

# Etablierung eines humanen stammzellbasierten *in vitro* Tests zur Prüfung auf Entwicklungsknochentoxizität

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

Dana Sittner

aus Zwickau

2016

Diese Dissertation wurde zwischen Juli 2010 und Dezember 2013 am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Abteilung 9 „Experimentelle Toxikologie und ZEBET“, Fachgruppe 92 „ZEBET – Alternativmethoden zu Tierversuchen“ unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Andreas Luch und Dr. Andrea E. M. Seiler angefertigt.

Diese Arbeit wurde mit einem 2-jährigen Promotionsstipendium von der Sonnenfeld Stiftung gefördert.

1. Gutachter: Prof. Dr. Günther Weindl

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Spielmann

Disputation am 14.12.2016

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>viii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Entwicklungs(knochen)toxizität – Grundlagen und Prüfstrategien</i>	1
1.1.1 Grundlagen	1
1.1.2 Konventionelle <i>in vivo</i> Prüfung	4
1.1.3 Notwendigkeit des Einsatzes alternativer Prüfmethode	5
1.1.4 Alternative Prüfmethode	8
1.2 <i>Knochenentwicklung – in vivo Entwicklung, molekulare Grundlagen und in vitro Zellkulturmodelle</i>	11
1.2.1 <i>In vivo</i> Knochenentwicklung	12
1.2.2 Molekulare Grundlagen der osteogenen Differenzierung	14
1.2.2.1 Dlx5	15
1.2.2.2 Runx2	16
1.2.2.3 Alkalische Phosphatase	17
1.2.2.4 Kollagen Typ I	18
1.2.2.5 Osteocalcin	18
1.2.2.6 Mineralisierung	19
1.2.3 <i>In vitro</i> Modelle für die osteogene Differenzierung	19
1.2.4 Mesenchymale Progenitorzellen aus humanen embryonalen Stammzellen	21
1.3 <i>Auswahl von Testsubstanzen für die Evaluierung des etablierten in vitro Assays</i>	22
1.3.1 Valproinsäure	25
1.3.2 Borsäure	25
1.3.3 Warfarin	27
1.3.4 5-Fluorouracil	28
1.3.5 Diphenhydramin	29
1.3.6 Metoclopramid	30
1.3.7 Penicillin G	30
<b>2 Zielstellung</b>	<b>31</b>
<b>3 Material</b>	<b>33</b>
3.1 <i>Reagenzien</i>	33

3.2	<i>Testsubstanzen</i>	35
3.3	<i>Zelllinien</i>	36
3.4	<i>Zellkulturmaterialien</i>	36
3.5	<i>Primäre Antikörper und Phalloidin</i>	37
3.6	<i>Sekundäre Antikörper</i>	38
3.7	<i>Isotypkontrollen</i>	38
3.8	<i>Kits</i>	39
3.9	<i>Geräte</i>	39
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>42</b>
4.1	<i>Zellkultur</i>	42
4.1.1	Kultivierung von mesenchymalen Progenitorzellen aus humanen embryonalen Stammzellen (hES-MPs)	42
4.1.2	Kultivierung der humanen Osteosarkomzelllinie Saos-2	44
4.1.3	Kultivierung von embryonalen Stammzellen aus der Maus	44
4.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	45
4.1.5	Osteogene Differenzierung von hES-MPs	46
4.1.6	Osteogene Differenzierung von embryonalen Stammzellen aus der Maus	48
4.2	<i>Zellbiologische Methoden</i>	50
4.2.1	Bestimmung der Zellviabilität	50
4.2.2	Messung der Proliferation	50
4.2.3	Färbung und quantitativer Nachweis der Mineralisierung	51
4.2.3.1	Alizarin Rot S Färbung	51
4.2.3.2	Von Kossa Färbung	52
4.2.3.3	Quantifizierung von Calcium	52
4.2.3.4	Fluoreszenzbasierter Nachweis der Mineralisierung	53
4.2.4	Nachweis der Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase	54
4.2.4.1	Färbung der Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase	54
4.2.4.2	Quantifizierung der Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase	55
4.3	<i>Immun- und biochemische Methoden</i>	56
4.3.1	Immunfluoreszenzfärbungen	56
4.3.1.1	Fixierung der Zellen	56
4.3.1.2	Nachweis von Dlx5	57
4.3.1.3	Nachweis von Kollagen Typ I	57
4.3.1.4	Nachweis von Runx2	58
4.3.1.5	Nachweis von Osteocalcin	58
4.3.1.6	Zellkernfärbung, Einbettung der Präparate und Auswertung	59
4.3.2	Durchflusszytometrische Analysen	59
4.3.2.1	Nachweis von Oberflächenmarkern	59

4.3.2.2	Zellvereinzelung osteogen differenzierender Zellkulturen	60
4.3.2.3	Nachweis von Runx2	62
4.3.2.4	Nachweis von Alkalischer Phosphatase	62
4.3.3	Herstellung von Zelllysaten für Western-Blot Analysen	63
4.3.4	Proteinbestimmung	64
4.3.5	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	64
4.3.6	Western-Blot	66
4.3.7	Nachweis geblotteter Proteine mittels Antikörpern	67
4.4	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	69
4.4.1	Isolierung und Aufreinigung von Ribonukleinsäure	69
4.4.1.1	Zellyse und Isolierung von Ribonukleinsäure	69
4.4.1.2	Enzymatischer Verdau mit Desoxyribonuklease	70
4.4.1.3	Weitere Aufreinigung der Ribonukleinsäure	70
4.4.2	Untersuchung der Ribonukleinsäure-Quantität und -Qualität	71
4.4.2.1	NanoDrop-Messung	71
4.4.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	71
4.4.3	Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure	72
4.4.4	Real-Time Polymerasekettenreaktions Array	73
4.5	<i>Applikation von Testsubstanzen</i>	74
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>77</b>
5.1	<i>Kultivierung und Differenzierung von hES-MPs</i>	77
5.1.1	Nicht-differenzierende hES-MPs	77
5.1.2	Optimierung des Differenzierungsprotokolls	78
5.1.3	Einfluss verschiedener Induktorkombinationen	80
5.2	<i>Charakterisierung der Differenzierung von hES-MPs und Identifizierung molekularer Marker</i>	82
5.2.1	Wachstum der hES-MP Kulturen	83
5.2.2	Identifizierung geeigneter Antikörper/Färbungen und Methodenetablierung mit Saos-2 Zellen	84
5.2.3	Bildung früher osteogener Markerproteine in hES-MPs	85
5.2.4	Ausbildung der extrazellulären Matrix in hES-MP Kulturen	88
5.2.5	Mineralisierung von hES-MPs	91
5.3	<i>Etablierung von Methoden zur Quantifizierung molekularer Marker</i>	94
5.3.1	Entwicklung eines Protokolls zur Zellvereinzelung für die durchflusszytometrische Analyse	94
5.3.2	Quantifizierung von Runx2	96
5.3.3	Quantifizierung von Alkalischer Phosphatase	98
5.3.4	Quantifizierung der Mineralisierung	99
5.4	<i>Substanztestungen</i>	101

5.4.1	Effekt von Levamisol auf differenzierende hES-MPs	103
5.4.2	Identifizierung eines geeigneten Zeitfensters für Substanzbehandlungen	104
5.4.3	Testung weiterer Substanzen	106
5.4.4	Limitierungen des Assays	109
5.4.4.1	Zytotoxische Substanzkonzentrationen	109
5.4.4.2	Lösungsmittelleffekte	111
5.4.5	Initiale weiterführende Untersuchungen	113
5.4.5.1	Identifizierung weiterer molekularer Marker der Differenzierung von hES-MPs	114
5.4.5.2	Effekt von Natriumvalproat auf spezifische Marker während der Differenzierung von hES-MPs	117
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>119</b>
6.1	<i>Eignung von hES-MPs als Zellmodell für die Etablierung eines osteogenen in vitro Testsystems</i>	119
6.1.1	Etablierung und Optimierung der osteogenen Differenzierung von hES-MPs	119
6.1.1.1	Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter	120
6.1.1.2	Einfluss verschiedener osteogener Induktoren	121
6.1.2	Charakterisierung der osteogenen Differenzierung von hES-MPs	124
6.1.2.1	Präsenz und zeitlicher Verlauf typischer osteogener Differenzierungsprozesse in hES-MPs	124
6.1.2.2	Bildung ausgewählter osteogener Marker in hES-MPs	125
6.1.2.2.1	Dlx5	125
6.1.2.2.2	Runx2	126
6.1.2.2.3	Alkalische Phosphatase	127
6.1.2.2.4	Kollagen Typ I	127
6.1.2.2.5	Osteocalcin	127
6.1.2.2.6	Mineralisierung	128
6.1.2.3	Erkenntnisse zum Entwicklungsstadium von hES-MPs	129
6.2	<i>Etablierung toxikologischer Endpunkte für osteogen differenzierende hES-MPs</i>	130
6.2.1	Eignung der näher untersuchten molekularen Marker und der Methoden zu ihrer Quantifizierung	131
6.2.2	Identifizierung potentieller weiterer molekularer Marker	132
6.3	<i>Eignung des etablierten in vitro Assays zur Erfassung von substanzinduzierten Effekten auf die Knochendifferenzierung</i>	135
6.3.1	Diskussion der Resultate für die einzelnen Testsubstanzen	136
6.3.1.1	Valproinsäure	136
6.3.1.2	Borsäure	137
6.3.1.3	Warfarin	138
6.3.1.4	5-Fluorouracil	139
6.3.1.5	Diphenhydramin	140
6.3.1.6	Metoclopramid	140

## Inhaltsverzeichnis

---

6.3.1.7	Penicillin G	141
6.3.2	Limitierungen des Assays	142
6.3.2.1	Zytotoxische Substanzkonzentrationen	142
6.3.2.2	Effekt von Dimethylsulfoxid auf die Mineralisierung	144
6.4	<i>Zusammenfassende Bewertung der Eignung des hES-MP Assays zur Vorhersage von Entwicklungsknochentoxizität</i>	147
6.5	<i>Ausblick</i>	148
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>152</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b>	<b>155</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>158</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>187</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>190</b>
<b>12</b>	<b>Anhang</b>	<b>192</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Relative Sensitivität des humanen Embryos gegenüber teratogenen Einflüssen während verschiedener Entwicklungsstadien (aus Schäfer et al., 2012).	2
Abb. 2: Sensitive Perioden der wichtigsten Organsysteme während der pränatalen Entwicklung des Menschen (aus Schäfer et al., 2012).	3
Abb. 3: Schematische Phasen der embryonalen und fetalen Skelettentwicklung (aus Mundlos, 2005).	13
Abb. 4: Schema der enchondralen Ossifikation in den Röhrenknochen von Vertebraten (nach Wolpert et al., 2007).	14
Abb. 5: Prozesse der osteogenen Differenzierung (nach Stein et al., 2004).	15
Abb. 6: Morphologie nicht-differenzierender hES-MPs.	77
Abb. 7: Biosynthese von Oberflächenmarkern in nicht-differenzierenden hES-MPs.	78
Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mineralisierung in differenzierenden hES-MPs.	79
Abb. 9: Osteogene Differenzierung von hES-MPs in Abhängigkeit von der Beschichtung und der initialen Zelleinsaat.	80
Abb. 10: Differenzierung von hES-MPs unter Zugabe verschiedener Induktorkombinationen.	82
Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Proliferation und Zellviabilität in differenzierenden hES-MPs.	83
Abb. 12: Nachweis osteoblastärer Proteinmarker in Saos-2 Zellen.	85
Abb. 13: Bildung von Dlx5 und Runx2 in hES-MPs.	87
Abb. 14: Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase (AP) in hES-MPs.	88
Abb. 15: Bildung von Kollagen Typ I in hES-MPs.	89
Abb. 16: Bildung von Osteocalcin (OC) in hES-MPs.	91
Abb. 17: Differenzierungsverlauf von hES-MPs.	93
Abb. 18: Vereinzelung osteogener Zellkulturen für die durchflusszytometrische Analyse.	95
Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse von Runx2 in verschiedenen humanen Zelllinien.	96
Abb. 20: Durchflusszytometrische Quantifizierung von Runx2 in hES-MPs.	97
Abb. 21: Einfluss der Dissoziationsmethode auf die Färbung von zellmembranständiger AP für die Durchflusszytometrie.	98
Abb. 22: Durchflusszytometrische Quantifizierung von AP in differenzierenden hES-MPs.	99
Abb. 23: Quantifizierung der Mineralisierung in differenzierenden hES-MPs.	101
Abb. 24: Effekt von Levamisol (LEV) auf die Mineralisierung, Zellviabilität und AP-Aktivität in differenzierenden hES-MPs.	104
Abb. 25: Effekte von 5-Fluorouracil (5-FU), Natriumvalproat (NaVPA) und Penicillin G (PenG) auf die Mineralisierung und Zellviabilität von differenzierenden hES-MPs bei unterschiedlichen Expositionsszenarien.	105

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 26: Effekte von Borsäure (BA), Warfarin (WAR), Diphenhydramin (DPH) und Metoclopramid (MCP) auf die Mineralisierung und Zellviabilität von differenzierenden hES-MPs.	107
Abb. 27: Vergleich der Mineralisierung und Zellviabilität für die verwendeten Testsubstanzen bei Exposition von Tag 1–15.	109
Abb. 28: Effekt zytotoxischer Konzentrationen von PenG auf den Mineralisierungsassay.	110
Abb. 29: Effekt von Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die Zellviabilität und Mineralisierung von hES-MPs.	112
Abb. 30: Effekt von Ethanol (EtOH) auf die Mineralisierung und Zellviabilität von hES-MPs.	113
Abb. 31: Genexpression der bereits untersuchten Marker während der Differenzierung von hES-MPs.	115
Abb. 32: Marker mit hochregulierter Genexpression während der Differenzierung von hES-MPs.	116
Abb. 33: Effekt von NaVPA auf die Genexpression ausgewählter Marker.	118
Abb. 34: Schematische Darstellung der osteogenen Differenzierung von hES-MPs und Verlauf der Bildung/Entwicklung typischer osteogener Marker basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Daten.	125
Abb. A1: Alizarin Rot S Färbung der Differenzierung von hES-MPs unter Zugabe verschiedener Induktorkombinationen.	192
Abb. A2: Enzymaktivität von AP in hES-MPs induziert mit $\beta$ -GP oder AA und $\beta$ -GP.	193

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht zur Klassifizierung der in dieser Arbeit verwendeten Testsubstanzen entsprechend ihres embryo- und entwicklungstoxischen Potentials für den Menschen.	24
Tab. 2: Mittlere EC <sub>50</sub> -Werte, untere und obere Grenze des 95 % Konfidenzintervalls (Klammer) und p-Werte der für hES-MPs getesteten Endpunkte.	108
Tab. A1: Expressionsdaten aller mittels PCR Array untersuchten Gene in differenzierenden hES-MPs.	193

## Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>
5-FU	5-Fluorouracil
5-HT	5-Hydroxytryptamin
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
$\beta$ -GP	$\beta$ -Glycerophosphat
A	Absorption
AA	<i>Ascorbic acid</i> , Ascorbinsäure
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BA	<i>Boric acid</i> , Borsäure
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i> , basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BMP(s)	<i>Bone morphogenetic protein(s)</i> , knochenmorphogenetische(s) Protein(e)
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CALCR	Calcitonin-Rezeptor
CCD	<i>Charge-coupled device</i> , ladungsgekoppeltes Bauteil
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CLP- Verordnung	<i>Regulation (European Commission) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures</i> , Verordnung Nr. 1272/2008 der Europäischen Kommission zur Klassifizierung, Kennzeichnung und Verpackung von Substanzen und Gemischen
COLxA1	Alpha-1-Kette des Kollagens Typ x
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

C <sub>T</sub>	<i>Cycle threshold</i> , Schwellenwert-Zyklus
CTSK	Cathepsin K
Cy	Cyanin
d	<i>Day</i> , Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dex	Dexamethason
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPH	Diphenhydramin
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	<i>Half maximal effective concentration</i> , halbmaximale effektive Konzentration
ECM	<i>Extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
ECHA	Europäische Chemikalienagentur
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i> , Europäisches Zentrum für die Validierung von Alternativmethoden
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ES Zellen	Embryonale Stammzellen
EST	Embryonaler Stammzelltest
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
FACIT	<i>Fibril-associated collagens with interrupted triple-helices</i> , fibrillenassoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

## Abkürzungsverzeichnis

---

Fc	<i>Fragment crystallisable region</i> , kristallisierbares Fragment
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor
FSC	<i>Forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
Gla	Gamma-Carboxyglutamat
IgG	Immunglobulin G
H+L	<i>Heavy and light chains</i> , schwere und leichte Ketten
HDAC(s)	Histondeacetylase(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hES-MP(s)	<i>Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitor cell(s)</i> , aus humanen embryonalen Stammzellen gewonnene mesenchymale Progenitorzelle(n)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> , Internationaler Rat zur Harmonisierung technischer Anforderungen für die Zulassung von Humanarzneimitteln
IHH	<i>Indian hedgehog</i>
kDa	Kilodalton
LEV	Levamisol
MCP	Metoclopramid
MGP	Matrix Gla Protein
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> , durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MM-Test	Micromass test
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , Boten-RNA
MSC(s)	<i>Mesenchymal stem cell(s)</i> , mesenchymale Stammzelle(n)
MV	Matrixvesikel
Naphthol AS	3-Hydroxy-2-naphthanilid
NaVPA	Natriumvalproat

## Abkürzungsverzeichnis

---

n.d.	<i>No date</i> , kein Datum
OCPC	Ortho-Cresolphthalein Complexone
OC	Osteocalcin
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> , Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PenG	Penicillin G
PFA	Paraformaldehyd
pNP	p-Nitrophenol
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> , Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien
RFU	<i>Relative fluorescence units</i> , relative Fluoreszenzeinheiten
RLU	<i>Relative light units</i> , relative Lichteinheiten
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
Saos-2	„ <i>Sarcoma osteogenic</i> “, humane Osteosarkomzelllinie
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

SSC	<i>Side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
T25	25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche
T75	75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Saline
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i> , transformierender Wachstumsfaktor beta
TNAP	<i>Tissue-nonspecific alkaline phosphatase</i> , gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
ToF-SIMS	<i>Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry</i> , Sekundärionenmassenspektrometrie
TSA	Trichostatin A
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
U.S. FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i> , amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
VPA	<i>Valproic acid</i> , Valproinsäure
w/v	Gewichtsprozent
WAR	Warfarin
WEC	<i>Whole embryo culture</i>
Wnt	<i>Wingless and int-1</i>

# 1 Einleitung

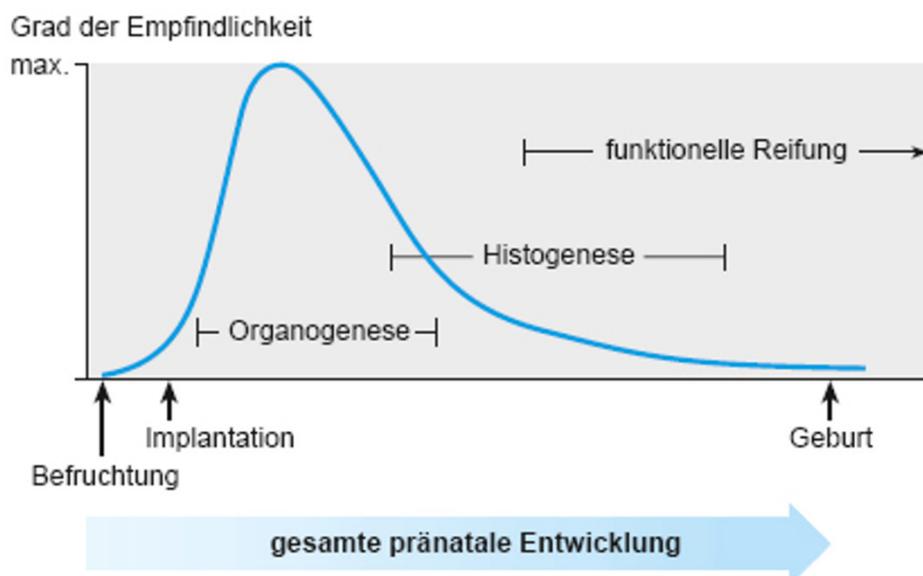
## 1.1 Entwicklungs(knochen)toxizität – Grundlagen und Prüfstrategien

### 1.1.1 Grundlagen

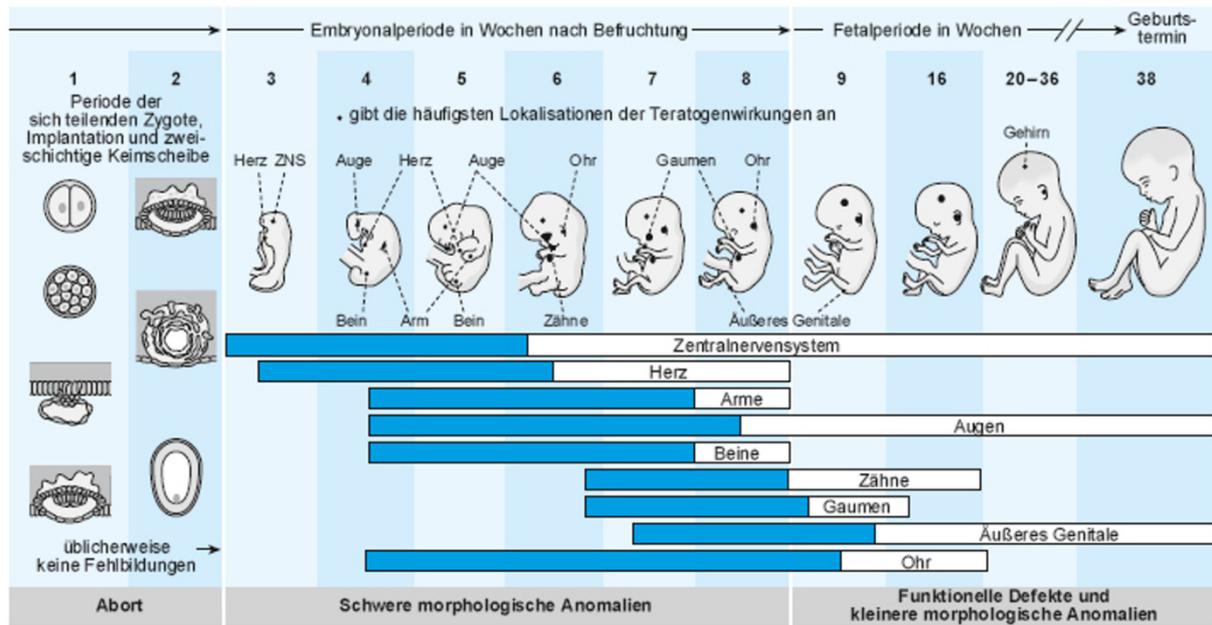
Die Entwicklungstoxikologie ist ein Teilgebiet der Toxikologie, das sich mit der Untersuchung von adversen Effekten beschäftigt, die durch exogene Einflüsse auf den sich entwickelnden Organismus verursacht wurden. Als Folge einer entwicklungstoxischen Schädigung kann es zum Tod des Embryos oder Fetus, strukturellen Fehlbildungen, Wachstumsverzögerungen oder funktionellen Defiziten kommen. Es wird geschätzt, dass ca. 2–8,5 % der Entwicklungsstörungen auf Umwelteinflüsse, die toxische Chemikalien mit umfassen, zurückgeführt werden können (Miller et al., 2007). Genetisch bedingte Ursachen bilden im Vergleich mit ca. 13,5–28 % eine deutlich gewichtigere Position, allerdings ist der überwiegende Anteil auf multifaktorielle (ca. 20–50 %) oder unbekannte (ca. 34–70 %) Gründe zurückzuführen. Der sich entwickelnde Organismus besitzt eine besondere Sensitivität gegenüber exogenen Noxen. Dies erscheint nicht überraschend im Hinblick darauf, dass während der Entwicklung in kürzester Zeit ein komplexes biologisches System entsteht, dass die Spezifizierung in mehr als 200 Zelltypen, die Organisation von diesen zu funktionellen Organen und die Anlage einer umfangreichen Infrastruktur zur Versorgung und Kommunikation umfasst und die Grundlage für Jahre und Jahrzehnte bildet.

Während der Embryogenese gibt es Phasen unterschiedlicher Sensitivität und das Ausmaß und die Art der Schädigung hängen, neben anderen Faktoren, wie z. B. dem toxischen Wirkmechanismus und der Dosis einer Substanz, davon ab in welchem Entwicklungsstadium eine Exposition mit einer Noxe erfolgt (Abb. 1 und Abb. 2) (Schäfer et al., 2012). In der ersten Phase, von der Fertilisation bis zur Bildung der Blastozyste, ist der frühe Embryo relativ resistent gegenüber exogen induzierten Fehlbildungen. Die embryonalen Zellen sind zu diesem Zeitpunkt pluripotent und besitzen keine Spezifizierung, sodass geschädigte Zellen leicht ersetzt werden können, es sei denn die Noxe ist so stark, dass es zum Abort kommt. Die anschließende Organogenese ist die sensitivste Periode gegenüber Teratogenen, d. h. äußeren Faktoren, die durch entwicklungstoxische Effekte strukturelle Missbildungen hervorrufen können. In diesem Zeitraum, der beim Menschen ca. die dritte bis achte Schwangerschaftswoche umfasst, werden zunächst die drei Keimblätter (Endo-, Meso- und Ektoderm) gebildet, aus denen dann durch weitere Differenzierung und Spezifizierung

der Zellen die individuellen Organe angelegt werden. Dies erfolgt für die einzelnen Organe zeitversetzt und nimmt einen unterschiedlichen Zeitraum in Anspruch, sodass jedes Organ seine eigene Phase mit einer besonders hohen Empfindlichkeit besitzt. Mit zunehmender Reifung des Embryos nimmt die Anfälligkeit für Fehlbildungen ab. Während der Fetalperiode, die durch das Wachstum und die funktionelle Reifung der Organe gekennzeichnet ist, führen toxische Einflüsse seltener zu schwerwiegenden morphologischen Beeinträchtigungen, können aber Wachstumsverzögerungen und funktionelle Defizite verursachen. Für einige Organe, wie z. B. das Gehirn oder auch das Skelettsystem, ist die Entwicklung mit der Geburt nicht abgeschlossen und setzt sich postnatal zum Teil noch über Jahre fort, sodass toxische Einflüsse auch dann noch Konsequenzen haben können (Felter et al., 2015; Watson et al., 2006; Zoetis et al., 2003).



**Abb. 1: Relative Sensitivität des humanen Embryos gegenüber teratogenen Einflüssen während verschiedener Entwicklungsstadien (aus Schäfer et al., 2012).**



**Abb. 2: Sensitive Perioden der wichtigsten Organsysteme während der pränatalen Entwicklung des Menschen (aus Schäfer et al., 2012).**

Fehlbildungen des Skeletts gehören zu den am häufigsten auftretenden Anomalien bei Neugeborenen, entweder als ein Teil eines multiplen Symptomkomplexes oder als primäre Ausprägung (International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research, 2012; Mundlos, 2005; Parker et al., 2010). Mundlos führt dies darauf zurück, dass skelettale Missbildungen zum einen leicht zu diagnostizieren sind und zum anderen, dass die Entwicklung des Skelettsystems sehr komplex ist und durch eine Vielzahl von Genen und Signalwegen reguliert und beeinflusst wird, was die Störanfälligkeit erhöht. Daher gibt es zahlreiche genetisch bedingte, den Knochen betreffende Erkrankungen und Syndrome, die auf Interferenzen mit der Musterbildung während der frühen Embryogenese (z. B. über *Hox*-Gene), einer Beeinträchtigung der Organogenese (z. B. über *indian hedgehog* (IHH), *Sox9* oder *Runx2*) oder einer Störung der nachfolgenden zeitintensiven Wachstumsphase des Knochens (z. B. über Gene von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM)) zurückgeführt werden können (zusammengefasst in Mundlos, 2005). Betroffen sein können dabei alle drei Hauptelemente des Organs: das axiale Skelett, die Extremitäten und der Schädel. Die meisten skelettalen Fehlbildungen sind auf Mutationen einzelner, zum Teil auch mehrerer Gene zurückzuführen, die vererbt werden. Es ist bisher wenig darüber bekannt, welches Potential exogene Stoffe besitzen skelettale Anomalien im Menschen (mit) zu induzieren, abgesehen davon, dass für ca. die Hälfte der nachgewiesenen humanen Teratogene eine Interferenz mit der Knochenentwicklung beschrieben ist (vgl. Schäfer, 2005).

### 1.1.2 Konventionelle *in vivo* Prüfung

Die Beurteilung des entwicklungstoxischen Potentials für den Menschen ist für zahlreiche Erzeugnisse, wie Industriechemikalien, Pharmazeutika, Kosmetikprodukte, Lebensmittelzusatzstoffe und verbrauchernahe Produkte, von Bedeutung. Die konkreten regulatorischen Anforderungen an die Testung variieren in Abhängigkeit vom Erzeugnis, dem Land in dem sie vertrieben werden und unter Umständen dem Produktionsvolumen.

Es gibt allerdings für Chemikalien von der *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) standardisierte und harmonisierte Richtlinien, wie entwicklungstoxische Prüfungen durchgeführt werden sollten. Für Pharmazeutika gelten Richtlinien, die durch das *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) herausgegeben werden. Die Richtlinien beider Organisationen beruhen auf tierexperimentellen Untersuchungen. In Bezug auf die OECD sind entwicklungstoxische Prüfungen z. B. ein Teil der Richtlinien Nr. 416 (2-Generationen-Studie), 443 (erweiterte 1-Generations-Studie) und 421 bzw. 422 (Screening Studien). Hinsichtlich des ICH sind sie u. a. in das Dokument S5(R2), 4.1.2 (Studie zur prä- und postnatalen Entwicklung) integriert.

Insbesondere relevant sind jedoch die OECD-Prüfrichtlinie Nr. 414 (Studie zur pränatalen Entwicklungstoxizität) (OECD, 2001) und das ICH-Dokument S5(R2), 4.1.3 (Studie zu Effekten auf die embryonale und fetale Entwicklung) (ICH, 2005). Diese Untersuchungen werden als Konsequenz aus dem Thalidomid-Skandal üblicherweise an zwei Spezies durchgeführt, einem Nager (zumeist Ratte) und einem Nicht-Nager (zumeist Kaninchen). Das experimentelle Vorgehen beinhaltet eine Substanzapplikation an trächtigen Muttertieren über die gesamte Tragzeit, beginnend mit der Präimplantationsperiode. Im Anschluss werden sowohl die toxischen Effekte auf die Muttertiere als auch auf die Nachkommen (Tod der Feten, Fehlbildungen etc.) bewertet. Die Richtlinien sehen den Einsatz von 20 trächtigen Tieren pro Substanzdosis mit mindestens drei Dosen und entsprechenden Kontroll- und Vehikelgruppen vor, was in einer Gesamtzahl von annähernd 1000 Tieren pro Testsubstanz resultiert (Muttertiere und Nachwuchs).

Die Untersuchung der skelettalen Entwicklung ist ein integraler und wichtiger Bestandteil von Entwicklungstoxizitätsstudien. In Experimenten mit Nagern wird ca. die Hälfte des Wurfs dahingehend examiniert, im Fall von Nicht-Nagern gilt dies für die gesamte Nachkommenschaft. Die Feten werden dabei in einem späten Stadium aus den getöteten Muttertieren entnommen und das Skelett mit Alizarin Rot S gefärbt. Anschließend erfolgt eine detaillierte

Analyse der verschiedenen Knochen und der ca. 200 Ossifikationszentren, nicht nur in Bezug auf offensichtlich erkennbare Fehlbildungen, sondern auch hinsichtlich subtilerer Veränderungen und Verzögerungen in der Entwicklung (Carney und Kimmel, 2007).

Skelettale Anomalien werden sehr häufig in Entwicklungstoxizitätsstudien an Tieren beobachtet. So konnten Bremer et al. (2007) in einer Analyse zu 202 entwicklungstoxischen Substanzen z. B. zeigen, dass bei fast 80 Stoffen skelettale Parameter statistisch signifikant auffielen und damit zu den wichtigsten registrierten Effekten zählten. Neben manifestierten Fehlbildungen werden jedoch auch sogenannte Variationen, wie z. B. *wavy ribs*, Extrarippen oder geringe Verzögerungen in der Ossifikation, sehr oft und häufig als erster Effekt bei vergleichsweise geringen Dosierungen beobachtet. Ihre Relevanz als Hinweis auf ein teratogenes Potential einer spezifischen Substanz ist umstritten, da sie nicht selten auch in den Kontrolltieren auftreten, meist reversibel sind und widersprüchliche Beobachtungen bzgl. einer Korrelation zur Substanzdosis und zur maternalen Toxizität gemacht wurden (Carney und Kimmel, 2007; Daston und Seed, 2007). Erschwerend kommt hinzu, dass die Untersuchung nur eine Momentaufnahme zu einem bestimmten Zeitpunkt am Ende der fetalen Entwicklung darstellt und die Terminologie sowie die Bewertung zwischen Laboren nicht einheitlich sind. Daher wird die Bedeutung von skelettalen Variationen für die Risikobewertung für den Menschen debattiert und erfordert ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen (Carney und Kimmel, 2007; Daston und Seed, 2007).

### **1.1.3 Notwendigkeit des Einsatzes alternativer Prüfmethode**

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel angeführt, erfordern Entwicklungstoxizitätsstudien den Einsatz einer hohen Anzahl von Versuchstieren und sie sind, wie die meisten Tierversuche, sehr belastend für diese. In der Europäischen Union (EU) werden jedes Jahr über eine Million Versuchstiere für Studien zur Toxizität und Sicherheit von Stoffen eingesetzt, wobei Tests zur Reproduktions- und Entwicklungstoxizität mit ca. 10 % an dritter Stelle stehen (European Commission, 2013, 2010). Zusätzlich zu dem hohen Tierverbrauch sind diese *in vivo* Untersuchungen kosten- und zeitintensiv (Augustine-Rauch, 2007; Fleischer, 2007).

Ein noch wichtigerer Punkt ist, dass Tiermodelle nur eine limitierte Prädiktivität im Hinblick auf die Toxizität für den Menschen besitzen (Bailey et al., 2014; Knight, 2007; Olson et al., 1998). Bailey et al. (2005) führten dazu anhand der in der wissenschaftlichen Literatur und Datenbanken verfügbaren Daten eine spezifische Analyse für bekannte humane Teratogene durch. Die positive Vorhersagekraft variierte dabei stark bei den zwölf gängigen Versuchs-

tierspezies. Bei einer Einteilung der Stoffe in elf Substanzgruppen lag sie zwischen 20–100 % und im Mittel bei 51 %. Bei Betrachtung der 35 individuellen Pharmazeutika und Chemikalien schwankte die positive Prädiktivität zwischen 0–100 % und betrug im Mittel 56 %. Diese Untersuchung illustriert anschaulich, dass es kein experimentelles Tiermodell erster Wahl gibt, das alleinig in der Lage ist das teratogene Potential von Substanzen für den Menschen zu bestimmen. Die Ursachen für die Differenzen zwischen verschiedenen Spezies sind vielfältig. Bailey et al. führen u. a. Unterschiede in der Anatomie und der Entwicklung der einzelnen Organismen sowie in der Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung von Substanzen auf. Zudem haben die experimentelle Durchführung und Auswertung, aber auch Umweltparameter einen Einfluss.

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel angeführt, werden Entwicklungstoxizitätsstudien in der Regel an zwei Spezies durchgeführt, um die unzureichende prädiktive Kapazität einzelner Tiermodelle zu kompensieren. Allerdings ist auch dieser Ansatz nicht ausreichend, um das teratogene Potential aller Substanzen korrekt abzuschätzen. Bremer et al. (2007) führten diesbezüglich beispielhaft Kalkulationen durch. Dabei wurde die von Experten aufgestellte Annahme einbezogen, dass 5 % aller Substanzen entwicklungstoxische Effekte im Embryo hervorrufen können. Des Weiteren wurde die über wissenschaftliche Auswertungen erstellte Schätzung berücksichtigt, dass die Interspezieskorrelation 60 % beträgt. Unter diesen Voraussetzungen würden bei 1000 zu testenden Substanzen von den theoretisch erwarteten 50 entwicklungstoxischen Stoffen acht nicht identifiziert werden (falsch-negative Zuordnung). Die Zahlen sind allerdings insbesondere ernüchternd für die nicht-entwicklungstoxischen Substanzen, die den Großteil ausmachen: Mehr als 600 würden hier als falsch-positiv eingeordnet werden, was entsprechende regulatorische und wirtschaftliche Konsequenzen nach sich ziehen kann.

Neben den zuvor angeführten Aspekten machen aber auch die zahlreichen regulatorischen Entwicklungen der letzten Jahre den Einsatz von alternativen Testmethoden in der Toxizitätsprüfung dringend erforderlich. Im Zuge der in 2007 eingeführten EU-Chemikalienverordnung REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) sollen umfangreiche sicherheitstoxikologische Daten für alle Chemikalien, deren Produktionsvolumen über eine Tonne pro Jahr beträgt, bis 2018 gesammelt werden (European Parliament and Council, 2006). Dies gilt sowohl für neue registrierungspflichtige Chemikalien als auch für Altstoffe, die einer Re-Evaluierung unterzogen werden sollen. In der wissenschaftlichen Gemeinschaft wurde und wird intensiv über die tatsächlichen Versuchstierzahlen und Kosten, die mit REACH einhergehen, diskutiert (Hartung und Rovida, 2009; Höfer et al.,

2004; Pedersen et al., 2003; Rovida und Hartung, 2009; van der Jagt et al., 2004). In Bezug auf die Versuchstierzahlen variieren die Schätzungen dabei von 2,6–54 Millionen Tieren, hinsichtlich der Kosten wird ein Bedarf von ca. 1,5–9,5 Billionen Euro angenommen. Reproduktions- und entwicklungstoxische Studien tragen dabei erheblich zu den Zahlen bei. Abgesehen davon ist es allerdings auch ein Ziel von REACH, den Einsatz von Alternativmethoden zu fördern (European Parliament and Council, 2006, Artikel 1 (1)). Dabei werden konkrete Maßnahmen, wie die Anwendung von *grouping/read-across* zu anderen Stoffen, der Einbezug von Nichtstandard-Daten über *weight of evidence* Ansätze und auch die Verwendung von Daten aus *in vitro* Testmethoden, empfohlen.

