die mES Zellen, unabhängig ob sie zu neuronalen Zellen oder zu Herzmuskelzellen differenziert wurden, durch gleich hohe Konzentrationen von PenG gehemmt.

Mit der Substanz **LiCl** wurde die neuronale Differenzierung bei Konzentrationen von 40 - 150 µg/ml Substanz zu 50% gehemmt, was einem Bereich von 0,94 - 3,5 mM LiCl entspricht (Abb. 40). Im Viabilitätstest wurden die Zellen durch LiCl in einem Konzentrationsbereich von 540 - 740 µg/ml zu 50% gehemmt. Hier war ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,05$) zwischen dem Effekt auf die Differenzierung von MAP2-positiven Neuronen und dem zytotoxischen Effekt zu verzeichnen. Zudem wurde im Viabilitätstest bei 333 µg/ml (7,86 mM) ein Anstieg der Kurven und somit ein Effekt auf die Vitalität der Zellen beobachtet. Dieser liegt jedoch einem Konzentrationsbereich, in dem die neuronalen MAP2-positiven Zellen bereits stark gehemmt werden. Offensichtlich fördert LiCl das Wachstum anderer, nicht-neuronalen Zellen, vermutlich insbesondere von neuronalen Vorläuferzellen. Da die Gesamtzellzahl nicht anstieg, liegt der Schluss nahe, dass sich im Bereich von 12 und 333 µg/ml LiCl zwei Effekte überlagern: eine zunehmende Hemmung der neuronalen Differenzierung und ein positiver Effekt auf die Viabilität nicht-neuronaler Zellen.

Der Wirkmechanismus von LiCl auf das sich entwickelnde Gehirn ist vielfältig und noch nicht vollständig geklärt. LiCl beeinflusst die Differenzierung und die Proliferation von Vorläuferzellen und weist sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Eigenschaften auf. An differenzierenden ES Zellen der Linie E14/T mit RA kam es unter Zugabe von 10 mM LiCl zu einer Reduktion von Sox1-positiven Zellen (Aubert et al., 2002). In Zusammenhang damit wird die Wirkung von LiCl auf den Wnt/GSK-3-Signalweg diskutiert. LiCl inhibiert GSK-3 und imitiert so den Wnt-Signalweg, welcher während der frühen Entwicklungsphase des Gehirns eine wichtige Rolle spielt. Ein proliferativer Effekt wurde in einer Studie mit Progenitorzellen des Hippocampus von Ratten bei einer Konzentration von 1-3 mM LiCl gemessen. In diesen Untersuchungen war ebenfalls eine Stimulation eines bestimmten Neuronensubtyps (calbindin_{D28k}) zu beobachten (Kim et al., 2004). Auch bei humanen Teratocarcinomzellen (NT2) förderte LiCl bei 3 mM die Vitalität und Proliferation der Zellen (Misiuta et al., 2006). Bei NT2 Zellen, die über die Bildung von Neurosphären und unter der Zugabe von RA zu Neuronen und Gliazellen differenziert wurden, erhöhte LiCl die Proliferation der Zellen ohne signifikante Effekte auf die Bildung neuronaler Proteine (Hill et al., 2008). Der proliferative Effekt wird mit der Einflussnahme von LiCl auf verschiedene Regulationsmechanismen der Zellen, wie z.B. auf die bereits genannten Signalwege Wnt/GSK-3 und Phosphatidylinositol in Zusammenhang gebracht.

Im EST wurde ein Effekt auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen bei 268 µg/ml (mikroskopische Auswertung) und 306 µg/ml (FACS-EST) gemessen (Büsen et al., 2009). Somit reagierten die sich differenzierenden neuralen Zellen empfindlicher gegenüber LiCl als die sich zu Herzmuskelzellen differenzierenden mES Zellen. Ein Vergleich ist nur eingeschränkt möglich, da es sich um zwei unterschiedliche Methoden der Differenzierung handelt. Allerdings gibt es Hinweise, dass dies auch im Tierversuch der Fall ist. Zwar wurden unter therapeutischen Dosen an Nagern keine adversen entwicklungspezifischen Effekte beobachtet, doch führten leicht höhere Dosen bei Ratten und Mäusen zu einem weiten Spektrum an teratogenen Effekten, die hauptsächlich das Zentralnervensystem betrafen und auch skelettale sowie kraniofaziale Defekte verursachten (Giles und Bannigan, 2006). Beim Menschen induziert LiCl in erster Linie Fehlbildungen des Herzens und des kardiovaskulären Systems und mit geringerem Risiko andere kongenitale Missbildungen (Giles und Bannigan, 2006).

Durch die Substanz **MAM** wurde die neuronale Differenzierung bei 3 - 35 µg/ml (0,02 - 0,26 mM) Substanz zu 50% gehemmt und im gleichen Konzentrationsbereich die Viabilität der sich differenzierenden Zellen (Abb. 41). Dies liegt daran, dass MAM einen hemmenden Effekt auf mitotische neurale Zellen ausübt. Es wird angenommen, dass die DNA-Reparaturmechanismen während der frühen Differenzierung der Zellen noch nicht effizient genug sind und diese somit besonders empfindlich auf DNA-methylierende Substanzen reagieren. Kisby et al. (2006) haben gezeigt, dass primäre unreife Neuronen aus dem Kleinhirn von Mausembryonen bei einer Konzentration von 1 µM MAM deutlich gehemmt wurden. Astrozyten des gleichen Ursprungs hingegen reagierten weniger empfindlich. Eine andere Untersuchung mit Großhirnzellen, die aus Rattenembryonen isoliert wurden, zeigte, dass MAM nach einer drei- und fünftägigen Exposition bei einer Konzentration von 10 µg/ml speziell proliferierende Neuroblasten stark hemmt (Cattaneo et al., 1995). Demnach tritt der hier gemessene Effekt von MAM in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich auf, wie er auch bei Primärzellen gemessen wurde.

Durch **VPA** wurde die Differenzierung zu 50% bei 90 - 190 µg/ml (0,55 - 1,32 mM) gehemmt. Im Viabilitätstest lagen die IC₅₀-Werte mit 50 - 90 µg/ml VPA leicht darunter, unterschieden sich jedoch nicht signifikant von den ID₅₀-Werten (Abb. 42/A). Demnach war kein Unterschied zwischen dem Effekt von VPA auf die Differenzierung von Neuronen und dem zytotoxischen Effekt auf alle in der Kultur sich differenzierenden Zellen zu erkennen. Ähnliche Ergebnisse zu den ID₅₀- und IC₅₀-Werten wurden auch mit mES Zellen, die nach dem PLO-Protokoll differenziert wurden, erzielt (Abb. 42/B). Im gleichen Konzentrationsbereich traten im Whole Embryo Culture (WEC) -Test Neuralrohrdefekte auf. Bei einer Konzentration von 0,6 mM VPA wurden bei 27%, bei 1,2 mM VPA bereits bei 94% der Embryonen Neuralrohrdefekte beobachtet (Lewandowski, 1986). Dass VPA einen Einfluss auf die neurale Differenzierung ausübt, konnte auch in zahlreichen *in vitro* Studien gezeigt werden. In humanen NT2-Zellen wurde beispielsweise eine Hemmung der Proliferation und der neuronalen Differenzierung beobachtet (Skladchikova et al., 1998). Murabe et al. (2007) zeigten jedoch einen gegenteiligen Effekt: Die Differenzierung von mES Zellen der Linie R1 wurde durch VPA konzentrationsabhängig stimuliert, jedoch im Vergleich zu den hier gezeigten Resultaten in etwas niedrigeren Konzentrationen (0,38 mM VPA). Im Zytotoxizitätstest mit mES Zellen der Linie R1 konnte gezeigt werden, dass sich die

IC₅₀-Werte für die sich differenzierenden Zellen von den IC₅₀-Werten mit NIH-3T3 Zellen unterscheiden. Letztere wurden erst bei einer VPA-Konzentration von 3,25 mM zu 50% gehemmt (Murabe et al., 2007). Ähnliche Unterschiede waren auch zwischen D3 und 3T3 Zellen im Zytotoxizitätstest ermittelt worden (Büsen et al., 2009). Die dargelegten Ergebnisse sprechen dafür, dass dem entwicklungsneurotoxischen Effekt von VPA ein Wirkmechanismus zugrunde liegt, der nicht nur in die Differenzierung von Neuronen eingreift, sondern auch die Proliferation von Vorläuferzellen und anderer, sich differenzierender Zellen beeinflusst. Die Hemmung der Histondeacetylase, die in einigen Arbeiten beschrieben wurde (Eikel et al., 2006; Kultima et al., 2004; Göttlicher et al., 2002), könnte ein solcher Effekt sein.

Zusätzlich wurde der Effekt von VPA auf die neuronale Differenzierung in Anwesenheit von Gliazellen untersucht. Es stellte sich die Frage, ob in dem *in vitro* Testsystem möglicherweise ein neuroprotektiver Einfluss durch Gliazellen gemessen werden könnte. Astrozyten stellen zum Beispiel bei hohem Energieverbrauch der Neuronen Laktat bereit und puffern die extrazelluläre Umgebung mit Basenäquivalenten ab. Durch die Aufnahme von Glutamat verhindern die Astrozyten toxische Konzentrationen von Glutamat im synaptischen Spalt und können dadurch einer neuronalen Übererregung entgegensteuern und somit neuroprotektiv wirken (Benarroch, 2005; Brown, 1999). Umgekehrt kann die Neurotoxizität einer Substanz mit einer spezifischen Wirkung auf Gliazellen einhergehen. Beispielsweise gibt es eine Reihe von Hinweisen, dass MeHg⁺ in Astrozyten akkumuliert und u.a. die Glutamat-Aufnahme inhibiert, wodurch ein neurotoxischer Effekt induziert wird (Ashner et al., 2007).

In den hier differenzierten Zellen ließen sich Astrozyten durchflusszytometrisch anhand des Zytoskelettproteins GFAP standardisiert nachweisen. Zur zeitgleichen Messung von Neuronen und Astrozyten eignete sich Tag 21 der Differenzierung. Das Ergebnis dreier unabhängiger Versuche auf Basis des Gelatine-Protokolls zeigte, dass sich für die Neuronen die ID₅₀-Werte für VPA nicht von denen am Tag 12 der Differenzierung gemessenen Werten unterschieden. Jedoch war es in zwei von drei Fällen nicht möglich, anhand von GFAP-positiven Zellen Konzentrations-Wirkungskurven zu erzielen, da diese bereits in den niedrigsten eingesetzten Konzentrationen zu ca. 50% gehemmt wurden (Abb. 44). Dies könnte darauf hindeuten, dass Astrozyten im Vergleich zu den Neuronen empfindlicher auf VPA reagieren. Allerdings lassen sich für diese Hypothese in der Literatur keine weiteren

konkreten Hinweise finden. Um dies anhand des hier entwickelten Testsystems zu klären, bedarf es weitergehender Forschung.

4.2.5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die mES Zellen der Linie D3 sowohl nach dem Gelatine-Protokoll als auch nach dem PLO-Protokoll standardisiert in neurale Zellen differenziert werden können, wobei insbesondere anhand des PLO-Differenzierungsprotokolls ein hoher Anteil an differenzierten Neuronen für die Messung von Substanzeffekten erzielt werden kann. Die Studien zur Charakterisierung haben ergeben, dass die differenzierenden neuronalen Zellen vergleichbare morphologische Entwicklungen sowie Markerprofile zeigen, wie sie auch bei der *in vivo* Entwicklung zu beobachten sind. Des Weiteren weisen hier erzielte Ergebnisse auf eine funktionale Reife der sich entwickelten Neuronen und Gliazellen hin. Für die Erfassung von Substanzeffekten mit Hilfe der Durchflusszytometrie eignet sich als molekularer Endpunkt insbesondere der Marker MAP2, welcher in den differenzierenden Kulturen zwischen Tag 12 und 16 am stärksten gebildet wurde. Anhand der Testung von fünf unterschiedlichen Substanzen konnte gezeigt werden, dass mit diesem Endpunkt reproduzierbare Konzentrations-Wirkungskurven erzielt werden können. Der Vergleich mit Viabilitätsdaten zeigte, dass die Beeinflussung von Differenzierung und Zytotoxizität in den meisten Fällen im gleichen Konzentrationsbereich stattfand. Wie jedoch bei der Substanz LiCl zu erkennen war, kann sich der entwicklungsneurotoxische Effekt vom Effekt auf die Viabilität stark unterscheiden. Für valide Aussagen bedarf es weiterer Forschung, um den Datensatz einerseits zu vergrößern und andererseits durch das Testen von weiteren, entwicklungsneurotoxisch relevanten Substanzen zu erweitern.

Zukünftig sollten in Hinblick auf die Etablierung eines Testsystems für Untersuchungen zur Entwicklungsneurotoxizität weitere zusätzliche Endpunkte in die Sicherheitsbewertung integriert werden. Solche wären z.B. Proliferation, Migration, Synaptogenese, Apoptose und Myelinisierung (Rice und Barone, 2000). Für die Proliferation konnte beispielsweise im ZEBET-Labor im Rahmen einer Diplomarbeit (Sittner, 2008) anhand der Differenzierung der mES Zellen nach dem PLO-Protokoll gezeigt werden, dass Substanzeffekte zwischen Tag 5 und 12 der Differenzierung erfasst werden können. Der konzentrationsabhängige Effekt auf die

Proliferation zeigte, dass die zu Neuronen differenzierten D3-Zellen eine größere Sensitivität gegenüber Natriumvalproat zeigten als undifferenzierte D3 Zellen und differenzierte 3T3 Zellen. Darüber hinaus entwickelten beispielsweise Moors et al. (2007) einen Neurosphären-basierten Assay mit humanen NHNP Zellen, um substanzabhängige Effekte auf die Migration von neuronalen Zellen zu erfassen. Anhand von verschiedenen, entwicklungsneurotoxisch relevanten Substanzen wie z.B. Methylquecksilberchlorid wurde gezeigt, dass die Erfassung eines konzentrationsabhängigen Effektes auf migrierende Zellen möglich ist.

Ein weiterer Forschungsansatz, der sich aus dieser Arbeit ergibt, ist die Fragestellung, ob für Substanzexpositionen sensitive und weniger sensitive Zeitpunkte unterscheidbar sind. Sind doch entwicklungsstoxikologische Einflüsse und deren Auswirkungen maßgeblich vom Expositionszeitpunkt und der Expositionsdauer einer Noxe abhängig (Bondy und Campbell, 2005). Darüber hinaus wäre es interessant, auf Basis der hier dargestellten Arbeiten mit der Methode des Ca^{2+} -Imaging zu untersuchen, ob Substanzeffekte auch funktionelle Einschränkungen zur Folge haben können.

Schlussendlich könnten all die genannten Weiterentwicklungen sowie die Einbeziehung von Extrapolations- und Vorhersagemodellen im Rahmen integrierter *in vitro* Testsysteme Tierversuche deutlich reduzieren, wenn nicht gar eines Tages an einigen Stellen ganz ersetzen. Liegt doch das Potential zukünftiger Alternativmethoden in der Möglichkeit, die toxischen Eigenschaften von relevanten Substanzen anhand geeigneter Endpunkte schnell, einfach und reproduzierbar im Hochdurchsatzverfahren zu prüfen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Zusammenfassung

Dem Einsatz von alternativen Vorhersagemodellen zur Risikobewertung von chemischen Substanzen wird heute international ein hoher Stellenwert eingeräumt. Sowohl bei der Umsetzung der REACH-Verordnung, als auch bei der Entwicklung neuer Arzneimittel sind tierversuchsfreie, toxikologische Screening-Verfahren von Vorteil, um Substanzen auf unerwünschte Wirkungen zuverlässig, schnell und kostengünstig zu testen. Bei der Prüfung auf eine entwicklungstoxische und speziell entwicklungsneurotoxische Wirkung sind dabei vor allem zelluläre Testsysteme von Interesse, da mit ihnen grundlegende Prozesse der Entwicklung untersucht und toxikologisch relevante Angriffspunkte standardisiert erfasst werden können.

Mit dem Embryonalen Stammzelltest (EST) liegt bereits ein validiertes *in-vitro* Testverfahren vor, um embryotoxische Substanzen anhand der Kombination der Endpunkte „Hemmung der Herzmuskelzellendifferenzierung“ und „Zytotoxizität“ in die Klassen „nicht“, „schwach“ und „stark embryotoxisch“ einzustufen. Der Test basiert auf der Fähigkeit von embryonalen Stammzellen der Maus (mES Zellen) der Linie D3 in kontrahierende Herzmuskelzellen zu differenzieren. Dieser Endpunkt wird im validierten EST durch eine mikroskopische Analyse bestimmt.

Die Arbeit hatte zum Ziel, den EST durch die Etablierung von molekularen Endpunkten weiter zu entwickeln. In Vorversuchen wurden molekulare Endpunkte für die Erfassung der Herzmuskelzellendifferenzierung geprüft. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Etablierung eines Protokolls basierend auf einem neuen Endpunkt zur Erfassung von Substanzeffekten auf die neuronale Differenzierung sowie in der Charakterisierung der sich differenzierenden neuronalen Zellen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung zu Herzmuskelzellen anhand der Marker für die skelettalen Muskelzellproteine MHC (*myosin heavy chain*) und α -Actinin immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen und im Durchflusszytometer quantitativ erfasst werden kann. Anhand einer Zeitanalyse über 20 Tage wurde festgestellt, dass der optimale Zeitpunkt für die Messung der beiden intrazellulären Proteinmarker der Tag 7 der Differenzierung ist. Die neuen molekularen Endpunkte wurden anhand von drei in der Validierungsstudie klassifizierten Substanzen 5-Fluorouracil, all-trans Retinsäure und Penicillin G mit dem validierten Endpunkt, der mikroskopischen Erfassung der Herzmuskelzellkontraktionen, verglichen. Bei der Ermittlung der ID_{50} -Werte für die 50%ige Hemmung der Differenzierung wurden gut übereinstimmende Ergebnisse erzielt.

Für die Optimierung eines Protokolls zur neuronalen Differenzierung wurden insbesondere die Einflussfaktoren Zellzahl, Mediumzusammensetzung und Beschichtungsform untersucht. Zunächst wurden die D3 Zellen auf Gelatinebeschichteten Zellkulturplatten differenziert, auf Basis dessen die meisten Substanztestungen durchgeführt wurden. Über die Zeit führten weitere Optimierungsschritte zu einem Protokoll, bei dem die Zellen auf Poly-L-Ornithin-(PLO)-beschichteten Platten unter Zugabe von Laminin differenziert wurden. Damit konnte nachweislich der Anteil an differenzierten Neuronen in der Kultur erhöht werden. Anhand beider Protokollvarianten wurde gezeigt, dass die mES Zellen während der voranschreitenden Differenzierung eine zeitlich gestaffelte Entwicklung durchlaufen, beginnend mit der Proliferation neuraler Vorläuferzellen bis hin zur Bildung reifer Neuronen und Gliazellen. Dies wurde anhand von zelltypischen Markern für Vorläuferzellen, Neuronen und Gliazellen immunfluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen gelang es neuronale und gliale Proteine anhand der Marker Mikrotubulin-assoziiertes Protein 2 (MAP2), β -Tubulin III, α -Internexin, saures gliale Faserprotein (GFAP) und 2',3'-zyklisches Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (CNPase) über die Zeit von 30 Tagen zu quantifizieren. Der Nachweis von synaptischen Vesikeln und Neurotransmittern lieferte zudem Hinweise auf die Entwicklung funktional ausgereifter Neuronen und Gliazellen. Des Weiteren reagierten die differenzierten Zellen auf die Stimulierung mit Neurotransmitter bzw. deren Agonisten spezifisch mit einem Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} , was auf die Ausbildung von Glutamat- und Dopamin-spezifischen Rezeptoren schließen lässt.