Mit der Novellierung der Europäischen Kosmetikdirektive wurde ein zeitlich abgestufter Ausstieg aus der tierexperimentellen Sicherheitsbewertung von kosmetischen Produkten in der EU implementiert (European Parliament and Council, 2003). Das Inverkehrbringen von kosmetischen Produkten, für die neue Inhaltsstoffe an Tieren getestet wurden, ist daher seit 2013 komplett verboten. Dies wurde auch in die seit 2013 vollständig gültige EU-Kosmetikverordnung übernommen (European Parliament and Council, 2009, Artikel 18) und gilt sowohl für akute Toxizitätstestungen als auch für chronische Studien bzw. Prüfungen nach wiederholter Substanzapplikation (z. B. Entwicklungstoxizität). In den USA ist mit dem 2013 vorgeschlagenen *Safe Cosmetics and Personal Care Products Act* (Schakowsky et al., 2013) hingegen eine entgegengesetzte Entwicklung zu beobachten. Dieses Dokument fordert ein neues, erweitertes Programm zur Evaluierung fertiger Kosmetikprodukte und ihrer Bestandteile, was nach Schätzungen von Knight und Rovida mit einer Versuchstierzahl von 1–11,5 Millionen Tieren und Kosten von 1,7–9 Billionen US Dollar einhergehen könnte (Knight und Rovida, 2014). Es sollen zwar auch hier alternative Testmethoden verwendet werden, allerdings ist dies nur gefordert, wenn diese auch zur Verfügung stehen, was insbesondere für chronische Studien und Prüfungen mit wiederholter Substanzapplikation nicht gegeben ist.

Andererseits wird die Verwendung von humanrelevanten *in vitro* Testsystemen in Kombination mit *computational biology* seit dem Vorschlag des *National Research Council* zur strategischen Neuausrichtung in der Toxizitätsprüfung (National Research Council, 2007) in den USA derzeit intensiv ausgeweitet und vorangetrieben. In diesem Zusammenhang sind von den nationalen Behörden umfangreiche Programme, wie Tox21 und ToxCast, ins Leben gerufen worden, in denen tausende Stoffe mittels Hochdurchsatzverfahren gescreent werden, um ihr toxisches Potential zu erkunden, zu priorisieren und ein besseres Verständnis vom Mechanismus der Toxizität zu erhalten (Environmental Protection Agency, n.d.; n.d.). Auch in der EU wurden und werden im Rahmen großer Kollaborationsprojekte, wie

SEURAT, ESNATS und EU-ToxRisk, neue Strategien zur Toxizitätstestung verfolgt, die neben Computer-gestützten Methoden auf dem Einsatz von *in vitro* Systemen basieren (EU-ToxRisk, n.d.; Gocht und Schwarz, 2015; Rovida et al., 2014).

Für die pharmazeutische Industrie bestehen spezifische Erfordernisse, die den Einsatz von kostengünstigen und schnell durchführbaren alternativen Toxizitätstests notwendig machen. In diesem Bereich führte der verstärkte Einsatz der kombinatorischen Chemie in den letzten Jahrzehnten zum Aufbau großer Bibliotheken potentieller Wirkstoffe, die für weitere Anwendungen bezüglich ihrer therapeutischen Eigenschaften getestet werden müssen. Dies schließt die Testung ihrer möglichen toxischen Eigenschaften mit ein. Gleichzeitig haben sich die zur Verfügung stehenden Substanzmengen für die Testung der individuellen Wirkstoffkandidaten stark reduziert und nur eine geringe Anzahl an Kandidaten erreicht tatsächlich den Eingang in klinische Prüfungen bzw. die spätere Marktreife, wobei toxische Effekte ein Haupthindernis darstellen (Arrowsmith, 2011; Kola und Landis, 2004). Einen vielversprechenden Lösungsansatz für eine effiziente Vorselektion auf einer möglichst frühen Stufe der Wirkstoffentwicklung stellt daher die Anwendung von *in vitro* Tests im Hochdurchsatzverfahren dar (Schoonen et al., 2009).

### **1.1.4 Alternative Prüfmethoden**

Im Hinblick auf die Etablierung von alternativen Testsystemen wurden in den letzten Jahren zahlreiche Ansätze entwickelt, die spezifisch entwicklungs-toxische Fragestellungen adressieren. Diese basieren auf Modellen mit unterschiedlicher physiologischer und technischer Komplexität. Zum einen handelt es sich dabei um Kulturen differenzierender Zellen, vorrangig basierend auf embryonalen Stammzellen (ES Zellen), und zum anderen um *ex vivo* Ansätze in denen Embryonen von unterschiedlichen Spezies verwendet werden.

In zahlreichen Studien wurde der Einsatz von Zebrafischembryonen als Testmodell untersucht und weiterentwickelt (Ball et al., 2014; Brannen et al., 2010; de Jong et al., 2011; Gustafson et al., 2012; Selderslaghs et al., 2012; Yamashita et al., 2014). Die Vorteile dieses Systems sind u. a. eine kostengünstige Unterhaltung, hohe Reproduktionsraten, die schnelle Entwicklung des Organismus, konservierte genetische Programme für die Entwicklung in Fischen und Säugetieren, eine umfangreiche Datenbasis zur Entwicklung und Genetik, der Einbezug eines gesamten Organismus und eine gute Zugänglichkeit zur Analyse toxischer Effekte aufgrund der optischen Transparenz während der Embryogenese (Sogorb et al., 2014). In vielen Studien zeigte der Zebrafisch eine gute Prädiktivität in Bezug auf entwick-

lungstoxische bzw. teratogene Substanzen, allerdings erbrachten einige Untersuchungen auch unzureichende Resultate (Sipes et al., 2011; van den Bulck et al., 2011). Zudem wird bisher noch nicht nach einem einheitlichen, standardisierten und validierten Protokoll gearbeitet und Validierungsstudien unter Blindbedingungen fehlen.

Der *whole embryo culture* (WEC)-Test basiert ebenfalls auf der Untersuchung gesamter Embryonen, wobei diese aus Ratten isoliert werden. Der Vorteil hier ist ebenso, dass toxische Effekte auf den vollständigen Organismus abgebildet werden können, allerdings ist dafür die Tötung von Tieren erforderlich. In einer internationalen Validierungsstudie durch das *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) wurde dieser Test wissenschaftlich validiert und konnte, unter Einbezug von zytotoxischen Daten mit 3T3 Fibroblasten, 80 % der embryotoxischen Testsubstanzen entsprechend ihres *in vivo* Potentials korrekt klassifizieren (Genschow et al., 2002; Piersma et al., 2004). Seitdem wurden verschiedene Studien zur Weiterentwicklung und Verbesserung der Prädiktivität des WEC-Tests durchgeführt. Hierfür wurde u. a. die Datenbasis erweitert, ein neues morphologisches Bewertungssystem eingeführt und neue toxikologische Endpunkte, wie Genexpressionsanalysen, etabliert (zusammengefasst in Lee et al., 2012; Sogorb et al., 2014).

Auch der *micromass* (MM)-Test wurde in der oben angeführten ECVAM-Studie evaluiert (Genschow et al., 2002; Spielmann et al., 2004). Bei diesem Assay wird die Knorpel-differenzierung von Primärkulturen analysiert, die aus den Extremitätsknospen von Rattenembryonen gewonnen werden. Obwohl der MM-Test mit einer Vorhersagekraft von 70 % als wissenschaftlich validiert angesehen wurde, sind für eine regulatorische Akzeptanz Verbesserungen der Leistungsfähigkeit gefordert worden.

Ein beliebtes Modell für alternative Testmethoden im Bereich der Embryo- und Entwicklungstoxizität stellen ES Zellen dar und zahlreiche Assays sind in den vergangenen Jahren mit diesen etabliert worden. Obwohl mit ES Zellen jeweils nur ausgewählte Aspekte der Entwicklung abgebildet werden können, ist ein wesentlicher Vorteil, dass hier kein Einsatz von Versuchstieren notwendig ist. Eines der am weitesten entwickelten Systeme ist der Embryonale Stammzelltest (EST; Seiler und Spielmann, 2011; Spielmann et al., 1997). In diesem Test wird der Einfluss von Substanzen auf die Differenzierung von Maus ES Zellen in schlagende Kardiomyozyten im Vergleich zur Zytotoxizität auf ES Zellen und 3T3 Fibroblasten analysiert. Auch dieses Testsystem wurde in der oben genannten ECVAM-Studie wissenschaftlich validiert und zeigte eine korrekte Vorhersage der Embryotoxizität für 78 % der Substanzen (Genschow et al., 2004, 2002). Sein prädiktives Potential wurde zudem durch weitere Unter-

suchungen untermauert (de Jong et al., 2009; Paquette et al., 2008; Riebeling et al., 2015, 2011; Schenk et al., 2010), es existieren jedoch auch Limitierungen im Anwendungsbereich (Marx-Stoelting et al., 2009; Riebeling et al., 2012; Strikwold et al., 2012). Zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit des EST wurde die Implementierung von weiteren relevanten Differenzierungswegen, wie die zu neuralem, chondrogenem und osteogenem Gewebe, vorgeschlagen, die u. a. später stattfindende Entwicklungsprozesse abbilden (Riebeling et al., 2012; Spielmann, 2009). Für die Differenzierung zu neuronalen Kulturen sind hier bereits zahlreiche Ansätze mit nicht-humanen und humanen ES Zellen oder Progenitorzellen in den letzten Jahren etabliert, weiterentwickelt und bewertet worden (Balmer et al., 2012; Baumann et al., 2015; Hayess et al., 2013; Krug et al., 2013a, 2013b; Moors et al., 2009; Theunissen et al., 2010; Visan et al., 2012).

Für die osteogene Differenzierung ist die Datenlage hingegen deutlich weniger umfangreich. Erste Forschungsarbeiten wurden von zwei Arbeitsgruppen durchgeführt, wobei sich beide auf die Verwendung von Maus ES Zellen konzentrierten (de Jong et al., 2014, 2012; zur Nieden und Baumgartner, 2010; zur Nieden et al., 2010a, 2010b, 2004). In diesen Studien wurden als potentielle toxikologische Endpunkte die Genexpression verschiedener osteogener Marker, wie Osteocalcin (OC) und Runx2, und morphometrische bzw. kolorimetrische Methoden zur Bestimmung der Mineralisierung bzw. Kalzifizierung evaluiert. Die Prädiktivität der etablierten Assays wurde dann mit einer Auswahl an Testsubstanzen geprüft und zum Teil mit den Daten des klassischen EST verglichen, wobei zumeist eine gute Korrelation festgestellt werden konnte. Darüber hinaus konnten zur Nieden et al. eine höhere Sensitivität der in Richtung Knochen differenzierenden Maus ES Zellen gegenüber dem Teratogen Thalidomid im Vergleich zu den kardial differenzierenden Zellen beobachten (zur Nieden et al., 2004). Auf das von de Jong et al. etablierte System, das andere Endpunkte beinhaltete, hatte Thalidomid allerdings keinen Einfluss (de Jong et al., 2014). Dafür zeigte diese Arbeitsgruppe, dass 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin einen spezifischen Effekt auf die osteogene Entwicklung von Maus ES Zellen hat, während die Herzdifferenzierung im klassischen EST nicht spezifisch beeinträchtigt wurde. Beide Beispiele illustrieren, dass die Inkorporation einer osteogenen Differenzierungsrouten eine wichtige Ergänzung zum EST darstellen kann. In einer neueren Pilotstudie der Gruppe um zur Nieden wurden die Auswirkungen von verschiedenen Substanzen auf die Mineralisierung von osteogen differenzierenden ES Zellen aus der Maus sowie aus Neu- und Altweltaffen miteinander verglichen (Walker et al., 2015). Die Autoren beobachteten hier deutliche speziesabhängige Unterschiede in den Effekten. Der Einsatz humaner Zellen scheint notwendig zu sein, um Interspeziesdifferenzen aus-

schließen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine humane Zelllinie als Modellsystem für die Knochendifferenzierung verwendet, die in Kapitel 1.2.4 näher vorgestellt wird.

Die angeführten Testsysteme bieten eine solide Grundlage, um mögliche toxische Effekte auf unterschiedliche Aspekte der humanen Entwicklung vorherzusagen. Jedes System weist allerdings auch Grenzen und Limitierungen auf, sodass nur eine Kombination verschiedener komplementärer Modelle in Form von sogenannten integrierten Teststrategien zu einer näherungsweise adäquaten Beurteilung des toxikologischen Gefährdungspotentials beitragen kann. Solch ein Ansatz wurde z. B. für Reproduktionstoxizität im europäischen ReProTect-Projekt verfolgt und zeigte vielversprechende Resultate (Schenk et al., 2010). Konzepte wurden zudem für die Testung auf Entwicklungsneurotoxizität und auf Entwicklungstoxizität durch Umweltkontaminanten vorgestellt (Bal-Price et al., 2015; Sogorb et al., 2014). Ein vollständiger Ersatz der Studien an Säugetieren wird allerdings auch mit einer modularen Teststrategie nicht für alle Fälle realisierbar sein. Das Potential existierender und zukünftiger Alternativmethoden liegt insbesondere in der Möglichkeit, durch die Messung im Hochdurchsatzverfahren die toxischen Eigenschaften von für die Industrie oder Pharmazie relevanten Substanzen schnell und einfach zu prüfen und so vorab Prioritäten zu setzen. Dies kann wesentlich dazu beitragen, nachfolgende *in vivo* Versuche an Säugetieren nach dem 3R-Konzept (*Reduce, Refine, Replace*) von Russel und Burch (1959) zu reduzieren.

### **1.2 Knochenentwicklung – *in vivo* Entwicklung, molekulare Grundlagen und *in vitro* Zellkulturmodelle**

Das Skelett ist eines der größten und komplexesten Organe des menschlichen Körpers und seine Entwicklung dauert auch nach der Geburt noch bis zum Ende der Pubertät an. Mit dem Abschluss der initialen Bildung ist allerdings kein statisches Gebilde geschaffen, sondern ein kontinuierlicher Prozess aus Auf- und Abbau sorgt dafür, dass jedes Jahr ungefähr 10 % des Knochens ausgetauscht werden und eine komplette Erneuerung des Skeletts ca. alle zehn Jahre durchlaufen ist (Cohen, 2006). Seine Funktionen beschränken sich nicht nur auf die Aufgaben als Stütz- und Bewegungsapparat, sondern umfassen auch den Schutz anderer Organe, die Unterstützung der Hämatopoese im Knochenmark, die Speicherung von Mineralsalzen und die Anheftung von Muskeln, Bändern und Sehnen (Cohen, 2006).

### 1.2.1 *In vivo* Knochenentwicklung

Die Bildung des mehr als 200 Knochen umfassenden Skelettsystems des Menschen beginnt im ersten Trimester der Schwangerschaft und setzt sich, bedingt durch eine sehr lange Wachstumsperiode, bis zum Ende der Pubertät fort (Carney und Kimmel, 2007; Mundlos, 2005). Die Skelettentwicklung lässt sich im Wesentlichen in drei Phasen unterteilen: die initiale Musterbildung, die Organogenese und die anschließende Wachstumsperiode (Abb. 3) (Mundlos, 2005).

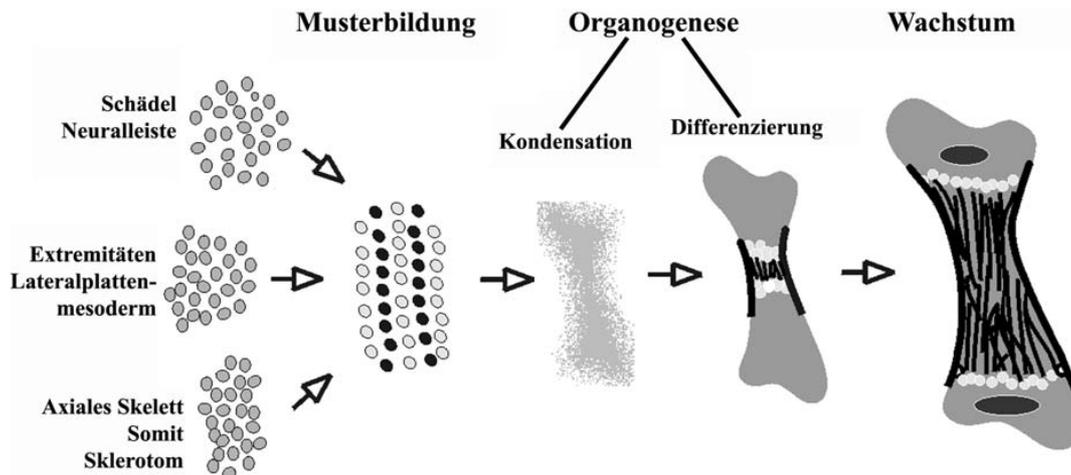
In der Phase der Musterbildung wird die Anzahl, Größe und Gestalt der einzelnen Knochen angelegt und gesteuert (Mundlos, 2005). Die Vorläuferzellen, aus denen später Knorpel und Knochen hervorgehen, erhalten hier durch genau regulierte molekulare Signale eine positionelle Identität, d. h. ein Muster für die nachfolgende Organentwicklung wird angelegt. Je nach Lokalisation im Embryo sind dabei unterschiedliche Vorläuferzellen des mesenchymalen Typs involviert. Kraniofaziale Strukturen werden in erster Linie aus Zellen der Neuralleiste gebildet, während die Knochen der Gliedmaßen auf Zellen des Lateralplattenmesoderms zurückzuführen sind und der Großteil des axialen Skeletts aus dem Sklerotomkompartiment der Somiten entsteht (Abb. 3).

Während der nachfolgenden Organogenese wird dann das eigentliche Knorpel- und Knochengewebe produziert (Karaplis, 2002; Mundlos, 2005; Wolpert et al., 2007). Hierfür kommt es in allen skelettalen Kompartimenten zunächst zu einer Kondensation der mesenchymalen Zellen (Abb. 3). Die weiteren Entwicklungsschritte unterscheiden sich dann in Abhängigkeit vom Skelettelement. Ein Großteil der Schädelstrukturen wird über die sogenannte desmale Ossifikation erzeugt, d. h. die kondensierten mesenchymalen Zellen differenzieren direkt in Osteoblasten, denjenigen Zellen, die das Knochengewebe aufbauen.

Die meisten Knochen jedoch werden über einen Knorpelvorläufer, der als mustergebende Vorlage dient, gebildet. Es handelt sich hierbei um die enchondrale Ossifikation. Die mesenchymalen Zellen reifen dabei zu Knorpelzellen (Chondrozyten), die zunächst eine knorpeltypische ECM anlegen, die später kalzifiziert. Nach der terminalen Differenzierung und Hypertrophie der Chondrozyten sterben diese durch Apoptose ab und Blutgefäße infiltrieren die Strukturen (Abb. 4). Mit diesem Prozess gelangen Osteoprogenitoren und hämatopoetische Zellen in die Knorpelmatrix, die nun abgebaut wird. Osteoblastäre Zellen werden zudem von außen aus der den Knorpel umgebenden Knorpelhaut, dem Perichondrium, geliefert.

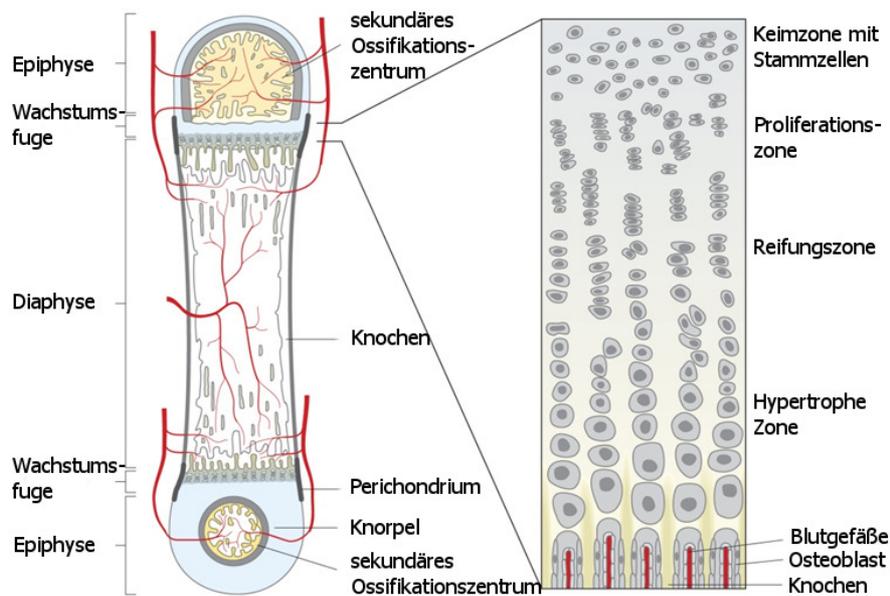
Sowohl bei der desmalen als auch der enchondralen Ossifikation bilden die reifenden Knochenzellen eine organische ECM (Osteoid) aus, die zunehmend mineralisiert. Die Zellen

mauern sich dadurch selbst ein und ca. ein Fünftel differenziert terminal zu Osteozyten, spezialisierten kleinen Zellen mit zahlreichen Plasmaausläufern, die an die „rauen“ Bedingungen einer verknöcherten Umgebung angepasst sind (Felsenberg, 2001). Ein weiterer wichtiger Zelltyp sind Osteoklasten, die sich aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Sie sind für die Resorption der Knochensubstanz verantwortlich und spielen daher eine Rolle in der Remodellierung des Knochens und der Regulation des Calciumgehalts im Blut.



**Abb. 3: Schematische Phasen der embryonalen und fetalen Skelettentwicklung (aus Mundlos, 2005).**

Die letzte Phase der Skelettentwicklung umfasst die Wachstumsperiode, in der das Längswachstum der Röhrenknochen stattfindet (Mundlos, 2005). Die oben beschriebene enchondrale Ossifikation beginnt im Zentrum dieser Knochen, der Diaphyse, und schreitet in Richtung der äußeren Enden (Epiphysen) fort (Abb. 4, linker Bildteil) (Wolpert et al., 2007). Das eigentliche Wachstum geschieht dabei in einem spezialisierten Bereich zwischen Diaphyse und Epiphyse, der Wachstumsfuge. Hier finden in voneinander abgrenzbaren Zonen die bereits oben beschriebene sukzessive Reifung der säulenartig angeordneten Chondrozyten und ihr Ersatz durch osteoblastäre Zellen statt (Abb. 4, rechter Bildteil). In einem späten fetalen Stadium und in der frühen Kindheit bilden sich zudem sekundäre Ossifikationszentren in den Epiphysen (Abb. 4, linker Bildteil) (Karaplis, 2002). Die Knochenentwicklung ist abgeschlossen, wenn die Wachstumsfugen am Ende der Pubertät durch Knochenmaterial ersetzt wurden.



**Abb. 4:** Schema der enchondralen Ossifikation in den Röhrenknochen von Vertebraten (nach Wolpert et al., 2007).

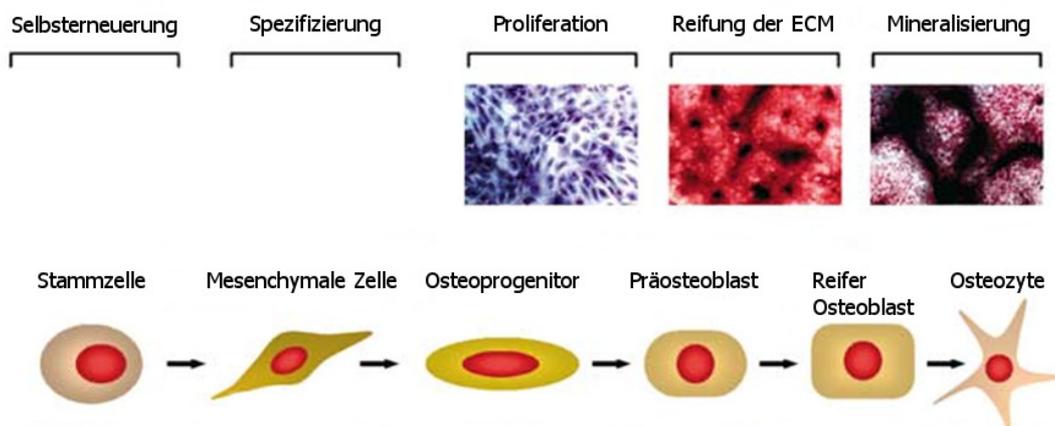
### 1.2.2 Molekulare Grundlagen der osteogenen Differenzierung

Die Skelettentwicklung beinhaltet die komplexe Regulation, Reifung und Interaktion verschiedener Zelltypen und Gewebe in einer zeitlich und räumlich streng koordinierten Weise. Dabei spielen verschiedene Signalwege eine essentielle Rolle, einige wichtige werden im Folgenden genannt.

Der *wingless and int-1* (Wnt)/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beeinflusst neben seiner generellen Funktion in der zellulären Spezifikation und in den Musterbildungsprozessen während der Embryogenese auch spezifisch die osteoblastäre Differenzierung (zusammengefasst in Deng et al., 2008; Long, 2012 und Soltanoff et al., 2009). Die *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ )/*bone morphogenetic protein* (BMP)-Signaltransduktion hat über die Regulation spezifischer Schlüsselproteine und die Wechselwirkung mit anderen Signalwegen ebenfalls entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung von Knochenzellen (Chen et al., 2012). Der Notch-Signalweg ist ein kritischer Faktor für die Somitenformierung in der frühen Embryonalentwicklung (Deng et al., 2008). Im Gegensatz zu den zuvor genannten Signalgebungen scheint er die Osteoblastendifferenzierung zu inhibieren (Long, 2012). Die Proliferation, Differenzierung und Aktivität von osteogenen Zellen wird durch den *fibroblast growth factor* (FGF)-Signalweg moduliert (zusammengefasst in Deng et al., 2008 und Long, 2012). Sowohl die FGF-Liganden als auch -Rezeptoren sind hierbei von Bedeutung. Von den Hedgehog-Proteinen ist *sonic hedgehog* (SHH) wichtig für die Bildung skelettaler Strukturen und IHH für eine

reguläre enchondrale Ossifikation (zusammengefasst in Deng et al., 2008 und Long, 2012).

Die osteogene Differenzierung (Spezifizierung und Reifung von Zellen zu Osteoblasten bzw. Osteozyten und der Aufbau einer verknöcherten ECM) stellt einen Teilaspekt der Skelettentwicklung dar. Die typischen zellulären Prozesse, die dabei durchlaufen werden, sind die Spezifizierung von multipotenten mesenchymalen Zellen zu Osteoprogenitorzellen, die Proliferation dieser Vorläuferzellen und sukzessive Reifung über verschiedene Zwischenstufen zu funktionalen, reifen Osteoblasten, die durch Sezernierung spezifischer Proteine das Osteoid aufbauen, und schließlich die Mineralisierung der ECM (Abb. 5) (Stein et al., 2004). Zu einem späteren Zeitpunkt wandelt sich ein Teil der Osteoblasten in Osteozyten um oder geht in Apoptose. Die osteoblastäre Differenzierung geht mit einer morphologischen Veränderung von einem spindelförmigen Phänotyp, der typisch für mesenchymale Zellen ist, zu einer kuboidalen Form einher und ist durch die koordinierte Biosynthese gewebetypischer Proteine charakterisiert, die regulatorische, enzymatische oder strukturelle Funktionen besitzen. Dabei handelt es sich vorwiegend um Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Runx2, Osterix, Dlx5 und Msx2, membranständige Proteine, wie z. B. Alkalische Phosphatase (AP) und Annexin 5A, und sezernierte Proteine mit Funktionen in der ECM, wie z. B. Kollagen Typ I, Osteonectin, Osteopontin, *bone sialoprotein* und OC.



**Abb. 5: Prozesse der osteogenen Differenzierung (nach Stein et al., 2004).**

Ausgewählte Markerproteine, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind in den nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben.

### 1.2.2.1 Dlx5

Bei den humanen *Dlx*-Genen handelt es sich um eine evolutionär konservierte Genfamilie mit sechs Mitgliedern, die Homologe zum Drosophila Distal-less Gen bilden und jeweils als

paarweise Cluster (*Dlx1/Dlx2*, *Dlx3/Dlx4*, *Dlx5/Dlx6*) im Genom angeordnet sind. Sie kodieren für Transkriptionsfaktoren mit einer Homöodomäne als Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Bindungsstelle und spielen eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung des Gehirns, der kraniofazialen Strukturen, des axialen Skeletts und der Gliedmaßen (Kraus und Lufkin, 2006).

*Dlx5* und *Dlx6* sind dabei die einzigen Mitglieder, deren jeweilige *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) in den perichondralen Regionen aller sich entwickelnden skelettalen Elemente von Mausfeten exprimiert wird (Simeone et al., 1994). Homozygote *Dlx5* Knockout-Mäuse (*Dlx5*<sup>-/-</sup>) weisen Abnormitäten in den kraniofazialen Strukturen, aber keinen Effekt auf die frühe Entwicklung der Extremitäten auf (Acampora et al., 1999). Im Gegensatz dazu führt eine gleichzeitige Inaktivierung von *Dlx5* und *Dlx6* zu schweren Fehlbildungen sowohl im Schädel- und Gesichtsbereich als auch im axialen und appendikulären Skelett (Robledo et al., 2002). Für die enchondrale Knochenentwicklung scheint dies u. a. auf eine gestörte Chondrozytenreifung zurückzuführen zu sein.

Die genauen molekularen Zusammenhänge des Einflusses von *Dlx5* auf die osteoblastäre Differenzierung sind hingegen noch weitgehend ungeklärt. *In vivo* und *in vitro* Studien mit verschiedenen nicht-humanen Spezies zeigten, dass *Dlx5* bereits in frühen Stadien der Osteoblastenentwicklung gebildet wird und die mRNA- und/oder Proteinmenge im Laufe der Differenzierung zunimmt, was für eine Funktion in der Zellreifung spricht (Acampora et al., 1999; Hassan et al., 2004; Holleville et al., 2003; Ryoo et al., 1997). Zudem beeinflusst *Dlx5* die Genexpression von verschiedenen osteogenen Proteinen, wie AP, Runx2 und OC (Holleville et al., 2003; Kim et al., 2004; Lee et al., 2005; Ryoo et al., 1997).

### 1.2.2.2 Runx2

Runx2 ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Literatur oft als „Masterregulator“ der Osteogenese bezeichnet wird (Stein et al., 2004). Diese Bezeichnung rührt aus der Beobachtung, dass die enchondrale und desmale Ossifikation in *Runx2*<sup>-/-</sup> Mäusen komplett ausbleibt (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). Zudem reguliert das Protein die Genexpression zahlreicher Knochenmarker (Komori, 2010).

Runx2 gehört neben Runx1 und Runx3 zu einer Proteinfamilie, die die hoch konservierte Runt-Domäne besitzt, die sowohl für die DNA-Bindung als auch die Dimerisierung mit Proteinfaktoren verantwortlich ist. Es existieren zwei Hauptisoformen von Runx2, die in ihren N-Termini differieren und deren Genexpression durch zwei unterschiedliche Promotoren

reguliert wird (Banerjee et al., 2001). Runx2-I wird dabei bereits in mesenchymalem Gewebe sowie Osteoprogenitorzellen produziert und scheint somit eine regulatorische Funktion in der frühen Gewebespezifizierung zu haben (Banerjee et al., 2001; Choi et al., 2002). Runx2-II ist hingegen charakteristisch für Osteoprogenitorzellen und nachfolgende Stadien und ihm wird daher eine Rolle in der Zellreifung zugeordnet (Banerjee et al., 2001; Choi et al., 2002). In Übereinstimmung damit zeigen beide Isoformen ein unterschiedliches Genexpressionsprofil während der pränatalen Entwicklung von Mäusen (Smith et al., 2005; Zhang et al., 2009). Während Runx2-I auf einem konstanten Niveau exprimiert wird, steigen Runx2-II Level sukzessive an. Die lokale und temporäre Feinregulation der produzierten Menge an Runx2 ist dabei entscheidend für eine normale Knochenentwicklung (Zhang et al., 2009). So ist z. B. in Mäusen gezeigt worden, dass für die späten Reifungsstadien von Osteoblasten eine Herunterregulation des Transkriptionsfaktors notwendig ist (Komori, 2010).

### 1.2.2.3 Alkalische Phosphatase

Das Enzym AP kommt in den meisten Geweben des menschlichen Körpers vor. Entsprechend der Anzahl an kodierenden Genen werden vier humane Isoformen unterschieden, von denen drei mehr oder weniger gewebespezifisch gebildet werden (Whyte, 2010). Die vierte hingegen ist in zahlreichen Geweben zu finden und trägt daher die Bezeichnung *tissue-nonspecific alkaline phosphatase* (TNAP). Insbesondere Knochen, Leber und Niere sind reich an TNAP.

In Knochen wird TNAP dabei eine wichtige Funktion in der Ossifikation der ECM zugesprochen. AP hydrolysiert bei alkalischem pH-Wert Phosphatester und Pyrophosphat ( $PP_i$ ). Dadurch sorgt das Enzym im Knochen dafür, dass einerseits anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) zur Bildung von Hydroxyapatit zur Verfügung gestellt und andererseits der Mineralisierungsinhibitor  $PP_i$  reduziert wird (Millán, 2012). Das Verhältnis von  $PP_i$  zu  $P_i$  ist dabei ein kritischer Faktor für die Bildung von Mineralablagerungen. Dies wird insbesondere deutlich am Beispiel des Krankheitsbilds der Hypophosphatasie, bei dem (eine) *loss-of-function* Mutation(en) im *TNAP*-Gen zu einem Überschuss an  $PP_i$  führt/führen (Whyte, 2010). Infolgedessen wird die Ossifikation gehemmt, was in Abhängigkeit vom Schweregrad zu brüchigen und weichen Knochen, skelettalen Deformierungen und Kleinwuchs führen kann.

Während der osteoblastären Differenzierung wird AP bereits in frühen Stadien gebildet und ihre Produktion und Aktivität nimmt mit voranschreitender Reifung der Zellkulturen sukzessive zu (Frith und Genever, 2008; Hoemann et al., 2009).

#### 1.2.2.4 Kollagen Typ I

Kollagene sind tripelhelikale Proteine in der ECM von Bindegewebe und definieren maßgeblich dessen Form sowie seine strukturellen und mechanischen Eigenschaften. Das fibrilläre Kollagen Typ I ist dabei das am häufigsten vorkommende Mitglied dieser Proteinfamilie in Haut, Sehnen, Knochen, Hornhaut, Lungen und den Blutgefäßen (Hulmes, 2008). Im Gegensatz zu den meisten Weichgeweben stellt es in Knochen mit ca. 90 % die überwältigende Mehrheit des organischen Anteils der ECM (Young, 2003). Neben seiner Bedeutung für die strukturelle Integrität und die mechanische Belastbarkeit von Knochen dient es als Gerüst für die Verankerung von Zellen sowie für die Ablagerung von nicht-kollagenen Proteinen und Apatitkristallen in der ECM und als Mediator für die Mineralformierung (Nudelman et al., 2013). Mutationen in den für die Kollagen Typ I-Untereinheiten kodierenden Genen können die Struktur der Fibrillen beeinträchtigen und dadurch zu einem Krankheitsbild führen, das als Osteogenesis imperfecta bezeichnet wird und durch eine abnormal hohe Knochenbrüchigkeit gekennzeichnet ist (Cohen, 2006). Während der Differenzierung zu Knochenzellen wird Kollagen Typ I bereits von Präosteoblasten gebildet, die stärkste Synthese erfolgt jedoch durch funktionelle, gereifte Osteoblasten (Cohen, 2006).

#### 1.2.2.5 Osteocalcin

Bei OC handelt es sich um ein relativ kleines, extrazellulär vorliegendes Protein, das alternativ auch *bone Gla protein* genannt wird. Die gamma-Carboxyglutamat (Gla)-Domäne umfasst bestimmte Glutamatreste, die Vitamin K-abhängig eine zusätzliche Carboxylierung erfahren (Lee et al., 2000). Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins, die in einer höheren Affinität für Calcium und Calciumverbindungen resultiert.

OC wird häufig als der spezifischste Marker für Knochen beschrieben, da es nur von Osteoblasten, Odontoblasten und Zementoblasten synthetisiert wird (Cancela et al., 2014). Es wird von reifen Osteoblasten gebildet und der Großteil akkumuliert durch eine hochaffine Bindung an Hydroxyapatit im Extrazellularraum von Knochen. Nicht-gebundenes OC gelangt ins Serum und wird in der klinischen Chemie in Abhängigkeit vom Kontext als Marker für die Knochenbildung oder den -abbau genutzt.

Die genaue Funktion von OC ist bis heute noch nicht aufgeklärt und wird kontrovers diskutiert. Wichtige Hinweise ergaben sich 1996 durch die Generierung von *OC<sup>-/-</sup>* Mäusen, die phänotypisch eine erhöhte Knochenmasse aufwiesen (Ducy et al., 1996). Diese Daten lassen vermuten, dass OC ein negativer Regulator der Knochenbildung ist, was möglicher-

weise auf Effekte auf die Formierung und Reifung von Hydroxyapatit (Boskey et al., 1998; Hunter et al., 1996; Price et al., 2009; Romberg et al., 1986) und/oder die Rekrutierung, Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten (Chenu et al., 1994; Liggett et al., 1994; Malone et al., 1982) zurückgeführt werden kann.

### **1.2.2.6 Mineralisierung**

Neben Zahnschmelz, Dentin, Wurzelzement und Knorpel ist Knochen das einzige Körperelement, das unter normalen physiologischen Bedingungen mineralisiert (Golub, 2011). Im Knochen sind zwei notwendige Voraussetzungen dafür zum einen die zellulär vermittelte Anlage einer kollagenreichen ECM und zum anderen die Sezernierung spezifischer nicht-kollagener Proteine mit Funktionen in der Regulation der Mineralisierung. Eine weitere ist eine genau ausbalancierte extrazelluläre Ionenkonzentration von Calcium und Phosphat, die durch die Aktivität von Ionenpumpen, Transportproteinen und Enzymen, die in der Membran der Zellen und der von ihnen abgegebenen Matrixvesikel (MV) lokalisiert sind, gesteuert wird. Die MV bilden zudem möglicherweise Zentren für die initiale Kristallkeimbildung. Aus Calcium und Phosphat bildet sich dann Hydroxyapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), in das während der weiteren Reifung Carbonate und andere Ionen eingebaut werden, was den Kristallinitätsgrad moduliert (Bala et al., 2013). Der Kristallisationsprozess schreitet voran bis ca. 50–90 % des Knochens aus Mineral aufgebaut sind (Golub, 2011).

### **1.2.3 *In vitro* Modelle für die osteogene Differenzierung**

Für die zell- und molekularbiologische Untersuchung von Osteoblasten und die Generierung von verknöchertem Gewebe sind verschiedenste Zellkulturmodelle in der Literatur beschrieben (Boskey und Roy, 2008; Czekanska et al., 2012). Dies umfasst z. B. isolierte Organkulturen und primäre Zellen, immortalisierte Zelllinien sowie adulte und embryonale Stammzellen.

Organtypische Kulturen und primäre Zellen sind der *in vivo* Situation näher als Zelllinien, erfordern jedoch den Einsatz von Labortieren bzw. haben eine limitierte Verfügbarkeit im Fall humaner Proben. Des Weiteren ist es aufgrund ihrer Heterogenität schwieriger sie gut zu standardisieren und sie umfassen meist Zellen mit einem gereiften osteoblastären Phäno-/Genotyp. In Bezug auf die immortalisierten Zelllinien gibt es eine Vielzahl gut charakterisierter Linien aus Säugetieren, die aus Tumorgewebe gewonnen oder transformiert wurden. Ihr Vorteil ist eine unbegrenzte Verfügbarkeit und gute Standardisierbarkeit, allerdings können

sie aufgrund genetischer Veränderungen und/oder der Ausprägung einer spezifischen Entwicklungsstufe nicht die gesamte Breite der phäno- und genotypischen Eigenschaften von Osteoblasten und ihrer Differenzierung reflektieren (Boskey und Roy, 2008; Czekanska et al., 2012).

Ein in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts eingeführtes Zellmodell für die Osteogenese sind adulte mesenchymale Stammzellen (MSCs), die z. B. aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder Fettgewebe isoliert werden. Bei MSCs handelt es sich um multipotente Zellen, die sich unter definierten Bedingungen relativ einfach in Chondrozyten, Adipozyten, Fibroblasten und Osteoblasten differenzieren lassen und typische zellbiologische und molekulare Prozesse der jeweiligen Gewebespezifizierung rekapitulieren können (Lindner et al., 2010). Die entsprechende Differenzierung wird dabei durch die gezielte Supplementierung mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Reagenzien induziert. Der Nachteil von MSCs ist, dass sie *in vitro* nur eine limitierte Proliferations- und Differenzierungskapazität besitzen. Daher ist die regelmäßige Gewinnung von neuem Probenmaterial erforderlich, das aufgrund verschiedener Spender und Schwankungen in der technischen Aufarbeitung variieren kann. Zudem ist die Zellheterogenität von MSC-Isolaten ein weiterer Faktor, der die Standardisierbarkeit dieses Modells beeinträchtigen kann.

Für wissenschaftliche Fragestellungen zur embryonalen und fetalen Entwicklung bietet sich in erster Instanz der Einsatz von ES Zellen an. Diese Zellen werden entweder von den Blastomeren der Morula oder aus der inneren Zellmasse der Blastozyste in der frühen Embryogenese isoliert. Durch symmetrische Zellteilungen können ES Zellen identische, undifferenzierte Nachkommen generieren und somit unter geeigneten Kulturbedingungen als permanente Zelllinien propagiert werden. Es handelt sich um pluripotente Zellen, d. h. sie können in die somatischen Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren und damit auch die frühen Vorgänge der Embryogenese und Gewebedifferenzierung rekapitulieren (Keller, 2005). Die *in vitro* Differenzierung zu Knochenzellen ist für humane und nicht-humane ES Zellen vor etwas mehr als 10 Jahren das erste Mal beschrieben worden und lehnt sich an die Protokolle für die oben beschriebenen Zellmodelle an (Buttery et al., 2001; Sottile et al., 2003; Yamashita et al., 2005). Der Nachteil von humanen ES Zellen ist, dass ihre Anwendung für Fragestellungen in der Grundlagen- und in der angewandten Forschung in verschiedenen Staaten, u. a. auch Deutschland, aufgrund ethischer Bedenken restriktiv reguliert ist (EuroStemCell, n.d.).

Um mit einem Zellmodell zu arbeiten, das gut standardisierbar und möglichst homogen ist,

sich in ausreichendem Maß expandieren lässt, frühe und späte osteoblastäre Differenzierungsstadien reflektieren kann, nicht aus Tumorgewebe gewonnen wurde und kommerziell ohne Einschränkungen verfügbar ist, wurde in der vorliegenden Arbeit ein aus humanen ES Zellen generiertes Modell verwendet, das im nachfolgenden Kapitel näher vorgestellt wird.

### **1.2.4 Mesenchymale Progenitorzellen aus humanen embryonalen Stammzellen**

Im Bereich der regenerativen Medizin führte die Notwendigkeit mit nicht-tumorösem Ausgangsmaterial arbeiten zu müssen, zur Generierung von multipotenten Progenitorzellen mesenchymalen Charakters aus humanen ES Zellen. Diese Zellen stellen eine isolierte bzw. angereicherte Subpopulation aus „andifferenzierten“ humanen ES Zellkulturen dar und weisen diverse Eigenschaften von MSCs auf.

Verschiedene Protokolle wurden etabliert, um diesen Zelltypus zu generieren, die unterschiedliche Techniken umfassen, wie z. B. die Kokultur mit murinen Knochenmarkszellen (Barberi et al., 2005), die manuelle Selektion (Olivier et al., 2006), die fluoreszenzbasierte Zellsortierung (Lian et al., 2007) und selektive oder anreichernde Kulturbedingungen (Harkness et al., 2011; Karlsson et al., 2009; Liu et al., 2012; Mahmood et al., 2010). Im Allgemeinen wird damit eine relativ homogene Population an langgestreckten, spindelförmigen Zellen gewonnen, die charakteristische Oberflächenmarker des mesenchymalen Phänotyps synthetisieren und negativ für hämatopoetische, endotheliale, neuroektodermale, epitheliale sowie Muskelzell- und Pluripotenzmarker sind (de Peppo und Marolt, 2013).

Zudem haben die meisten dieser Progenitorzellen die Kapazität *in vitro* in die drei typischen mesenchymalen Gewebe (Fett, Knorpel und Knochen) zu differenzieren, wobei die Quantität der Differenzierung u. a. von der parentalen ES Zelllinie und der Genexpression mesenchymaler Marker abhängig zu sein scheint (de Peppo und Marolt, 2013; de Peppo et al., 2013). Wie bei adulten MSCs sind auch bei diesen Progenitorzellen die Proliferationsdauer und die Differenzierungskapazität nach längerer Expansion aufgrund von Seneszenz begrenzt. Durch ihre Gewinnung aus pluripotenten ES Zellen stellen sie trotzdem eine theoretisch unlimitierte Zellressource dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine von Cellartis/Takara Bio kommerziell erhältliche Zelllinie verwendet, die unter dem Namen *human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitor cells* (hES-MPs) vertrieben wird. Diese Zellen sind in Deutschland nicht den regulatorischen Einschränkungen unterworfen wie sie für humane ES Zellen gelten und daher unproblematisch zu beziehen. Die Generierung von hES-MPs wurde 2009 von der Arbeits-

gruppe um Karlsson beschrieben und umfasst einen Selektionsprozess über die Anwendung einer *feeder*-freien Zellkultur und dem regelmäßigen Passagieren, der die Anreicherung schnell proliferierender, spindelförmiger Zellen unterstützt (Karlsson et al., 2009).

In den nachfolgenden Jahren wurden hES-MPs hinsichtlich der oben beschriebenen generellen Eigenschaften für mesenchymale Progenitorzellen und zusätzlicher Parameter gut charakterisiert. So konnte z. B. mittels eines Genom-weiten Oligonukleotid Microarrays gezeigt werden, dass hES-MPs ein vergleichbares Genexpressionsprofil wie adulte humane MSCs besitzen (de Peppo et al., 2010b). Zudem zeichnen sie sich im Vergleich zu MSCs durch eine hohe proliferative Aktivität und eine effizientere Mineralisierung während der osteogenen Differenzierung aus (de Peppo et al., 2010a, 2010b). Dieser Differenzierungsweg wurde bisher in Bezug auf die Genexpression charakteristischer Schlüsselfaktoren, den Verlauf und die Qualität der Mineralisierung und den vergleichenden Einfluss von statischen und dynamischen Kulturbedingungen in hES-MPs näher untersucht (de Peppo et al., 2012, 2010a).

### **1.3 Auswahl von Testsubstanzen für die Evaluierung des etablierten *in vitro* Assays**

Derzeit gibt es ca. 40 bis 50 Umweltfaktoren von denen bekannt ist, dass sie eine teratogene Wirkung im Menschen haben (Daston und Knudsen, 2010). Zu diesen zählen neben Infektionskrankungen und physikalischen Einflüssen auch Arzneimittel, wie z. B. Retinoide, Antiepileptika, Benzodiazepine oder Thalidomid, Genussmittel/Drogen, wie Alkohol, Kokain und Rauchen, und Umweltchemikalien, wie z. B. polychlorierte Biphenyle, Blei- und Quecksilberverbindungen (Schäfer et al., 2012). Angesichts der Menge an chemischen Stoffen, denen der Mensch ausgesetzt ist – die Zahl wird von Schäfer mit 100.000 angegeben (Schäfer, 2005) – erscheint die Anzahl gering. Am Beispiel von REACH wird deutlich, dass für einen sehr großen Anteil jedoch Informationen zum entwicklungstoxischen Potential nicht vorhanden oder nur unzureichend sind (Rovida et al., 2011; Springer et al., 2015). Für Tiermodelle ist die Datenlage natürlich umfangreicher als für den Menschen und hier liegen die Zahlen für Substanzen, die Hinweise auf Entwicklungstoxizität aufweisen, deutlich höher; je nach Quelle zwischen ca. 600 und 1300 (Daston und Knudsen, 2010; Schäfer, 2005).

Die Auswahl geeigneter Testsubstanzen ist ein wichtiges Kriterium für die Evaluierung von *in vitro* Modellen für Toxizitätsprüfungen. Verschiedene stoffspezifische Parameter, wie Mechanismus, Metabolismus, tierexperimentelle und humane Daten, physikalisch-chemische

Eigenschaften, Substanzklasse etc., müssen dabei in die Überlegungen einbezogen werden. In Bezug auf Entwicklungstoxizität wurden Vorschläge für relevante Substanzen von Smith et al. (1983) und Brown (2002) zusammengestellt.

Für die vorliegende Arbeit sollte in einem *Proof of Concept* getestet werden inwieweit sich das Differenzierungsmodell der hES-MPs und die etablierten Endpunkte zur Erfassung von schädlichen Einflüssen auf die osteogene Entwicklung eignen. Dies sollte mit einer kleinen Auswahl an Substanzen erfolgen, die unterschiedliche Mechanismen abbilden, für die gesicherte *in vivo* Daten zur Verfügung stehen und die in der Evaluierung von *in vitro* Systemen „etabliert“ sind. In Bezug auf die entwicklungstoxischen Stoffe sollte zudem bekannt sein, dass Knochen ein relevantes Zielgewebe ist. Zu diesen gehörten Valproinsäure (VPA), Borsäure (BA), Warfarin (WAR) und 5-Fluorouracil (5-FU). Diphenhydramin (DPH), Metoclopramid (MCP) und Penicillin G (PenG) wurden als nicht-entwicklungstoxische Stoffe hinzugenommen. Mit Ausnahme von MCP sind alle gewählten Chemikalien von Brown (2002) als mögliche Testsubstanzen zur Validierung von *in vitro* Testsystemen vorgeschlagen worden. Zudem wurden alle Substanzen bereits im validierten EST getestet. WAR, DPH und MCP wurden bewusst gewählt, da mit dem EST keine korrekte Klassifizierung entsprechend ihres *in vivo* Potentials erfolgte.

Die gewählten Stoffe werden in den nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben. Tab. 1 bietet zudem eine Übersicht über die Klassifizierung der Substanzen bezüglich ihres embryo- und entwicklungstoxischen Potentials nach wissenschaftlicher Bewertung und rechtlichen Regularien.

**Tab. 1: Übersicht zur Klassifizierung der in dieser Arbeit verwendeten Testsubstanzen entsprechend ihres embryo- und entwicklungstoxischen Potentials für den Menschen.**

Substanz	U.S. FDA Schwangerschaftsrisikokategorie <sup>§</sup>	Harmonisierte Einstufung nach CLP-Verordnung*	Brown, 2002 oder Riebeling et al., 2012 <sup>§</sup>
VPA	X <sup>a</sup> (Migräne) D <sup>b</sup> (Epilepsie, manische Episoden)	k.A. (Natriumsalz)	Schwach embryotoxisch
BA	k.A.	Reproduktions- und entwicklungstoxisch Kategorie 1B <sup>d</sup>	Schwach embryotoxisch
WAR	X <sup>a</sup>	Entwicklungstoxisch Kategorie 1A <sup>e</sup>	Schwach embryotoxisch
5-FU	D <sup>b</sup>	k.A.	Stark embryotoxisch
DPH	B <sup>c</sup>	k.A.	Nicht-embryotoxisch
MCP	B <sup>c</sup>	k.A.	Nicht-embryotoxisch
PenG	B <sup>c</sup>	n.a.	Nicht-embryotoxisch

<sup>§</sup> Die Anforderungen zur Klassifizierung von in den USA vertriebenen Medikamenten in die verschiedenen Schwangerschaftsrisikokategorien sind in Shuren, 2008 beschrieben. Mit dem 30. Juni 2015 wurde ihre Angabe auf Arzneimitteln abgeschafft (U. S. FDA, 2014). U.S. FDA=*United States Food and Drug Administration*.

\* Verordnung Nr. 1272/2008 der Europäischen Kommission zur Klassifizierung, Kennzeichnung und Verpackung von Substanzen und Gemischen (European Parliament and Council, 2008).

<sup>§</sup> Kategorisierung nach den von Brown zusammengestellten Kriterien für die internationale ECVAM-Validierungsstudie zu *in vitro* Embryotoxizitätstests.

<sup>a</sup> Marktbeobachtungen oder klinische Studien zeigten, dass ein Risiko für den menschlichen Fetus besteht und dieses Risiko überwiegt eindeutig den möglichen Nutzen der Anwendung des Arzneistoffs.

<sup>b</sup> Marktbeobachtungen oder klinische Studien zeigten, dass ein Risiko für den menschlichen Fetus besteht, der potentielle Nutzen des Arzneistoffs rechtfertigt jedoch möglicherweise die Anwendung während der Schwangerschaft.

<sup>c</sup> Reproduktionstoxische Studien an Tieren zeigten kein Risiko für den Fetus auf und es liegen keine adäquaten und gut kontrollierten Studien für den Menschen vor. Oder: Reproduktionstoxische Studien an Tieren zeigten adverse Effekte auf, adäquate und gut kontrollierte Studien für den Menschen sprechen jedoch gegen ein Risiko für den Fetus.

<sup>d</sup> Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen und kann das Kind im Mutterleib schädigen.

<sup>e</sup> Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

n.a. nicht anwendbar

k.A. keine Angabe

### 1.3.1 Valproinsäure

VPA ist eine kurzkettige, verzweigte Fettsäure, die in der Medizin als Antiepileptikum für die Dauertherapie verwendet wird und zu den am häufigsten eingesetzten Wirkstoffen in diesem Bereich gehört. Zu den beschriebenen negativen Effekten der langfristigen Gabe dieser Substanz gehören eine verminderte Knochendichte und damit einhergehend ein erhöhtes Risiko für Frakturen sowohl bei Kindern als auch Erwachsenen (Leonard et al., 2010; Sheth et al., 1995).

VPA passiert die Plazenta und weist entwicklungstoxische Effekte in zahlreichen tierexperimentellen Spezies, wie z. B. Ratten (Vorhees, 1987), Mäusen (Kao et al., 1981) und Rhesusaffen (Hendrickx et al., 1988), auf. Skelettale Anomalien wurden in all diesen Studien beobachtet und umfassten sowohl kostale, vertebrale, kraniofaziale als auch die Gliedmaßen betreffende Defekte. Der humane Embryo bzw. Fetus scheint jedoch die höchste Sensitivität gegenüber VPA zu besitzen (Ornoy, 2009). Die Nachkommen von mit VPA behandelten Müttern weisen dabei ein 3-fach höheres Risiko für schwere Anomalien auf als die nicht-exponierter Mütter. Zu den beschriebenen Effekten gehören Spina bifida, Entwicklungsstörungen, Autismus und die Beeinträchtigung unterschiedlicher Organsysteme. Zudem ist das sogenannte „fetale Valproinsäure-Syndrom“ beschrieben, das einen charakteristischen Komplex an kraniofazialen Abnormitäten umfasst. Ein höheres Risiko für teratogene Effekte besteht ab einer täglichen Dosierung von 1000 mg oder mehr bzw. einer Polytherapie mit weiteren antiepileptischen Medikamenten.

Als wahrscheinlichster Mechanismus für die Teratogenität von VPA wird die Inhibierung von Histondeacetylasen (HDACs) angesehen (Menegola et al., 2005; Phiel et al., 2001). Diese Enzyme modulieren durch die Entfernung von Acetylgruppen an Histonen die Chromatinkonformation und beeinflussen somit die Gentranskription. Gestützt wird diese Hypothese u. a. dadurch, dass Trichostatin A (TSA), ein anderer HDAC-Inhibitor, ähnliche teratogene Effekte wie VPA in Mäusen induziert (Menegola et al., 2005) und VPA-Analoga ohne HDAC-inhibitorische Aktivität keine Teratogenität aufweisen (Phiel et al., 2001). Durch den beschriebenen Effekt auf HDACs hat VPA nicht nur einen Einfluss auf spezifische entwicklungsrelevante Gene, sondern beeinflusst auch den Zellzyklus, das Zellwachstum, die Apoptose und essentielle Signalwege wie Wnt (Di Renzo et al., 2010; Ornoy, 2009; Wiltse, 2005).

### 1.3.2 Borsäure

Bei BA handelt es sich um die Säure des Halbmetalls Bor, die in dieser Form oder als Borat-

verbindung in zahlreichen industriell hergestellten Produkten, wie Pestiziden, Wasch- und Bleichmitteln, Pharmazeutika, Verbraucherprodukten und als Konservierungsstoff in Lebensmitteln, verwendet wird.

BA ist nach der CLP-Verordnung als reproduktions- und entwicklungstoxische Substanz der Kategorie 1B eingestuft. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde der Stoff 2010 auch von der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA) in die Kandidatenliste der besonders besorgniserregenden Stoffe aufgenommen (ECHA, 2010). Die Klassifizierung von BA als entwicklungstoxisch erfolgte auf Basis tierexperimenteller Studien, die zeigten, dass die Substanz sich schädigend auf die Nachkommen von Ratten, Mäusen und Kaninchen auswirkt (Heindel et al., 1994; Price et al., 1996). Variationen und Missbildungen des axialen Skeletts, wie z. B. *wavy ribs*, eine verkürzte XIII. Rippe sowie vertebrale und Rippenfusionen (Di Renzo et al., 2007; Price et al., 1996), trugen dabei wesentlich zur Entscheidung bezüglich der Einstufung bei (Bureau for Chemical Substances Poland, 2013). Epidemiologische Studien am Menschen liegen, mit Ausnahme einer Untersuchung zur kurzzeitigen vaginalen Applikation von BA, nur generell für Borverbindungen vor und adressierten nicht die Säure im Speziellen (zusammengefasst in Bureau for Chemical Substances Poland, 2013). In diesen Studien konnten in Populationen mit gebiets- bzw. arbeitsbedingter hoher Exposition keine adversen entwicklungstoxischen Effekte beobachtet werden. Aufgrund methodischer Defizite sind diese Untersuchungen allerdings nur wenig belastbar und werden für Entscheidungen in Bezug zur Klassifizierung von BA nur als bedingt verwendbar angesehen (Bureau for Chemical Substances Poland, 2013; ECHA. Committee for Risk Assessment, 2014).

In der Literatur gibt es derzeit zwei Hypothesen zum möglichen embryo- und entwicklungstoxischen Mechanismus von BA. Aufgrund ähnlicher schädigender Effekte des axialen Skeletts wie durch VPA und TSA untersuchten Di Renzo et al. (2007) das HDAC-inhibitorische Potential von BA in Mäusen. Tatsächlich reduzierte die Substanz die HDAC-Aktivität in den murinen Embryonen schwach, aber statistisch signifikant. Dabei waren ausschließlich Somiten von der untersuchten Hyperacetylierung des Histons H4 betroffen, was in Einklang damit steht, dass BA sich auf die Entwicklung des axialen Skeletts auswirkt, nicht aber auf die des Neuralrohrs wie VPA und TSA. Narotksy et al. (1998) beobachteten, dass in Ratten die schädigenden Effekte von BA in einem engen Zeitfenster zwischen den Gestationstagen 5–10 induziert werden und vermuteten daher eine Interferenz mit den Kontrollmechanismen, die die Identität von Somiten regulieren. Etwas später konnten Wéry et al. (2003) dann zeigen, dass BA tatsächlich die Expression bestimmter *Hox*-Gene stört, die in die Spezifizierung des anterioren Wirbelsäulenteils involviert sind.

### 1.3.3 Warfarin

WAR ist ein synthetisch hergestellter heterozyklischer Wirkstoff, der zur Gruppe der 4-Hydroxycumarine gehört. Substanzen mit dieser Molekülstruktur inhibieren das Enzym Vitamin-K-Epoxid-Reduktase, das oxidiertes Vitamin K reduziert und somit eine aktivierte Form für Vitamin K-abhängige Prozesse verfügbar macht. Hierzu gehört z. B. die Blutgerinnung, bei der die gamma-Carboxylierung inaktiver Vorstufen von verschiedenen prokoagulatorischen Gerinnungsfaktoren von Vitamin K abhängig ist. WAR wirkt daher gerinnungshemmend und wird entsprechend dieser Eigenschaft in der Medizin seit den 1950ern z. B. zur Behandlung von Thrombose eingesetzt. Zusätzlich findet es auch Verwendung als Rodentizid.

Cumarin-Derivate sind plazentagängig und es ist seit langem bekannt, dass sie im Menschen teratogen wirken, wobei die umfangreichsten Daten hierzu für WAR vorliegen (van Driel et al., 2002). Die beobachteten Effekte sind Blutungskomplikationen, Fehlbildungen des zentralen Nervensystems sowie eine Reihe charakteristischer faszialer und skelettaler Anomalien, die unter dem Begriff „Warfarin-Embryopathie“ zusammengefasst werden. Dazu gehören u. a. Mittelgesichtshypoplasie, ektopische Kalzifizierungen, Rhizomelie, Brachydaktylie und hypoplastische Nägel. Mit einer Prävalenz von 6 % scheint der humane Organismus die höchste Sensitivität für die Ausbildung der „Warfarin-Embryopathie“ von der sechsten bis neunten Schwangerschaftswoche zu besitzen, während eine spätere Gabe der Medikation dieses Syndrom nicht verursacht (van Driel et al., 2002). In Ratten induziert WAR zum Teil ähnliche Geburtsdefekte wie im Menschen (Howe und Webster, 1992).

Mechanistisch werden alle beschriebenen teratogenen Effekte von WAR u. a. auf die Interferenz mit Vitamin K-abhängigen Prozessen zurückgeführt (Kidd, 2010; van Driel et al., 2002). Für Knochengewebe sind dadurch im Speziellen die drei Proteine OC, Matrix Gla Protein (MGP) und Periostin betroffen (Kidd, 2010). Wie die Gerinnungsfaktoren werden auch diese Proteine durch die gamma-Carboxylierung spezifischer Glutamatreste (Gla-Reste) modifiziert, die von Vitamin K-abhängigen Enzymen durchgeführt wird. Die Gla-Reste begründen im Fall von OC dessen Affinität zu Calcium und Hydroxyapatit (Hauschka und Carr, 1982; Lee et al., 2000) und scheinen auch für die Calcium-bindenden Eigenschaften von MGP verantwortlich zu sein (Proudfoot und Shanahan, 2006). Die Funktion der Gla-Reste in Periostin ist bisher noch unbekannt (Coutu et al., 2008).

Eine weitere Hypothese zum teratogenen Mechanismus von WAR beruht darauf, dass ähnliche skelettale Missbildungen auch bei der X-gekoppelt rezessiven Form der Erbkrankheit Chondrodysplasia punctata auftreten. Bei dieser speziellen Form der Erkrankung liegt

der Defekt im Gen für Arylsulfatase E, einem Enzym, das zur Gruppe der Sulfatasen gehört, die für die Hydrolyse von Sulfatesterverbindungen verantwortlich sind und eine Rolle im Aufbau der ECM in Knorpel und Knochen spielen. Franco et al. konnten zeigen, dass die Enzymaktivität von Arylsulfatase E in transfizierten Zellen durch WAR inhibiert wird und vermuteten, dass derselbe metabolische Weg bei der speziellen Form der Chondrodysplasia punctata und bei einer Exposition mit WAR betroffen ist (Franco et al., 1995).

### 1.3.4 5-Fluorouracil

5-FU ist eine synthetisch hergestellte heterozyklische organische Verbindung und ein Derivat der Nukleinsäurebase Uracil. Im Gegensatz zur letztgenannten ist 5-FU mit einem Fluoratom am fünften Kohlenstoffatom der Pyrimidingrundstruktur ausgestattet. In Säugerzellen wird 5-FU zu 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat metabolisiert, das die Thymidylat-Synthase inhibiert (Parker und Cheng, 1990). Dadurch wird die Produktion von Desoxythymidinmonophosphat unterbrochen, das ein essentieller Baustein für die Replikation und Reparatur der DNA ist. Weiterhin kann 5-FU aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeiten zu Uracil und Thymin auch anstatt dieser in Ribonukleinsäure (RNA) und DNA eingebaut werden, was Auswirkungen auf die RNA-Transkription und Prozessierung hat sowie zu einer Akkumulation des Pyrimidin-Analogs im Genom führt (Parker und Cheng, 1990). Aufgrund der angeführten Mechanismen weist 5-FU ausgeprägte zytostatische und -toxische Eigenschaften auf und wird daher in der chemotherapeutischen Behandlung verschiedener Krebserkrankungen eingesetzt (Longley et al., 2003).

Die Substanz wirkt teratogen in zahlreichen Spezies, wie z. B. in Ratten (Shuey et al., 1994), Mäusen (Dagg, 1960), Hamstern (Shah und MacKay, 1978) und Hühnern (Karnofsky et al., 1958). Zu den beobachteten Effekten gehören u. a. ein reduziertes fetales Wachstum, Fehlbildungen des Schwanzes, des Gehirns, der Hinterläufe sowie Pfoten, Gaumenspalten, *wavy ribs* und eine verminderte Ossifikation. In Bezug auf adverse Effekte von 5-FU auf die humane embryonale und fetale Entwicklung gibt es nur Hinweise aus wenigen Fallstudien. Eine Behandlung der Mutter während des zweiten und dritten Trimesters schien hier keine Geburtsdefekte im Nachwuchs zu verursachen (Berry et al., 1999). In einer Fallstudie traten bei Gabe von 5-FU am Ende des ersten Trimesters zahlreiche Defekte, wie eine radiale Aplasie der Daumen und Finger, eine Aplasie von Speiseröhre, Zwölffingerdarm und Harnleiter sowie eine Hypoplasie von Lunge, Aorta, Thymus und Gallengängen, auf (Stephens et al., 1980), allerdings ist die Aussagekraft der Beobachtungen aufgrund von weiteren diagnostischen und medizinischen Maßnahmen eingeschränkt.

Die oben beschriebenen Interferenzen mit Nukleinsäuren und die daraus resultierenden Beeinträchtigungen von Zellteilung, -wachstum und -metabolismus werden als hauptverantwortliche Mechanismen für die entwicklungstoxischen Eigenschaften von 5-FU angesehen (Lau et al., 2001). Darüber hinaus konnten Xian et al. (2006) in Experimenten mit jungen Ratten zeigen, dass 5-FU direkt das Längenwachstum von Knochen beeinträchtigt. Dies geschieht durch die Induktion von Apoptose und der Inhibition der Proliferation sowohl von Chondrozyten in der Wachstumsfuge als auch von (Prä)osteoblasten in der Metaphyse.

### **1.3.5 Diphenhydramin**

DPH ist eine synthetisch hergestellte Benzhydryl-Verbindung, die zu den H1-Antihistaminika der ersten Generation gehört und seit den 1940ern als Medikament verwendet wird. Sie besitzt antiallergische, antiemetische, antitussive, anticholinerge und sedierende Eigenschaften und wird daher zur Behandlung von Allergien und als Schlaf-/Beruhigungsmittel eingesetzt (Cirillo und Tempero, 1976). Die Wirkung von DPH ist darauf zurückzuführen, dass es sowohl ein Antagonist von Histamin an H1-Rezeptoren als auch von Acetylcholin an Muscarin-Rezeptoren ist.

Tierexperimentelle Studien liegen für verschiedene Spezies vor. Schardein et al. (1971) konnten bei einer Gabe von 3–19 mg/kg/Tag DPH während der Organogenese keine adversen Effekte auf den Nachwuchs von Ratten und Kaninchen feststellen. Auch Dosierungen von 100 mg/kg/Tag zeigten bei gleicher Behandlung keine eindeutigen teratogenen Effekte in Ratten (NTP, 1983). In neueren Studien wies eine Dosis von 20 mg/kg/Tag, die trächtigen Ratten über die gesamte Schwangerschaft bzw. in der fetalen Periode verabreicht wurde, allerdings Einflüsse auf die physische und die Reflexentwicklung sowie auf die postnatale Reifung des Zentralnervensystems und die Sexualentwicklung des männlichen Nachwuchses auf (Chiavegatto et al., 1997; Moraes et al., 2004). Bei Exposition von trächtigen Mäusen gegenüber DPH wurde eine erhöhte Inzidenz für Gaumenspalten beobachtet, jedoch bei Dosen, die auch generell toxisch auf Feten und Muttertiere wirkten (NTP, 1982, 1981). In Bezug auf den Menschen wird H1-Antihistaminika der ersten Generation im Allgemeinen kein erhöhtes Risiko für teratogene Schädigungen zugeschrieben (Gilboa et al., 2009). Eine retrospektive epidemiologische Studie aus dem Jahr 2009 zeigte Assoziationen zwischen DPH und bestimmten Geburtsdefekten (Gilboa et al., 2009), die allerdings in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden konnten (Li et al., 2013).

### 1.3.6 Metoclopramid

MCP ist ein synthetisches Benzamid-Derivat, das aufgrund seiner antiemetischen und gastrointestinal prokinetischen Wirkungen zur Behandlung von Erbrechen, Übelkeit und Störungen des Magen-Darm-Trakts eingesetzt wird (Tonini et al., 2004). Seine therapeutischen Eigenschaften resultieren zum einen aus der Blockade von Dopamin-D2-Rezeptoren im Zentralnervensystem. Zum anderen wirkt es auch antagonistisch bzw. agonistisch über die Bindung an 5-Hydroxytryptamin (5-HT)<sub>3</sub>- und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren und beeinflusst somit durch Serotonin regulierte physiologische Funktionen.

Aus Studien in Ratten, Mäusen und Kaninchen konnte keine teratogenes Risiko abgeleitet werden (Gill und Einarson, 2007; Pfizer, 2012). Kürzlich veröffentlichte retrospektive epidemiologische Studien ergaben ebenfalls kein erhöhtes Risiko für Geburtsdefekte beim Menschen (Matok et al., 2009; Pasternak et al., 2013).

### 1.3.7 Penicillin G

PenG ist ein von Pilzen der Gattung *Penicillium* gebildeter Wirkstoff, der zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehört. Diese Substanzgruppe übt ihren antibakteriellen Einfluss über die Inhibition der Quervernetzung von Peptidoglykanen in der Zellwand aus (Clark, 2005). Dies geschieht durch eine Inaktivierung der verantwortlichen Enzyme mit Hilfe der Amidgruppe des Lactamrings. PenG wird als Therapeutikum gegen verschiedene bakterielle Infektionen eingesetzt. Es konnte kein teratogenes Risiko von PenG aus tierexperimentellen Studien und den vorhandenen Daten zur humanen Exposition abgeleitet werden (Nahum et al., 2006).

## 2 Zielstellung

Die Etablierung und Anwendung von alternativen Testmethoden für entwicklungstoxikologische Studien im Rahmen der Prüfung von Chemikalien und Pharmazeutika ist aus ethischen, qualitativen, finanziellen und zeitlichen Gründen dringend erforderlich. Durch teratogene Substanzen induzierte skelettale Anomalien werden sowohl im Menschen als auch in Versuchstieren häufig beobachtet und die Analyse der Knochenentwicklung ist ein integraler Bestandteil von sicherheitstoxikologischen Studien. Ein *in vitro* Testsystem, das der Vorhersage von Substanzeffekten auf die humane Knochenentwicklung dient, könnte daher einen wertvollen Bestandteil einer modularen Teststrategie zur Erfassung des entwicklungstoxischen und teratogenen Potentials von exogenen Noxen darstellen. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es jedoch keinen validierten Assay, der diesen Aspekt adressiert. Erste Ansätze für den Aufbau solch eines Testmoduls beschränkten sich auf die Verwendung von Maus ES Zellen. Dies birgt das Risiko eines inadäquaten prädiktiven Potentials für den Menschen aufgrund von Interspeziesdifferenzen und ein humanes System ist daher wünschenswert.

Aus diesem Grund war das übergreifende Ziel der vorliegenden Arbeit die Grundlagen für ein *in vitro* Testsystem zur Erfassung von Entwicklungsknochentoxizität zu schaffen, das auf humanen embryonalen Zellen beruht.

Dafür wurden die folgenden aufeinander aufbauenden Fragestellungen untersucht:

1. Sind mesenchymale Progenitorzellen, die aus humanen embryonalen Stammzellen gewonnen wurden (hES-MPs), ein geeignetes Zellmodell für die Etablierung eines *in vitro* Assays?

Basierend auf den initialen Arbeiten der Arbeitsgruppe um Karlsson et al. sollte die publizierte osteogene Differenzierung von hES-MPs zunächst etabliert und optimiert werden, um mit einem Standardprotokoll zu arbeiten, das eine ausreichende Effizienz sowie eine gute Reproduzierbarkeit und Stabilität der Differenzierung garantiert. Anschließend sollte eine weitergehende Charakterisierung der osteogen differenzierenden hES-MPs mittels verschiedener zellbiologischer sowie immun- und biochemischer Methoden dazu dienen, mehr Informationen zur Präsenz und dem zeitlichen Verlauf der typischen osteogenen Differenzierungsprozesse in den Kulturen zu gewinnen. Die humane Osteosarkomzelllinie Saos-2 sollte dabei als Referenzmodell für die Methodenetablierung und -entwicklung dienen.

2. Etablierung toxikologischer Endpunkte: Welche molekularen Marker bieten sich für die Testentwicklung an und wie können diese quantifiziert werden?

Die oben angeführten Charakterisierungsexperimente sollten auch der Identifizierung von molekularen Markern dienen, die sich aufgrund ihrer Quantität und ihrer Zeitprofile eignen. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf die Mineralisierung gelegt, da sie das Ergebnis der funktionellen Interaktion verschiedener zellulärer und molekularer Prozesse ist und sich bereits als prädiktiver Marker in einem Assay mit Maus ES Zellen erwiesen hat. Ein weiterer Fokus waren Proteinmarker, da sie sowohl die Erfassung von transkriptional als auch (post)translational bedingten Veränderungen ermöglichen.

Anschließend sollten Methoden zur sensitiven und möglichst frühen Quantifizierung ausgewählter Marker etabliert werden, um toxische Effekte erfassen zu können. Die Entwicklung der Methoden erfolgte zum Teil mit osteogen differenzierenden Maus ES Zellen.

3. Können mit dem etablierten Assay (hES-MP Modell und toxikologische Endpunkte) spezifische Substanzeffekte auf die Knochenentwicklung erfasst werden?

Abschließend sollte mit einer Auswahl an gut beschriebenen Testsubstanzen geprüft werden, ob der etablierte Assay Stoffe mit einem schädigenden Einfluss auf die Knochenentwicklung und Substanzen ohne spezifische Effekte unterscheiden kann. Als Maß dafür sollte die Abgrenzung eines spezifischen Effekts auf den Endpunkt osteogene Differenzierung von einer generellen zytotoxischen Wirkung (Endpunkt Zytotoxizität) dienen. Ein Vergleich der gewonnenen Resultate zu *in vivo* Daten und zu Daten von anderen relevanten *in vitro* Testsystemen sollte dann Aussagen über die Prädiktivität und Eignung des humanen Assays ermöglichen. Des Weiteren sollten möglich Limitierungen des Tests identifiziert werden, um seinen Anwendungsbereich besser abschätzen zu können.