Die quantitativen Untersuchungen zeigten, dass die Neuronen anhand des Markers MAP2 am Tag 12 der Differenzierung standardisiert erfasst werden können. Anhand von Substanztests mit 5-Fluorouracil, Penicillin G, Lithiumchlorid, Valproinsäure und Methylazoxymethanolacetat wurde demonstriert, dass durch die Bestimmung dieses Endpunktes in den meisten Fällen reproduzierbare Konzentrations-Wirkungskurven erzeugt werden können.

Im Vergleich zu den Daten, die bei der Erfassung der Zellviabilität im MTT-Test erhoben wurden, zeigte es sich, dass der ID_{50} -Wert für die Differenzierung mit dem IC_{50} -Wert, dem Wert für die 50%ige Hemmung der Viabilität der sich differenzierenden Zellen, in den meisten Fällen zusammenfällt. Bei Lithiumchlorid war aufgrund der abweichend niedrigeren ID_{50} -Werte ein spezifischer Effekt auf die Differenzierung von MAP2-positiven Neuronen zu erkennen. Anhand der

Untersuchung von Valproinsäure konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sowohl bei der Differenzierung der Zellen nach dem Gelatine- als auch nach dem PLO-Protokoll, gleiche ID₅₀- und IC₅₀-Werte erzielt wurden.

5.2 SUMMARY

The use of alternative prediction models for risk assessment of chemical substances is currently of high international priority. Due to their ability to screen the side effects of chemicals reliably, cost efficiently and rapidly, animal free toxicological test systems could support the implementation of the REACH-Regulation as well as the research on new pharmaceuticals. In the field of developmental toxicity and especially developmental neurotoxicity *in vitro* test methods are of interest because they offer the opportunity to investigate key aspects of development at a mechanistic level and allow determination of toxicological relevant endpoints.

The Embryonic Stem Cell Test (EST) is a validated test system for the detection and classification of chemicals according to their teratogenic potency by discriminating them into the classes “non-”, “weakly” and “strongly embryotoxic”. The test is based on the ability of embryonic stem cells from mice (mESC) of line D3 to differentiate into contracting cardiomyocytes. The toxicological endpoint for differentiation is evaluated by quantification of the contracting cell areas via microscopic analysis.

The aim of this work was to improve the EST further by establishing predictive molecular endpoints. Preliminary investigations were made to establish molecular markers in order to substitute the visual determination of the cardiac differentiation. The focus of this work was to develop a new molecular endpoint for measuring developmental neurotoxicity. For this purpose it was necessary to optimize a protocol for neural differentiation which is adequate for substance testing and also to characterize the differentiated neural cells.

Applying immunofluorescence microscopy for qualitative and flow cytometry for quantitative analysis it has been shown that the skeletal proteins myosin heavy chain (MHC) and α -actinin are sensitive markers for the detection of myocardial differentiation. A 20 day quantitative analysis of the differentiation demonstrated, that both intracellular protein markers could be best monitored on day 7 of cultivation. With three substances previously tested in the EST validation study -

5-fluorouracil, all-trans retinoic and penicillin G - it was shown that comparable ID₅₀ (concentration of half maximal inhibition of differentiation) values can be obtained using the molecular endpoints.

In order to optimize a protocol for neural differentiation suitable for chemical testing, the main focus was determining the effect of the parameters cell count, medium composition and surface coating. First the cells were differentiated on gelatin-coated cell culture dishes, which most of the substance tests are based on. Further investigations led to the development of a poly-l-ornithin (PLO) based protocol supplemented with laminin, which enhanced the proportion of neurons in the differentiated culture. With both protocols it was shown, that the differentiation is a time-dependent, graduated developmental process which started with the proliferation of neural precursor cells and ended with the generation of mature neurons and glial cells. This was monitored, using immunofluorescence microscopy, by typical specific protein markers of precursor cells, neurons and glial cells. Using the markers microtubule-associated protein 2 (MAP2), β -tubulin III, α -Internexin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase), neurons and glial cells were also quantified by flow cytometry analysis until day 30 of differentiation. The presence of presynaptic vesicles and neurotransmitters indicated functional maturation of the differentiated cells. It was also shown, that the differentiated cells responded to different agonists of glutamate and dopamine receptors with temporary increases of intracellular Ca²⁺-levels.

Quantitative investigations demonstrated that neurons were best detected with the protein marker MAP2 on day 12 of the differentiation. To evaluate the applicability of the endpoint, the substances 5-fluorouracil, penicillin G, lithium chloride, valproic acid and methylazoxymethanolacetate were examined applying flow cytometry analysis. Most of the tests showed reproducible concentration-response curves.

When compared to the effect on cell viability recorded in the MTT-cytotoxicity assay it was shown, that the ID₅₀ value for differentiation is mostly similar to the IC₅₀ value for the half maximal inhibition of viability of all differentiating cells in culture. With lithium chloride, a specific effect was detected on the differentiating MAP2-positive neurons. Using valproic acid it was shown that both differentiation protocols (gelatin and PLO-protocol) generated identical ID₅₀ and IC₅₀ values.

6 LITERATUR

- Azais-Braesco**, V., and Pascal, G. (2000): Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 71, 1325S-1333S.
- Aizenman**, Y., and de Vellis, J. (1987): Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Research*, Vol. 406, 32-42.
- Andressen**, C., Adrian, S., Fässler, R., Arnhold, S., and Addicks, K. (2005): The contribution of $\beta 1$ integrins to neuronal migration and differentiation depends on extracellular matrix molecules. *European Journal of Cell Biology*, Vol. 84, 973-982.
- Armando**, S., Lebrun, A., Hugnot, J.-P., Ripoll, C., Saunier, M., and Simonneau, L. (2007): Neurosphere-derived neural cells show region-specific behaviour in vitro. *NeuroReport, Developmental Neurosciences*, Vol. 18, 1539-1542.
- Aschner**, M., Allen, J.W., Kimelberg, H.K., LoPachin, R.M., and Streit, W.J. (1999): Glial cells in neurotoxicity development. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 39, 151-173.
- Aubert**, J., Dunstan, H., Chambers, J., and Smith, A. (2002): Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nature Biotechnology*, Vol. 20, 1240-1245.
- Bain**, G., Ray, W.J., Yao, M., and Gottlieb, D.I. (1996): Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol. 223, 691-694.
- Bain**, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., and Gottlieb, D.I. (1995): Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Developmental Biology*, Vol. 168, 342-357.
- Barone**, S., Prasada, R., Kodavanti, R.S., and Mundy, W.R. (2004): Effects of toxicants on neural differentiation. In: Tiffany-Castiglioni, E. (Ed.): *Methods in Pharmacology and Toxicology. In Vitro Neurotoxicology: Principles and Challenges*, Humana Press, New Jersey, 187-215.
- Barreto**, R.A., Sousa, C.S., Silva, V.D.A., Silva, A.R., Veloso, E.S., Cunha, S.D., and Costa, M.F.D. (2008): Monocotiline pyrrol is cytotoxic and alters the patterns of GFAP expression on astrocyte primary cultures. *Toxicology in Vitro*, Vol. 22, 1191-1197.
- Benarroch**, E.E. (2005): Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clinic Proceedings*, Vol. 80, 1326-1338.

- Berridge**, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., and Wang, R. (1996): The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, Vol. 4, 14-19.
- Bibel**, M., Richter, J., Schrenk, K., Tucker, K.L., Staiger, V., Korte, M., Goetz, M., and Barde, Y.-A. (2004): Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nature Neuroscience*, Vol. 7, 1003-1009.
- BioTec Instruments**: Technical Resources. <http://www.biotek.com/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html> (14.10.2010).
- Boheler**, K.R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H.-T., Anisimov, S.V., and Wobus, A.M. (2002): Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circulation Research*, Vol. 91:189-201.
- Bondy**, S.C., and Campbell, A. (2005): Developmental Neurotoxicology. *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 81, 605-612.
- Breier** J.M., Radio, N.M., William R. Mundy, W.R., and Timothy J. Shafer, T.J. (2008): Development of a high-throughput screening assay for chemical effects on proliferation and viability of immortalized human neural progenitor cells. *Toxicological Sciences*, Vol. 105, 119-133.
- Brown**, N.A. (2002): Selection of test chemicals for the ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests. *ATLA*, Vol. 30, 177-198.
- Brüstle**, O., Jones, N.K., Learish, R.D., Karrami, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D. and McKay, R.D.G. (1999): Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, Vol. 285, 754-765.
- Buesen**, R., Genschow, E., Slawik, B., Visan, A., Spielmann, H., Luch, A., and Seiler, A. (2009): Embryonic stem cell test remastered: comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity in vitro. *Toxicological Sciences*, Vol. 108, 389-400.
- Burdon**, T., Smith, A., and Savatier, P. (2002): Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *TRENDS in Cell Biology*, Vol. 12, 432-437.
- Buschmann**, J. (2006): Critical aspects in reproductive and developmental toxicity testing of environmental chemicals. *Reproductive Toxicology*, Vol. 22, 157-163.
- Butt**, A.M. (2006): Neurotransmitter-mediated calcium signalling in oligodendrocyte physiology and pathology. *Glia*, Vol. 54, 666-675.
- Buttery**, L.D., Bourne, S., Xynos, J.D., Wood, H., Hughes, F.J., Hughes, S.P., Episkopou, V., and Polak, J.M. (2001): Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Engineering*, Vol. 7, 89-99.
- Massa**, V., Cabrera, R.M., Menegola, E., Giavini, E., and Finell, R.H. (2005): Valproic acid-induced skeletal malformations: associated gene expression cascades. *Pharmacogenetics and Genomics*, Vol. 15, 787-800.

- Cai, C., and Grabel, L. (2007):** Directing the differentiation of embryonic stem cells to neural stem cells. *Developmental Dynamics*, Vol. 235, 3255-3266.
- Campos, L.S. (2004):** Neurospheres: insights into neural stem cell biology. *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 78, 761–769.
- Cattaneo, E., Rainach, B., Caputi, A., Cattabeni, F., and Di Luca, M. (1995):** Selective in vitro blockade of neuroepithelial cells proliferation by methylazoxymethanol, a molecule capable of inducing long lasting functional impairments. *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 41, 640 – 647.
- Cazillis, M., Rasika, S., Mani, S., Gressens, P., and Lelièvre, V. (2006):** In vitro induction of neural differentiation of embryonic stem (ES) cells closely mimics molecular mechanisms of embryonic brain development. *Pediatric Research*, Vol. 59, 48R-53R.
- Chan, A, Hanna, M., Abbott, M., and Keane R.J. (1996):** Oral retinoids and pregnancy. *Medical Journal of Australia*, Vol. 165, 164-167.
- Chambers, J. (2004):** The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning and Stem Cells*, Vol. 6, 386-391.
- Chien, C.-B. (2005):** Guidance of axons and dendrites. In: Rao, M.S., and Jacobson, M. (Eds.): *Developmental Neurobiology*, 4th ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 241-267.
- Coecke, S., Goldberg, A.M., Allen, S., Buzanska, L., Calamandrei, G., Crofton, K., Hareng, L., Hartung, T., Knaut, H., Henegger, P., Jacobs, M., Lein, P., Li, A., Mundy, W., Owen, D., Schneider, S., Silbergeld, E., Reum, T., Trnovec, T., Monnet-Tschudi, F., and Bal-Price, A. (2007):** Workgroup Report: Incorporating in vitro alternative methods for developmental neurotoxicity into International hazard and risk assessment strategies. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 115, 924-931.
- Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E. Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.-L., Cattaneo, E., and Smith, A. (2005):** Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biology*, Vol. 3, 1594-1606.
- Costa, L.G., Guizetti, M., Burry, M., and Oberdoerster, J. (2002):** Developmental neurotoxicity: do similar phenotypes indicate a common mode of action? A comparison of fetal alcohol syndrome, toluene embryopathy and maternal phenylketonuria. *Toxicology Letters*, Vol. 127, 197-205.
- Crofton, M.K., Mundy, W.R., Lein, P.J., Bal-Price, A., Coecke, S., Seiler, A.E.M., Knaut, H., Buzanska, L., and Goldberg, A. (2011):** Developmental neurotoxicity testing: recommendations for developing alternative methods for the screening and prioritization of chemicals. *ALTEX*, Vol. 28, 9-15.
- Cull-Candy, S., Kelly, L., and Farrant, M. (2006):** Regulation fo Ca²⁺-permeable AMPA recetpors: synaptic plasticity and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 16, 288-297.

- Dehmelt**, L., and Halpain, S. (2005): The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, Vol. 6, 204-213.
- Deng**, W., and Poretz, R.D. (2003): Oligodendroglia in developmental neurotoxicity. *NeuroToxicology*, Vol. 24, 161-178.
- Dickman**, E.D., and Smith, S.M. (1996): Selective regulation of cardiomyocyte gene expression and cardiac morphogenesis by retinoic acid. *Developmental Dynamics*, Vol. 106, 39-48.
- Doetschman**, T., Eistetter, H., Katz, M., Schmitt, W., and Kemler, R. (1985): The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac blood islands and myocardium. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, Vol. 87, 27-45.
- Eikel**, D., Lampen, A., and Nau, H. (2006): Teratogenic effects mediated by inhibition of histone deacetylases: evidence from quantitative structure activity relationships of 20 valproic acid derivatives. *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 19, 272-278.
- Elkabetz**, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N.D., Tabar, V., and Studer, L. (2008): Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes & Development*, Vol. 22, 152-165.
- Evans**, M.J., and Kaufman, M.H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, Vol. 292, 154-156.
- Fässler**, R., Rohwedel, J., Maltsev, V., Bloch, W., Lentini, S., Guan, K., Gullberg, D., Hescheler, J., Addicks, K., and Wobus, A.M. (1996): Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *Journal of Cell Science*, Vol. 109, 2989-2999.
- Fiacco**, T.A., and McCarthy, K.D. (2006): Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia*, Vol. 54, 676-690.
- Fountoulakis**, K.N., Vieta, E., Bouras, C., Notaridis, G., Giannakopoulos, P., Kaprinis, G., and Akiskal, H. (2008): A systematic review of existing data on long-term lithium therapy: neuroprotective or neurotoxic? *International Journal of Neuropsychopharmacology*, Vol. 11, 269-287.
- Gassanov**, N., Er, F., Zagidullin, N., Jankowski, M., Gutkowska, J., and Hoppe, U.C. (2008): Retinoid acid-induced effects on atrial and pacemaker cell differentiation and expression of cardiac ion channels. *Differentiation*, Vol. 76, 971 – 980.
- Genschow**, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler A., Brown, N.A., Piersma, A., Brady, M., Clemann, N., Huuskonen, H., Paillard, F., Bremer, B., and Becker, K. (2002). The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests. Results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *ATLA*, Vol. 30, 151 - 176.

- Genschow**, E., Spielmann, H., Scholz, G., Pohl, I., Seiler, A., Bremer, B., Clemann N., and Becker K. (2004). Validation of the embryonic stem cell test (EST) in the ECVAM international validation study of three in vitro embryotoxicity tests. *ATLA*, Vol. 32, 209-244.
- Ghobrial**, I.M., and Rajkumar, S.V. (2003): Management of thalidomide toxicity. *The Journal of Supportive Oncology*, Vol. 1, 194-205.
- Giles**, J.J., and Bannigan, J.G. (2006): Teratogenic and developmental effects of lithium. *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 12, 1531-1541.
- Glaser**, T., and Brüstle, O. (2005): Retinoic acid induction of ES-cell-derived neurons: the radial glia connection. *TRENDS in Neurosciences*, Vol. 28, 397-400.
- Goetz**, A.K., Scheffler, B., Chen, H., Wang, S., Suslov, O., Xiang, H., Brüstle, O., Roper, S.N., and Steindler, D.A. (2006): Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells. *PNAS*, Vol. 103, 11063-11068.
- Göttlicher**, M., Zhu, P., Werling, U., Sleeman, J., Krämer, O., und Heinzel, T. (2002), Molekulare Toxikologie der Valproinsäure: von der Schädigung der Embryonalentwicklung zur Therapie von Krebs. *Nachrichten, Forschungszentrum Karlsruhe*, Vol. 34, 69-74.
- Götz**, M., and Huttner, W. (2005): The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, Vol. 6, 777-788.
- Götz**, M., and Barde, Y.-A. (2005): Radial glial cells: defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron*, Vol. 46, 369-372.
- Götz**, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998): Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron*, Vol. 21, 1031-1044.
- Graff**, R.D., Falconer, M.M., Brown D.L., Reuhl, K.R. (1997): Altered sensitivity of posttranslationally modified microtubules to methylmercury in differentiating embryonal carcinoma-derived neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 144, 215-224.
- Grandjean**, E.M., and Aubry, J.-M. (2009): Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach. Part III: clinical safety. *CNS Drugs*, Vol. 23, 397-418.
- Guan**, K., Chang, H., Rolletschek, A., and Wobus A.M. (2001): Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell and Tissue Research*, Vol. 305, 171-176.
- Hansen**, S.M., Berezin, V., and Bock, E.: Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Cellular and Molecular Life Science*, Vol. 65, 3809-3821.
- Hartung**, T., and Rovida, C. (2009): Chemical regulators have overreached. *Nature*, Vol. 460, 1080-1082.

- Hass, U.** (2006): Current status of developmental neurotoxicity: regulatory view. *Toxicology Letters*, Vol. 140-141, 155-159.
- Hescheler, J., Fleischmann, B.K., Lentini, S., Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Wobus, A.M., and Addicks, K.** (1997): Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovascular Research*, Vol. 36, 149-162.
- Hidaka, K., Lee, J.-K., Kim, H.S., Chun Hwa Ihm, C.H., Iio, A., Ogawa, M., Nishikawa, S.-I., Itsuo Kodama, I., and Takayuki Morisaki, T.** (2003): Chamber-specific differentiation of Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cells. *FASEB*, Vol. 17, 740-742.
- Hill, E.J., Woehrling, E.K., Prince, M., and Coleman, M.D.** (2008): Differentiating human NT2/D1 neurospheres as a versatile in vitro 3D model system for developmental neurotoxicity testing. *Toxicology*, Vol., 249, 243-250.
- Höfer, T., Gerner, I., Gundert-Remy, U., Liebsch, M., Schulte, A., Spielmann, H., Vogel, R., and Wettig, K.** (2004): Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. *Archives of Toxicology*, Vol. 78, 549-564.
- Hogberg, H.T., Kinsner-Ovaskainen, A., and Hartung, T.** (2009): Gene expression as a sensitive endpoint to evaluate cell differentiation and maturation of the developing central nervous system in primary cultures of rat cerebellar granule cells (CGCs) exposed to pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 235, 268-286.
- Hübner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F., Bolani, M., and Schöler, H.R.** (2003): Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, Vol. 300, 1251-1256.
- Hunter, A.M., and Brown, D.L.** (2000): Effects of microtubule-associated protein (MAP) expression on methylmercury-induced microtubule disassembly. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 166, 203-213.
- Kaltenhäuser, J.** (2006): Einfluss embryotoxischer Substanzen auf die Expression differenzierungsspezifischer Gene in murinen embryonalen Stammzellen. Dissertation, FU Berlin.
- Kapur, N. Mignery, G.A., and Banach, K.** (2007): Cell cycle-dependent calcium oscillations in mouse embryonic stem cells. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, Vol. 292, C1510-C1518.
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.I., and Sasai, Y.** (2000): Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, Vol., 28, 31-40.
- Kaufmann, W.** (2003): Current status of developmental neurotoxicity: an industry Perspective. *Toxicology Letters*, Vol. 140-141, 161-169.