### 3 Material

#### 3.1 Reagenzien

Alle Chemikalien, wie z. B. Lösungsmittel und Puffer, wurden in analytischer Qualität von Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Spezielle Reagenzien und Materialien wurden bei folgenden Anbietern erworben:

1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> (1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> )	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), Dihydrochlorid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
$\beta$ -Glycerophosphat ( $\beta$ -GP)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, Vernetzungsgrad 29:1, 30 %	Bio-Rad, München, Deutschland
Agarose für die Gelelektrophorese	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Alizarin Rot S	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ascorbinsäure (AA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
AquaPolyMount	Polysciences, Eppelheim, Deutschland
CASY blue	Roche, Mannheim, Deutschland
Chemilumineszenzsubstrat SuperSignal™ West Pico/Femto	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Citratlösung, 27 mM, pH 3,6	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Collagenase A, > 0,15 Units/mg	Roche, Mannheim, Deutschland
Cytofix™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

## Material

---

Dexamethason (Dex)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Diethanolamin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Desoxyribonuklease (DNase), rekombinant, Ribonuklease (RNase)-frei	Roche, Mannheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung	PanBiotech, Aidenbach, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
FACSFlow™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Glycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumthiosulfat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Nonidet™ P40	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Normales Ziegenserum	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Perm/Wash™ Puffer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran, 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ponceau Rot	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

## Material

---

cOmplete™, Mini, Proteaseinhibitortabletten, EDTA-frei	Roche, Mannheim, Deutschland
Protein Loading Buffer Pack	Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Proteinmarker Precision Plus Protein™ Dual Color	Bio-Rad, München, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V, 30 % Lösung	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA), lyophilisiertes Pulver, ≥ 96 %	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
RNA Loading Dye (2x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Saponin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Silbernitrat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
TRIzol® Reagenz	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland
Whatman-Papier	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 3.2 Testsubstanzen

5-Fluorouracil, CAS RN 51-21-8, Best.-Nr. F6627	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Borsäure, CAS RN 10043-35-3, Best.-Nr. B7660	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Diphenhydraminhydrochlorid, CAS RN 147-24-0, Best.-Nr. D3630	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumvalproat, CAS RN 1069-66-5, Best.-Nr. P4543	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

## Material

---

Metoclopramidhydrochlorid, CAS RN 7232-21-5, Best.-Nr. M0763	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Levamisolhydrochlorid, CAS RN 16595-80-5, Best.-Nr. L9756	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin G Natriumsalz, CAS RN 69-57-8, Best.-Nr. PENNA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Warfarin, CAS RN 81-81-2, Best.-Nr. PS104	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

### 3.3 Zelllinien

hES-MP™002.5 wurden von Cellartis, Takara Bio Europe AB (Göteborg, Schweden) erworben.

Saos-2 wurden über das Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Maus ES Zellen des Stamms 129/Sv, Klon D3, wurden von Prof. Rolf Kemler, Max-Planck-Institut, Freiburg zur Verfügung gestellt.

### 3.4 Zellkulturmaterialien

β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
<i>Basic fibroblast growth factor</i> (bFGF)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 1 und 4,5 g/l Glucose	PAA Laboratories/GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland; Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ESGRO Complete™ Gelatin Solution	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland; HyClone/GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Gelatine-Lösung (2 % in H <sub>2</sub> O), zellkulturgeeignet	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Glasobjektträger (10 mm)	Menzel/Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland

## Material

---

Kryoröhrchen	NalgeNunc/Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
<i>Leukemia inhibitory factor</i>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
McCoy's 5A Medium	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (100 x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Permanox® Objektträger (8-well)	NalgeNunc/Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Pipetten	BD Falcon™, BD Biosciences, Erembodegem, Belgien; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter, 0,2 µM	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
TrypLE™ Select	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA, 0,05 % und 0,25 %	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin, 2,5 %, ohne Phenolrot, ohne EDTA	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturplatten	BD Falcon™ und BD Optilux™, BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Zellkulturflaschen	BD Falcon™, BD Biosciences, Erembodegem, Belgien; NalgeNunc/Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Sonstige Zellkulturmaterialien	BD Falcon™, BD Biosciences, Erembodegem, Belgien

### 3.5 Primäre Antikörper und Phalloidin

Maus anti-β-Aktin, monoklonal, IgGκ, HRP-konjugiert, Best.-Nr. ab20272	Abcam, Cambridge, UK
--	----------------------

Maus anti-human Alkalische Phosphatase, monoklonal, IgG1 $\kappa$ , PE-konjugiert, Klon # B4-78, Best.-Nr. 561433	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus anti-human CD10, monoklonal, IgG1, PE-konjugiert, Klon # HI10a, Best.-Nr. 332776	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus anti-human CD13, monoklonal, IgG1 $\kappa$ , PE-konjugiert, Klon # WM15, Best.-Nr. 555394	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus anti-human CD117, monoklonal, IgG1, PE-konjugiert, Klon # 104D2, Best.-Nr. 332785	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus anti-human CD166, monoklonal, IgG1 $\kappa$ , PE-konjugiert, Klon # 3A6, Best.-Nr. 559263	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus anti-human Dlx5, monoklonal, IgG2a, Klon # 712216, 0,5 mg/ml, Best.-Nr. MAB6710	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Maus anti-Dlx5, monoklonal, IgG1 $\kappa$ , Klon # 3B11, Best.-Nr. WH0001749M12	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Maus anti-Runx2, monoklonal, IgG2a, 0,5 mg/ml, Best.-Nr. ab76956	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen anti-Kollagen Typ I, polyklonal, 1 mg/ml, Best.-Nr. 600-401-103-0.1	Rockland/Biomol, Hamburg, Deutschland
Kaninchen anti-human Osteocalcin, polyklonal, 2-3 mg/ml, Best.-Nr. AB1857	Millipore, Eschborn, Deutschland
Phalloidin, Alexa Fluor® 488-konjugiert, Best.-Nr. A12379	Molecular Probes/Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

### 3.6 Sekundäre Antikörper

Ziege IgG anti-Maus IgG (H+L), Cy3™-konjugiert, Best.-Nr. 115-165-003	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege IgG anti-Maus IgG (H+L), HRP-konjugiert, Best.-Nr. 115-035-146	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege IgG anti-Maus IgG2a (Fc), HRP-konjugiert, Best.-Nr. 115-035-206	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege F(ab') <sub>2</sub> anti-Maus IgG (H+L), PE-konjugiert, Best.-Nr. 115-116-146	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege IgG anti-Kaninchen IgG (H+L), Cy3™-konjugiert, Best.-Nr. 111-165-144	Dianova, Hamburg, Deutschland

### 3.7 Isotypkontrollen

IgG Isotypkontrolle aus Kaninchen, Best.-Nr. 011-000-003	Dianova, Hamburg, Deutschland
--	-------------------------------

## Material

---

IgG1 $\kappa$ Isotypkontrolle aus murinem Myelom, PE-konjugiert, Best.-Nr. P4685	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
IgG2 $\alpha$ Isotypkontrolle aus Maus, Best.-Nr. 554126	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
IgG2 $\alpha$ Maus anti-PSD95, Best.-Nr. sc-32291	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

### 3.8 Kits

Alkaline Phosphatase (AP), Leukocyte, 86R	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Calcium (CPC) LiquiColor® Test	Stanbio, Boerne, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	Roche, Mannheim, Deutschland
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
CytoPainter F-actin Staining Kit	Abcam, Cambridge, UK
Human Osteogenesis RT <sup>2</sup> Profiler™ PCR Array	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
OsteoImage™ Mineralization Assay	Lonza, Köln, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RT <sup>2</sup> First Strand Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Perbio/Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland

### 3.9 Geräte

Absaugpumpe	INTEGRA Biosciences, Konstanz, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland

## Material

---

Dokumentationsstation Decon Devision DBox, ausgestattet mit einem UV-Transilluminator und einer CoolSNAP HQ2 CCD Kamera; Software: Gel-Pro Analyzer Version 6.0.0.349	DC SCIENCE TEK, Hohengandern, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophorese Apparatur PerfectBlue™ Mini	PEQLAB/VWR, Erlangen, Deutschland
Elektrophorese Apparatur Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Immunfluoreszenzmikroskop BX 51, ausgestattet mit einer F View II CCD Kamera; Software: analySIS 5.0	Olympus, Hamburg, Deutschland
Inverses Lichtmikroskop Axio Observer Z1 mit Fluoreszenz-Imaging-System ApoTome.2, ausgestattet mit einer AxioCam MRm CCD Kamera; Software: ZEN	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplattenlesegerät Infinite M200	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Mikrotiterplattenluminometer GloMax	Turner BioSystems/Promega, Mannheim, Deutschland
Mikrotiterschüttler	IKA, Staufen, Deutschland
Minifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
NanoDrop ND-2000 Spektrophotometer	PEQLAB/VWR, Erlangen, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop CKX 41, ausgestattet für Fluoreszenzuntersuchungen und mit einer C7070 CCD Kamera	Olympus, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe (accujet)	Brand, Wertheim, Deutschland
Power Supply PowerPac HC	Bio-Rad, München, Deutschland
Reagenzglas mixer (Vortex)	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
'Semi-Dry'-Elektroblotter PerfectBlue™	PEQLAB/VWR, Erlangen, Deutschland

## Material

---

Sonifier Branson Cell Disruptor B-30	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler Mastercycler® personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellmessgerät CASY®	Innovatis/Roche, Mannheim, Deutschland
Zellzählkammer (Thoma)	Brand, Wertheim, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus, Hanau, Deutschland; Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde mit drei verschiedenen Zellsystemen gearbeitet. Das wichtigste und hauptsächlich verwendete stellten die Progenitoren aus humanen ES Zellen (hES-MPs) dar, deren Eignung als Testsystem evaluiert und die für die Etablierung des Assays zur Prüfung auf Entwicklungsknochentoxizität verwendet wurden. Die humanen Osteosarkomzellen Saos-2 dienten als Referenzkultur für die Etablierung bestimmter Methoden und die Identifizierung geeigneter Antikörper (AK). Zu Beginn der experimentellen Arbeiten wurde auch mit Maus ES Zellen gearbeitet, um Methoden zur Charakterisierung der osteogenen Differenzierung zu etablieren. In die schriftliche Arbeit sind davon nur ausgewählte Experimente eingeflossen, wenn dadurch an entsprechender Stelle relevante Informationen zur Verfügung gestellt wurden.

#### 4.1.1 Kultivierung von mesenchymalen Progenitorzellen aus humanen embryonalen Stammzellen (hES-MPs)

Die Kultivierung der nicht-differenzierenden hES-MPs erfolgte nach einem von de Peppo et al. publizierten Protokoll (2010a).

hES-MPs weisen mit zunehmender Kultivierungszeit eine abnehmende Differenzierungskapazität auf (de Peppo et al., 2010a). Um eine vergleichbare Differenzierung über alle Experimente hinweg zu gewährleisten, war es daher erforderlich mit Zellen in einer frühen und immer gleichen Passage zu arbeiten. Daher erfolgte zunächst der Aufbau eines ausreichend großen Bestands an Zellen. Die von Cellartis gelieferten hES-MPs wurden zunächst für sieben Tage in Expansionsmedium kultiviert, anschließend auf mehrere Kryoröhrchen aufgeteilt und erneut eingefroren (p1). Ein Gefäß dieser ersten Kultivierung wurde erneut aufgetaut, die Zellen für 13 Tage mit zweimaligem Umsetzen expandiert und erneut eingefroren (p1+3). Dieser Bestand bildete das Ausgangsmaterial für alle weiteren Experimente. hES-MPs in p1+3 wurden über weitere neun Tage mit einmaligem Umsetzen expandiert bevor sie dann für Differenzierungsexperimente eingesetzt wurden (p1+3+3). Mit einer Aussaat von  $1 \times 10^6$  Zellen konnten nach diesen neun Tagen ca.  $2-2,5 \times 10^7$  Zellen geerntet werden.

## Methoden

### Expansionsmedium

---

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 4.5 g/l Glucose, PAA Laboratories)	
Fetales Kälberserum (FCS, Pan Biotech)	10 % (v/v)
L-Glutamin	2 mM
Penicillin-Streptomycin	100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
<i>Basic fibroblast growth factor</i> (bFGF), Zugabe direkt zu den Zellkulturgefäßen	10 ng/ml

---

Lagerung bei 4 °C für max. 1,5 Wochen

---

### bFGF-Lösung

---

Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl), pH 7,5	5 mM
Bovine serum albumin (BSA), Fraktion V, 30 % Lösung	0,1 % (v/v)
bFGF	10 µg/ml

---

Sterilfiltriert, Lagerung in Aliquots bei -20 °C, nach dem Auftauen Lagerung bei 4 °C für 2 Wochen

---

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in unbeschichteten 75 cm<sup>2</sup> (T75) oder 25 cm<sup>2</sup> (T25) Zellkulturflaschen (BD Falcon™) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Expansionsmedium wurde alle drei bis vier Tage ausgetauscht zur Zufuhr von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren sowie der Abnahme von Stoffwechselprodukten und totem Zellmaterial.

hES-MPs wachsen als adhärente Kulturen. Bei einer Konfluenz von ca. 70–90 % wurde die Zellkultur geteilt und in neue Zellkulturflaschen transferiert. Dafür wurde zunächst das alte Medium gründlich abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 5 ml vorgewärmter 1x phosphatgepufferter Saline (PBS) ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> zur Entfernung von Mediumrückständen gespült. Anschließend erfolgte die Zugabe von TrypLE™ Select (500 µl/T75; 200 µl/T25), um die adhärennten Zellen von der Oberfläche zu lösen. Nach einer Einwirkzeit von 5 min bei 37 °C wurden die Zellen vorsichtig mit Medium abgespült und bei 250 x g für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Darauf folgend wurden die hES-MPs in einer Dichte von 1–1,2x10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Das Endvolumen betrug 10 ml/T75 bzw. 4 ml/T25. Abschließend wurden 10 ng/ml bFGF zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken des Kulturgefäßes gleichmäßig im Medium verteilt.

In Optimierungsexperimenten erfolgte die Kultivierung der hES-MPs zum Teil in Gelatine-

beschichteten Zellkulturgefäßen. Dafür wurden vor Aussaat der Zellen die Böden der Kulturgefäße mit ESGRO Complete™ Gelatin Solution (0,1 % porcine Gelatine in H<sub>2</sub>O) für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Entsprechende Experimente sind bei den Ergebnissen in Kapitel 5.1.2 kenntlich gemacht.

#### 4.1.2 Kultivierung der humanen Osteosarkomzelllinie Saos-2

Saos-2 wurden nach den Angaben des DSMZ kultiviert.

Expansionsmedium

---

McCoy's 5A Medium

FCS (Pan Biotech), hitzeinaktiviert

15 % (v/v)

Penicillin-Streptomycin

50 Units/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin

---

Lagerung bei 4 °C für max. 1,5 Wochen

---

Die Expansion erfolgte in unbeschichteten T75 Zellkulturflaschen (Nunc) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Expansionsmedium wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht.

Saos-2 wurden alle drei bis vier Tage bei einer Konfluenz von ca. 60–70 % passagiert. Das alte Medium wurde abgenommen, die Zellen mit 2 ml vorgewärmtem 0,05 % Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) gespült und anschließend im gleichen Volumen derselben Lösung für 5 bis 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sie vorsichtig mit 8 ml Medium vom Flaschenboden gespült und bei 250 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium gelöst und 1/3 oder 1/4 der Zellsuspension in neue Kulturflaschen ausgesät. Das Endvolumen betrug 10 ml/T75.

#### 4.1.3 Kultivierung von embryonalen Stammzellen aus der Maus

Die Kultivierung der Maus ES Zelllinie D3 erfolgte wie in Seiler und Spielmann (2011) beschrieben.

## Methoden

---

### Expansionsmedium

---

DMEM, 4,5 g/l Glucose, mit L-Glutamin (Life Technologies)

FCS (HyClone), hitzeinaktiviert 15 % (v/v)

Penicillin-Streptomycin 50 Units/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin

Nicht-essentielle Aminosäuren (100 x) 1 % (v/v)

β-Mercaptoethanol 0,1 mM

*Leukemia inhibitory factor*, Zugabe direkt zu den Zellkulturgefäßen 1000 Units/ml

---

Lagerung bei 4 °C für max. 1 Woche

---

Die Expansion erfolgte in unbeschichteten 60 mm Zellkulturplatten (BD Falcon™) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Die Maus ES Zellen wurden alle zwei bis drei Tage bei einer Konfluenz von ca. 40–60 % passagiert. Hierfür wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen mit 5 ml vorgewärmtem 1x PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gespült und anschließend in 1 bis 2 ml vorgewärmter 1x Trypsin/EDTA-Lösung für 2 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sie durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, in 4 ml Medium resuspendiert und bei 170 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 bis 5 ml frischem Medium aufgenommen und 2,5x10<sup>5</sup> Zellen (zwei Tage) oder 1,5x10<sup>5</sup> Zellen (drei Tage) in neue Zellkulturplatten überführt. Das Endvolumen betrug 5 ml/60 mm Schale.

#### 4.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

##### Einfriermedium hES-MPs

---

FCS (Pan Biotech) 90 % (v/v)

Dimethylsulfoxid (DMSO) 10 % (v/v)

---

Frisch angesetzt

---

##### Einfriermedium Saos-2

---

McCoy's 5A

FCS (Pan Biotech) 20 % (v/v)

DMSO 10 % (v/v)

---

Frisch angesetzt

---

Einfriermedium Maus ES Zellen

DMEM, 4,5 g/l Glucose, mit L-Glutamin (Life Technologies)	
FCS (HyClone), hitzeinaktiviert	40 % (v/v)
Penicillin-Streptomycin	50 Units/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin
Nicht-essentielle Aminosäuren (100 x)	1 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	0,1 mM
DMSO	10 % (v/v)
Frisch angesetzt	

Zum Einfrieren wurden nur Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die Zellen wurden hierfür zunächst nach dem in Kapitel 4.1.1 (hES-MPs), 4.1.2 (Saos-2) oder 4.1.3 (Maus ES Zellen) beschriebenen Vorgehen trypsinisiert, zentrifugiert und vorsichtig in Einfriermedium mit einer Anzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Die Zellzahl war kurz zuvor durch das Passagieren eines weiteren Zellkulturgefäßes bestimmt worden. Anschließend wurde die Zellsuspension auf Kryoröhrchen verteilt und in einer Gefrierhalterung langsam um 1 °C/min über flüssigem Stickstoff auf –70 bis –80 °C heruntergekühlt. Daraufhin konnten die Zellen in der flüssigen Phase des Stickstoffs gelagert werden.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und die Zellsuspension anschließend in 9 ml vorgewärmtes Expansionsmedium überführt. Nach Zentrifugation bei 250 x g (Saos-2 und hES-MPs) bzw. 170 x g (Maus ES Zellen) für 5 min und gründlicher Abnahme des DMSO-haltigen Überstands wurde das Zellpellet in dem jeweiligen Expansionsmedium resuspendiert und in die entsprechenden Zellkulturgefäße überführt. Für Maus ES Zellen waren diese zuvor mit 0,1 % Gelatine in PBS beschichtet worden.

#### 4.1.5 Osteogene Differenzierung von hES-MPs

Die osteogene Differenzierung von hES-MPs erfolgte in den meisten Experimenten durch Supplementierung des Mediums mit Ascorbinsäure (AA), β-Glycerophosphat (β-GP) und Dexamethason (Dex) wie bei de Peppo et al. (2010a) beschrieben. In ausgewählten Experimenten wurden andere Kombinationen an osteogenen Induktoren verwendet. Das in der Arbeit verwendete standardmäßige Protokoll umfasste zudem eine Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Gelatine und eine Zellaussaat von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. In initialen Experimenten zur Optimierung wurden diesbezüglich auch andere Bedingungen getestet. Experimente mit abweichenden Supplementkombinationen, Beschichtungen und Zelleinsaat sind im Kapitel

## Methoden

---

5 (Ergebnisse) kenntlich gemacht.

Das für die Expansion von hES-MPs verwendete FCS der Firma Pan Biotech wurde auch für die osteogene Differenzierung verwendet. Dieses hatte sich in einer vorhergehenden Serumtestung mit FCS verschiedener Anbieter und Chargen als am besten geeignet für die osteogene Differenzierung von Maus ES Zellen der Linie D3 erwiesen. Da es in initialen Experimenten sowohl eine solide Expansion als auch eine zügige Mineralisierung während der Differenzierung von hES-MPs ermöglichte, wurde es für alle weiteren Arbeiten mit den humanen Zellen verwendet.

### Differenzierungsmedium

---

DMEM, 1 g/l Glucose (PAA Laboratories)

FCS (Pan Biotech) 10 % (v/v)

L-Glutamin 2 mM

Penicillin-Streptomycin 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

---

Lagerung bei 4 °C für max. 1,5 Wochen

---

Zugabe von verschiedenen Kombinationen der folgenden Supplemente:

AA 45 µM

β-GP 10 mM

Dex 1 µM

1α,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 5x10<sup>-8</sup> M

---

Frisch angesetzt

---

### AA Stocklösung

---

Bidest. H<sub>2</sub>O

AA 284 mM

---

Sterilfiltriert, Lagerung in Aliquots bei -20 °C

---

### β-GP Stocklösung

---

Bidest. H<sub>2</sub>O

β-GP 1 M

---

Sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C für max. 9 Monate, nach dem Auftauen Lagerung bei 4 °C für 1 Woche

---

## Methoden

---

### Dex Stocklösung

---

Ethanol (EtOH)

Dex 10 mM

---

Lagerung in Aliquots bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

---

### 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Stocklösung

---

DMSO

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 120  $\mu\text{M}$

---

Lagerung in Aliquots bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

---

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Vor Aussaat der Zellen wurden die Böden der Kulturgefäße (BD Falcon™) mit ESGRO Complete™ Gelatin Solution für mindestens 30 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Für die Differenzierung wurden hES-MPs in Passage p1+3+3 wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben trypsinisiert und in Differenzierungsmedium resuspendiert.  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> wurden in die beschichteten Zellkulturgefäße transferiert. Das Volumen des Differenzierungsmediums betrug ca. 250  $\mu\text{l/cm}^2$  für alle Gefäßformate. Ein Austausch des Mediums erfolgte alle drei bis fünf Tage. Die Differenzierungszeit variierte in Abhängigkeit vom Experiment. Ein Beginn der Mineralisierung konnte ca. ab Tag 12 beobachtet werden und war bis Tag 20 deutlich ausgeprägt.

### 4.1.6 Osteogene Differenzierung von embryonalen Stammzellen aus der Maus

Die osteogene Differenzierung von Maus ES Zellen der Linie D3 erfolgte über eine Generierung von *embryoid bodies* in Suspensionskultur und der anschließenden Supplementierung der vereinzelt Zellen mit osteogenen Induktoren. Das hierfür verwendete Protokoll wurde vom Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie in Leipzig zur Verfügung gestellt.

## Methoden

---

### Differenzierungsmedium

---

DMEM, 4,5 g/l Glucose, mit L-Glutamin (Life Technologies)

FCS (Pan Biotech) 10 % (v/v)

Penicillin-Streptomycin 50 Units/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin

Nicht-essentielle Aminosäuren (100 x) 1 % (v/v)

β-Mercaptoethanol 0,1 mM

---

Lagerung bei 4 °C für max. 1 Woche

---

Frische Zugabe der folgenden Supplemente:

AA 25 µg/ml

β-GP 10 mM

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 5x10<sup>-8</sup> M

---

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Maus ES Zellen wurden wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben trypsinisiert und in Differenzierungsmedium ohne Supplemente resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf 3,75x10<sup>4</sup> Zellen/ml eingestellt und 5 ml der Suspension in eine 60 mm bakteriologische Zellkulturschale überführt. Nach einer dreitägigen Inkubation wurde die Hälfte des Mediums mit den gebildeten Zellaggregaten in eine neue bakteriologische Schale überführt und beide Schalen mit 2,5 ml frischem Medium ergänzt. Es erfolgte eine Kultivierung für weitere zwei Tage. Die *embryoid bodies* wurden dann durch vorsichtiges Schwenken der Schale in der Plattenmitte gesammelt und mit einer 1 ml Pipettenspitze in ein neues Zellkulturgefäß mit 2 ml 0,25 % Trypsin/EDTA transferiert. Nach einer fünf- bis zehnminütigen Inkubation wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in 5 ml Medium für 5 min bei 170 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in Differenzierungsmedium mit Supplementen resuspendiert und je 5 ml in eine 60 mm Zellkulturschale überführt. Diese waren zuvor für 30 min bei 37 °C mit 0,1 % Gelatine in PBS beschichtet worden. Die eingesäte Zellzahl betrug 2x10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>. Ein Austausch des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Differenzierungszeit für die hier vorgestellten Experimente mit Maus ES Zellen betrug insgesamt 31 Tage. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Kulturen eine ausgeprägte Mineralisierung.

## **4.2 Zellbiologische Methoden**

### **4.2.1 Bestimmung der Zellviabilität**

Die quantitative Ermittlung der Zellviabilität diente zum einen als Parameter für das Wachstum von hES-MP Kulturen und zum anderen der Erfassung von zytotoxischen Effekten durch die verwendeten Testsubstanzen. Die Messung der metabolischen Aktivität der Zellen mit Hilfe des Farbstoffs Resazurin ist eine schnelle und zellschonende Methode, die häufig als Indikator für die Viabilität herangezogen wird (Rampersad, 2012). Das die Zellmembran penetrierende, blaue Resazurin wird durch zelluläre Reduktasen in das pinkfarbene Resorufin umgewandelt, dessen Fluoreszenz dann bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm erfasst werden kann. Allgemein anerkannt ist, dass die Reduktion durch mitochondriale Enzyme erfolgt (Rampersad, 2012). Ein zusätzlicher Einfluss durch die Aktivität zytosolischer und mikrosomaler Reduktasen konnte in hepatischen subzellulären Fraktionen nachgewiesen werden (Gonzalez und Tarloff, 2001).

Die Bestimmung der Zellviabilität wurde mit dem CellTiter-Blue® Assay der Firma Promega durchgeführt. Die Zugabe der Resazurinlösung erfolgte direkt zum Medium der Zellen in fluoreszenzgeeigneten 96-*well* Platten (schwarz/klar; BD Falcon™ und BD Optilux™). Zunächst wurden in Vortests Versuchsbedingungen festgelegt, die eine Messung der Viabilität von hES-MPs im linearen Bereich sicher stellen. Dafür wurden serielle Verdünnungen der Zellen mit verschiedenen Volumina des Reagenzes unterschiedlich lang inkubiert. Basierend auf diesen Daten wurden in allen weiteren Experimenten 20 µl der vorgewärmten Resazurinlösung zu 100 µl Medium gegeben, vorsichtig gemischt und die Platten für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz von Resorufin erfolgte mit dem Infinite M200 Mikrotiterplattenlesegerät von Tecan.

### **4.2.2 Messung der Proliferation**

Die Bestimmung der Rate von sich aktiv teilenden Zellen erfolgt neben der manuellen Zellzählung in der Regel über die Messung der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Replikation. Zur Markierung der neu synthetisierten DNA wird u. a. das Thymidin-Analog 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) eingesetzt, das anschließend über einen spezifischen Enzym-gekoppelten AK nachgewiesen werden kann (Porstmann et al., 1985). Entsprechend der Konjugation kann eine Detektion kolorimetrisch oder chemilumineszenzbasiert erfolgen.

hES-MPs wurden in 96-*well* Platten (schwarz/klar; BD Falcon™ und BD Optilux™) kultiviert

und die Proliferation mit Hilfe des Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) von Roche bestimmt. Das Protokoll folgte den Herstellerangaben. Die Zellen wurden mit 10  $\mu$ M BrdU für 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 200  $\mu$ l FixDenat-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert und die DNA denaturiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertem AK für 1,5 h bei RT. Nach drei gründlichen Waschschritten in je 200  $\mu$ l des mitgelieferten Waschpuffers wurden die Plattenböden mit dunkler Folie abgeklebt. Dann wurden 100  $\mu$ l der HRP-Substratlösung, die Luminol, Wasserstoffperoxid und 4-Iodophenol enthält, hinzugefügt und die Platten für 3 min bei RT geschüttelt. Im direkten Anschluss wurde die Chemilumineszenz mit einem GloMax Luminometer (Turner BioSystems/Promega) gemessen.

### 4.2.3 Färbung und quantitativer Nachweis der Mineralisierung

#### 4.2.3.1 Alizarin Rot S Färbung

Eine häufig und seit langer Zeit angewendete Methode zur Visualisierung von mineralisierten Bereichen in Knochenpräparaten und osteogenen Zellkulturen ist die Färbung mit Natrium-alizarinsulfonat (Alizarin Rot S) (McGee-Russell, 1958). Sie beruht auf der Bindung des Farbstoffs mit Calciumionen, die ein Hauptbestandteil von Hydroxyapatit in der extrazellulären Matrix (ECM) von Knochengewebe sind. Die Präzipitate aus Alizarin Rot S und Calcium sind an ihrer orange-roten Färbung erkennbar.

#### Alizarin Rot S Färbelösung

---

Bidest. H<sub>2</sub>O

Alizarin Rot S

5 mg/ml

---

Nach dem Lösen pH-Wert mit Ammoniak auf 4,1 bis 4,3 einstellen, filtrieren, Lagerung bei RT

---

Der Nachweis erfolgte nach einem von Dienelt und zur Nieden (2011) beschriebenen Protokoll mit Modifikationen. In 24-well Platten differenzierende hES-MPs (siehe Kapitel 4.1.5) wurden mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol/Aceton (7:3) für 10 min bei – 20 °C fixiert. Nach einem erneuten Waschschriff mit PBS wurden die Kulturen in 200  $\mu$ l der Färbelösung für 5 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundenem Farbstoff und unspezifischer Färbungen wurden die Präparate zunächst mit 500  $\mu$ l bidest. H<sub>2</sub>O und anschließend mit aufsteigenden EtOH-Konzentrationen von 70 bis 100 % für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mit einem CKX

41 Mikroskop, ausgestattet mit einer C-7070 CCD Kamera (beides Olympus).

#### 4.2.3.2 Von Kossa Färbung

Eine weitere klassische Methode zum Nachweis von Mineralisierung in Gewebe und Zellkulturen ist die Färbung nach von Kossa (McGee-Russell, 1958). Bei dieser Methode werden die Kationen von Calciumsalzen durch Silberionen ausgetauscht, die anschließend photochemisch zu metallischem Silber reduziert werden. Dadurch ist ein Nachweis der Anionen der Calciumsalze (in Knochen hauptsächlich Phosphate und Carbonate) in Form von Präzipitaten mit dunkelbrauner bis schwarzer Farbe möglich.

##### Silbernitratlösung

---

Bidest. H<sub>2</sub>O

Silbernitrat 50 mg/ml

---

Lichtgeschützte Lagerung bei RT

---

##### Natriumthiosulfatlösung

---

Bidest. H<sub>2</sub>O

Natriumthiosulfat 50 mg/ml

---

Lagerung bei RT

---

Die Differenzierung und Fixierung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Kulturen mit 200 µl der Silbernitratlösung überschichtet und für 1 h dem direkten Lichtstrahl einer 60 W Lampe ausgesetzt. Daraufhin wurden sie dreimal mit je 500 µl bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Entfernung von nicht-reduziertem Silber wurden die Kulturen für 2 min in 200 µl Natriumthiosulfatlösung inkubiert und anschließend dreimal mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Weitere Waschschrirte mit EtOH und die Auswertung erfolgten wie in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben.

#### 4.2.3.3 Quantifizierung von Calcium

Für eine Quantifizierung von Calcium in biologischen Materialien werden zumeist Farbstoffe eingesetzt, die das Kation stabil binden und einen kolorimetrischen Nachweis ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür mit dem ortho-Cresolphthalein Complexone (OCPC) gearbeitet (Ray Sarkar und Chauhan, 1967). Dabei wird der Farbstoff in einer sauren Lösung

zu den Proben gegeben, in der Calcium von Proteinen dissoziiert und direkt von OCPC gebunden wird. Der gebildete Komplex entwickelt anschließend unter alkalischen Bedingungen eine violette Farbe und der Calciumanteil kann so über Absorptionsmessungen bestimmt werden. Interferenzen mit Magnesium und Schwermetallen werden durch die Anwesenheit von 8-Hydroxychinolin und Kaliumcyanid eingedämmt.

#### Lysepuffer

PBS	10 ml
Triton X-100	1 % (v/v)
cOmplete™, Mini, Proteaseinhibitortabletten, EDTA-frei	1 Tablette
Lagerung in Aliquots bei –20 °C	

Die in 6-well Platten kultivierten Zellen wurden zunächst mit vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend 50 µl Lysepuffer zu jeder Vertiefung hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellscraper vom Plattenboden gelöst und mit dem Lysepuffer in Eppendorfgefäße überführt. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 20.000 x g für 30 min bei 4 °C. Die Überstände wurden bis zur Messung bei –80 °C gelagert. Das Pellet wurde in bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen, erneut zentrifugiert und in 200 µl 0,5 M HCl über Nacht bei 4 °C unter kräftigem Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation bei 20.000 x g für 5 min bei 4 °C wurden die Überstände bis zur Messung bei –80 °C gelagert. Die Bestimmung des Calciumanteils in den Proben erfolgte mit dem Calcium (CPC) LiquiColor® Test der Firma Stanbio. Dafür wurden je 2 µl der Triton- oder HCl-Überstände in eine Vertiefung einer 96-well Platte pipettiert und mit 200 µl des OCPC enthaltenden Arbeitsreagenzes für 5 min bei RT inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte direkt im Anschluss bei einer Wellenlänge von 550 nm mit dem Infinite M200. Anhand der seriellen Verdünnungsreihe eines Calciumstandards (0 bis 0,5 mg/ml in Lysepuffer oder 0,5 M HCl) wurde eine Standardkurve abgeleitet, die der Ermittlung der Calciumkonzentrationen in den Proben diente. Der aus dem Triton-Überstand und der zugehörigen HCl-Probe summierte Calciumanteil wurde anschließend gegen die Proteinkonzentration im Triton-Überstand normalisiert. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA Assay wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben.

#### 4.2.3.4 Fluoreszenzbasierter Nachweis der Mineralisierung

Eine Alternative sowohl zur Visualisierung als auch zur Quantifizierung von mineralisierten Bereichen in Zellkulturmodellen stellt der OsteoImage™ Mineralization Assay der Firma

Lonza dar. Nach Herstellerangaben beruht er auf der Bindung eines fluoreszierenden Reagenzes an Hydroxyapatit. Ob es sich dabei um ein Fluorochrom, einen gekoppelten AK oder ein anderes Reagenz handelt wird nicht spezifiziert. Einzige Voraussetzung ist eine Fixierung der Kulturen.

Die Färbung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. In fluoreszenzgeeigneten 96-*well* Platten (schwarz/klar; BD Optilux™ und BD Falcon™) differenzierende hES-MPs (siehe Kapitel 4.1.5) wurden 2x mit 200 µl PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol/Aceton (7:3) für 10 min bei –20 °C fixiert. Nach zwei Waschschritten in 100 µl des mitgelieferten Waschpuffers wurden die Kulturen in 100 µl des im Kit enthaltenen Färbereagenzes für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrritte in je 200 µl Waschpuffer. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, erfolgten diese jeweils für mindestens 15 min unter vorsichtigem Schütteln und es wurde darauf geachtet den restlichen Waschpuffer gründlich abzunehmen. Abschließend wurden 200 µl Waschpuffer hinzu pipettiert und die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 492 nm und einer Emission von 520 nm am Infinite M200 Mikrotiterplattenlesegerät von unten detektiert. Dabei wurden insgesamt 25 vordefinierte und für alle Messungen konstant gehaltene Positionen, die mindestens einen Abstand von 100 µm zum Rand der Vertiefung hatten, in jedem *well* vermessen und deren Mittelwert für die weitere Auswertung verwendet. Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem CKX 41 Mikroskop nach der Messung erstellt, um ein Ausbleichen der Proben zu verhindern.

### **4.2.4 Nachweis der Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase**

#### **4.2.4.1 Färbung der Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase**

Für den zytochemischen Nachweis von Alkalischer Phosphatase (AP)-Aktivität wird häufig eine Enzym-Substrat-Reaktion eingesetzt (Kaplow, 1968). Im alkalischen Milieu spaltet AP Phosphorsäureesterverbindungen wie 3-Hydroxy-2-naphthanilid (Naphthol AS) Phosphat. Das phosphatfreie Produkt bildet dann mit Diazoniumsalzen (z. B. Fast Red TR oder Fast Red Violett LB) unlösliche Azoverbindungen, die als farbige Depositionen in Bereichen in denen Enzymreaktionen stattgefunden haben erkennbar sind. Wichtig hierbei ist, dass eine Fixierung erfolgt, die einerseits die zytologische Struktur konserviert und andererseits die Enzymaktivität von AP so wenig wie möglich beeinträchtigt.

## Methoden

---

Fixierungslösung	
Citratlösung, 27 mM, pH 3,6	25 % (v/v)
Aceton	67 % (v/v)
Formaldehyd, 37 %	8 % (v/v)
Lagerung bei 4 °C für max. 4 Wochen	

---

Die Visualisierung der Aktivität von AP in differenzierenden hES-MPs erfolgte mit dem Alkaline Phosphatase (AP), Leukocyte Kit der Firma Sigma nach Herstellerangaben. Die in 24-well Platten kultivierten hES-MPs wurden 2x mit je 500 µl vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend für 30 s 300 µl der auf RT temperierten Fixierungslösung zugegeben. Nach zwei Waschschritten in PBS erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation in 300 µl frisch angesetzter Substratlösung, die Naphthol AS-BI Phosphat und Fast Red Violet LB Salz enthält, für 15 min bei RT. Die Kulturen wurden dann in PBS gewaschen und lichtmikroskopisch ausgewertet. Areale mit AP-Aktivität waren durch die Ablagerung der gebildeten Azoverbindung an einer roten Färbung erkennbar.

### 4.2.4.2 Quantifizierung der Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase

Für den Nachweis von AP-Enzymaktivität in Zelllysaten wurde als Substrat mit p-Nitrophenylphosphat (pNPP) gearbeitet. AP katalysiert vorzugsweise im alkalischen Bereich die Hydrolyse des farblosen Phosphatesters zum gelben p-Nitrophenol (pNP), dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt werden kann (Bessey et al., 1946).

---

Diethanolaminpuffer	
Bidest. H <sub>2</sub> O	
Diethanolamin	1 M
Magnesiumchlorid	0,5 mM
pH-Wert mit HCl auf 9,8 einstellen, Lagerung bei RT	

---

---

pNPP-Puffer	
Diethanolaminpuffer	
pNPP	10,78 mM
Frisch angesetzt	

---

Für die Experimente mit dem AP-Inhibitor Levamisol (LEV) wurden hES-MPs am Tag 13 der Differenzierung aufgearbeitet, einem Zeitpunkt an dem die Mineralisierung stark voranschreitet. Die in 6-*well* Platten kultivierten Zellen wurden wie in Kapitel 4.2.3.3 beschrieben lysiert. Am Tag der Messung wurde eine serielle Verdünnungsreihe von Levamisolhydrochlorid in PBS hergestellt und 3  $\mu$ l jeder Konzentration mit 15  $\mu$ l des aufgetauten Zelllysates für 15 min bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden je 3x 5  $\mu$ l jeder Probe in die Vertiefung einer 96-*well* Platte überführt und mit 100  $\mu$ l pNPP-Puffer ergänzt. Die finalen Konzentrationen von Levamisol betragen 0 bis 500  $\mu$ M. Die Bildung von pNP wurde mit dem Infinite M200 bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Temperatur von 37 °C erfasst. Um eine Messung im linearen Bereich zu gewährleisten, wurden die Absorptionswerte für jede Probe alle 2 min aufgezeichnet. Für die Auswertung wurden die Messwerte nach 1 h Inkubation herangezogen. Absorptionswerte sind als prozentualer Anteil von der Lösungsmittelkontrolle (100 %) angegeben.

### **4.3 Immun- und biochemische Methoden**

#### **4.3.1 Immunfluoreszenzfärbungen**

Zum qualitativen Nachweis von Markerproteinen wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen primären AK und Fluorochrom-gekoppelten sekundären AK in fixierten Zellkulturen durchgeführt. Für die einzelnen Proteine/AK mussten die im Folgenden beschriebenen individuellen Protokollbedingungen etabliert werden, um einen aussagekräftigen Nachweis zu erhalten.

##### **4.3.1.1 Fixierung der Zellen**

Saos-2 Zellen wurden in 8-*well* Permanox® Objektträgern oder auf 10 mm Glasobjektträgern herangezogen wie in Kapitel 4.1.2 ausgeführt. Differenzierende hES-MPs wurden auf 8-*well* Permanox® Objektträgern kultiviert wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben. Vor der Fixierung wurden beide Kulturen 3x mit PBS gewaschen. Nicht-differenzierende hES-MPs wurden auf 10 mm Glasobjektträgern herangezogen wie in Kapitel 4.1.1 dargestellt. Letztere wurden dann durch die Zugabe eines gleichen Volumens von 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS zum Medium für 2 min bei RT vorfixiert, um einem Ablösen der Zellen von den Objektträgern vorzubeugen. Sowohl differenzierende als auch nicht-differenzierende Zellen wurden dann mit 200  $\mu$ l 4 % PFA in PBS für 15 bis 20 min bei RT fixiert und anschließend 3x mit PBS oder TBS (Tris-gepufferte Saline, Rezeptur siehe Kapitel 4.3.1.4) gewaschen.

#### 4.3.1.2 Nachweis von Dlx5

##### Blockierungspuffer

PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	
Normales Ziegenserum	10 % (v/v)
BSA, lyophilisiertes Pulver, ≥ 96 %	10 mg/ml
Frisch angesetzt	

Zur Detektion des Transkriptionsfaktors Dlx5 wurden die Membranen der fixierten Zellen zunächst mit 0,25 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden freie Bindungsstellen mit Blockierungspuffer für 1 h bei RT blockiert. Der anti-Dlx5 AK (Klon # 712216; R&D Systems, 1:50 in Blockierungspuffer) und die Isotypkontrolle wurden für 2 h bei RT zu den Präparaten gegeben. Nach 3x Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit einem Cy3<sup>TM</sup>-konjugierten Ziege-anti-Maus AK (1:1600 in Blockierungspuffer) für 1 h bei RT. Anschließend wurde mit PBS gewaschen. Das Volumen aller Lösungen betrug 200 µl. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach Kapitel 4.3.1.6.

#### 4.3.1.3 Nachweis von Kollagen Typ I

##### Blockierungspuffer

PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	
Normales Ziegenserum	10 % (v/v)
BSA, lyophilisiertes Pulver, ≥ 96 %	10 mg/ml
Saponin	1,5 mg/ml
Frisch angesetzt	

Zur Färbung von zytoplasmatischem und extrazellulärem Kollagen Typ I wurden die Zellen zunächst für 1 h bei RT mit Blockierungspuffer versetzt und anschließend mit einem anti-Kollagen Typ I AK (1:100 in Blockierungspuffer) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Als Kontrolle diente Blockierungspuffer ohne AK. Nach dreimaligem Waschen in PBS mit 0,15 % (w/v) Saponin wurde ein Cy3<sup>TM</sup>-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen AK (1:1000 in Blockierungspuffer) für 1 h bei RT zugegeben. Die Zellen wurden 2x in PBS/0,15 % Saponin gewaschen und für 30 min mit Alexa Fluor® 488-gekoppeltem Phalloidin (44 nM in Blockierungspuffer) versetzt zur Visualisierung von F-Aktin. Danach wurde mit PBS gewaschen. Das Volumen aller Lösungen betrug 200 µl. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach Kapitel 4.3.1.6.

**4.3.1.4 Nachweis von Runx2**

TBS

Bidest. H<sub>2</sub>O

Tris-HCl, pH 7,5 50 mM

Natriumchlorid 150 mM

Lagerung bei 4 °C

Blockierungspuffer

TBS

Normales Ziegen Serum 4 % (v/v)

Tween 20 0,1 % (v/v)

Frisch angesetzt

Der Nachweis des Transkriptionsfaktors Runx2 erfolgte nach einem publizierten Protokoll (Kärner et al., 2007). Die Zellen wurden nach Inkubation in 0,2 M HCl für 15 min bei RT mit 0,25 % (v/v) Triton X-100 in TBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Nach 3x Waschen in TBS und einer einstündigen Inkubation in Blockierungspuffer wurden die Präparate mit dem anti-Runx2 AK (1:100 in Blockierungspuffer) oder der Isotypkontrolle bei 4 °C über Nacht behandelt. Am nächsten Tag wurden die Proben 3x mit TBST (0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS) gewaschen und ein Cy3<sup>TM</sup>-konjugierter Ziege-anti-Maus AK (1:1000 in Blockierungspuffer) für 1 h bei RT zugegeben. Es wurde erneut mit TBST gewaschen. Das Volumen aller Lösungen betrug 200 µl. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach Kapitel 4.3.1.6.

**4.3.1.5 Nachweis von Osteocalcin**

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Osteocalcin (OC) wurde nach dem Protokoll von Runx2 (Kapitel 4.3.1.4) mit nachfolgend aufgeführten Modifikationen gearbeitet. Eine Behandlung mit HCl entfiel hier. Anstatt dessen wurden die fixierten Kulturen von Tag 13 und 20 für 15 min bei RT mit 1 % EDTA behandelt, um die Mineralisierung aufzulösen und extrazelluläres OC für den AK zugänglich zu machen. Die Präparate wurden für 1 h bei RT mit dem anti-OC AK (1:1000 in Blockierungspuffer) oder der Isotypkontrolle inkubiert. Als sekundärer AK diente ein Cy3<sup>TM</sup>-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen AK (1:1000 in Blockierungspuffer). Im Anschluss an die Inkubation mit dem sekundären AK wurde F-Aktin mit dem CytoPainter F-actin Staining Kit nach den Angaben des Herstellers detektiert. Das Volumen

aller Lösungen betrug 200 µl. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach Kapitel 4.3.1.6.

#### **4.3.1.6 Zellkernfärbung, Einbettung der Präparate und Auswertung**

Für die Visualisierung der Zellkerne wurden die Proben für 5 min mit 10 ng/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) inkubiert und abschließend mehrmals mit PBS oder TBS gewaschen. Die Einbettung der Proben erfolgte mit AquaPolyMount. Nach dem Trocknen der Präparate wurden die Färbungen mit einem Olympus BX 51 Immunfluoreszenzmikroskop ausgewertet und Aufnahmen mit der angeschlossenen F View II CCD Kamera erstellt. Die OC-Färbungen wurden am Axio Observer Z1 mit dem ApoTome.2 System ausgewertet.

#### **4.3.2 Durchflusszytometrische Analysen**

Bei der durchflusszytometrischen Analyse handelt es sich um eine Methode, die in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelt wurde und die Untersuchung verschiedener Parameter auf Einzelzellebene erlaubt. Die in einer Trägerflüssigkeit aufgenommenen Zellen werden hierbei durch Überdruck in einer Kapillare beschleunigt (hydrodynamische Fokussierung) und passieren so gestaffelt einen Laserstrahl. Das von den Zellen gebrochene, gebeugte und/oder ausgesendete Licht wird durch verschiedene Detektoren erfasst und über Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt und verstärkt. Darüber können verschiedene Informationen über die Zellen gewonnen werden, wie relative Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC), relative Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC) und über die Markierung mit (AK-gekoppelten) Fluorochromen der Biosynthesestatus eines spezifischen Proteins oder der Lebenszustand. Unterschiedliche Zellpopulationen lassen sich durch benutzerdefinierte Analysefenster („gates“) abgrenzen und näher untersuchen. Die Durchflusszytometrie ermöglicht somit eine detaillierte und gleichzeitig relativ schnelle Analyse von Zellpopulationen und ihren Charakteristika.

##### **4.3.2.1 Nachweis von Oberflächenmarkern**

Zur Charakterisierung nicht-differenzierender hES-MPs erfolgte der Nachweis spezifischer CD-Marker an der äußeren Zellmembran der Zellen mittels einer direkten Immundetektion.

## Methoden

---

### Blockierungspuffer

---

PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>

FCS 10 % (v/v)

Natriumazid 0,5 mg/ml

---

Lagerung bei 4 °C

---

### Inkubationspuffer

---

PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>

FCS 5 % (v/v)

Natriumazid 0,5 mg/ml

---

Filtriert, Lagerung bei 4 °C

---

Alle Lösungen wurden eisgekühlt verwendet. Subkonfluente hES-MPs wurden nach dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Vorgehen von den Zellkulturflaschen gelöst und 2x in 10 ml Blockierungspuffer gewaschen. Nach Inkubation für 30 min in Blockierungspuffer (ca. 1–2x10<sup>7</sup> Zellen/ml) wurden die Zellen bei 300 x g für 5 min zentrifugiert, in Inkubationspuffer gewaschen und die Zellzahl ermittelt. Anschließend wurden 1x10<sup>7</sup> Zellen in 1 ml Inkubationspuffer resuspendiert und in Aliquots mit je 100 µl aufgeteilt. Zu den Proben wurden dann 20 µl des jeweiligen Phycoerythrin (PE)-gekoppelten primären AK (CD10, CD13, CD117 oder CD166) hinzugegeben und diese lichtgeschützt für 45 min bei 4 °C inkubiert. Eine geeignete Isotypkontrolle (IgG1κ-PE) und eine Kontrolle ohne AK wurden mitgeführt. Nach zweimaligem Waschen in Inkubationspuffer wurden die Zellen in selbigem resuspendiert und mit einem BD FACSCanto II analysiert. Zelldebris und tote Zellen wurden durch Gating im FSC/SSC-Diagramm von der weiteren Messung ausgeschlossen. Die Analyse von je 1x10<sup>4</sup> Zellen erfolgte durch Anregung mit dem 488 nm Argonlaser und Detektion der PE-Fluoreszenz nach Filterung des emittierten Lichts mit einem 585/42 nm Bandpass Filter. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FACSDiva Software, Version 6.1.3.

### 4.3.2.2 Zellvereinzelung osteogen differenzierender Zellkulturen

Eine effiziente Vereinzelung von verknöcherten Zellverbänden ist aufgrund der stark vernetzten ECM und deren Mineralisierung durch eine alleinige Verwendung von trypsinisierenden Enzymen oder ihrer Kombination mit EDTA kaum möglich. Daher wurde im Rahmen der Arbeit ein Protokoll etabliert, das eine Zellvereinzelung dieser Kulturen für durchflusszyto-

## Methoden

---

metrische Analysen ermöglicht. Grundlage hierfür waren die methodischen Arbeiten von Kalajzic et al. (2005). Verknöcherte Bereiche wurden zunächst mit EDTA behandelt, das über Stickstoffatome und Carboxygruppen stabile Komplexe mit Calciumionen bildet und somit die an diesem Metall reichen Kristallstrukturen aufzulösen vermag. Anschließend wurde die ECM durch die kombinierte Zugabe von Collagenase A und Trypsin verdaut. Erstgenannte ist ein aus dem Kulturüberstand von *Clostridium histolyticum* gewonnenes Enzymgemisch, das sich neben proteolytischer Aktivität insbesondere durch seine Fähigkeit zur Degradation 3-fach helikaler nativer Kollagenfibrillen auszeichnet. Trypsin unterstützte zusätzlich den Abbau nicht-kollagener Proteine.

### Dissoziationslösung

---

DMEM

Collagenase A, > 0,15 Units/mg 0,5 mg/ml

Trypsin, 2,5 %, ohne Phenolrot, ohne EDTA 0,25 % (v/v)

---

Frisch angesetzt

---

### Abstopplösung

---

DMEM

FCS 10 % (v/v)

EDTA 1 mM

---

Frisch angesetzt

---

Das Protokoll wurde mit Maus ES Zellen etabliert und erwies sich auch für hES-MPs als geeignet. Die Zellen wurden in T25 Kulturflaschen differenziert und am Analysetag zunächst mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Die Zugabe von 2 ml 1 % EDTA erfolgte dann nur bei Kulturen mit mikroskopisch erkennbaren Mineralstrukturen. Die Inkubationszeit betrug 2–25 min (bei 37 °C) in Abhängigkeit vom Mineralisierungsgrad. Nach erneutem Waschen in PBS wurden 2 ml Dissoziationslösung zugefügt und die Platten je nach Differenzierungsgrad für 5–10 min bei 37 °C inkubiert. Die Vereinzelnung der Zelllayer wurde anschließend durch mehrmaliges, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren unterstützt. Der Verdau wurde durch Zugabe von 10 ml Abstopplösung beendet und die Zellsuspension für 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS oder dem entsprechenden Inkubationspuffer des jeweiligen Färbeprotokolls resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer oder dem CASY® Zellzähler bestimmt.

#### 4.3.2.3 Nachweis von Runx2

Zur indirekten Immundetektion von Runx2 wurde mit Fixierungs- und Permeabilisierungspuffern von BD Biosciences gearbeitet, von denen bekannt ist, dass sie die Detektion von Transkriptionsfaktoren in pluripotenten Maus ES Zellen ermöglichen (BD Stemflow, 2014).

##### Blockierungspuffer

1x BD Perm/Wash™	
Ziegenserum	10 % (v/v)
Frisch angesetzt	

1,5x10<sup>6</sup> Zellen der in Kapitel 4.1.5 (differenzierende hES-MPs), in Kapitel 4.1.1 (nicht-differenzierende hES-MPs) oder in Kapitel 4.1.2 (Saos-2) generierten Einzelzellsuspension wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, erneut mit PBS gewaschen und für 20 min bei RT in 150 µl BD Cytifix™ fixiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1400 x g wurde das Pellet in 150 µl 1x BD Perm/Wash™ resuspendiert, zentrifugiert und freie Bindungsstellen mit 150 µl Blockierungslösung für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurden gleiche Volumina der Zellsuspension auf drei Eppendorfgefäße verteilt, zentrifugiert und in 50 µl Blockierungspuffer mit Runx2 (10 µg/ml), der Isotypkontrolle (PSD95 AK IgG2a, 10 µg/ml) oder ohne AK für 1 h bei RT inkubiert. Die Konzentration des Runx2 AK war anhand eines Titrationsexperiments ermittelt worden. Nach drei Waschschritten in 1x BD Perm/Wash™ erfolgte die Zugabe von 50 µl Blockierungslösung mit einem PE-gekoppeltem Ziege-anti-Maus AK (1:200). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen 3x mit BD Perm/Wash™ gewaschen und in 150 µl 5 % FCS/PBS resuspendiert. Die durchflusszytometrische Analyse und Auswertung erfolgte wie in Kapitel 4.3.2.1 beschrieben.

#### 4.3.2.4 Nachweis von Alkalischer Phosphatase

Die direkte Immundetektion von AP an der äußeren Zellmembran erfolgte in Anlehnung an dem unter Kapitel 4.3.2.1 beschriebenen Protokoll für CD-Marker. Initiale Experimente mit Saos-2 hatten ergeben, dass eine Inkubation in Blockierungspuffer hier allerdings nicht notwendig war.

Saos-2 wurden wie in Kapitel 4.1.2 dargestellt trypsinisiert und zur Testung des Einflusses der Dissoziationsmethode auf die Färbung auch nach dem in Kapitel 4.3.2.2 beschriebenen Protokoll ohne den EDTA-Schritt. Nicht-differenzierende hES-MPs wurden nach Kapitel 4.1.1

aufgearbeitet, differenzierende hES-MPs nach Kapitel 4.3.2.2. Alle Lösungen wurden eiskühlt verwendet.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 ml Inkubationspuffer (Kapitel 4.3.2.1) resuspendiert und je 50  $\mu$ l in neue Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen mit dem PE-gekoppelten AP AK (5  $\mu$ g/ml), der Isotypkontrolle (IgG1-PE) oder ohne AK lichtgeschützt für 45 min bei 4 °C inkubiert. Die Konzentration des AP AK war anhand eines Titrationsexperiments ermittelt worden. Nach zweimaligem Waschen in Inkubationspuffer wurden die Zellen in 50  $\mu$ l von diesem resuspendiert. 15  $\mu$ l davon wurden vor der Analyse am BD FACSCanto II zur Färbung nicht-viabler Zellen mit 1,5  $\mu$ l 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) für 10 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Die Analyse von je  $1 \times 10^4$  Zellen erfolgte durch Anregung mit dem 488 nm Argonlaser und Detektion der PE-Fluoreszenz nach Filterung des emittierten Lichts mit einem 585/42 nm Bandpass Filter bzw. der 7-AAD-Fluoreszenz mit einem 670 nm Longpass Filter. Spektrale Überschneidungen der beiden Fluorochrome wurden durch Kompensation minimiert; eine Bestimmung der Kompensationswerte war zuvor mit Saos-2 Zellen erfolgt. Zelldebris wurden durch Gating im FSC/SSC und tote Zellen im 7-AAD/FSC-Diagramm von der weiteren Messung ausgeschlossen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FACSDiva Software, Version 6.1.3.

### 4.3.3 Herstellung von Zelllysaten für Western-Blot Analysen

Für die Extraktion der Transkriptionsfaktoren Dlx5 und Runx2 aus den Zellkulturen wurde mit einem Hoch-Salz-Lysepuffer gearbeitet, der sich an einem von Dignam et al. (1983) beschriebenen Puffer orientierte.

#### Lysepuffer

Bidest. H <sub>2</sub> O	10 ml
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), pH 7,9	10 mM
Magnesiumchlorid	1,5 mM
Natriumchlorid	150 mM
EDTA	0,2 mM
Dithiothreitol (DTT)	0,5 mM
Natriumdesoxycholat	5 mg/ml
Nonidet™ P40	2 % (v/v)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 mg/ml
cOmplete™, Mini, Proteaseinhibitortabletten, EDTA-frei	1 Tablette
Lagerung in Aliquots bei -20 °C	

Hierfür wurden zunächst nicht-differenzierende hES-MPs wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben vom Boden der Kulturgefäße gelöst. Bei differenzierenden hES-MPs erfolgte dies wie in Kapitel 4.3.2.2 dargestellt. Eine Vorbehandlung mit EDTA wurde bei den Kulturen ab Tag 14 der Differenzierung durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt wurde der Inhalt einer T25 Zellkulturflasche aufgearbeitet. Alle nachfolgenden Bearbeitungsschritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden 1x mit PBS gewaschen, bei 500 x g für 4 min zentrifugiert und anschließend in 300 µl Lysepuffer für 30 min schüttelnd inkubiert. Nach etwa der Hälfte der Zeit wurden die Proben zudem für 10 s auf der niedrigsten Stufe mit einem Cell Disruptor B-30 sonifiziert. Im Anschluss an eine 30-minütige Zentrifugation bei 20.000 x g wurden die Überstände bei -80 °C gelagert.

### **4.3.4 Proteinbestimmung**

Die quantitative Bestimmung der Proteinmenge in den Zelllysaten erfolgte mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit. Diese Methode stellt eine Verknüpfung der Biuret-Reaktion mit dem Einsatz von Bicinchoninsäure (BCA) zur Detektion dar und wurde von Smith et al. (1985) entwickelt. Proteine und Peptide reduzieren  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen (Biuret-Reaktion), die dann mit BCA Komplexe bilden. Das purpurfarbene Reaktionsprodukt kann kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm nachgewiesen werden.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Proben wurden zunächst 1:50 in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  vorverdünnt, um eine Interferenz der Komponenten des Lysepuffers mit den Reagenzien des Assays zu vermeiden. Eine Verdünnungsreihe des mitgelieferten BSA diente als Standard zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben. 25 µl der vorverdünnten Proben oder des BSA-Standards wurden in 3-fachem Ansatz in je eine Vertiefung einer 96-well Platte pipettiert und mit 200 µl des BCA-Reagenzes (zusammengesetzt aus 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B) vermengt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C und dem Abkühlen der Platte wurde die Absorption bei 562 nm mit dem Infinite M200 erfasst. Aus den Absorptionswerten wurden die Proteinkonzentrationen in den Proben mit Hilfe der BSA-Standardkurve berechnet.

### **4.3.5 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde von Laemmli et al. (1970) entwickelt und stellt eine häufig eingesetzte Methode zur Separierung von Proteingemischen entsprechend ihres Molekulargewichts dar. Die mit SDS

## Methoden

---

und DTT denaturierten Proteine werden hierbei auf ein vernetztes, in einem Pufferbad befindliches Polyacrylamidgel geladen und durch das Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt. Die Anlagerung des anionischen Detergenzes SDS an die Seitenketten der Moleküle überdeckt deren eigentliche Ladung und ermöglicht so die Separierung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts in den Poren des Gels. Ein diskontinuierliches Gel bedeutet eine Zusammensetzung des Trägermaterials aus zwei verschiedenen Phasen mit unterschiedlichem pH-Wert und unterschiedlicher Porengröße. Das Sammelgel dient der Aufkonzentration der Proben, während im Trenngel die eigentliche Auftrennung erfolgt. Eine Abschätzung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine erfolgt über das Mitführen von Proteinmarkern mit Proteinen bekannter Größe.

### Sammelgel (4,5 %)

---

Bidest. H<sub>2</sub>O

Tris-HCl, pH 6,8 125 mM

SDS 2 mg/ml

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 4,5 % (v/v)

Tetramethylethylendiamin (TEMED) 0,1 % (v/v)

Ammoniumpersulfat (APS) 1,5 mg/ml

---

Frisch hergestellt; Sammelgelpuffer (4x Tris-HCl/SDS/bidest. H<sub>2</sub>O) Lagerung bei 4 °C

---

### Trenngel (10 %)

---

Bidest. H<sub>2</sub>O

Tris-HCl, pH 8,8 375 mM

SDS 2 mg/ml

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 10 % (v/v)

TEMED 0,1 % (v/v)

APS 750 µg/ml

---

Frisch hergestellt; Trenngelpuffer (4x Tris-HCl/SDS/bidest. H<sub>2</sub>O) Lagerung bei 4 °C

---

## Methoden

---

### Laufpuffer

---

Bidest. H<sub>2</sub>O

Tris-HCl, pH 8,3 25 mM

Glycin 192 mM

SDS 1 mg/ml

---

Lagerung als 10x Ansatz bei 4 °C

---

Nach dem Aufbau der Elektrophorese-Apparatur (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad) und dem Zusammenbau der Gelkammern mit 1,5 mm Spacerplatten wurde das Trenngel in den Zwischenraum der Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisierung wurde die Trenngelkante mit bidest. H<sub>2</sub>O gespült, das Sammelgel eingefüllt und der Probenkamm eingesetzt. Sobald das Sammelgel ausreichend polymerisiert war, wurde die Gelkammer in die Elektrophorese-Einrichtung eingesetzt, das System mit Laufpuffer gefüllt und der Probenkamm entfernt.

Die Proben wurden auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt und mit DTT-haltigem Ladepuffer (5x, Fermentas) vermischt. Anschließend wurden sie für 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz abzentrifugiert und, ebenso wie der Proteinmarker, in die Taschen des Sammelgels eingefüllt. Die Elektrophorese wurde zunächst mit einer Spannung von 90 V (Sammelgel) und anschließend mit 120 V (Trenngel) durchgeführt. Die Stromstärke lag bei ca. 20 mA pro Gel. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus den Kammern entnommen und weiter für die Western-Blot Analyse eingesetzt.

### 4.3.6 Western-Blot

Ein AK-vermittelter Nachweis spezifischer Proteine in den durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemischen erfolgt üblicherweise nach einem elektrophoretischen Transfer von diesen auf eine Trägermembran, dem sogenannten Western-Blot Verfahren (Towbin et al., 1979).

### Transferpuffer

---

Bidest. H<sub>2</sub>O

Tris-HCl, pH 8,3 25 mM

Glycin 192 mM

Methanol 20 % (v/v)

---

Lagerung als 10x Ansatz bei 4 °C

---

## Methoden

### Ponceau Rot Färbelösung

Bidest. H <sub>2</sub> O	
Ponceau Rot	2 mg/ml
Trichloressigsäure	30 mg/ml
Lagerung bei RT	

Der Transfer erfolgte mit einem Semi-Dry-Blot-System (PEQLAB). Als Trägermaterial wurde eine 0,45 µm dicke Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran verwendet, die zur Aktivierung zunächst für 90 s in Methanol und anschließend in bidest. H<sub>2</sub>O vorinkubiert wurde. Parallel wurden drei Lagen Whatman-Papier in Transferpuffer getränkt und auf die Anodenseite des Semi-Dry-Blot-Systems positioniert. Darauf wurden die PVDF-Membran, das SDS-Gel und drei weitere Lagen getränktes Whatman-Papier gelegt und etwaige Luftblasen durch leichtes Rollen mit einer Pasteurpipette entfernt. Anschließend wurde das Sandwich mit der Kathodenseite des Blot-Systems abgedeckt und die Apparatur mit den angebrachten Schrauben festgestellt, um ein Verrutschen des Sandwichs zu vermeiden. Der Transfer erfolgte für 1 h bei einer Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup>. Die Membran wurde danach kurz in bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen und für 5 min in Ponceau Rot Lösung gefärbt, um die Qualität des Transfers zu prüfen. Durch mehrmaliges Waschen in bidest. H<sub>2</sub>O und TBST wurde das Ponceau Rot entfernt und die Membran stand für die Markierung mit AK zur Verfügung.

### 4.3.7 Nachweis geblotteter Proteine mittels Antikörpern

Der Nachweis der mittels Western-Blot immobilisierten Proteine erfolgte durch eine Markierung mit spezifischen primären AK, deren Bindung dann mit Hilfe von HRP-gekoppelten sekundären AK über eine Chemilumineszenzreaktion detektiert wurde.

#### Blockierungspuffer Runx2 und β-Aktin

TBST	
Milchpulver	40 mg/ml
Frisch angesetzt	

#### Blockierungspuffer Dlx5

TBST	
BSA, lyophilisiertes Pulver, ≥ 96 %	30 mg/ml
Lagerung bei 4 °C	

## Methoden

### Inkubationspuffer sekundäre AK und $\beta$ -Aktin

#### TBST

BSA, lyophilisiertes Pulver, $\geq 96\%$	10 mg/ml
--	----------

Lagerung bei 4 °C

### Strippingpuffer, pH 2,3

#### Bidest. H<sub>2</sub>O

Glycin	0,2 M
--------	-------

SDS	10 mg/ml
-----	----------

Tween 20	0,1 % (v/v)
----------	-------------

Direkt hinzufügen bei Inkubation der Membran:

DTT	5 mM
-----	------

Natriumazid	20 mM
-------------	-------

Lagerung bei RT; nach Riebeling, 2001 mit Modifikationen

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran zunächst in 8 ml Blockierungspuffer für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Markierung mit dem jeweiligen primären und zugehörigen sekundären AK wie folgt:

1. AK	Inkubationsbedingungen	2. AK	Inkubationsbedingungen
Anti-Dlx5 (Sigma)	1:3000 verdünnt in Blockierungspuffer bei 4 °C über Nacht	Ziege- anti-Maus IgG	1:2000 verdünnt in Inkubationspuffer für 1 h bei RT
Anti-Runx2	1:1000 verdünnt in Blockierungspuffer bei 4 °C über Nacht	Ziege- anti-Maus IgG2a	1:5000 verdünnt in Inkubationspuffer für 1 h bei RT
Anti- $\beta$ -Aktin (HRP-gekoppelt)	1:2500 verdünnt in Inkubationspuffer bei 4 °C über Nacht	–	–

Das Volumen betrug jeweils 8 ml und vor sowie nach Inkubation mit dem sekundären AK wurde die Membran 3x für 10 min in TBST bei RT gewaschen. Für die Chemilumineszenzreaktion wurde die Membran für 5 min mit der Arbeitslösung des SuperSignal™ West Pico Substrats (Thermo Fisher Scientific) exponiert. Im Fall von Runx2 war ein sensitiveres Substrat notwendig, um ausreichend starke Signale zu erhalten (SuperSignal™ West Femto). Die Membran wurde dann luftblasenfrei mit Klarsichtfolie umschlossen und die emittierten

Lichtsignale mit Hilfe einer Dokumentationsstation detektiert und fotografisch dokumentiert. Bei Verwendung der Membran für einen weiteren Nachweis erfolgte im Anschluss ein Stripping, um die zuvor verwendeten AK zu entfernen. Hierfür wurde die Membran 3x in bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen und in 8 ml Strippingpuffer ohne DTT und Natriumazid für mehr als 3 min bei RT vorbehandelt. Daraufhin erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT in 8 ml Strippingpuffer mit Zugabe von DTT und Natriumazid. Nach fünf gründlichen Waschschritten in bidest. H<sub>2</sub>O konnte eine zweite Antikörperbehandlung beginnend mit dem Blockierungsschritt erfolgen.

### **4.4 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.4.1 Isolierung und Aufreinigung von Ribonukleinsäure**

Die Isolierung und Aufreinigung der gesamten Ribonukleinsäure (RNA) aus hES-MPs zum Einsatz für Polymerasekettenreaktion (PCR) Array Analysen erfolgte mit einem stufenweisen Protokoll, das zunächst die Extraktion der RNA mittels TRIzol® Reagenz, einen Desoxyribonuklease (DNase)-Verdau und die abschließende Aufreinigung mit dem RNeasy® Mini Kit umfasste. Zum Schutz der RNA vor Degradation wurde mit Lösungen und Materialien gearbeitet, die entweder als Ribonuklease (RNase)-frei erworben oder die bei 121 °C autoklaviert worden waren.

##### **4.4.1.1 Zellyse und Isolierung von Ribonukleinsäure**

Die Verwendung von TRIzol® Reagenz zum gleichzeitigen Zellaufschluss und der Isolation von RNA, aber auch von DNA und Proteinen, basiert auf der von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Sowohl Guanidiniumthiocyanat als auch Phenol tragen durch ihre Protein-denaturierende Wirkung zum Aufschluss der Zellen bei. Die Zugabe von Chloroform zu dem homogenisierten Gemisch sorgt dann für eine Separierung in eine wässrige obere Phase, die die freigeordnete RNA enthält, und eine organische untere Phase, die den Proteinanteil beinhaltet. Die DNA sammelt sich sowohl in der unteren als auch zwischen beiden Phasen (Interphase) an. Diese Trennung ermöglicht anschließend die Isolierung des jeweiligen Makromoleküls von Interesse.

Die Isolierung der RNA mit TRIzol® Reagenz erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die in 100 mm Schalen kultivierten Zellen wurden mit warmem PBS gewaschen und 3 ml

TRIzol® Reagenz hinzugegeben. Nach mechanischer Homogenisierung und einer fünfminütigen Inkubation wurde die Suspension auf drei Eppendorfgefäße mit je 1 ml aufgeteilt und bei 12.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei –80 °C gelagert. Je ein aufgetautes Aliquot wurde mit 200 µl Chloroform für 15 s kräftig geschüttelt und nach 2–3 min Inkubation bei RT für 15 min mit 12.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde, ohne mit der darunter liegenden Phase in Berührung zu kommen, vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Zur Präzipitation der RNA wurde die Probe anschließend mit 500 µl Isopropanol für 10 min bei RT inkubiert und für 10 min mit 12.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und das Pellet 2x mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 10.000 x g bei 4 °C). Nach gründlicher Abnahme des EtOH wurde das Pellet für 5–10 min antrocknen lassen und anschließend in 15 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **4.4.1.2 Enzymatischer Verdau mit Desoxyribonuklease**

Zur Degradation möglicher restlicher genomischer DNA in den RNA-Proben wurde ein Verdau mit DNA-abbauenden Enzymen durchgeführt. Dafür wurden die Proben aus Kapitel 4.4.1.1 auf 45 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt und vorsichtig mit 5 µl DNase-Puffer und 1 µl rekombinanter DNase I (10 Units), den beiden Komponenten des verwendeten DNase-Kits von Roche, gemischt. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 37 °C. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt.

### **4.4.1.3 Weitere Aufreinigung der Ribonukleinsäure**

Um eine hochaufgereinigte RNA für die PCR Array Analysen zu gewährleisten, wurden die Proben in einem weiteren Schritt nach dem Cleanup Protokoll des RNeasy® Mini Kits von QIAGEN behandelt. Die Methode beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an eine Silicagel-Membran unter bestimmten pH-Bedingungen und Salzkonzentrationen. Weitere Makromoleküle und Kontaminanten binden nicht und werden dadurch gewaschen.

Die Proben aus dem DNase-Verdau wurden mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und mit 350 µl des im Kit enthaltenen fertigen RLT-Puffers gemischt. Anschließend wurden 250 µl 100 % EtOH dazu gemischt und das gesamte Volumen auf eine RNeasy Spin Column aufgetragen. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g für 15 s bei RT wurde der Durchfluss verworfen, 500 µl des im Kit enthaltenen fertigen RPE-Puffers aufgetragen und wieder zentrifugiert. Nach einem erneuten Waschschritt mit RPE-Puffer und einer Zentrifugation bei 10.000 x g für 2 min bei RT

wurde die Spin Column in ein neues Sammelröhrchen überführt und für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurde die Spin Column in ein neues Sammelröhrchen eingesetzt, 20 µl H<sub>2</sub>O direkt auf die Säule gegeben und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde anschließend wiederholt, sodass 40 µl RNA-Probenmaterial für die weitere Bearbeitung zur Verfügung standen.

### **4.4.2 Untersuchung der Ribonukleinsäure-Quantität und -Qualität**

#### **4.4.2.1 NanoDrop-Messung**

Die Vermessung der RNA-Quantität und eine erste qualitative Prüfung erfolgte mit je 1 µl des in Kapitel 4.4.1.3 gewonnenen Probenmaterials am NanoDrop ND-2000 Spektrophotometer. Bei dieser Methode wird in wässriger Lösung die UV-Absorption von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) und die von Proteinen bei 280 nm ( $A_{280}$ ) gemessen. Mögliche Kontaminanten aus der Aufarbeitung, wie Phenol und Guanidiniumthiocyanat, absorbieren bei ca. 230 nm ( $A_{230}$ ). Die Quotienten aus  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$  geben Informationen über die Reinheit der Probe. Allgemein akzeptiert ist, dass für pure RNA der Quotient aus  $A_{260}/A_{280}$  in etwa 2,0 entspricht, für pure DNA ca. 1,8. Das Verhältnis aus  $A_{260}/A_{230}$  liegt üblicherweise bei ca. 2,0–2,2. Geringere Werte sprechen in beiden Fällen für eine Kontamination der Proben mit Proteinen oder aromatischen Substanzen. Die hergestellten Proben entsprachen den Kriterien. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte nach der Regel, dass ein Wert von 1 bei  $A_{260}$  ca. 40 µg/ml RNA entsprach. Alle Proben wiesen RNA-Konzentrationen > 570 µg/ml auf.

#### **4.4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Als eine weitere Qualitätskontrolle wurde die Integrität der 18S- und 28S-ribosomalen RNA (rRNA) mittels einer denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Üblicherweise wird rRNA für die Qualitätskontrolle verwendet, da sie ca. 80 % oder mehr der zellulären Gesamt-RNA ausmacht. Nukleinsäuren wandern durch Anlegen einer elektrischen Spannung aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrats in Richtung Anode und können so in einer porösen Matrix wie Agarose entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Der Zusatz des in Nukleinsäuremoleküle interkalierenden Aromaten Ethidiumbromid ermöglicht die Visualisierung der Fragmente nach UV-Anregung.