- Kaufmann** W., and Gröters S. (2006): Developmental neuropathology in DNT-studies – a sensitive tool for the detection and characterization of developmental neurotoxicants. *Reproductive Toxicology*, Vol. 22, 196-213.
- Kim**, J.-H., Panchision, D., Kittappa, R., and McKay, R. (2003): Generation CNS from embryonic, fetal and adult stem cells. *Methods in Enzymology*, Vol. 365, 303-327.
- Kim**, J.S., Chang, M.-Y., Yu, I.T., Kim, J.H., Lee, S.-H., and Lee, Y.-S. (2004): Lithium selectively increases neuronal differentiation of hippocampal neural progenitor cells both *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Neurochemistry*, Vol. 89, 324-336.
- Kisby**, G.E., Olivas, A., Standley, M., Lu, X., Pattee, P., O'Malley, J., Li, X., Muniz, J., and Nagalla, S.R. (2006): Genotoxic targets distinct molecular networks in neonatal neurons. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 114, 1703-1712.
- Kleven**, G.A., Qeral, L., and Robinson, S.R. (2004): Prenatal methylazoxymethanol exposure alters evoked responses in fetal rats. *Neurotoxicology and Teratology*, Vol. 26, 663-671.
- Kramer**, J., Hegert, C., Guan, K., Wobus, A.M., Müller, P.K., and Rohwedel, J. (2000): Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mechanisms of Development*, Vol. 92, 193-205.
- Kuegler**, P.B., Zimmer, B., Waldmann, T., Baudis, B., Ilmjärv, S., Hescheler, J., Gaughwin, P., Brundin, P., Mundy, W., Bal-Price, A.K., Schratzenholz, A., Krause, K.H., van Thriel, C., Rao, M.S., Kadereit, S., and Leist, M. (2010): Markers of murine embryonic and neural stem cells, neurons and astrocytes: reference points for developmental neurotoxicity testing. *ALTEX*, Vol. 27, 17 -42.
- Kultima**, K., Nyström, A.M., Scholz, B., Gustafson, A.L., Dencker, L., and Stigson, M. (2004): Valproic acid teratogenicity: a toxicogenomics approach. *Toxicogenomics*, Vol. 112, 1225-1235.
- Kunz**, S., Ziegler, U., Kunz, B. and Sonderegger, P. (1996): Intracellular signaling is changed after clustering of the neural cell adhesion molecules Axonin-1 and NgCAM during neurite fasciculation. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 135, 253-267.
- Lammer**, E.J., Chen, D.T., Hoar, R.M., Agnish, N.D., Benke, P.J., Braun, J.T., Curry, C.J., Fernhoff, P.M., Grix, A.W., and Lott, I.T. (1985): Retinoic acid embryopathy. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 313, 837-841.
- Lang**, R. J., Haynes, J. M., Kelly, J., Johnson J., Greenhalgh, J., O'Brien, C., Mulholland, E. M., Baker, L., Munsie, M., and Pouton, C. W. (2004): Electrical and neurotransmitter activity of mature neurons derived from mouse embryonic stem cells by Sox-1 lineage selection and directed differentiation. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 20, 3209–3221.

- Lau, C.**, Mole, M.L., Copeland, F.M., Rogers, J.M., Kavlock, R.J., Shuey, D.L., Cameron, A.M., Ellis, D.H., Ellis, D.H., Logsdon, T.R., Merriman, J., and Setzer, R.W. (2001): Toward a biologically based dose-response model for developmental toxicity of 5-fluorouracil in the rat: acquisition of experimental data. *Toxicological Sciences*, Vol. 59, 37-48.
- Lee, S.-H.**, Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., and McKay, R.D. (2000): Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, Vol. 18, 675-679.
- Lein, P.**, Silbergeld, E., Locke, P., and Goldberg, A. (2005): In vitro and other alternative approaches to developmental neurotoxicity testing (DNT). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 19, 735-744.
- Levinson, S.W.**, de Vellis, J., and Goldman, J.E. (2005): Astrocyte Development. In: Rao, M.S., and Jacobson, M. (Eds.): *Developmental Neurobiology*, 4th ed., Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 197-221.
- Lewandowski, C.**, Klug, S., Nau, H., and Neubert, D. (1986): Pharmacokinetics aspects of drug effects in vitro: effects of serum protein binding on concentration and teratogenicity of valproic acid and 2-en-valproic acid in whole embryos in culture. *Archives in Toxicology*, Vol. 58, 239 – 242.
- Liu, S.**, Qu, Y., Stewart, T.J., Howard, M.J., Chakraborty, S., Holekamp, T.F., and McDonald, .W. (2000): Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *PNAS USA*, Vol. 97, 6126-6131.
- Liu, N.**, Lu, M., Tian, x., and Han, Z. (2006): Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Journal of Cell Physiology*, Vol. 211, 279-286.
- Longley, D.B.**, Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003): 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature*, Vol. 3, 330-338.
- Malatesta, P.**, Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., and Gotz M (2003): Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*, Vol. 37, 751–764.
- Malatesta, P.**, Appolloni, I., and Calzolari, F. (2008): Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res* 331, 165–178.
- Maltsev, V.A.**, Wobus, A.M., Rohwedel, J., Bader, M. and Hescheler, J. (1994): Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circulation Research*, Vol. 75, 233-244.
- Marx-Stoelting, P.**, Adriaens, E., Ahr, H.-J., Bremer, S., Garthoff, B., Gelbke, H.-P., Piersma, A., Pellizzer, C., Reuter, U., Rogiers, V., Schenk, B., Schengberg, S., Seiler, A., Spielmann, H., Steemans, M., Stedman, D.B., Vanparys, P., Vericat, J.A., Verwei, M., van de Water, F., Weimer, M., and Schwarz, M. (2001): A review of the implementation of the embryonic stem cell test (EST).The report and recommendations of an ECVAM/ReProTect Workshop. *ATLA*, Vol., 27, 313-328.

- Martin, G.** (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS USA*, Vol. 78, 7634-7638.
- Marvin, M.J., Dahlstrand, J., Lendahl, U., and McKay, R.D.G.** (1998): A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *Journal of Cell Science*, Vol. 111, 1951-1961.
- Michaelis, M., Michaelis, R., Fleming, I., Suhan, T., Cinatl, J., Blaheta, R.A., Hoffmann, K., Kotchetkov, R., Busse, R., Nau, H., and Cinatl, J.** (2004): Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Molecular Pharmacology*, Vol. 65, 520-527.
- Misiuta, I.E., Saporta, S., Sanberg, P.R., Zigova, T. and Willing, A.E.** (2006): Influence of retinoic acid and lithium on proliferation and dopaminergic potential of human NT2 cells. *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 83, 668 – 679.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S.** (2003): The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, Vol. 113, 631-642.
- Moore, J.A., and an IEHR Expert Scientific Committee** (1995): An assessment of lithium using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents. *Reproductive Toxicology*, Vol. 9, 175 – 210.
- Moors, M., Cline, J.E., Abel, J., and Fritsche, E.** (2007): ERK-dependent and – independent pathways trigger human neural progenitor cell migration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 221, 57-67.
- Morris-Kay, G.M., Murphy, P., Hill, R.E., and Davidson, D.R.** (1991): Effects of retinoic acid excess on expression of Hox-2.9 and Krox-20 and on morphological segmentation in the hindbrain of mouse embryos. *The EMBO Journal*, Vol. 10, 2985-2995.
- Murabe, M., Yamauchi, J., Fujiwara, Y., Hiroyama, M., Sanbe, A., and Tanoue, A.** (2007): A novel embryotoxic estimation method of VPA using ES cells differentiation system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 352, 164-169.
- Na, L., Wartenberg, M., Nau, H., Hescheler, J., and Sauer, H.** (2003): Anticonvulsant valproic acid inhibits cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by increasing intracellular levels of reactive oxygen species. *Birth Defects Research (Part A)*, Vol. 67, 174-180.
- Nakayama, T., Momoki-Soga, T., Yamaguchi, K., and Inoue N.** (2004): Efficient production of neural stem cells and neurons from embryonic stem cell. *Developmental Neuroscience*, Vol. 15, 487-491.
- Nahum, G.G., Uhl, K., and Kennedy, D.** (2006): Antibiotic use in pregnancy and lactation. What is and is not known about teratogenic and toxic risks. *Obstetrics & Gynecology*, Vol. 107, 1120-1138.