---

50x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer

---

Bidest. H<sub>2</sub>O

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) 2 M

Eisessig 1 M

EDTA, pH 8,0 0,05 M

---

Autoklaviert, Lagerung bei RT

---

Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 1 %-igen Agarose-Gel. Hierfür wurden 1 g Agarose durch Erhitzen in der Mikrowelle bei 600 W in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit Ethidiumbromid (finale Konzentration 0,5 µg/ml) versetzt und in den vorbereiteten Gel-Schlitten gefüllt. Die Probenaschen wurden durch Einsetzen eines Kamms generiert. Nach dem Abkühlen wurde der Schlitten in die Gelkammer eingesetzt und diese mit 1x TAE-Puffer gefüllt, sodass das Gel komplett bedeckt war. Je 2 µl Probe wurden mit 2 µl 2x RNA Probenpuffer für 10 min bei 70 °C inkubiert und das komplette Volumen in eine Probenasche gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte für 25 min bei 80 V. Die RNA-Banden wurden anschließend mit einem UV-Transilluminator visualisiert und Aufnahmen der Gele mit Hilfe einer Dokumentationsstation erstellt. Eine Abschätzung der Größe der aufgetrennten RNA-Moleküle erfolgte über das Mitführen eines Markers mit Fragmenten bekannter Größe. In allen weiterverwendeten Proben zeigten die Banden der 18S- und 28S-rRNA klar abgrenzbare scharfe Banden, das Verhältnis 28S:18S betrug ca. 2:1 und es war kein Hinweis auf eine Degradation der RNA erkennbar.

#### 4.4.3 Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure

Die Quantifizierung von *messenger* RNA (mRNA)-Transkripten mittels PCR erfordert eine Umschreibung der RNA in die komplementäre DNA (cDNA). Das geschieht durch den Einsatz des Enzyms reverse Transkriptase, das den Aufbau eines komplementären DNA-Strangs bei Anwesenheit von Oligodesoxynukleotiden zur Kettenverlängerung und geeigneten Primern (z. B. Random Hexamer Primern) als Startmoleküle katalysiert. Die cDNA-Synthese für den nachfolgenden PCR Array erfolgte mit dem RT<sup>2</sup> First Strand Kit von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers.

Lösung für die reverse Transkription

RNase-freies H <sub>2</sub> O	3 µl
5x Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
Frisch angesetzt	

Um mögliche restliche genomische DNA zu eliminieren wurden zunächst je 2 µg RNA mit 2 µl des im Kit enthaltenen GE-Puffers versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 42 °C. Die Proben wurden im direkten Anschluss für mindestens 1 min auf Eis gestellt und nachfolgend 10 µl der Lösung für die reverse Transkription hinzu gemischt. Die Proben wurden für 15 min bei 42 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch eine fünfminütige Inkubation bei 95 °C abgestoppt. Nach Zugabe von 91 µl RNase-freiem Wasser wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

#### 4.4.4 Real-Time Polymerasekettenreaktions Array

Bei der PCR handelt es sich um eine sensitive *in vitro* Methode zur schnellen Amplifizierung von DNA-Abschnitten, die in den frühen 1980er Jahren von Kary Mullis konzeptioniert wurde (Mullis et al., 1986). Doppelsträngige DNA wird dabei denaturiert und die Einzelstränge dienen dann als Vorlage für die Synthese eines komplementären Strangs aus Desoxynukleotiden durch die enzymatische Aktivität einer hitzestabilen DNA Polymerase. Kurze Oligonukleotide, sogenannte Primer, definieren dabei welcher Abschnitt der DNA repliziert wird. Die einzelnen Schritte der Methode, bezeichnet als Denaturierung, Annealing und Elongation, werden in mehreren Zyklen wiederholt. Dabei kommt es in jedem Zyklus zu einer Verdopplung des adressierten DNA-Abschnitts und somit zu einer exponentiellen Zunahme.

Heute existieren zahlreiche Modifikationen und Weiterentwicklungen der ursprünglichen Methode, die in verschiedenen Bereichen eingesetzt wird in denen eine Vervielfältigung und/oder Analyse von Gensegmenten erforderlich ist. Zu diesen gehört auch die Real-Time PCR, bei der die Zunahme der DNA-Kopien mittels Fluoreszenzmessungen in Echtzeit verfolgt und quantifiziert werden kann. Dafür werden fluoreszierende Farbstoffe oder spezifische Sonden eingesetzt. Bei den von SABiosciences/QIAGEN vertriebenen RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Arrays wird mit dieser Technik ein ausgesuchtes, nach Themen zusammengestelltes Set aus

84 Zielgenen parallel im Mikrotiterplattenformat untersucht. Dafür wird als Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet und mit der HotStart Taq DNA Polymerase gearbeitet. In der vorliegenden Arbeit wurde der Human Osteogenesis Array eingesetzt, der eine Auswahl an Genen umfasst, die eine Funktion in verschiedenen Prozessen der osteoblastären Differenzierung und der Knochenentwicklung haben.

102  $\mu\text{l}$  der in Kapitel 4.4.3 hergestellten cDNA wurden mit 1350  $\mu\text{l}$  des im Kit enthaltenen 2x RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermixes und 1248  $\mu\text{l}$  RNase-freiem H<sub>2</sub>O gemischt. Nach Überführung des PCR Mixes in ein Ladereservoir wurden je 25  $\mu\text{l}$  der Lösung in jede Vertiefung einer im Kit inkludierten 96-well PCR Array Platte pipettiert. Die Platte wurde anschließend vorsichtig mit einer Lage Optical Adhesive Film versiegelt und bei 1000 x g zentrifugiert bis alle Vertiefungen frei von Luftblasen waren. Bis zur Messung am Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System wurde die Platte auf Eis gelagert. Das PCR-Programm umfasste eine initiale Erhitzung auf 95 °C für 10 min zur Aktivierung der HotStart Taq DNA Polymerase. Darauf folgend wurden 40 Zyklen mit je 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C durchlaufen. Die Erfassung der SYBR Green Fluoreszenz erfolgte am Ende der Elongation in jedem der 40 Zyklen. Im direkten Anschluss wurden Dissoziationskurven mit dem am Gerät voreingestellten Programm erstellt, um das Vorliegen spezifischer PCR-Produkte zu überprüfen. *Cycle threshold* (C<sub>T</sub>)-Werte wurden durch die Geräte-Software nach automatischer Festlegung der Baseline und manueller Einstellung des Schwellenwerts berechnet und exportiert. C<sub>T</sub>-Werte > 35 wurden auf 35 gesetzt und das Gen als nicht detektierbar betrachtet. Spezifische Kontrollen im Array dienten der Prüfung der Anwesenheit von nicht-transkribierter genomischer DNA, der mit dem RT<sup>2</sup> First Strand Kit durchgeführten Effizienz der reversen Transkription sowie der Effizienz der PCR selbst. Zudem war eine definierte hES-MP cDNA-Probe zur Kontrolle der Variabilität zwischen den Array Platten auf jede Platte aufgetragen und analysiert worden. Die relative Quantifizierung der Daten erfolgte durch die im Kit inkludierte Web-basierte Software nach der  $\Delta\Delta\text{C}_T$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Dabei wurden die Expressionsdaten aller Zielgene auf den mittleren C<sub>T</sub>-Wert aller fünf inkludierten Referenzgene normalisiert. Die Genexpressionsdaten der differenzierenden hES-MPs wurden dann als *fold change* im Vergleich zu nicht-differenzierenden Zellen (d0) dargestellt.

### 4.5 Applikation von Testsubstanzen

Zur Überprüfung der Prädiktivität des in der vorliegenden Arbeit etablierten Assays zur Erfassung von chemisch induzierten Effekten auf die Knochenentwicklung wurde mit einer Auswahl an Substanzen mit bekanntem *in vivo* entwicklungstoxischen Potential gearbeitet.

Folgende Chemikalien dienten als Positivsubstanzen: 5-Fluorouracil (5-FU), Borsäure (BA), Natriumvalproat (NaVPA) und Warfarin (WAR). Diphenhydramin (DPH; als Hydrochlorid), Metoclopramid (MCP; als Hydrochlorid) und Penicillin G (PenG) wurden als Negativsubstanzen eingesetzt. Zudem wurden Versuche mit Levamisol (LEV; als Hydrochlorid) als positive Test-spezifische Referenzsubstanz durchgeführt. Alle Substanzen wurden in PBS (max. 1 % v/v) gelöst, mit der Ausnahme von WAR, für das DMSO (0,065 % v/v) verwendet wurde, und aliquotiert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Lösungsmittel wurde durch Vergleich mit einer unbehandelten Kontrolle bei jedem Versuch sichergestellt, dass sie keinen Effekt auf die Endpunkte Mineralisierung und Zellviabilität hatten. In Vorversuchen wurde der relevante Konzentrationsbereich für alle verwendeten Stoffe ermittelt. Für jede Substanz wurden dann in den Hauptversuchen sechs verschiedene Konzentrationen getestet, die mit Hilfe von Verdünnungsreihen hergestellt wurden.

Die Differenzierung der hES-MPs erfolgte in Gelatine-beschichteten fluoreszenzgeeigneten 96-well Platten (schwarz/klar; BD Falcon™ und BD Optilux™). Für eine Exposition von Tag 1–5 und Tag 1–15 wurden die Zellen in 50  $\mu\text{l}$  des Differenzierungsmediums mit AA,  $\beta$ -GP und Dex ausgesät (Kapitel 4.1.5) und über Nacht adhären lassen. Am nächsten Tag (Tag 1) wurden 50  $\mu\text{l}$  des Differenzierungsmediums mit der doppelten Endkonzentration des Lösungsmittels oder der Testsubstanzen hinzugefügt. Für die Behandlung von Tag 8–15 wurde das Differenzierungsmedium am Tag 8 mit frischem Medium ersetzt, dem das Lösungsmittel oder die Testsubstanz zugesetzt worden war. Medienwechsel erfolgten wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben mit frisch hergestelltem Medium, das, wenn in Bezug auf den gewählten Expositionszeitraum relevant, das entsprechende Lösungsmittel oder die jeweilige Testsubstanz enthielt.

Die Mineralisierung und die Zellviabilität wurden am Tag 15 der Differenzierung in parallelen Platten mit dem OsteoImage™ Mineralization Assay (Kapitel 4.2.3.4) und dem CellTiter-Blue® Assay (Kapitel 4.2.1) analysiert. Der gemittelte Fluoreszenzwert der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle wurde als 100 % gesetzt und die Werte der behandelten Zellen als prozentualer Anteil dieser Kontrolle angegeben.

Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden aus den Einzelwerten aller Experimente zu einer Substanz mit dem R-Paket *drm* nach einem der folgenden nicht-linearen Modelle gefittet: das dreiparametrische log-logistische Modell oder das Brain-Cousens Modell (Ritz und Streibig, 2005; R Core Team, 2013). Für einen gegebenen Datensatz wurde das Modell angewandt, das das größere Akaike Informationskriterium ergab (Akaike, 1998). Falls not-

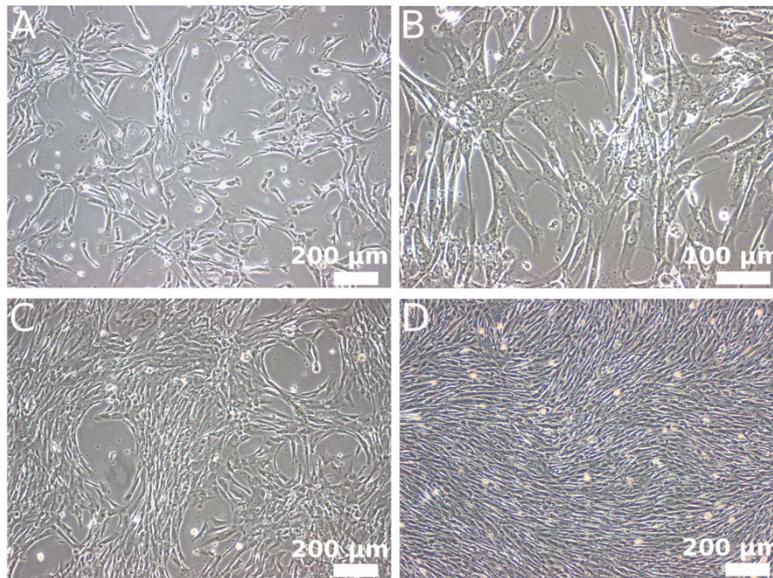
wendig wurde eine Extrapolation bis zum 2-fachen Wert der maximalen applizierten Konzentration durchgeführt. Für jeden endpunktbezogenen Datensatz wurde mit den Modellen zudem ein  $EC_{50}$ -Wert ermittelt, definiert als die Konzentration bei der der Wert der gefitteten Kurve 50 % des mittleren Werts der Lösungsmittelkontrolle beträgt. Konfidenzintervalle wurden mit Hilfe der t-Verteilung berechnet. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass entwicklungstoxische Substanzen einen spezifischen Effekt auf die Mineralisierung von hES-MPs bei subtoxischen Konzentrationen zeigen, d. h. dass der mittlere  $EC_{50}$ -Wert für die Mineralisierung signifikant unter dem für die Zellviabilität liegt. Um dies zu testen wurde ein einseitiger paarweiser Zweistichproben-t-Test mit unterschiedlichen Varianzen durchgeführt. Dies setzte die Annahme einer Normalverteilung der  $EC_{50}$ -Werte voraus. Bei einem p-Wert  $< 0,05$  wurden die Unterschiede als signifikant erachtet. Zur Visualisierung der Abgrenzung von entwicklungstoxischen und nicht-entwicklungstoxischen Substanzen wurde der log-transformierte Quotient aus den mittleren  $EC_{50}$ -Werten bestimmt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kultivierung und Differenzierung von hES-MPs

#### 5.1.1 Nicht-differenzierende hES-MPs

Die Kultivierung der nicht-differenzierenden hES-MPs erfolgte nach einem von de Peppo et al. (2010a) publizierten Protokoll in glucosereichem Medium unter Zugabe von bFGF in unbeschichteten Zellkulturgefäßen. Die Zellen weisen unter diesen Bedingungen, wie bereits von Karlsson et al. (2009) beschrieben, eine spindelförmige Morphologie mit sich zum Teil verzweigenden Fortsätzen auf, der derjenigen von Fibroblasten ähnelt (Abb. 6A). Weiterhin zeichnen sie sich durch ein an Organellen und Vesikeln reiches Zytoplasma und einen gut erkennbaren Zellkern mit einem oder mehreren Nukleoli aus (Abb. 6B). Bei höherer Dichte der Kulturen werden die Zellen langgestreckter und formieren sich zunächst um zellfreie runde Areale (Abb. 6C). Mit Konfluenz der Kulturen ist eine parallele Gruppierung der Zellen in wellenförmigen Mustern erkennbar (Abb. 6D).

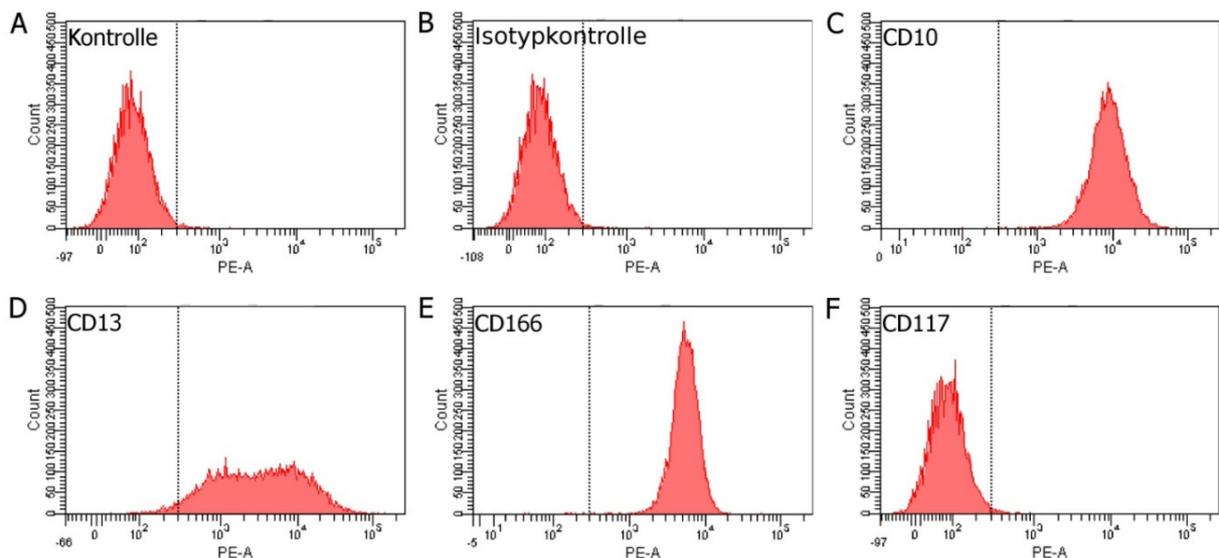


**Abb. 6: Morphologie nicht-differenzierender hES-MPs.**

hES-MPs in Expansionskultur am Tag (d) 2 (A) und d4 (B und C) nach Aussaat sowie bei Konfluenz am d6 (D).

Zur Qualitätskontrolle der hES-MPs wurden die Zellen aus verschiedenen Kryoröhrchen an unterschiedlichen Auftauzeitpunkten auf die Bildung von Oberflächenmarkern mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse geprüft. In Übereinstimmung mit Karlsson et al. (2009)

waren die Zellen positiv für die MSC-Marker CD10 (Abb. 7C), CD13 (Abb. 7D) und CD166 (Abb. 7E) sowie negativ für den hämatopoetischen Stammzellmarker CD117 (Abb. 7F). In allen Experimenten produzierten mehr als 99,6 % der Zellen CD10, mehr als 97,0 % CD13 und mehr als 99,7 % CD166. Weniger als 1,5 % der Zellen hingegen waren positiv für CD117.

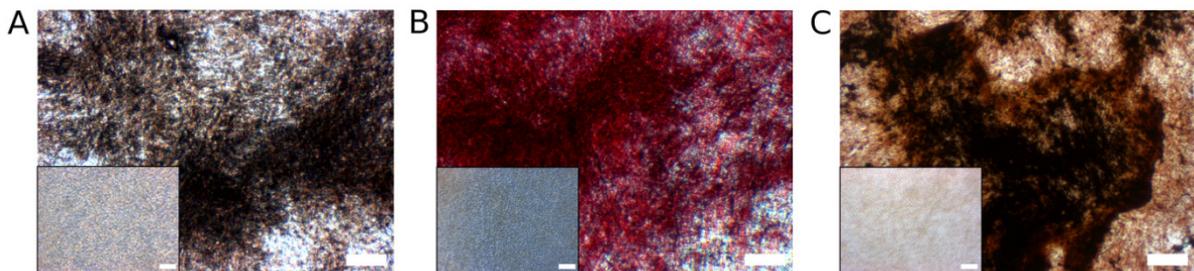


**Abb. 7: Biosynthese von Oberflächenmarkern in nicht-differenzierenden hES-MPs.**

hES-MPs wurden von den Zellkulturflaschen abgelöst und nach Inkubation in FCS-haltigem Blockierungspuffer mit PE-konjugiertem AK gegen CD10 (C), CD13 (D), CD166 (E) oder CD117 (F) markiert. Kontrollen enthielten keinen AK (A) oder einen geeigneten AK unbekannter Spezifität aus Myelomzellen (Isotypkontrolle, B). Anschließend wurden je 10.000 Zellen im FACSCanto II analysiert. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experiments.

### 5.1.2 Optimierung des Differenzierungsprotokolls

Die Grundlage für die osteogene Differenzierung der hES-MPs bildete ein von de Peppo et al. (2010a) publiziertes Protokoll. Dieses sieht eine Kultivierung der Zellen in unbeschichteten Zellkulturgefäßen in FCS-haltigem DMEM mit einer geringen Glucose-Konzentration (1 g/l) und Supplementierung mit 45 µM AA, 10 mM β-GP und 1 µM Dex vor. Die Zellen bilden unter diesen Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollkulturen ohne Induktoren mineralisierte Bereiche aus, die lichtmikroskopisch als dunkle Bereiche erkennbar sind (Abb. 8A) und sich mit Alizarin Rot S (Abb. 8B) und von Kossa (Abb. 8C) anfärben lassen.



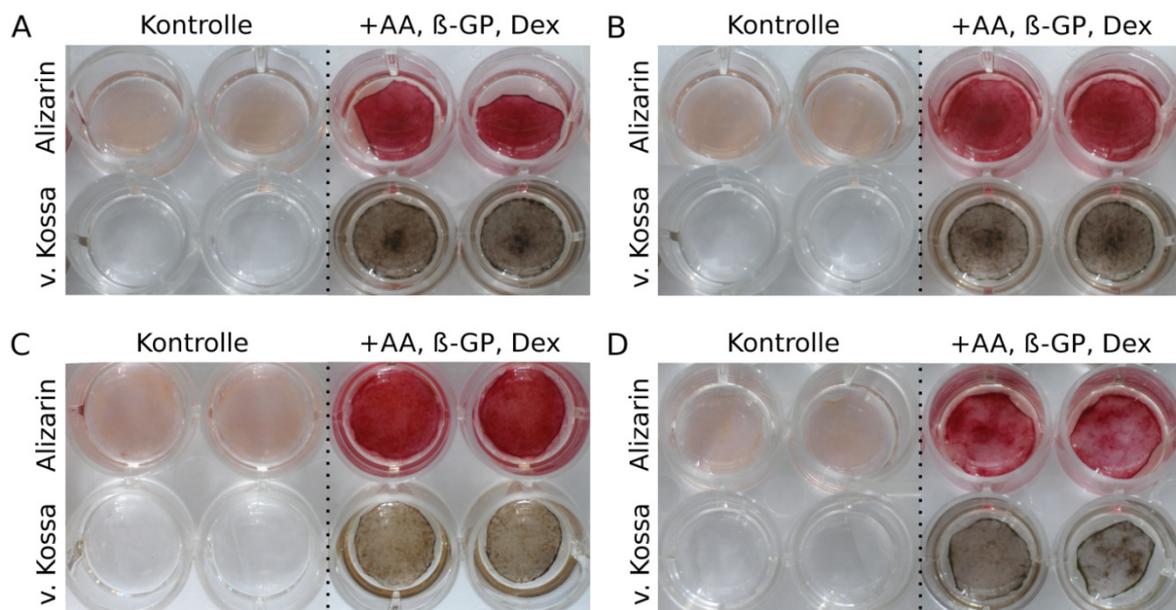
**Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mineralisierung in differenzierenden hES-MPs.**

Die Zellen wurden ohne (Kontrolle, Einschübe) oder mit Zugabe von AA,  $\beta$ -GP, Dex für 29 Tage in unbeschichteten Zellkulturgefäßen differenziert. (A) Ungefärbte Kulturen. (B) Anfärbung von calciumreichen Bereichen mit Alizarin Rot S. (C) Visualisierung mineralisierter Areale mit der von Kossa Färbung. Maßstabsbalken entsprechen 200  $\mu$ m.

Ein häufiges Problem, das verstärkt mit längerer Kultivierung der sich differenzierenden hES-MPs beobachtet werden konnte, war ein Ablösen des Zellrasens. Um die Adhärenz der Kulturen zu verbessern wurden daher eine Beschichtung der Gefäße mit Gelatine während der Expansion und Differenzierung und eine verringerte Zelleinsaat von 4.000 Zellen/cm<sup>2</sup>, wie sie bei Karlsson et al. (2009) eingesetzt wurde, getestet (Abb. 9). Für die Auswertung wurden komplette Vertiefungen der verwendeten 24-well Platten nach 29 Tagen Differenzierung fotografiert. Zur Überprüfung des Mineralisierungsgrads wurden die Kulturen zuvor mittels Alizarin Rot S und von Kossa gefärbt.

Die Adhärenz der hES-MPs konnte durch eine Gelatine-Beschichtung der Zellkulturgefäße während der Differenzierung verbessert werden (vgl. Abb. 9B mit A). Der Mineralisierungsgrad war davon unbeeinflusst. Eine Beschichtung der Zellkulturgefäße während der Differenzierung und Expansion führte zwar auch zu einem besseren Anhaften der Zellen, verringerte jedoch die Mineralisierung (vgl. Abb. 9C mit A). Eine Reduktion der Zelleinsaat auf 4.000 Zellen/cm<sup>2</sup> konnte nicht zu einer Verbesserung der Adhärenz beitragen und verminderte die Ausbildung mineralisierter Bereiche deutlich (vgl. Abb. 9D mit A).

Aufgrund dieser Daten wurden in allen nachfolgenden Experimenten die nicht-differenzierenden Zellen auf unbeschichteten Zellkulturgefäßen expandiert. Die Differenzierung erfolgte auf Gelatine-beschichteten Gefäßen mit einer Zelleinsaat von 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>.



**Abb. 9: Osteogene Differenzierung von hES-MPs in Abhängigkeit von der Beschichtung und der initialen Zelleinsaat.**

hES-MPs wurden ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von AA, β-GP, Dex für 29 Tage in 24-*well* Platten unter verschiedenen Bedingungen differenziert. Nach Fixierung der Zellen in Methanol/Aceton wurden mineralisierte Bereiche mittels Alizarin Rot S oder von Kossa Färbung detektiert. (A) Expansion und Differenzierung in unbeschichteten Zellkulturgefäßen, Zelleinsaat 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>. (B) Expansion in unbeschichteten Zellkulturgefäßen, Differenzierung in Gelatine-beschichteten Zellkulturgefäßen, Zelleinsaat 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>. (C) Expansion und Differenzierung in Gelatine-beschichteten Zellkulturgefäßen, Zelleinsaat 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>. (D) Expansion und Differenzierung in unbeschichteten Zellkulturgefäßen, Zelleinsaat 4.000 Zellen/cm<sup>2</sup>.

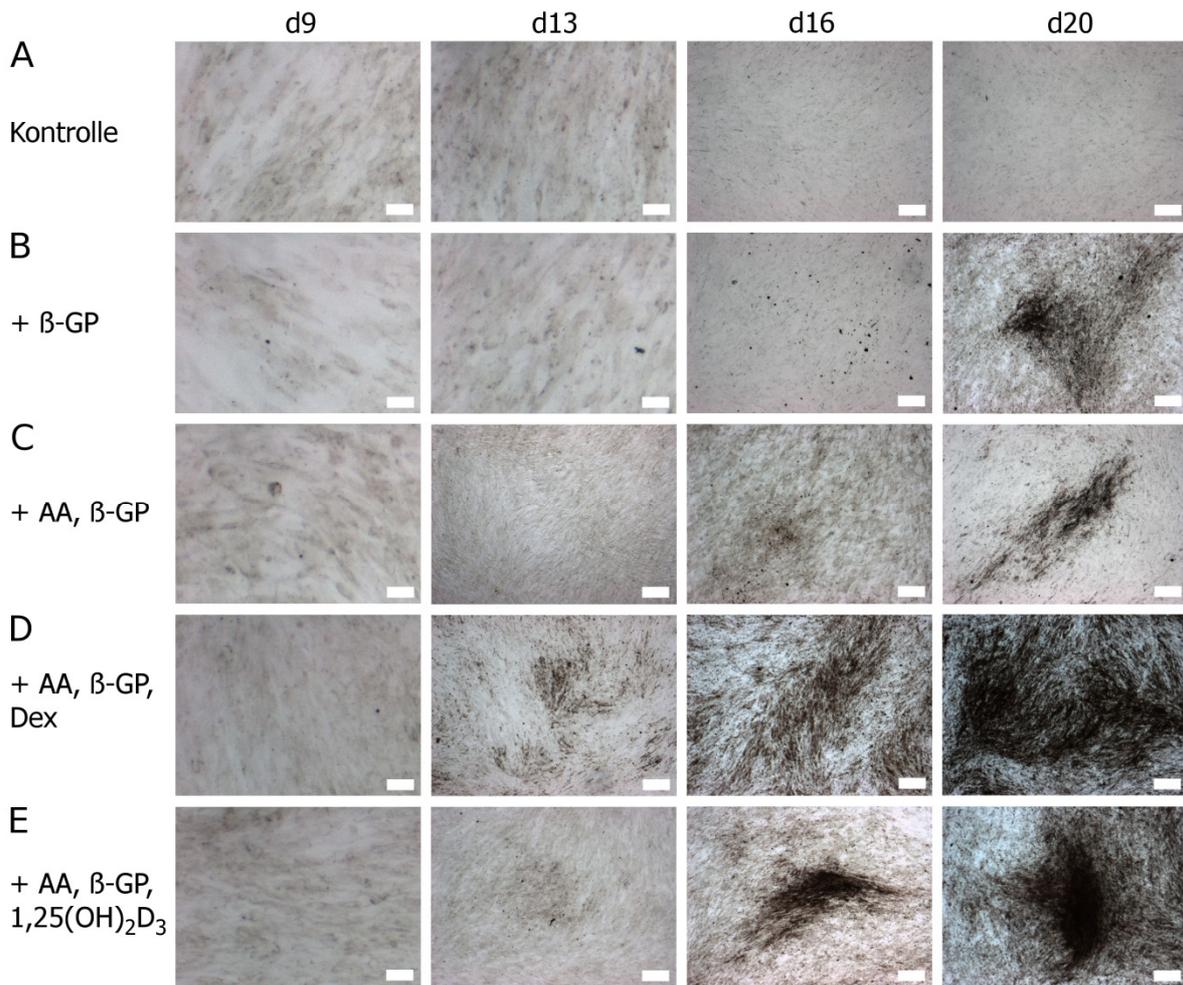
### 5.1.3 Einfluss verschiedener Induktorkombinationen

Dex wurde von der U.S. FDA in die Schwangerschaftsrisikokategorie C eingeteilt und ist damit als potentiell teratogen für den Menschen zu betrachten. Um einen möglichen synergistischen Effekt mit Testsubstanzen zu vermeiden sollte zunächst geprüft werden, ob auf den Einsatz von Dex für eine adäquate Differenzierung verzichtet werden kann oder gegebenenfalls Alternativen zur Verfügung stehen. Daher wurden hES-MPs in verschiedenen Varianten von supplementreduziertem Medium oder unter Zugabe von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> differenziert und die Mineralisierungseffizienz mittels von Kossa Färbung geprüft (Abb. 10).

Im Vergleich zu den Kontrollkulturen ohne Induktoren (Abb. 10A) führte eine Supplementierung mit β-GP allein (Abb. 10B) bereits zu einer positiven Färbung am Tag 20. Bei zusätzlicher Gabe von AA (Abb. 10C) waren erste Mineralablagerungen bereits etwas früher, am Tag 16, detektierbar; der Mineralisierungsgrad schien am Tag 20 jedoch nicht höher zu sein.

Wurde Dex zu dieser Kombination hinzugenommen, kam es zu einem deutlich früheren Mineralisierungsbeginn (Abb. 10D). Gefärbte Bereiche waren hier bereits am Tag 13 klar erkennbar und nahmen sukzessive zu, sodass am Tag 20 eine wesentlich stärkere Mineralisierung als bei einer Induktion ohne Dex vorhanden war. Wurde  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (in einer Konzentration, die die osteogene Differenzierung von Maus ES Zellen stimuliert (zur Nieden et al., 2003)) zusammen mit AA und  $\beta$ -GP eingesetzt, so zeigte sich ein ähnlicher Mineralisierungsverlauf wie bei der Verwendung von Dex (Abb. 10E). Insbesondere an Tag 13 jedoch war die Färbung etwas schwächer ausgeprägt. Ein direkter Nachweis von Calcium mit Alizarin Rot S bestätigte die hier gezeigten Resultate (Abb. A1 im Anhang).

Eine Supplementierung mit Dex oder  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  war demzufolge notwendig, um eine ausreichende Menge an mineralisierter Matrix in einem angemessenen Zeitfenster zu erhalten. Beide Induktionsmethoden wurden daher für die weitere Charakterisierung der Differenzierung von hES-MPs verwendet.



**Abb. 10: Differenzierung von hES-MPs unter Zugabe verschiedener Induktorkombinationen.**

Die Zellen wurden (A) ohne Supplemente (Kontrolle), (B) mit  $\beta$ -GP, (C) mit AA und  $\beta$ -GP, (D) mit AA,  $\beta$ -GP und Dex oder (E) mit AA,  $\beta$ -GP und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  differenziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert und es erfolgte ein Nachweis der Mineralisierung mit der von Kossa Methode. Maßstabsbalken entsprechen 200  $\mu\text{m}$ .

## 5.2 Charakterisierung der Differenzierung von hES-MPs und Identifizierung molekularer Marker

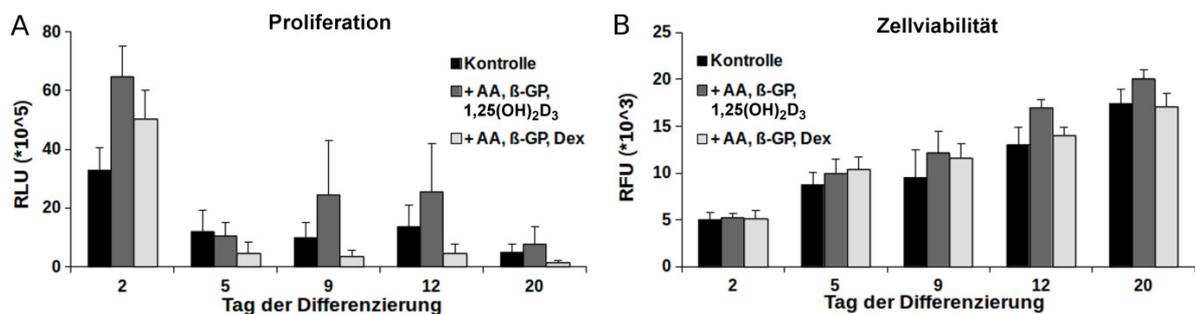
Für ein fundierteres Verständnis der typischen osteogenen Differenzierungsprozesse und zur Identifizierung geeigneter molekularer Marker für die Etablierung toxikologischer Endpunkte wurde der zeitliche Verlauf des Wachstums der Kulturen, der Bildung ausgewählter Proteine und der Mineralisierung in differenzierenden hES-MPs näher untersucht.

### 5.2.1 Wachstum der hES-MP Kulturen

Als Indikatoren für das Wachstum von hES-MP Kulturen wurden die Proliferation und die Zellviabilität über eine Dauer von 20 Tagen durch die Messung der BrdU-Inkorporation in neu synthetisierte DNA und die enzymatische Reduktion von Resazurin bestimmt (Abb. 11).

Sowohl die Kontrollkulturen ohne Induktoren als auch die induzierten Kulturen wiesen einen vergleichbaren zeitlichen Verlauf beider Wachstumsparameter auf. Die Proliferationsrate war für alle Bedingungen am Tag 2 am höchsten (Abb. 11A) und fiel am Tag 5 auf ein niedrigeres Level, was lichtmikroskopisch betrachtet mit einer Konfluenz der Kulturen einherging (Abb. 17). Zu späteren Zeitpunkten blieben die Proliferationsraten weitestgehend auf diesem niedrigeren Niveau (Abb. 11A). AA,  $\beta$ -GP, Dex-induzierte Kulturen wiesen am Tag 2 eine höhere Proliferation auf als die Kontrollen, bei allen nachfolgenden Zeitpunkten waren die Werte dann allerdings geringer. Auch die mit AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induzierten Zellen proliferierten am Tag 2 deutlich stärker als die Kontrollen und zeigten ebenfalls am Tag 9 und 12 tendenziell höhere Werte, wobei diese stark schwankten. Im Einklang mit den hohen Proliferationsraten am Tag 2 wurde der stärkste Anstieg in der Zellviabilität für alle Bedingungen zwischen Tag 2 und 5 detektiert (Abb. 11B). Im weiteren Verlauf nahm die Viabilität dann konstant bis Tag 20 zu und zeigte vergleichbare Werte für alle Konditionen.

Die Differenzierung von hES-MP Kulturen ist anhand dieser Daten für alle Induktionsbedingungen durch eine frühe Wachstumsphase innerhalb der ersten 5 Tage gekennzeichnet.



**Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Proliferation und Zellviabilität in differenzierenden hES-MPs.**

Die Zellen wurden in 96-well Platten ohne (Kontrolle, schwarze Balken) und mit Supplementierung von AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (dunkelgraue Balken) oder AA,  $\beta$ -GP, Dex (hellgraue Balken) über 20 Tage kultiviert. (A) Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Proliferation über die Inkorporation von BrdU (Cell Proliferation ELISA, BrdU, Roche) gemessen. (B) In parallelen Platten wurde die Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega) bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten sind in relativen Lumineszenzeinheiten (RLU, A) oder relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU, B) angegeben.

## 5.2.2 Identifizierung geeigneter Antikörper/Färbungen und Methodenetablierung mit Saos-2 Zellen

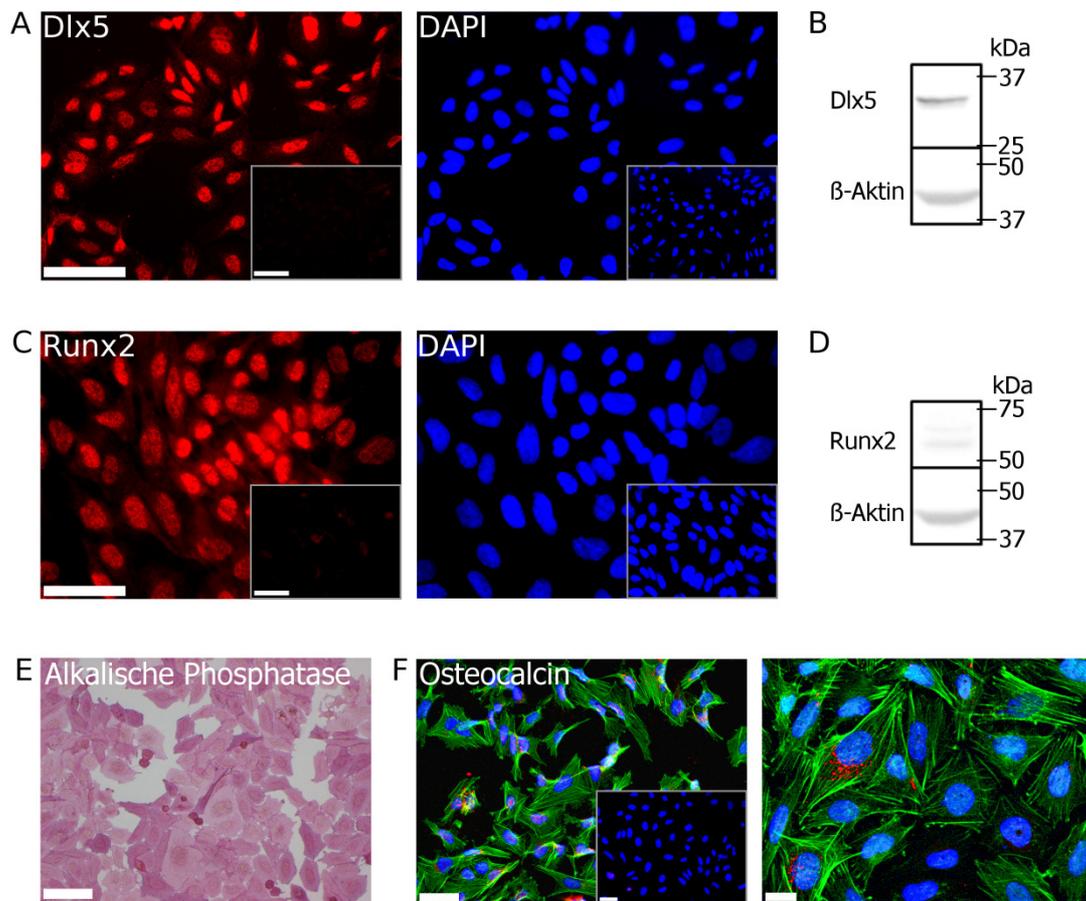
Für die Untersuchungen zur Proteinbildung in hES-MPs wurden zunächst verschiedene AK sowie ein AP-Enzymaktivitätsassay auf ihre Funktionalität und Spezifität getestet und Methoden zum Nachweis der Proteine etabliert. Dies erfolgte mit der Osteosarkomzelllinie Saos-2, die ein gut etabliertes osteogenes Modellsystem für molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen ist. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Zellen ohne die Zugabe von osteogenen Induktoren verwendet. Es wurden unterschiedliche AK gegen ausgewählte osteogene Schlüsselproteine (*bone sialoprotein*, Dlx5, Kollagen Typ I, Msx2, OC, Osterix, Runx2) von verschiedenen Anbietern mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Western-Blot getestet. Für die in Abb. 12 angeführten Proteine konnten zuverlässige Nachweismethoden etabliert werden.

Dlx5 und Runx2 wurden in unterschiedlicher Stärke in allen Saos-2 Zellen nachgewiesen (Abb. 12A und C). Beide Transkriptionsfaktoren waren den Erwartungen entsprechend hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Auch mittels Western-Blot konnten die Proteine bei den erwarteten Bandenhöhen detektiert werden (Abb. 12B und D). Das Molekulargewicht von humanem Dlx5 wird von der *Universal Protein Resource* (UniProt) mit ca. 31,5 Kilodalton (kDa) für die kanonische Sequenz angesetzt. Für humanes Runx2 gibt es verschiedene Isoformen. Die bei UniProt aufgeführten Hauptisoformen besitzen ein kalkuliertes Molekulargewicht von ca. 57 kDa (Runx2-II) und 55 kDa (Runx2-I). Eine weitere Isoform ist mit 54 kDa angegeben. Runx2 wurde im Western-Blot nur schwach detektiert. Für die Experimente mit hES-MPs wurde später dann mit einem sensitiveren Chemilumineszenzsubstrat gearbeitet, was die Stärke des Nachweises deutlich verbesserte.

Saos-2 zeigen eine ca. 100- bis 1000-fach höhere AP-Aktivität als andere Osteosarkomzellen (Murray et al., 1987). In Übereinstimmung damit konnte das Enzym mittels einer Färbung zur Visualisierung der Aktivität ebenfalls in allen Saos-2 Zellen detektiert werden (Abb. 12E).

OC, bei dem es sich um einen späten Marker der Osteogenese handelt, war hingegen nur in einzelnen Zellen nachweisbar (Abb. 12F). Dabei zeigte das Färbemuster eine vesikuläre zytoplasmatische Verteilung um den Zellkern. Die Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ I erfolgte mit Maus ES Zellen (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe von Saos-2 Zellen konnte ein zuverlässiger Nachweis somit für Dlx5, Runx2, AP und OC sowie mit Maus ES Zellen für Kollagen Typ I etabliert werden und ermöglichte die Untersuchung dieser Proteine in hES-MPs.



**Abb. 12: Nachweis osteoblastärer Proteinmarker in Saos-2 Zellen.**

Der Nachweis von Dlx5 und Runx2 in Saos-2 Zellen erfolgte mit Hilfe monoklonaler AK über Immunfluoreszenzfärbungen (A und C, rote Färbung) und im Western-Blot (B und D). AP wurde über eine Färbung der Enzymaktivität detektiert (E). Die Produktion von OC (rot) und F-Aktin (grün) in Saos-2 wurde ebenfalls mittels Immunfluoreszenzfärbung überprüft (F). (A, C und F) Zellkerne wurden mit DAPI (blau) visualisiert. Aufnahmen der entsprechenden Isotypkontrollen (C und F) bzw. der Kontrolle ohne 1. AK (A) sind als kleinere Bildeinschübe abgebildet und zeigten keine spezifische Färbung. Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$  in (A und E), 50  $\mu\text{m}$  in (C und F, linkes Bild) und 20  $\mu\text{m}$  in (F, rechtes Bild). (B und D) Je 50  $\mu\text{g}$  Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Western-Blot Dlx5 und Runx2 mittels spezifischer AK detektiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa=Kilodalton.

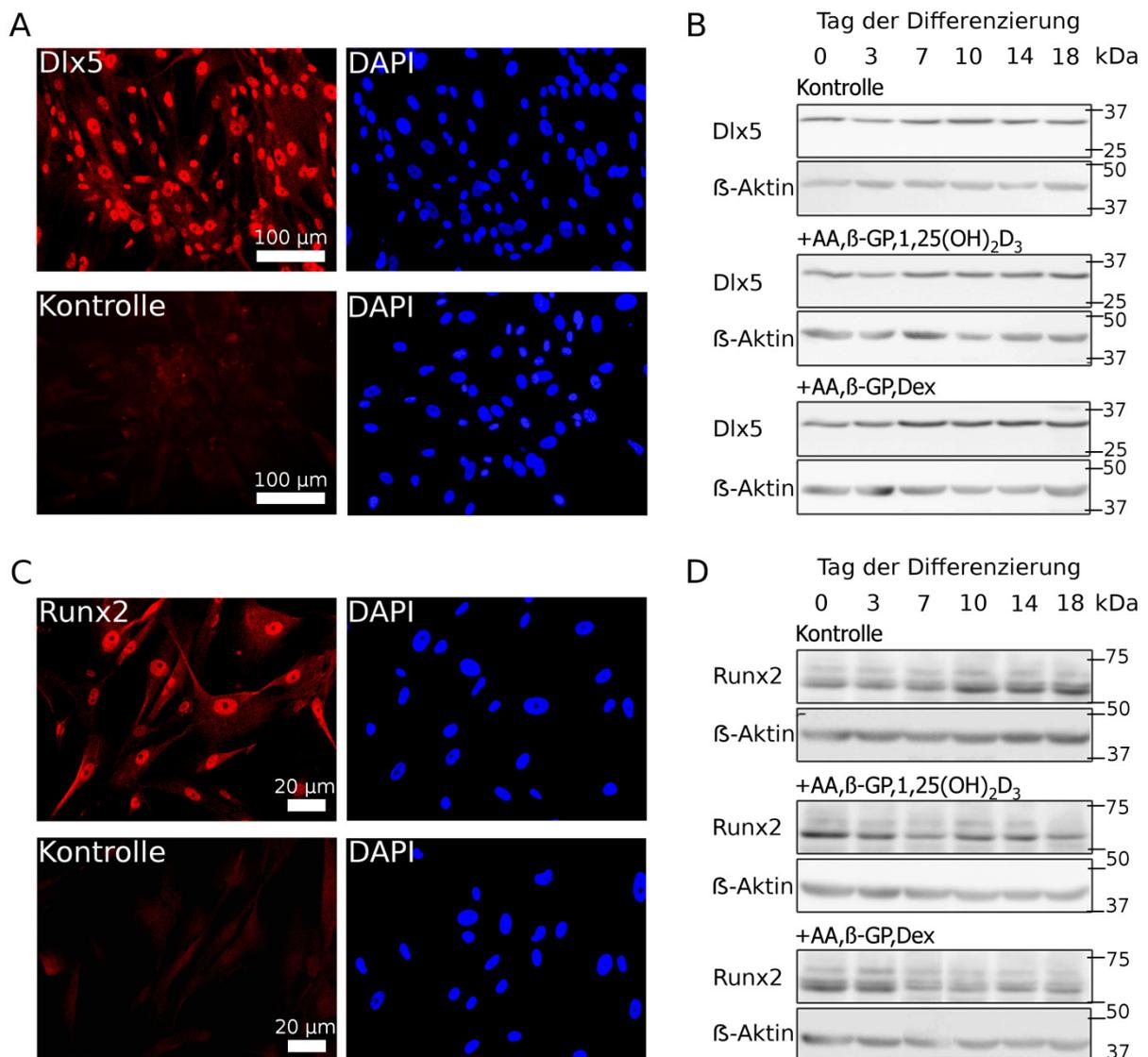
### 5.2.3 Bildung früher osteogener Markerproteine in hES-MPs

Dlx5, Runx2 und AP sind charakteristische Marker der Knochenentwicklung, die bereits frühe Prozesse der osteogenen Differenzierung von Zellen maßgeblich mit regulieren. Die Biosynthese bzw. Aktivität der drei Marker wurde daher auf Proteinebene mit zytochemischen Färbungen und Western-Blot Analysen in hES-MPs untersucht.

Bemerkenswerterweise wurden sowohl Dlx5 als auch Runx2 bereits von fast allen Zellen der

nicht-differenzierenden hES-MPs synthetisiert (Abb. 13A und C). Beide Transkriptionsfaktoren waren, wie erwartet, vorrangig in den Nuklei lokalisiert und ihre Intensität variierte zwischen einzelnen Zellen. Ein Nachweis der Proteine war auch im Western-Blot möglich (Abb. 13B und D). Dlx5 wies in differenzierenden hES-MPs über einen Zeitraum von 18 Tagen keine wesentliche Veränderung in der Bildung auf, unabhängig von den gewählten Induktionsbedingungen (Abb. 13B). Im Gegensatz dazu verringerte sich die Proteinsynthese von Runx2 ab Tag 7 insbesondere in den mit AA,  $\beta$ -GP, Dex, aber auch leicht in den mit AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induzierten Kulturen im Vergleich zur Kontrolle ohne Induktoren (Abb. 13D).

Eine starke Proteinbiosynthese von Dlx5 und Runx2 findet daher bereits in nicht-differenzierenden hES-MPs statt und eine durch osteogene Supplemente induzierte Veränderung der Bildung war im Verlauf der Differenzierung nur für Runx2 zu beobachten.



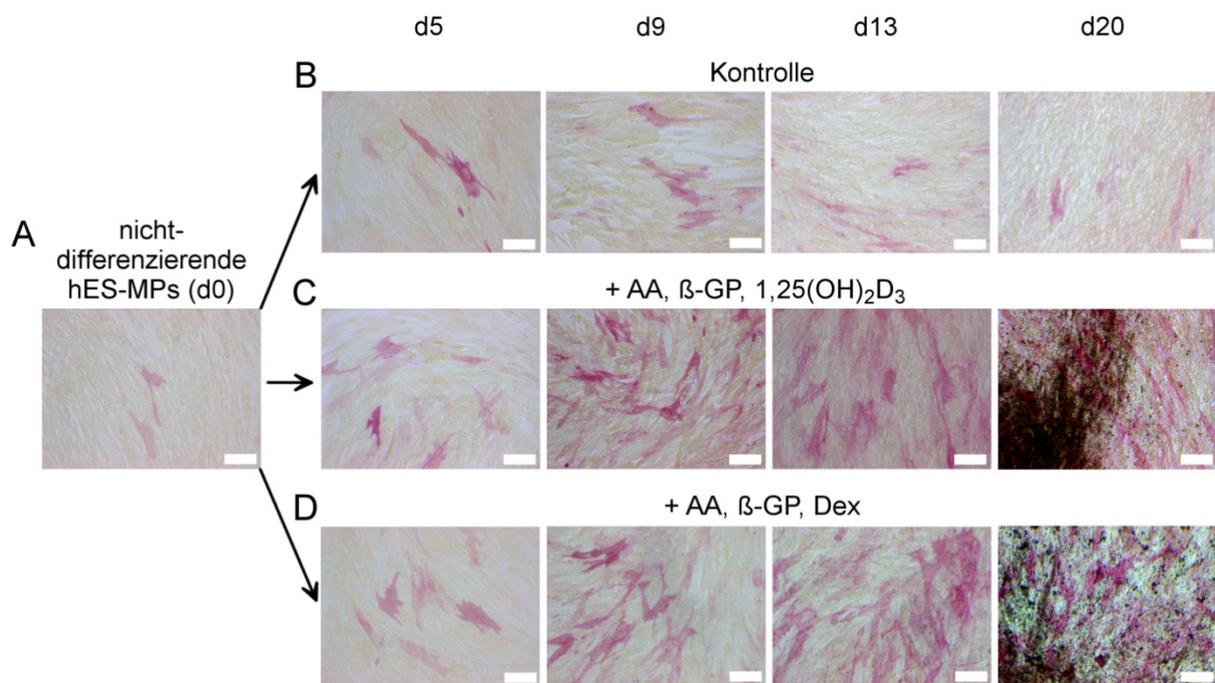
**Abb. 13: Bildung von Dlx5 und Runx2 in hES-MPs.**

Für die Immunfluoreszenzfärbung von nicht-differenzierenden hES-MPs (A und C) wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert, mit PFA fixiert und mit Hilfe monoklonaler AK gegen Dlx5 (A, rot) und Runx2 (C, rot) gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) visualisiert. Entsprechende Kontrollen zeigten keine spezifische Färbung (ohne 1. AK in A bzw. Isotypkontrolle in C). Die Western-Blot Methode wurde zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Biosynthese von Dlx5 (B) und Runx2 (D) in differenzierenden hES-MPs verwendet. Die Zellen wurden ohne (Kontrolle) oder mit Supplementierung von AA,  $\beta$ -GP, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oder AA,  $\beta$ -GP, Dex kultiviert. Je 50  $\mu$ g der Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Western-Blot die untersuchten Proteine mittels spezifischer AK detektiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle. kDa=Kilodalton.

Eine Aktivität des Enzyms AP war in nicht-differenzierenden hES-MPs histochemisch nur in Einzelzellen nachweisbar (Abb. 14A). In differenzierenden Kulturen führte eine Supplementierung mit AA,  $\beta$ -GP, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Abb. 14C) oder AA,  $\beta$ -GP, Dex (Abb. 14D) zu einer leich-

ten Zunahme der Aktivität am Tag 5 und zu einer deutlichen Steigerung an den Tagen 9–20 im Vergleich zu den Kontrollkulturen ohne Induktoren (Abb. 14B). Wie erwartet fand die Zunahme der AP-Aktivität nach der Hauptproliferationsphase von hES-MPs (vgl. Abb. 11A) und vor Initialisierung der Mineralisierung statt (erkennbar am Tag 20 als dunkle Areale in Abb. 14).

Osteogene Induktoren bedingen daher eine Zunahme der AP-Aktivität in differenzierenden hES-MPs.



**Abb. 14: Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase (AP) in hES-MPs.**

Nicht-differenzierende (A) sowie differenzierende Zellen ohne (B) oder mit Zugabe von AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (C) oder AA,  $\beta$ -GP, Dex (D) wurden in 24-well Platten kultiviert, mit Citrat/Aceton/Formaldehyd fixiert und mit einem Naphthol AS-BI/Fast Red Violet LB-basierten Alkaline Phosphatase Kit (Sigma) gefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$ .

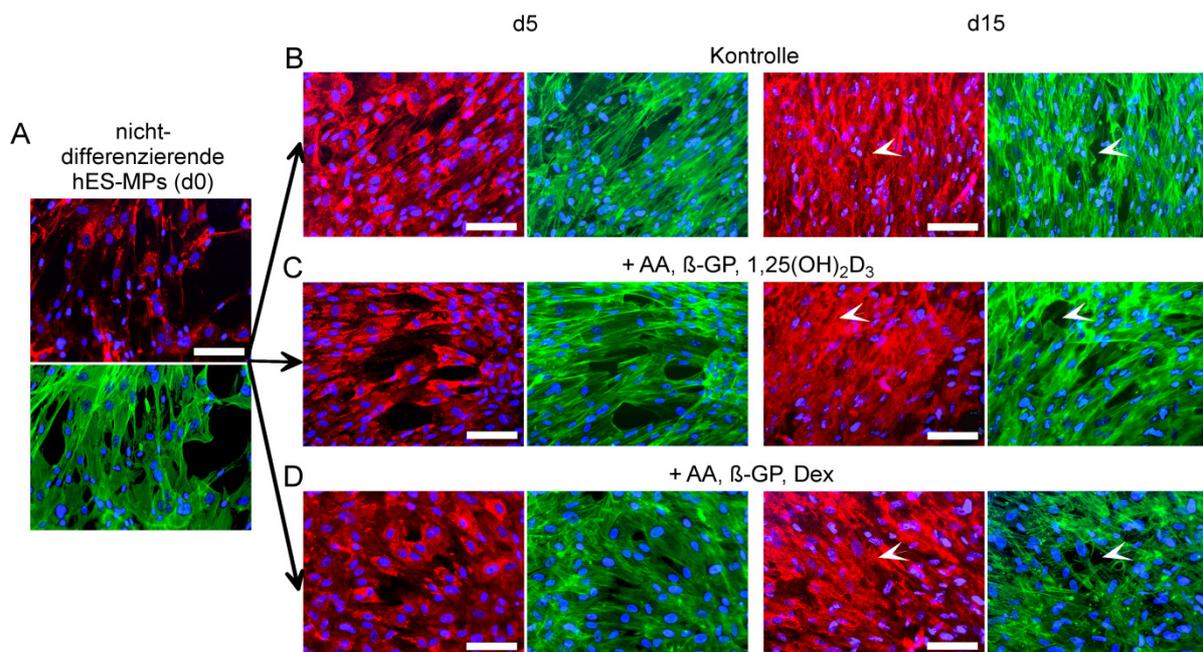
#### 5.2.4 Ausbildung der extrazellulären Matrix in hES-MP Kulturen

Kollagen Typ I ist ebenfalls ein früher Marker der Osteogenese und das prominenteste Protein der ECM in Knochengewebe. Die Ausbildung der ECM wurde daher mittels Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ I über einen Zeitraum von 15 Tagen untersucht (Abb. 15, rote Färbung). Zusätzlich wurde das Zytoskelett der Zellen mit einer Färbung von F-Aktin visualisiert (Abb. 15, grüne Färbung).

In Übereinstimmung mit vergleichenden Genexpressionsstudien zwischen hES-MPs und der

parentalen ES Zelllinie (de Peppo et al., 2010b) bildeten nicht-differenzierende hES-MPs bereits Kollagen Typ I (Abb. 15A). Das Protein lag hier vorwiegend intrazellulär vor. Diese Lokalisation war auch am Tag 5 der Differenzierung dominant, sowohl in den induzierten als auch den Kontrollkulturen ohne Induktoren (Abb. 15B–D). Bis Tag 15 veränderte sich das Färbemuster deutlich. Die Ausbildung eines mehrlagigen, fibrillären Netzwerks war erkennbar und Kollagen Typ I konnte auch extrazellulär nachgewiesen werden (weiße Pfeilspitzen, im Vergleich zur entsprechenden F-Aktin Färbung). Unter allen Induktionsbedingungen wurde Kollagen Typ I extensiv gebildet und zeigte ein vergleichbares Färbemuster über die Zeit. Diese Resultate sind in Übereinstimmung damit, dass der Aufbau der ECM eine Voraussetzung für die Mineralisierung darstellt (vgl. Abb. 10).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Differenzierung von hES-MP Kulturen mit der ausgeprägten Synthese eines Kollagen Typ I-Netzwerks für alle Induktionsbedingungen einhergeht.



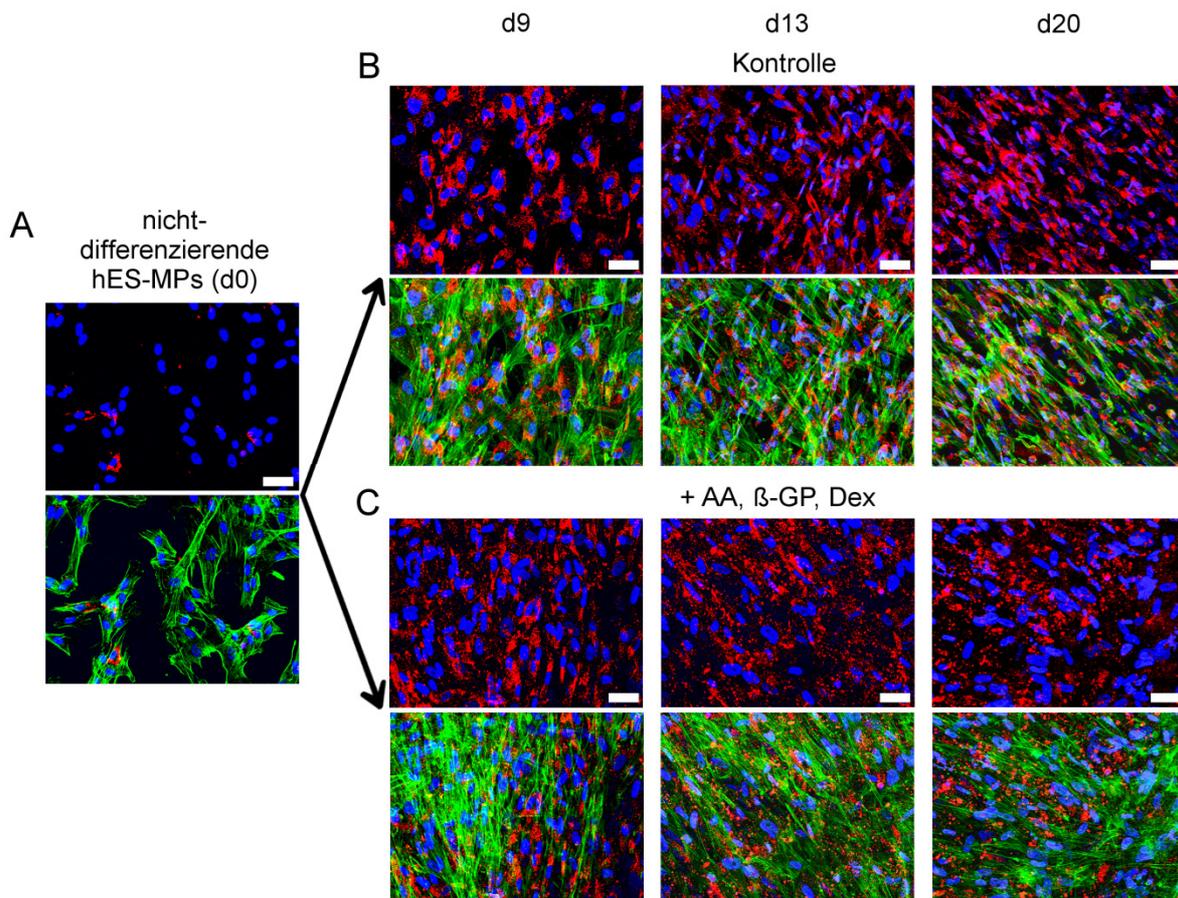
**Abb. 15: Bildung von Kollagen Typ I in hES-MPs.**

Nicht-differenzierende (A) sowie differenzierende Zellen ohne (B) oder mit Zugabe von AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (C) oder AA,  $\beta$ -GP, Dex (D) wurden mit PFA fixiert und gegen Kollagen Typ I (rot) und F-Aktin (grün, selber Bildausschnitt wie für Kollagen) gefärbt. DAPI wurde zur Detektion der Zellkerne (blau) verwendet. Bereiche mit extrazellulärer Lokalisation von Kollagen Typ I sind durch weiße Pfeilspitzen markiert (vgl. mit dem zugehörigen F-Aktin Bild). Kontrollen ohne 1. AK zeigten keine Färbung (Daten nicht gezeigt). Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$ .

OC ist ein von Osteoblasten produziertes Protein, das zum größten Teil in die ECM sezerniert

nirt wird, dort mit hoher Affinität an Hydroxyapatit und Calcium bindet und die Mineralisierung reguliert. Die Bildung des Proteins wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung über einen Zeitraum von 20 Tagen in hES-MPs ohne (Kontrolle) und mit Zugabe von AA,  $\beta$ -GP, Dex untersucht (Abb. 16, rote Färbung). Zur besseren Unterscheidung der Lokalisation von OC wurde das Zytoskelett durch eine Färbung gegen F-Aktin visualisiert (Abb. 16, grüne Färbung).

Nicht-differenzierende hES-MPs produzierten OC nur sehr vereinzelt (Abb. 16A). Das Protein wies dabei eine dichte vesikuläre Verteilung im Zytoplasma auf. Am Tag 9 der Differenzierung stieg die Zahl positiv gefärbter Zellen deutlich an, sowohl in den Kontrollen als auch in den induzierten Kulturen (Abb. 16B und C). Es handelte sich dabei vorwiegend um eine intrazelluläre Lokalisation, die vergleichbar war mit der am Tag 0 bei nicht differenzierenden hES-MPs. Dieses Färbemuster blieb für die Kontrollkulturen bis Tag 20 dominant. Im Gegensatz dazu wiesen die induzierten Zellen ab Tag 13, mit Beginn der Mineralisierung (vgl. Abb. 10), eine diffusere Verteilung auf. Die granulären Strukturen im Zytoplasma hatten sich weitgehend aufgelöst und wichen einer Cluster-förmigen Färbung. Dieses Muster intensivierte sich bis Tag 20. Mit Bezug zur F-Aktin Färbung schienen diese Cluster vorwiegend extrazellulär vorzuliegen, was für eine Sezernierung und Akkumulation von OC in der ECM spricht. Differenzierende hES-MPs bilden daher verstärkt OC, das bei Zugabe osteogener Induktoren in der ECM akkumuliert.



**Abb. 16: Bildung von Osteocalcin (OC) in hES-MPs.**

Nicht-differenzierende (A) sowie differenzierende Zellen ohne (B) oder mit Zugabe von AA,  $\beta$ -GP, Dex (C) wurden mit PFA fixiert und gegen OC (rot) und F-Aktin (grün) gefärbt. DAPI wurde zur Visualisierung der Zellkerne (blau) verwendet. Das jeweilige obere Bild zeigt die Färbung für OC und DAPI, bei der jeweiligen unteren Aufnahme handelt es sich um denselben Bildausschnitt mit zusätzlicher F-Aktin Färbung. Isotypkontrollen zeigten keine Färbung (Daten nicht gezeigt). Maßstabsbalken entsprechen 50  $\mu$ m.

### 5.2.5 Mineralisierung von hES-MPs

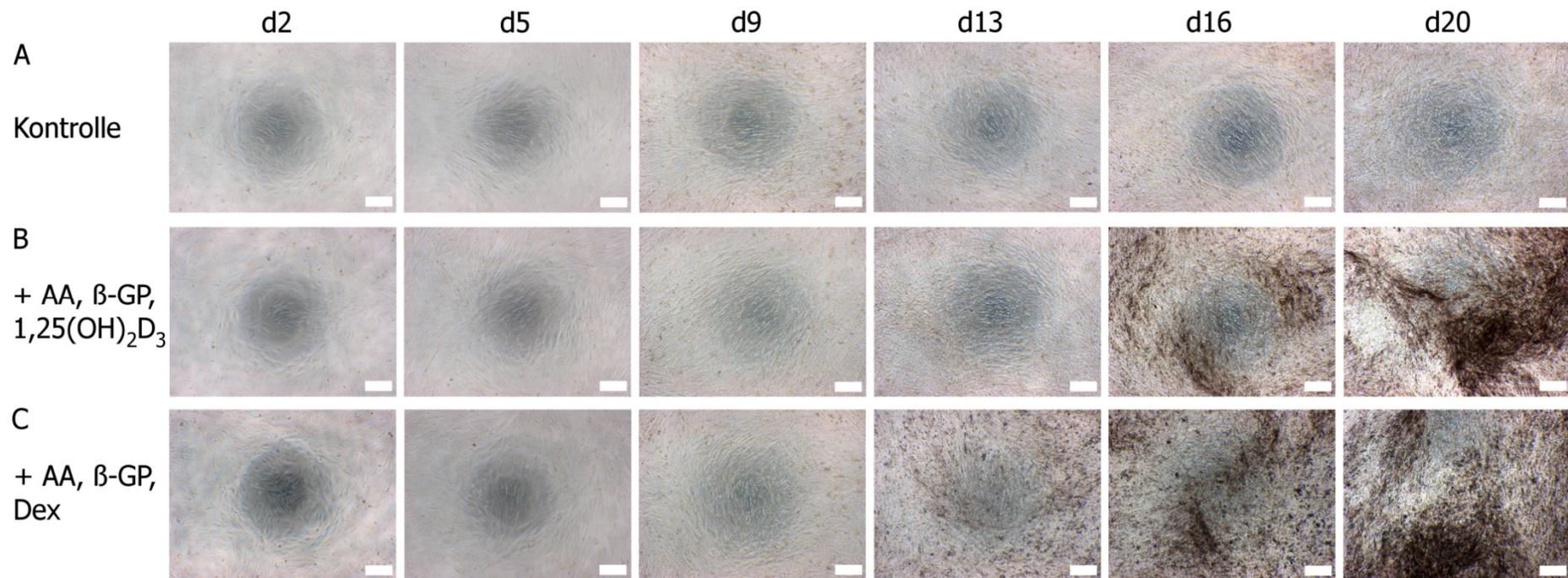
Die morphologischen Veränderungen während der Differenzierung von hES-MPs, insbesondere im Hinblick auf die Mineralisierung, wurden lichtmikroskopisch dokumentiert und sind in Abb. 17 dargestellt.

Sowohl die Kontrollkulturen ohne Induktoren (Abb. 17A) als auch mit AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Abb. 17B) oder AA,  $\beta$ -GP, Dex (Abb. 17C) induzierte hES-MPs wuchsen als Monolayer. Am Tag 2 verteilten sich die Zellen einzeln oder in kleinen Gruppen auf den Platten, erreichten bis ca. Tag 5 aber ein konfluentes Stadium. Am Tag 9 hatte sich ein dichter Zellrasen für alle Bedingungen ausgebildet, auf dem vereinzelt abgestorbene Zellen und Zelltrümmer hafteten.

Initiale Zeichen für eine Mineralisierung waren in den mit AA,  $\beta$ -GP, Dex supplementierten Kulturen bereits am Tag 13 durch eine flächige Verteilung dunkler Areale auf dem Zellrasen erkennbar (Abb. 17C). Diese Bereiche verstärkten sich deutlich in Intensität und Umfang bis Tag 20. Mineralablagerungen in mit AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induzierten Kulturen waren lichtmikroskopisch erst etwas später erkennbar (Abb. 17B), hatten am Tag 16 jedoch einen vergleichbaren Grad zu den mit Dex behandelten hES-MPs und nahmen ebenso bis Tag 20 in Intensität und Umfang deutlich zu. Die Kontrollkulturen wiesen zu keinem Zeitpunkt erkennbare mineralisierte Bereiche auf (Abb. 17A).

Ein qualitativer Nachweis der Mineralisierung erfolgte mit der von Kossa und der Alizarin Rot S Färbung und ist in Kapitel 5.1.3 bereits besprochen worden. Die in Abb. 10 gezeigte von Kossa und die im Anhang in Abb. A1 dargestellte Alizarin Rot S Färbungen bestätigen die Beobachtung, dass die Mineralisierung in Dex-induzierten Kulturen früher beginnt als bei hES-MPs, die mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  differenziert wurden.

Es lässt sich festhalten, dass induzierte hES-MPs im Laufe der Differenzierung eine dichte Mineralisierung ausbilden, die in mit Dex supplementierten Kulturen früher beginnt als bei Zugabe von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .



**Abb. 17: Differenzierungsverlauf von hES-MPs.**

Phasenkontrastaufnahmen der typischen morphologischen Veränderungen von osteogen differenzierenden hES-MPs ohne (A) und mit Supplementierung von AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (B) oder AA,  $\beta$ -GP, Dex (C). Mineralisierte Bereiche sind lichtmikroskopisch als dunkle Areale erkennbar. Maßstabsbalken entsprechen 200  $\mu\text{m}$ .

In Bezug auf die Identifizierung molekularer Marker während der osteogenen Differenzierung von hES-MPs konnten gut detektierbare differenzierungsbedingte Veränderungen für Runx2, AP, Kollagen Typ I, OC und die Mineralisierung festgestellt werden. Für Kollagen Typ I und OC jedoch war eine Zunahme der Bildung bzw. Akkumulation in der ECM (Kollagen Typ I) nicht nur in den induzierten Kulturen erkennbar, sondern in einem vergleichbaren Maß auch in den Kontrollkulturen ohne Induktoren. Daher wurden beide Proteine in den weiteren experimentellen Arbeiten zur Quantifizierung der Marker nicht weiter berücksichtigt und sich auf die Analyse von Runx2, AP und der Mineralisierung fokussiert.

### **5.3 Etablierung von Methoden zur Quantifizierung molekularer Marker**

Der Aufbau von toxikologischen Endpunkten umfasst neben der Identifizierung geeigneter Marker auch die Etablierung von zuverlässigen und sensitiven Methoden zu ihrer Quantifizierung. Neben der Anwendung biochemischer Methoden zur Messung der Mineralisierung sollte für die anderen Marker die quantitative Analyse auf Proteinebene erfolgen. Dafür wurde als Methode die Durchflusszytometrie gewählt.

#### **5.3.1 Entwicklung eines Protokolls zur Zellvereinzelung für die durchflusszytometrische Analyse**

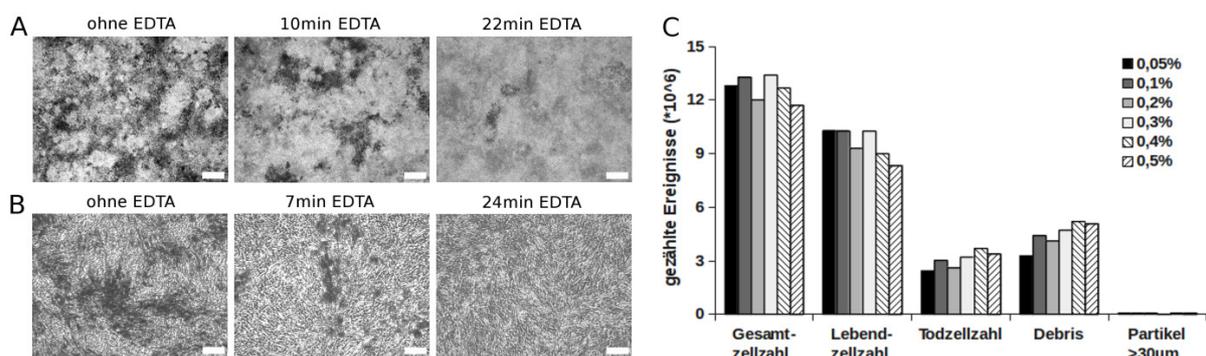
Die durchflusszytometrische Analyse hat das Ziel Untersuchungen auf Einzelzellebene durchzuführen. Die effektive Vereinzelung komplexer Zellverbände ist daher eine Grundvoraussetzung. Für die meisten 2D-Zellkulturen funktioniert dies mit den üblichen Dissoziationsmethoden problemlos. Aufgrund der stark vernetzten ECM und der voranschreitenden Mineralisierung ist die Isolierung von intakten Knochenzellen allerdings schwierig und Protokolle sind in der wissenschaftlichen Fachliteratur sehr limitiert. Daher wurde zunächst eine Methode etabliert, die eine Vereinzelung verknöcherter Zellverbände ermöglicht und sich grundlegend an einem Protokoll von Kalajzic und Kollegen (Kalajzic et al., 2005) orientiert. Hierfür wurde initial mit osteogen differenzierenden Maus ES Zellen gearbeitet und das Protokoll später auf die hES-MP Kulturen übertragen.

Zur Auflösung der calciumreichen Mineralstrukturen wurde den Zellen zunächst der Chelatbildner EDTA zugesetzt. Dieser Schritt war erst bei Differenzierungen mit erkennbarer Mineralisierung notwendig und die Inkubationszeit variierte entsprechend ihrer Ausprägung. Sowohl bei Maus ES Zellen als auch bei hES-MPs wurden lichtmikroskopisch erkennbare kalzifizierte Bereiche somit fast komplett aufgelöst (Abb. 18A und B).

Allerdings führte auch danach eine Behandlung mit 0,05–0,25 % Trypsin nur zum Ablösen eines zusammenhängenden Zellrasens. Ebenso zeigte auch die Verwendung von Accutase®, einem Enzym mit gleichzeitiger proteolytischer und kollagenolytischer Aktivität, keinen Erfolg. Vielmaliges Auf- und Abpipettieren unterstützte zwar bis zu einem gewissen Grad die Aufspaltung des Zelllayers bei den höheren Trypsinkonzentrationen, resultierte aber auch in einer hohen Anzahl an Zelltrümmern.