- Nassogne, M.-C., Evrard, P., and Courtoy, P.J. (1995):** Selective neuronal toxicity of cocaine in embryonic mouse brain cocultures. *PNAS USA*, Vol. 92, 11029-11033.
- Nau H., Hauck, R.-S., and Ehlers, K. (1991):** Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. *Pharmacology & Toxicology*, Vol. 69, 310-321.
- Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and Kodama, H. (1998):** Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, Vol. 125, 1747-1757.
- Niwa, H. (2007):** How is pluripotency determined and maintained? *Development*, Vol. 134, 635-646.
- Nguyen, L., Rigo, J.-M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., and Moonen, G. (2001):** Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell and Tissue Research*, Vol. 305, 187–202.
- Nusse, R. (2008):** Wnt signaling and stem cell control. *Cell Research*, Vol., 18, 523-527.
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A.C., Segal, M. and McKay, R.D.G. (1996):** Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mechanisms of Development*, Vol. 59, 89-102.
- Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., and Okano, H. (2004):** Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology*, Vol. 275, 124–142.
- O’Shea, K.S. (2002):** Neural differentiation of embryonic stem cells. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 198, 3-14.
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., and Motoko Maekawa, M. (2008):** Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells*, Vol. 26, 1663-1672.
- Osmond, M.K., Butler, A.J., Voon, F.C.T., and Bellairs, R. (1991):** The effects of retinoic acid on heart formation in the early chick embryo. *Development*, Vol. 113, 1405-1417.
- Otero, J. J., Fu, W., Kann, L., Cuadra, A.E., and Kessler, J.A. (2004):** β -Catenin signaling is required of neural differentiation of embryonic stem cells. *Development*, Vol. 131, 3545-3557.
- Paquette, J.A., Kumpf, S.W., Streck, R.D., Thomson, J.J., Chapin, R.E., and Stedman, D.B. (2008):** Assessment of the Embryonic Stem Cell Test and application and use in the pharmaceutical industry. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, Vol. 83, 104-111.

- Peters**, A.K., Van de Wouwer, G., Weyn, B., Verheyen, G.R., Vanparys, P., and Van Gompel, J. (2008): Automated analysis of contractility in the embryonic stem cell test, a novel approach to assess embryotoxicity. *Toxicology in Vitro*, Vol. 22, 1948 – 1956.
- Piersma**, A.H. (2004): Validation of alternative methods for developmental toxicity testing. *Toxicology Letters*, Vol. 149, 147-153.
- Pinelli**, J.M., Symington, A.J., Cunningham, K.A., and Paes, B.A. (2002): Case report and review of the perinatal implications of maternal lithium use. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, Vol. 187, 245-249.
- Radio**, N.M., Breier, Timothy J. Shafer, T.J., and Mundy, W.R. (2008): Assessment of chemical effects on neurite outgrowth in PC12 cells using high content screening. *Toxicology Sciences*, Vol. 105, 106–118.
- Raye**, W.S., Tochon-Danguy, N., Pouton, C.W., and Hayness, J.M. (2007): Heterogeneous population of dopaminergic neurons derived from mouse embryonic stem cells: preliminary phenotyping based on receptor expression and function. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 25, 1961-1970.
- Reubinoff**, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso A.(2000): Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology*, Vol. 18, 399-404.
- Rice**, D., and Barone Jr., S. (2000): Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspective*, Vol. 108, 511-533.
- Riebeling**, C., Pirow, R., Becker, K., Buesen, R., Eikel, D. Kaltenhäuser, J., Meyer, F., Nau, H., Slawik, B., Visan, A., Volland, J., Spielmann, H., Luch, A., and Seiler, A. (2011): The embryonic stem cell test as tool to assess structure-dependent teratogenicity: the case of valproic acid. *Toxicology Science*, Vol. 120, 360-370.
- Rohdewohld**, H., and Wobus, A.M. (2002) Embryonale Stammzellen der Maus. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*, Vol. 45, 113-122.
- Rohwedel**, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H.-H., Hescheler, J. and Wobus, A.M. (1994): Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Developmental Biology*, Vol. 165, 87-101.
- Rohwedel**, J., Guan, K., Hegert, C. and Wobus, A.M. (2001): Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicology in Vitro*, Vol. 15, 741–753.
- Rolletschek**, A., Chang, H., Guan, K., Czyz, J., Meyer, M., and Wobus, A.M. (2001): Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival promoting factors. *Mechanisms of Development*, Vol. 105, 93 – 104.

- Rühl, R., Plum, C., Elmazar, M.M.A., and Nau, H. (2001):** Embryonic subcellular distribution of 13-cis-and all-trans-retinoic acid indicates differential cytosolic/nuclear localization. *Toxicological Sciences*, Vol. 63, 82-89.
- Russel, W.M.S., and Burch, R.L. (1959):** The principles of humane experimental technique. London: Methuen.
- Sachinidis, A., Fleischmann, B.K., Kolossov, E., Wartenberg, M., Sauer, H., and Hescheler, J. (2003):** Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovascular Research*, Vol. 58, 278-291.
- Salero, E., and Hatten, M.E. (2000):** Differentiation of ES cells into cerebellar neurons. *PNAS USA*, Vol. 104, 2997-3002.
- Sarnat, H.B., Nochlin, D., and Born, D.E. (1998):** Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain and Development*, Vol. 20, 88-94.
- Scholz, G., Pohl, I., Seiler, A., Bremer, S., Brown, N.A., Piersma, A.H., Holzhutter, H.G., and Spielmann, H. (1998).** Results of the first phase of the ECVAM project "prevalidation and validation of three in vitro embryotoxicity tests". *ALTEX*, Vol.15, 3-8.
- Scholz, G, Genschow, E., Pohl, I., Bremer, S., Paparella, M., Raabe,HJ., Southee, J., and Spielmann, H. (1999):** Prevalidation of the embryonic stem cell test (EST) – a new in vitro embryotoxicity test. *Toxicology in Vitro*, Vol. 13, 675-681.
- Shuey, D.L., Lau, C., Logsdon, T.R., Zucker, R.M., Elstein, K.H., Narotsky, M.G., Setzer, R.W., Kavlock, R.J., and Rogers, J.M. (1994):** Biological based dose-response modeling in developmental toxicology: biochemical and cellular sequelae of 5-fluorouracil exposure in the developing rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 126, 129-144.
- Seiler, A., Visan, A., Buesen, R., Genschow, E., and Spielmann, H. (2004):** Improvement of an *in vitro* stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. *Reproduction Toxicology*, Vol. 18, 231-240.
- Seiler A.E., Buesen R., Visan A., and Spielmann H. (2006):** Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays: the embryonic stem cell test. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 329, 371-395.
- Sinning, A.R. (1998):** Role of Vitamin A in the formation of congenital heart defects. *The Anatomical Record*, Vol. 253, 147–153.
- Sittner, D. (2008):** Etablierung der toxikologischen Endpunkte Proliferation und Apoptose für ein *in vitro*-Testsystem zur Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität. Diplomarbeit, FU Berlin.
- Skladchikova, G., Berezin, V., and Bock, E. (1998):** Valproic acid, but not its nonteratogenic analogue 2-isopropylpentanoic acid, affects proliferation, viability and neuronal differentiation of the human teratocarcinoma cell line NTera-2. *Neurotoxicology*, Vol. 19, 357-370.

- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M. and Rogers, D. (1988):** Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, Vol. 336, 688–690.
- Spielmann, H., Pohl, I., Döring, B., Liebsch, M., and Moldenhauer, F. (1997):** The embryonic stem cell test (EST), an *in vitro* embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *In Vitro Toxicology*, Vol. 10, 119-127.
- Spitzer, N.C. (2006):** Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, Vol. 444, 707-712.
- Spitzer, N.C., Root, C.M., and Borodnisky, L.N. (2004):** Orchestrating neuronal differentiation: patterns of Ca^{2+} spikes specify transmitter choice. *TREND in Neuroscience*, Vol. 27, 415-421.
- Stavridis, M.P., and Smith, A.G. (2003):** Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 31, 45-49.
- Stephens, J.D., Golbus, M.S., Miller, T.R., Wolber, R.R. and Epstein, C.J. (1980):** Multiple congenital anomalies in a fetus exposed to 5-fluorouracil during the first trimester. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Vol. 137, 747-749.
- Strübing, C., Ahnert-Hilger, G., Shan, J., Wiedenmann, B., Hescheler, J., and Wobus, A.M. (1995):** Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mechanisms of Development*, Vol. 53, 275-287.
- Stummann, T.C., Hareng, L., and Bremer, S. (2007):** Embryotoxicity hazard assessment of methylmercury and chromium using embryonic stem cells. *Toxicology*, Vol. 242, 130-143.
- Trinh, H.-H., Reid, J., Shin, E., Liapi, A., Parnavelas, J.G., and Nadarajah, B. (2006):** Secreted factors from ventral telencephalon induce the differentiation of GABAergic neurons in cortical cultures. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 24, 2967-2977.
- Van Inzen, W.G., Peppelenbosch, M.P., van den Brand, M.W.M., Teroolen, L.G.J., and de Laat, S.W. (1996):** Neuronal differentiation of embryonic stem cells. *Biochemica et Biophysica Acta*, Vol 1312 21-26.
- Verkhatsky, A., and Kirchoff, F. (2007):** NMDA receptors in glia. *The Neuroscientist*, Vol. 13, 28-37.
- Verwei, M., van Burgsteden, J.A., Krul, C.A., van de Sandt, J.J., and Freidig, A.P. (2006):** Prediction of in vivo embryotoxic effect levels with a combination of in vitro studies and PBPK modelling. *Toxicological Letters*, Vol. 165, 79-87.
- Vetter, M.L., and Dorsky, R.I. (2005):** Neurogenesis. In: Rao, M.S., and Jacobson, M. (Eds.): *Developmental Neurobiology*, 4th ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 129-150.

- Wartenberg**, M., Günther, J., Hescheler, J., and Sauer, H. (1998): The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Laboratory Investigation*, Vol. 78, 1301-1314.
- Westmoreland**, J.J., Hancock, C.R., and Condie, B.G. (2001): Neuronal development of embryonic stem cells: A model of GABAergic neuron differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol. 284, 674-680.
- Wichterle**, H., Lieberam, I., Porter, J.A., and Jessell, T.M. (2002): Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, Vol. 110, 385-397.
- Wiese**, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K.V., Tarasova, Y., Wersto, R.P., Boheler, K.R., and Wobus, A.M. (2004): Nestin expression - a property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 61, 2510-2522.
- Wiles**, M.V., and Johansson, B.M. (1999): Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Experimental Cell Research*, Vol. 247, 241-248.
- Williams**, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, Vol. 336, 684-687.
- Wilson**, P.G., and Stice, S. (2006): Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews*, Vol. 2, 67-77.
- Wobus**, A.M., Kaomei, G., Shan, J., Wellner, M.-C., Rohwedel, J., Guanju, J., Fleischmann, B., Katus, H.A., Hescheler, J., and Franz, W.-M. (1997): Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular Cardiology*, Vol. 29, 1525-1539.
- Wobus**, Rohwedel, J., Maltsev, V., and Hescheler, J. (1994): In vitro differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specifically modulated by retinoic acid. *Roux's Archives of Developmental Biology*, Vol. 204, 36-45.
- Quiroz**, J.A., Gould, T.D., and Manji, H.K. (2004): Molecular effects of lithium. *Molecular Interventions*, Vol. 4, 259-272.
- Yerby**, M.S. (2003): Management issues for women with epilepsy: neural tube defects and folic acid supplementation. *Neurology*, Vol. 61, 23-26.
- Ying**, Q.-L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A. (2003): Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology*, Vol. 21, 183-186.
- Ying**, Q.-L., and Smith, A.G. (2003): Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods in Enzymology* 365, 327-341.

- Zhang, S.-C.** (2006): Neural subtype specification from embryonic stem cells. *Brain Pathology*, Vol. 16, 132-142.
- Zeng, C., Armando, I., Luo, Y., Eisner, G.M., Felder, R.A., and Jose P.A.** (2008): Dysregulation of dopamine-dependent mechanisms as a determinant of hypertension: studies in dopamine receptor knockout mice. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, Vol. 294, H551-H569.
- Zur Nieden, N.I., Kempka, G., and Ahr, H.J.** (2004): Molecular multiple endpoint embryonic stem cell test - a possible approach to test for the teratogenic potential of compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 194, 257-269.

7 PUBLIKATIONEN

Riebeling, C., Pirow, R., Becker, K., Buesen, R., Eikel, D. Kaltenhäuser, J., Meyer, F., Nau, H., Slawik, B., Visan, A., Volland, J., Spielmann, H., Luch, A., and Seiler, A. (2011): The embryonic stem cell test as tool to assess structure-dependent teratogenicity: the case of valproic acid. *Toxicology Science*, Vol. 120, 360-370.

Buesen, R., Genschow, E., Slawik, B., Visan, A., Spielmann, H., Luch, A., and Seiler, A. (2009): Embryonic stem cell test remastered: comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity in vitro. *Toxicological Sciences*, Vol. 108, 389-400.

Seiler, A., Buesen, R., Visan, A., and Spielmann, H. (2006): Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays: the Embryonic Stem Cell Test. In: Turksen, K. (Ed.): *Methods in Molecular Biology. Embryonic Stem Cell Protocols, Vol. 1: Isolation and Characterisation*, 2nd ed., Humana Press, New Jersey, 371-395.

Seiler, A., Visan, A., Buesen, R., Genschow, E. and Spielmann, H (2004): Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the Embryonic Stem Cell Test. *Reproductive Toxicology*, Vol. 18, 231-240.

Buesen, R., Visan, A., Genschow, E, Slawik, B., Spielmann, H., and Seiler, A. (2004): Trends in improving the Embryonic Stem Cell Test (EST): an overview. *ALTEX* 1, 15-22.

Poster:

Visan, A., Hayess, K., Slawik, B., Spielmann, H. and Seiler, A.: Towards an *in vitro* test system for developmental neurotoxicity: a new test method using mouse embryonic stem cells. 14th Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz, 28. - 30. September 2007.

Seiler, A., Hayess, K., Visan, A., Buesen, R., Slawik, B., Schlechter, K., and Spielmann, H.: The use of murine embryonic stem cells for assessing developmental neurotoxicity *in vitro*. Test Smart Developmental Neurotoxicity Symposium, Reston, USA, 12. - 15. März 2006.

Visan, A., Buesen, R., Slawik, B., Schlechter, K., Spielmann, H. and Seiler, A. Improving the Embryonic Stem Cell Test (EST) II: differentiation of mouse ES cells into multiple cell types and identification of molecular endpoints. 12th Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz, 19. - 21. September 2003.

Buesen, R., Visan, A., Slawik, B., Schlechter, K., Genschow, E., Spielmann, H., and Seiler, A.: Improving the Embryonic Stem Cell Test (EST) I: implementing molecular endpoints of ES cell differentiation into cardiomyocytes. 12th Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz, 19. - 21. September 2003.

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting für die Unterstützung und freundliche Betreuung der Arbeit als Erstgutachterin.

Besonders herzlich danke ich Frau Dr. Andrea Seiler für die Betreuung der Arbeit beim ZEBET im BfR. Sie hat die Arbeit wissenschaftlich begleitet und mich jederzeit unterstützt.

Prof. Dr. Horst Spielmann, dem ehemaligen Leiter des ZEBET, danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens. Er hat die Forschung an der Weiterentwicklung des EST stets gefördert

Bei Frau Dr. Katrin Hayess möchte ich mich sehr bedanken für den anregenden und hilfreichen wissenschaftlichen Austausch rund um die Neuronen. Bei Birgitta Slawik bedanke ich mich sehr für die technische Unterstützung im Labor und insbesondere für die Betreuung der Zellkulturen. Dana Sittner danke ich sehr für die zwar kurze aber anregende und konstruktive Zusammenarbeit in der ZEBET-Arbeitsgruppe. Einen herzlichen Dank an Katharina Schlechter und Dr. Roland Büsen für eine schöne vergangene Zeit in der ZEBET-Arbeitsgruppe rund um die FACS-Analyse und darüber hinaus. Katharina Schlechter danke ich besonders für die anregenden Gespräche rund um die Alternativmethoden und den Tierschutz.

Frau Prof. Dr. Elena Pohl danke ich sehr für die Unterstützung der Ca^{2+} -Imaging-Versuche. Sie hat mir ermöglicht, die Untersuchungen in ihrem damaligen Labor, am Institut für Zell- und Neurobiologie an der Charité Berlin durchzuführen. Die Möglichkeit, an einem konfokalen Lasermikroskop zu arbeiten war für mich eine interessante wissenschaftliche Bereicherung.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Katrin Hayess, Dana Sittner, Anke-Christine Sass, Silke Schwarz, Ronald Varlemann, Julie Wayne, Rik Brydson und Ernst-Ludwig von Aster für die hilfreiche Unterstützung beim Korrekturlesen der Arbeit.

Allen meinen Freunden danke ich sehr herzlich für die Anteilnahme, die aufmunternden Worte und netten Ratschläge.

Der größte Dank geht an Jule und Erni, dafür dass ihr mir immer aufbauend zur Seite standet und mir so viele Wochenenden freigeräumt habt.

9 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

10 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle öffentlichen Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Berlin, den 20.11.2011

Anke Visan

ANHANG**1 Material****1.1 Technisches Material**

Absaugpumpe	IBS, Chur (CH)
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
CASY® Zellzählgerät	innovatis, Bielefeld
Digitalkamera SIS ColorView II	Olympus, Hamburg
FACSCalibur™ Durchflusszytometer, PC-Einrichtung mit Cell Quest Pro™ Software	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
Glaswaren	Schott, Jena
Handzähler	NeoLab, Heidelberg
Konfokales Laser Mikroskop TCS SP5	Leica, Heidelberg
Kulturschalen mit Glasboden	MatTec, Ashland (USA)
Magnetrührer	NeoLab, Heidelberg
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroplatten-Reader	Tecan, Crailsheim
Minifuge (gekühlt)	Heraeus, Hanau
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem, Mini Trans-Blot Cell und PowerPac HC	Bio-Rad, München
Mikrotiterplattenschüttler	IKA, Staufen
Parafilm	NeoLab, Heidelberg
Phasenkontrast Mikroskop AH3-RFC	Olympus, Hamburg
Pipettierhilfe (accu jet)	Brand, Wertheim
Plastikware für die Zellkultur	Eppendorf, Hamburg; Falcon, Heidelberg; Greiner Bio-One, Solingen; NeoLab, Heidelberg
Rundbodenröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Röntgenfilm	Kodak, Berlin
Reagenzglasmixer (vortex)	NeoLab, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm)	Millipore, Eschborn
Spritzen	Braun, Melsungen

Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Köttermann, Uetze
Zählkammer nach Thoma	Brand, Wertheim
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg; Heraeus, Hanau
1.2 Medien und Chemikalien	
All-trans Retinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
(±)- α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-AMPA (Propionsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (30%, 29:1)	BioRad, München
AP5 (D(-)-2-Amino-5 Phosphonopentansäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
bFGF (<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> , human)	Strathmann Biotec, Hamburg
B27 Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA; 30%), Fraktion V	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	BioRad, München
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I (vom Rind)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Dopamin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin und Glucose	Invitrogen, Karlsruhe
Eserserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA-Lösung (1%)	PanBiotech, Aidenbach
EtOH	Merck, Darmstadt
FACSFlow	BD Biosciences, Heidelberg
FCS (<i>Fetal Calv Serum</i>), Charge AJC 10057 und Charge CRD0378	HyClone, Bonn
Charge 40Q3223K	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe
Fibronectin	Invitrogen, Karlsruhe

Fluo-4-Acetoxymethyl (Fluo-4-AM)	Invitrogen, Karlsruhe
5-FU (5-Fluorouracil)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gelatine (2%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	BioRad, München
L-Glutaminsäure Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Insulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KCl (Kaliumchlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Laminin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lithium Chlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	BioRad, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
mLIF (<i>Murine Leukemia Inhibitory Factor</i>); Esgron™	Millipore, Schwalbach
Methylazoxymethanolacetat	MRI, Kansas City (USA)
Mowiol	Merck, Darmstadt
MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N2-Supplemente	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NBQX (1,2,3,4-Tetrahydro-6-Nitro-2,3-Dioxobenzo-[f]quinoxalin-7-Sulfonamid Dinatriumsalz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NEAA (Nicht-essentielle Aminosäuren)	Invitrogen, Karlsruhe
Neurobalsal™ Medium	Invitrogen, Karlsruhe
NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	PanBiotech, Aidenbach
Penicillin G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺ (Tabletten)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pluronic® F-127, 20% (w/v) in DMSO	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Ponceau Rot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent	
Substrate	Pierce, Bonn
TEMED (1,2-Bi(dimethylamino)ethan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin (0,05%)-EDTA (0,53 mM)-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Valproinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

1.3 Antikörper

Alle Antikörper wurden nach den Angaben des Herstellers gelöst, aliquotiert und je nach Herstellerangaben bei -20°C oder 4°C aufbewahrt.

Tab. 1: Verwendete Primärantikörper in der Immunofluoreszenzmikroskopie (IFM), Durchflusszytometrie (hier: FACS) und im Western Blot (WB)

Primärantikörper	Verdünnung (v/v)		Hersteller
	IFM	FACS/ WB	
α -Actinin	1:1600	1:1600	Sigma-Aldrich
γ -Aminobuttersäure (GABA; Kaninchen IgG)	1:5000	-	Sigma- Aldrich
CNPase (Maus IgG)	1:200	1:3200/ 1:500	Biozol/Abcam
Cholin-Acetyltransferase (ChAT; Ziege IgG)	1:100	-	Chemicon
GFAP (G-A-5, Maus IgG)	1:1600	1:1600/ 1:5000	Chemicon
α -Internexin (1D2, Maus IgG1)	1:400	1:800	Biozol/Abcam
MAP2 (AP-20, Maus IgG)	1:800	1:1600/ 1:500	BD PharMingen

MF20 (Maus IgG2b)	1:1600	1:1600	Hybridoma Bank
My-32 (Maus IgG1)	1:100		Sigma-Aldrich
NCAM (AG1, Maus IgG; 5B8, IgG1)	1:100		Hybridoma Bank
Nestin (Rat-401; Maus IgG1)	1:1000	-	Hybridoma Bank
Neu-N (Maus IgG1)	1:100		Chemicon
Pax6 (Maus IgG1)	1:100	-	Hybridoma Bank
O4 (Maus IgM)	1:100	-	Chemicon
RC2 (Maus IgM)	1:40	-	Hybridoma Bank
Serotonin (Kaninchen IgG)	1:5000	-	Sigma-Aldrich
Skeletal Myosin (My 32; Maus IgG1)	1:100		Sigma-Aldrich
Sox1 (Maus IgG)	1:200	-	Chemicon
Synaptophysin (Kaninchen IgG)	1:1000	-	Biozol/Abcam
Thyrosin-Hydroxylase (TH; Maus IgG1)	1:200	-	Chemicon
β -Tubulin III (SDL.3D10; Maus IgG2b)	1:3200	1:3200/ 1:1000	Sigma-Aldrich

Tab. 2: Verwendete Sekundärantikörper und Konjugate

Sekundärantikörper/ Konjugate	Verdünnung	Hersteller
Biotin-SP, Fc _v (Ziege Anti-Maus IgG)	1:1000	Dianova
Biotin-SP, Fc _v (Ziege Anti-Maus IgG 1, 2a, 2b, 3)	1:1000	
Biotin-SP Ziege (Anti-Maus IgM)	1:100	
R-Phycoerythrin, F(ab') ₂ (Ziege Anti-Maus IgG)	1:600	
CY TM 3 (Ziege Anti-Kaninchen IgG)	1:500	
CY TM 3 (Ziege Anti-Maus IgG , H+L)	1:500	
CY TM 3 (Ziege Anti-Maus IgG 1)	1:500	
CY TM 3 (Ziege Anti-Maus IgG 2b)	1:500	
CY TM 2 (Ziege Anti-Kaninchen IgG)	1:100	
CY TM 2 (Ziege Anti-Maus IgG 2a)	1:100	
CY TM 2 (Ziege Anti-Maus IgM)	1:100	
CY TM 2 (Esel Anti-Ziege IgG)	1:100	
R-Phycoerythrin – Streptavidin	1:600	
HRPO (Ziege Anti-Maus IgG)	1:10000	

2 Medienzusammensetzungen

Tab. 3: Zusammensetzung des D3-Kulturmediums und des D3-Einfriermediums

D3-Kulturmedium	D3-Einfriermedium
DMEM 15% FCS 2 mM Glutamin 50 U/ml Penicillin/ 50 µg/ml Streptomycin 1% NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol	DMEM 40% FCS 2 mM Glutamin 50 U/ml Penicillin/ 50 µg/ml Streptomycin 1% NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol 10% DMSO

Tab. 4: Zusammensetzung des Neuronendifferenzierungsmediums

Neuronendifferenzierungsmedium (N2B27-Medium; 1:1)	
N2	B27
DMEM/F12 N2 (1:100) ¹⁾ 20 µg/ml Insulin 300 µg/ml BSA 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin	Neurobasalmedium B27 (1:50) ²⁾ 0,1 mM β-Mercaptoethanol

¹⁾ N2 enthält 1 mM Human Transferrin, 0,0861 mM Insulin, 0,002 mM Progesteron, 10,01 mM Putrescin und 0,00301 mM Selenit.

²⁾ B27 enthält ca. 20 unterschiedliche Substanzen, u.a. auch Retinol (Brewer et al., 1993). Die genaue Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht näher spezifiziert.

3 Zelllinie

Embryonale Stammzellen der Maus; Stamm 129/Sv; Klon D3 von ATCC-LGC Standards, Wesel (ATCC-Zellen) und erhalten von Prof. Dr. Rolf Kemler, Max-Planck-Institut, Freiburg (Kemler-Zellen).

4 Lösungen

Zellkultur/Mikroskopie

bFGF-Lösung: 5 µg/ml bFGF, 0,1% (w/v) BSA in PBS

Mowiol-Lösung: 30% (w/v) Mowiol in bidest. H₂O

Durchflusszytometrie/Immunzytochemie

DNase-Dissoziationslösung: 4 U/ml DNase I in Trypsin/EDTA-Lösung

PBS-EDTA-Lösung: 1 mM EDTA in PBS

PBS-EDTA-FCS-Lösung: 1 mM EDTA, 5% (v/v) FCS in PBS

Blockierungslösung: 1% (w/v) BSA, 0,15% (w/v) Saponin, 10% (v/v) Ziegen Serum oder Esel Serum in PBS

PFA-(Paraformaldehyd-) Fixierlösung: 4% (w/v) PFA in PBS

Waschlösung I: 1% (w/v) BSA in PBS

Waschlösung II: 1% (w/v) BSA, 0,15% (w/v) Saponin in PBS

Calcium-Imaging

HEPES-Pufferlösung: 145 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 5 mM KCl, 10 mM Glucose, 2,5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES in bidest. H₂O; pH 7,4

MTT-Test

MTT-Lösung: 5 mg/ml in Neuronendifferenzierungsmedium

SDS-PAGE/Western Blot

SDS-Probenpuffer: 1 mM EDTA, 6% (v/v) Glycerol, 12 mM Tris-HCl (Einstellen auf pH 6,8); dann Zugabe von 3% (v/v) SDS, 1,5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,02% (v/v) Bromphenolblau

Laufpuffer: 250 mM Tris-Base, 1921 mM Glycin, 34,6 mM SDS in bidest. H₂O (pH 8,6 - 8,8)

Blauer Laufpuffer: 0,001 % Bromphenolblau, 0,2% (v/v) Glycerol

Trenngelpuffer: 375 mM Tris-Base, 0,2% (v/v) SDS in bidest. H₂O (pH 8,8)

Sammelgelpuffer: 125 mM Tris-Base, 0,2% (v/v) SDS in bidest. H₂O (pH 6,8)

Entfärber: 10% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure

Ponceau Rot: 0,2% (w/v) Ponceau Rot, 3 % (w/v) Trichloressigsäure in bidest. H₂O

Tank-Blot-Puffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 18% (v/v) Methanol, 0,01% (v/v) SDS in bidest. H₂O

TBST: 50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween-20

TBST-Blockierungslösung: 4% (w/v) Magermilchpulver in TBST

DAB-NiCl-Farblösung: 100 mM Tris-HCL (pH 7,4), 0,03 mM DAB, 20 mM NiCl₂, 0,03% (v/v) H₂O₂

5 Beschichtungen

Gelatine: 6 cm Petrischalen oder Deckgläser wurden mit einer 0,1%igen (v/v) Gelatine-Lösung (in PBS) benetzt und mind. 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Gelatine-Lösung entfernt und die Platten einmal mit PBS gewaschen und trocken gesaugt.

Fibronectin: 6 cm Petrischalen wurden mit einer 50 µg/ml Fibronectin-Lösung (in bidest. H₂O) benetzt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Fibronectin-Lösung entfernt, die Platten einmal mit PBS gewaschen und trocken gesaugt.

Poly-L-Ornithin (PLO): 6 cm Petrischalen oder Deckgläser wurden mit einer 15 µg/ml PLO-Lösung (in PBS) benetzt und für ein- bis zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die PLO-Lösung entfernt, die Platten zweimal mit PBS gewaschen und trocken gesaugt. Die beschichteten Platten wurden über Nacht in den Brutschrank gestellt und vor dem Aussäen der Zellen einmal mit warmem DMEM/F12-Medium gewaschen.