Die Zugabe von 0,25 % Trypsin in Kombination mit Collagenase A und einer mehrmaligen vorsichtigen mechanischen Vereinzelung verbesserte die Situation deutlich und resultierte in einer Zellsuspension mit nur noch vereinzelt vorkommenden größeren Zellverbänden. Es wurden verschiedene Konzentrationen von Collagenase A getestet, wobei höhere Konzentrationen tendenziell zu einer höheren Anzahl von toten Zellen und Zelltrümmern in Maus ES Zellkulturen führten, ohne die Gesamtausbeute an Zellen zu steigern (Abb. 18C). Daher wurde mit einer Konzentration von 0,05 % Collagenase A weitergearbeitet. Auch bei dieser Methode blieb eine anteilige Destruktion von Zellen nicht aus, allerdings war die gemessene Lebendzellzahl mit 10,3 Millionen Zellen 4-mal höher als die Anzahl toter Zellen mit 2,4 Millionen Zellen (Abb. 18C).

Das etablierte Protokoll wurde daher als geeignet betrachtet, um einen ausreichenden und repräsentativen Pool an Zellen für die durchflusszytometrische Analyse zur Verfügung zu stellen.



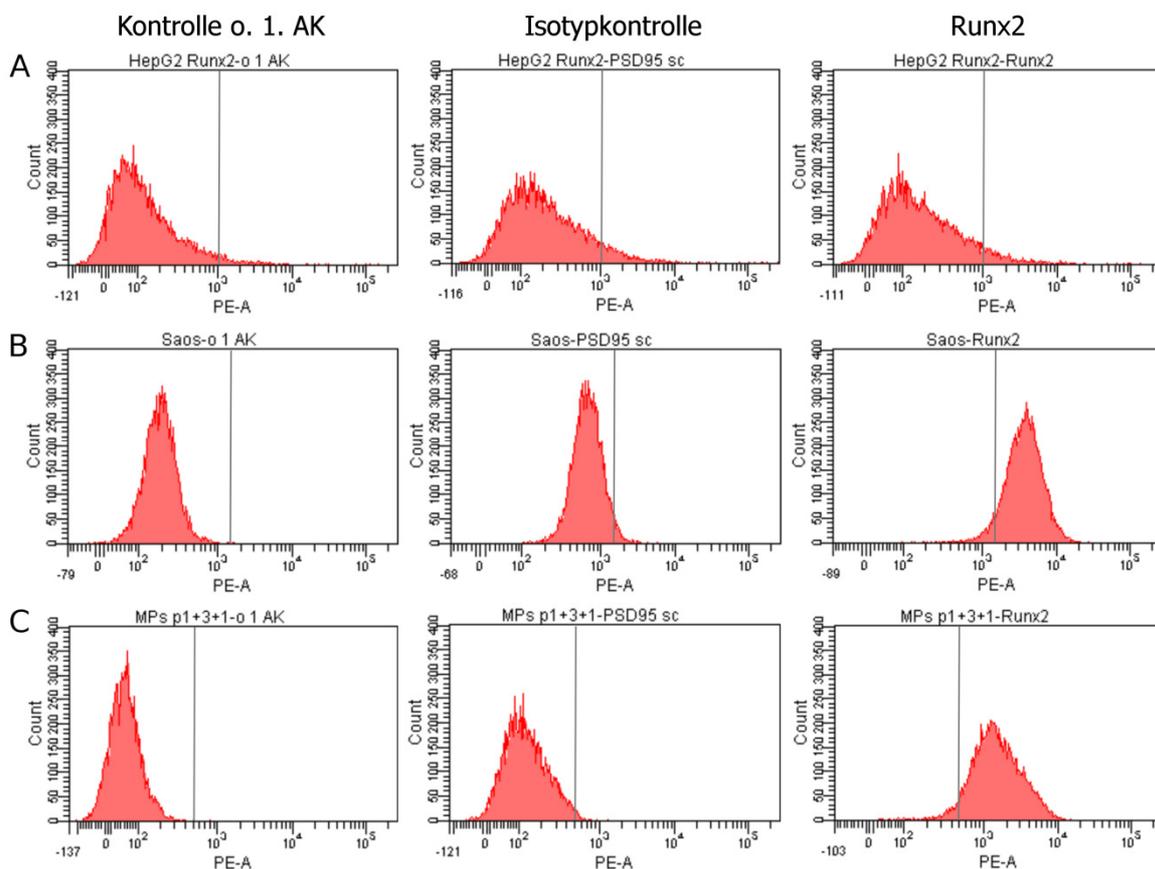
**Abb. 18: Vereinzelung osteogener Zellkulturen für die durchflusszytometrische Analyse.**

Die Behandlung mit 1 % EDTA führte zur Auflösung mineralisierter Bereiche in osteogen differenzierenden Maus ES Zellen (d31, A) und hES-MPs (d23, B). (C) Anschließend wurden mit den Maus ES Zellen unterschiedliche Konzentrationen von Collagenase A in Kombination mit 0,25 % Trypsin auf ihr Potential zur Vereinzelung der Zelllayer getestet. Zur Bestimmung viabler und toter Zellen sowie der Anzahl an Zelltrümmern und -aggregaten wurden die Zellsuspensionen mit CASY blue versetzt und im CASY Zellzähler vermessen.

### 5.3.2 Quantifizierung von Runx2

Zur Überprüfung der Funktionalität und Spezifität des bereits für die Immunfluoreszenzfärbungen und den Western-Blot eingesetzten AK wurden für die durchflusszytometrische Analyse von Runx2 zunächst vergleichende Experimente mit der humanen hepatozellulären Karzinomazelllinie HepG2 als Negativkontrolle, den Saos-2 als Positivkontrolle und den nicht-differenzierenden hES-MPs durchgeführt. Der AK wurde dabei im Überschuss zu den Zellen gegeben, um eine Färbung aller positiven Zellen in den verschiedenen Kulturen zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu HepG2 (Abb. 19A) zeigten sowohl Saos-2 (Abb. 19B) als auch hES-MPs (Abb. 19C) ein spezifisches Signal im Vergleich zu den Kontrollen ohne 1. AK und den Isotypkontrollen. In Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 12C und Abb. 13C) war der überwiegende Teil der Populationen beider Zelltypen positiv für Runx2.



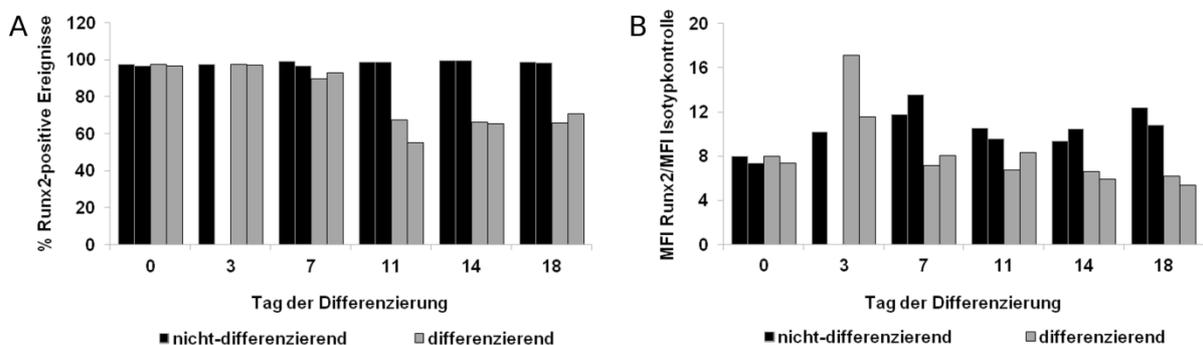
**Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse von Runx2 in verschiedenen humanen Zelllinien.**

HepG2 (A), Saos-2 (B) und nicht-differenzierende hES-MPs (C) wurden mit CytoFix fixiert, mit Perm/Wash permeabilisiert und mit einem monoklonalen AK gegen Runx2 gefärbt. Eine Kontrolle ohne 1. AK und eine Isotypkontrolle wurden mitgeführt. Die Analyse von je 10.000 Zellen erfolgte am BD FACSCanto II. Gezeigt sind Histogramme der Fluoreszenzverteilung.

Zur Feststellung, ob eine Veränderung der Bildung von Runx2 während der Differenzierung von hES-MPs mittels Durchflusszytometrie quantifizierbar ist, wurde beispielhaft mit AA,  $\beta$ -GP, Dex-induzierten Zellen gearbeitet, die fortlaufend expandierten, nicht-differenzierenden hES-MPs gegenübergestellt wurden. Letztgenannte zeigten auch bei längerer Kultivierung eine konstant hohe Prozentzahl an Runx2-positiven Zellen von  $> 96\%$  (Abb. 20A). In den differenzierenden Kulturen blieb die Anzahl Runx2-produzierender Zellen bis Tag 3 vergleichbar hoch zu den nicht-differenzierenden und nahm dann bis Tag 11 um ca. 40 % ab, wobei dieses Level für den restlichen Untersuchungszeitraum gleich blieb. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Western-Blot Daten (Abb. 13D), die eine Abnahme des Proteins ab Tag 7 zeigten.

Im selben Datensatz wurde zudem die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Zellen ausgewertet, um Veränderungen der zellulären Produktionsstärke von Runx2 zu erfassen (Abb. 20B). Nicht-differenzierende hES-MPs zeigten hier oszillierende Schwankungen über die verschiedenen Passagen. Differenzierende Kulturen wiesen hingegen eine relativ konstante Fluoreszenzintensität über alle Messtage auf, mit Ausnahme eines Peaks am Tag 3, dessen Höhe allerdings zwischen den biologischen Replikaten unterschiedlich ausfiel.

Eine gut quantifizierbare Veränderung bietet daher nur die Messung der Anzahl Runx2-positiver Zellen.



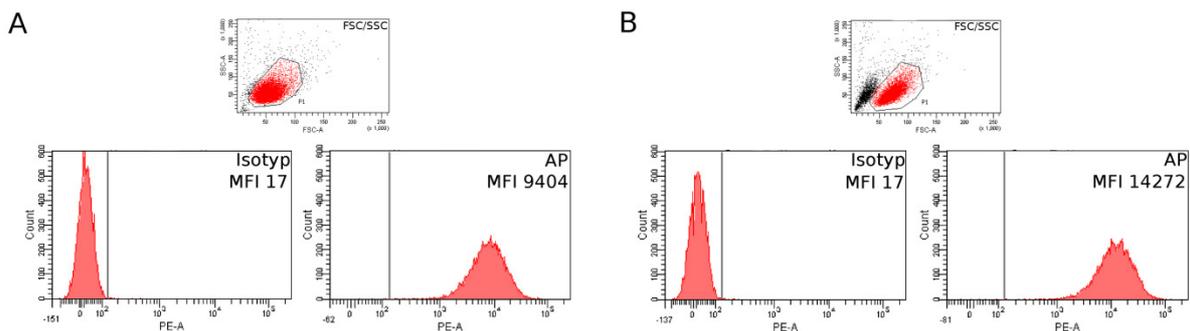
**Abb. 20: Durchflusszytometrische Quantifizierung von Runx2 in hES-MPs.**

Mit AA,  $\beta$ -GP, Dex induzierte hES-MPs (graue Balken) wurden über 18 Tage differenziert. Als Kontrolle dienten nicht-differenzierende hES-MPs, die fortlaufend expandiert wurden (schwarze Balken). Die Zellen wurden mit CytoFix fixiert, mit Perm/Wash permeabilisiert und mit einem monoklonalen AK gegen Runx2 gefärbt. Die Analyse von je 10.000 Zellen erfolgte am BD FACSCanto II. Das Gating Runx2-positiver Zellen wurde im Vergleich zu einer Isotypkontrolle durchgeführt. In (A) ist die Analyse der Runx2-positiven Zellen und in (B) die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen relativ zur MFI der Isotypkontrolle dargestellt. Gezeigt sind die Werte von zwei biologischen Replikaten (mit Ausnahme von nicht-differenzierenden Zellen am Tag 3, für die nur eine Probe vorlag).

### 5.3.3 Quantifizierung von Alkalischer Phosphatase

Zur Quantifizierung von AP wurde eine durchflusszytometrische Analyse angewandt, die das Enzym an der äußeren Zellmembran nachweist. Eingangs wurde getestet, ob das für die Vereinzelung von differenzierenden hES-MPs etablierte Protokoll, das eine vergleichsweise raue Aufarbeitung beinhaltet, möglicherweise Epitope des AP AK beschädigt und die Färbung damit negativ beeinflusst.

Hierfür wurden Saos-2, bei denen alle Zellen AP-Aktivität aufweisen (Abb. 12E), entweder mit 0,05 % Trypsin/EDTA oder mit 0,05 % Collagenase A/0,25 % Trypsin vereinzelt und gegen AP gefärbt. Wie erwartet bildeten alle Zellen AP und die Färbung war bei der Aufarbeitung mit 0,05 % Trypsin/EDTA sehr gut von der Isotypkontrolle abgrenzbar (Abb. 21A). Die Dissoziation mit 0,05 % Collagenase A/0,25 % Trypsin führte im Vergleich zu einer höheren Anzahl an Zelldebris und toten Zellen, allerdings zu keiner Beeinträchtigung der Anzahl AP-positiver Zellen (bezogen auf die gezählten Ereignisse) oder der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (Abb. 21B).



**Abb. 21: Einfluss der Dissoziationsmethode auf die Färbung von zellmembranständiger AP für die Durchflusszytometrie.**

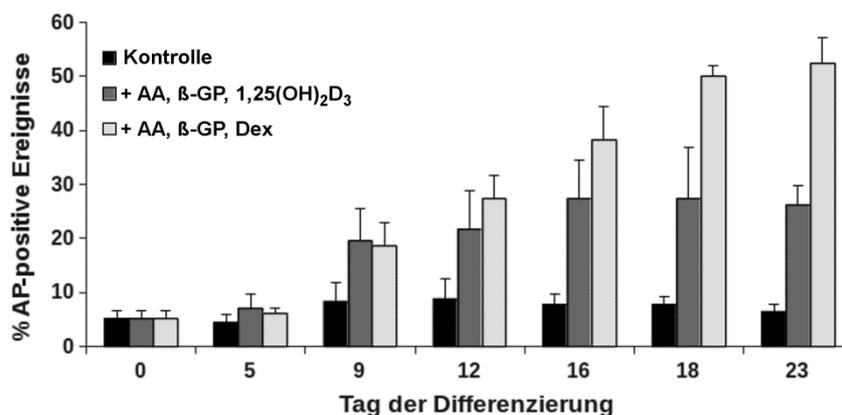
Saos-2 wurden entweder mit 0,05 % Trypsin/EDTA (A) oder 0,05 % Collagenase A/0,25 % Trypsin (B) vereinzelt und anschließend gegen AP gefärbt. Die Analyse von je 10.000 Zellen erfolgte am BD FACSCanto II. Gezeigt sind Dotplot-Diagramme der Größen- und Granularitätsverteilung von Saos-2 (obere Reihe) und Histogramme der Fluoreszenzverteilung der mit AP oder der Isotypkontrolle gefärbten Zellen (untere Reihe). MFI=durchschnittliche Fluoreszenzintensität.

Die Quantifizierung von AP in hES-MPs wurde vergleichend mit nicht-induzierten (Kontrolle) und mit AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder AA,  $\beta$ -GP, Dex behandelten Kulturen durchgeführt. Der AK wurde dabei im Überschuss zu den Zellen gegeben, um eine Färbung aller positiven Zellen an den verschiedenen Differenzierungstagen zu gewährleisten.

Die Kontrollkulturen zeigten über den gewählten Analysezeitraum von 23 Tagen eine gleichbleibend niedrige Anzahl AP-positiver Zellen von unter 10 % (Abb. 22). Im Gegensatz dazu

fürte eine Stimulation der Zellen mit AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu einem Anstieg zwischen Tag 5 und 16 auf annähernd 30 %. Bis Tag 23 wurde dieses Level beibehalten. Im Vergleich zu diesen Kulturen wiesen mit AA,  $\beta$ -GP, Dex induzierte hES-MPs bereits am Tag 12 einen höheren Anstieg auf und die Anzahl AP-positiver Zellen nahm über den gesamten Analysezeitraum konstant weiter zu. So war am Tag 23 bei über 50 % der Zellen AP detektierbar.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der beobachteten höheren Aktivität von AP in induzierten Zellen ab Tag 9 der Differenzierung (Abb. 14) und zeigen, dass ein hoher Anteil der hES-MPs AP produziert. Eine differenzierungsbedingte Zunahme des Markers ist dabei durchflusszytometrisch gut quantifizierbar.



**Abb. 22: Durchflusszytometrische Quantifizierung von AP in differenzierenden hES-MPs.**

Zellen wurden ohne (Kontrolle, schwarze Balken) oder mit Zugabe von AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (dunkelgraue Balken) oder AA,  $\beta$ -GP, Dex (hellgraue Balken) differenziert und gegen AP gefärbt. Die Analyse von je 10.000 Zellen erfolgte am BD FACSCanto II. Tote Zellen wurden mittels 7-AAD Färbung von der Analyse ausgeschlossen und AP-positive Zellen wurden im Vergleich zu einer Isotypkontrolle gegatet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

### 5.3.4 Quantifizierung der Mineralisierung

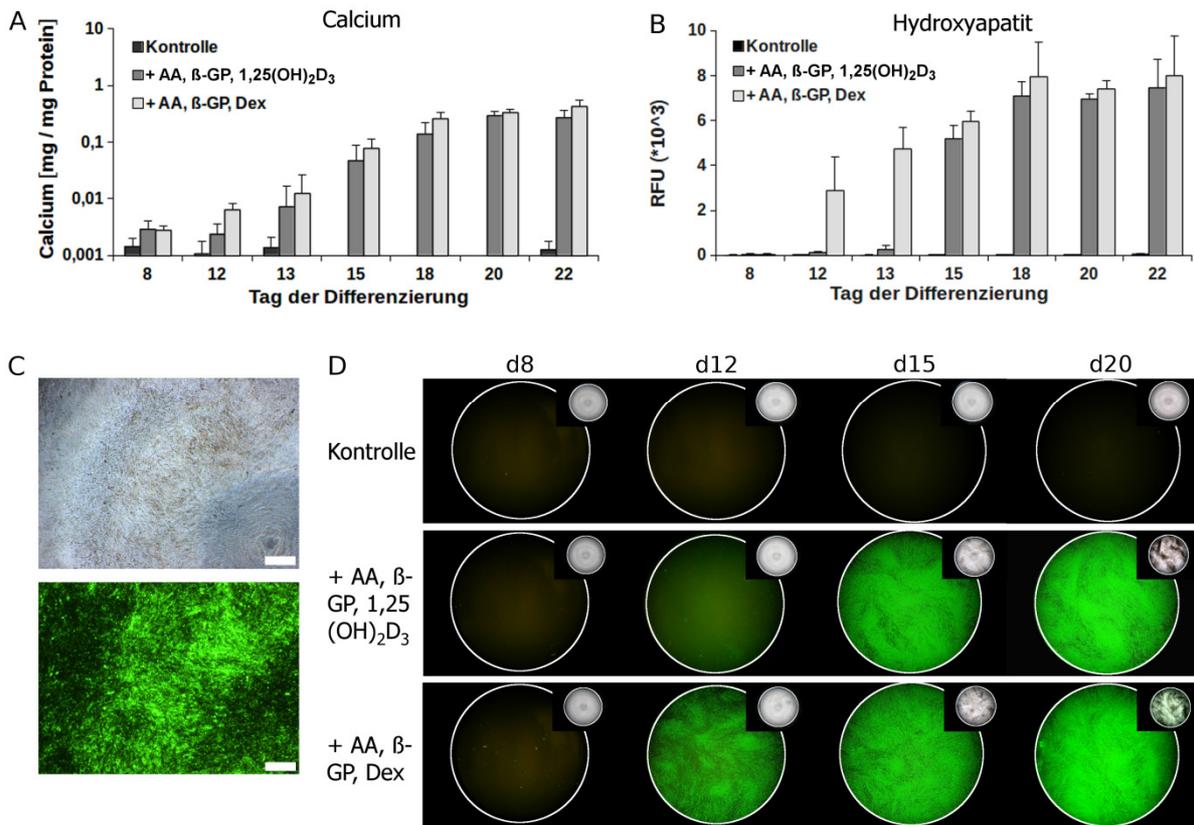
Die Fähigkeit zur Bildung einer ossifizierten ECM ist die hervorstechendste Eigenschaft von Knochengewebe und abhängig von multiplen molekularen Prozessen. Für die Identifizierung eines geeigneten Assays zur Quantifizierung der Mineralisierung in differenzierenden hES-MPs wurden die kolorimetrische Bestimmung von Calcium und die fluoreszenzbasierte Messung von Hydroxyapatit (OsteoImage Assay) miteinander verglichen.

Mit beiden Methoden war eine Zunahme der Mineralisierung bis Tag 18 in mit AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder AA,  $\beta$ -GP, Dex induzierten Kulturen detektierbar, gefolgt von einem

Plateau bis Tag 22 (Abb. 23A und B). Die Kontrollkulturen ohne Induktoren hingegen wiesen keine Mineralisierung auf. Für die Kulturen, die mit AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt wurden, war ein Anstieg im Calcium Assay ab Tag 13 erkennbar (Abb. 23A), während für Hydroxyapatit ein sprunghafter Anstieg zwischen Tag 13 und 15 zu beobachten war (Abb. 23B). Im Gegensatz dazu zeigten mit AA,  $\beta$ -GP, Dex stimulierte hES-MPs bereits am Tag 12 erhöhte Signale in beiden Assays. Ab Tag 15 lagen für beide Induktionen vergleichbare Signale sowohl bei der Calcium Messung als auch beim Osteolmage Assay vor.

Der Fluoreszenzassay benötigt kein Ablösen der Zellen und der ECM von den Kulturplatten und ermöglicht daher eine mikroskopische Inspektion der Färbung parallel zu den Messungen. Abb. 23C illustriert die Einlagerung des fluoreszierenden Reagenzes in mineralisierte Bereiche. Areale mit stärkerer Mineralisierung (lichtmikroskopisch erkennbar an den dunkleren Bereichen) zeigen hier auch eine ausgeprägtere Fluoreszenz. In Übereinstimmung mit der in Abb. 23B gezeigten Messung wiesen induzierte hES-MPs im Vergleich zu den Kontrollkulturen ohne Induktoren eine zeitabhängige Zunahme in der Menge und Intensität der fluoreszenzmarkierten Bereiche auf (Abb. 23D). In mit AA,  $\beta$ -GP, Dex behandelten hES-MPs waren fluoreszierende Strukturen dabei bereits früher (Tag 12) erkennbar als in Kulturen, die mit AA,  $\beta$ -GP,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimuliert wurden.

Diese Daten zeigen, dass sich die zunehmende Mineralisierung von differenzierenden hES-MPs gut und einfach quantifizieren lässt und mineralisierte Bereiche bereits zu einem frühen Zeitpunkt nachweisbar sind.



**Abb. 23: Quantifizierung der Mineralisierung in differenzierenden hES-MPs.**

Die Zellen wurden ohne (Kontrolle, schwarze Balken) oder mit Zugabe von AA, β-GP, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (dunkelgraue Balken) oder AA, β-GP, Dex (hellgraue Balken) differenziert. (A) Für die Quantifizierung von intra- und extrazellulärem Calcium erfolgte eine sequentielle Aufarbeitung der Kulturen mit Triton und HCl, gefolgt von einer photometrischen Bestimmung der mit ortho-Cresolphthalein gebildeten Komplexe. (B) Die Ablagerung von Hydroxyapatit in der ECM wurde nach Fixierung der Kulturen mit Methanol/Aceton über den fluoreszenzbasierten OsteoImage Mineralization Assay (Lonza) detektiert und quantitativ mittels Mikrotiterplattenlesegerät ausgewertet. (A und B) Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. (C) Lichtmikroskopische und die zugehörige Fluoreszenzaufnahme von AA, β-GP, Dex-induzierten Zellen am Tag 15 der Differenzierung nach Färbung mit dem OsteoImage Assay. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm. (D) Fluoreszenzaufnahmen der unterschiedlich induzierten hES-MPs nach Färbung mit dem OsteoImage Assay an ausgewählten Differenzierungstagen. Abgebildet ist jeweils eine ganze Vertiefung einer 96-well Platte. Die kleineren Bildeinschübe zeigen die jeweils zugehörigen lichtmikroskopischen Aufnahmen.

### 5.4 Substanztestungen

Die Eignung von hES-MPs für die Erfassung von chemisch induzierten Effekten auf die osteogene Differenzierung sollte in einem *Proof of Concept* mit Hilfe einer Auswahl von Testsubstanzen geprüft werden. Dafür wurden zunächst ein Differenzierungsprotokoll und ein Endpunkt verwendet.

Zur Induktion der Differenzierung wurde die Kombination AA,  $\beta$ -GP, Dex ausgewählt, da hiermit die höchste Produktion von AP und die früheste Mineralisierung beobachtet wurden und, unter Einbezug der Studien von de Peppo et al. (2010a), die umfangreichste Datenlage vorhanden ist. Weiterhin zeigten die hier eingesetzten Konzentrationen von Dex keine embryotoxische Aktivität in anderen Testsystemen (Genschow et al., 2004; Hansen und Grafton, 1988).

Als Endpunkt wurde die Mineralisierung eingesetzt, da die Messungen mit Calcium und Hydroxyapatit gezeigt hatten, dass diese in induzierten Kulturen bereits zu frühen Zeitpunkten (Tag 12–15) deutlich detektierbar war. Als Analysezeitpunkt wurde Tag 15 gewählt, da die Signale hier ausreichend hoch und stabil waren sowie eine gute Abgrenzung zu denen der Kontrollen aufwiesen. Zudem befanden sich die Messwerte im Anstieg und hatten noch keinen stationären Zustand erreicht. In Bezug auf den Assay wurde mit dem OsteoImage weitergearbeitet, da er eine schnelle und einfach durchzuführende Analyse erlaubt und eine visuelle Inspektion der gefärbten Kulturen parallel zur Messung möglich ist.

Zur Abgrenzung der substanzinduzierten Effekte auf die Mineralisierung von zytotoxischen Einflüssen wurde die Zellviabilität der differenzierenden hES-MPs in parallelen Ansätzen bestimmt. Dafür wurde der bereits für die Charakterisierung des Kulturwachstums eingesetzte CellTiter-Blue Assay verwendet.

Alle Testsubstanzen wurden in aufsteigenden Konzentrationen appliziert. Zur Auswertung wurde der gemittelte Wert der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle als 100 % gesetzt und die Werte der behandelten Zellen als prozentualer Anteil der Lösungsmittelkontrolle angegeben. Anhand dieser Werte wurde für jede Substanz über alle Experimente eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die einzelnen Endpunkte gefittet und die Kurven vergleichend dargestellt (Abb. 24–Abb. 26). Ein  $EC_{50}$ -Wert, definiert als die Konzentration bei der der Wert der gefitteten Kurve 50 % des Mittelwerts der Lösungsmittelkontrolle betrug, wurde für jeden Endpunkt ermittelt (Tab. 2).

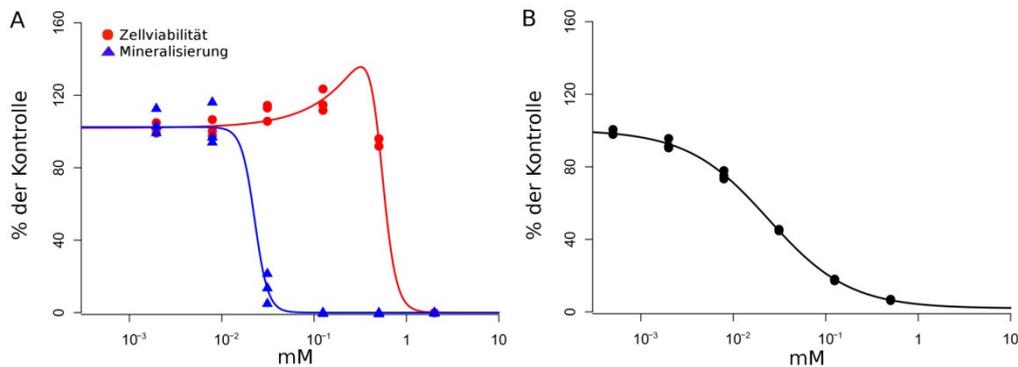
Bevor die Substanztestungen erfolgten sollte zunächst geprüft werden, ob die gewählte Methodik generell geeignet ist eine durch Chemikalien induzierte Beeinträchtigung der Mineralisierung zu detektieren. Dafür wurde mit einer positiven Referenzsubstanz gearbeitet. Des Weiteren musste ein geeigneter Zeitraum für die Exposition gegenüber den Testsubstanzen identifiziert werden. Diese Aspekte sind in den folgenden beiden Kapiteln dargestellt.

#### 5.4.1 Effekt von Levamisol auf differenzierende hES-MPs

LEV gehört zur Gruppe der Imidazothiazole und ist ein potenter Inhibitor von AP (Borgers, 1973). Diese Wirkung scheint ausschlaggebend dafür zu sein, dass LEV auch Mineralisierungsprozesse beeinträchtigt (Fallon et al., 1980; Garba und Marie, 1986). Dieser Stoff wurde in der vorliegenden Arbeit als endpunktspezifische Kontrollsubstanz eingesetzt, um die Spezifität des Assays zu testen.

Differenzierende hES-MPs wurden hierfür von Tag 1–15 der Differenzierung mit LEV behandelt und am Tag 15 die Mineralisierung und Zellviabilität erfasst. Die Messung von Hydroxyapatit zeigte, dass LEV konzentrationsabhängig die Mineralisierung inhibierte (Abb. 24A) mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 0,020 mM (Tab. 2). Die Zellviabilität war erst bei ca. 30-fach höheren Konzentrationen beeinträchtigt ( $p < 0,0007$ ), was demonstriert, dass der Effekt auf die Mineralisierung spezifisch war und erwartungsgemäß nicht durch eine zytotoxische Wirkung verursacht wurde. Die AP-Aktivität in Gesamtzelllysaten von hES-MPs, die bis Tag 13 differenziert wurden, war im gleichen Konzentrationsbereich vermindert wie die Mineralisierung (Abb. 24B) und ist daher vermutlich die Ursache für die letztgenannte Beobachtung. Die Effekte von LEV zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit und traten bei Konzentrationen auf, die die Kalzifizierung in anderen osteoblastären Zellkulturmodellen negativ beeinflusste (Chang et al., 2000; Nakano et al., 2007).

LEV scheint daher eine geeignete positive Standardreferenzsubstanz für den Endpunkt Mineralisierung zu sein. Ferner konnte gezeigt werden, dass mit dem verwendeten Ansatz eine spezifische Beeinträchtigung der Bildung mineralisierter Bereiche detektiert werden kann.



**Abb. 24: Effekt von Levamisol (LEV) auf die Mineralisierung, Zellviabilität und AP-Aktivität in differenzierenden hES-MPs.**

(A) hES-MPs wurden in 96-well Platten für 15 Tage differenziert und mit steigenden Konzentrationen von Levamisol (LEV) behandelt. Die Zellviabilität (rot) wurde mit dem CellTiter-Blue Assay und die Mineralisierung (blau) mit dem Osteolmage Assay erfasst. RFU-Werte der mit LEV behandelten Zellen sind als prozentualer Anteil der Lösungsmittelkontrolle gegeben, die auf 100 % gesetzt wurde. Gezeigt sind die mittleren gefitteten Kurven und die einzelnen Datenpunkte aus drei unabhängigen Experimenten. (B) hES-MPs wurden für 13 Tage differenziert, lysiert und der Überstand mit dem AP-Substrat p-Nitrophenylphosphat unter Zusatz von steigenden LEV-Konzentrationen für 1 h inkubiert. Die Absorption des Hydrolyseprodukts ist als prozentualer Anteil der Lösungsmittelkontrolle angegeben, die auf 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die mittlere gefittete Kurve und die einzelnen Datenpunkte aus drei unabhängigen Experimenten.

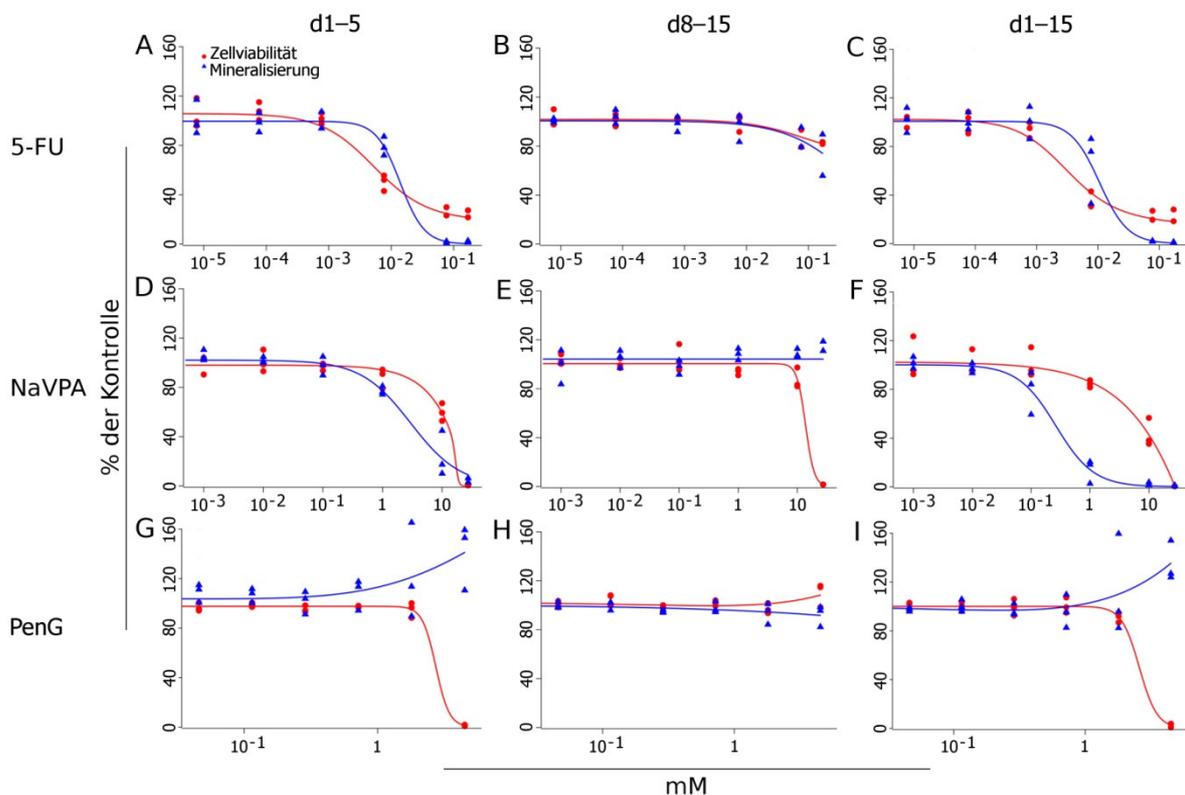
#### 5.4.2 Identifizierung eines geeigneten Zeitfensters für Substanzbehandlungen

Um den Zeitraum zu ermitteln, in dem differenzierende hES-MPs sensitiv gegenüber Substanzen sind und der eine bestmögliche Abtrennung der Effekte auf die Mineralisierung von zytotoxischen Einflüssen gewährleistet, wurde initial eine kleine Auswahl an Testsubstanzen geprüft. Die Auswahl umfasste 5-FU und NaVPA, von denen bekannt ist, dass sie die Skelettentwicklung *in vivo* beeinträchtigen, sowie das nicht-entwicklungstoxische PenG. Die Chemikalien wurden in einem frühen (Tag 1–5) und einem späten (Tag 8–15) Zeitraum sowie über die gesamte Differenzierungsdauer (Tag 1–15) appliziert.

Die Behandlung von Tag 1–5 der Differenzierung führte bei allen Substanzen zu einer Abnahme der Zellviabilität, wobei für 5-FU ca. 250- bis 1000-fach geringere Konzentrationen im Vergleich zu NaVPA und PenG ausreichen (Abb. 25A, D, G). Die Mineralisierung war im Vergleich zur Zellviabilität anhand der ermittelten  $EC_{50}$ -Werte im Fall von NaVPA spezifisch beeinträchtigt ( $p = 0,013$ , Tab. 2), im Fall von 5-FU nicht ( $p = 0,68$ , Tab. 2). Für PenG stiegen die mittleren Fluoreszenzsignale für die Mineralisierung bei zytotoxischen und der vorherigen, noch subtoxischen Konzentration an und im Vergleich zur Zellviabilität lag daher keine spezifische Beeinträchtigung vor ( $p > 0,97$ , Tab. 2). Alle Substanzen hatten bei einer Expo-

sition von Tag 8–15 keine oder nur marginale Auswirkungen auf beide Endpunkte, mit Ausnahme einer Inhibition der Zellviabilität durch NaVPA (Abb. 25B, E, H).

Für die Behandlung von Tag 1–15 konnte für alle Substanzen ein vergleichbares Profil der Kurven für beide Endpunkte wie bei einer Exposition von Tag 1–5 beobachtet werden (Abb. 25C, F, I). Dementsprechend wurde die Mineralisierung im Vergleich zur Zellviabilität durch 5-FU und PenG auch hier nicht signifikant inhibiert ( $p = 0,81$  und  $p = 1,0$ , Tab. 2). Im Fall von NaVPA jedoch wurde die Mineralisierung bereits bei ca. 10-fach geringeren Konzentrationen inhibiert als bei Zugabe von Tag 1–5, der Effekt auf diesen Endpunkt trat hier also noch stärker zum Vorschein. Die Mineralisierung wurde im Vergleich zur Zellviabilität somit auch hier statistisch signifikant beeinträchtigt ( $p = 0,013$ , Tab. 2).



**Abb. 25: Effekte von 5-Fluorouracil (5-FU), Natriumvalproat (NaVPA) und Penicillin G (PenG) auf die Mineralisierung und Zellviabilität von differenzierenden hES-MPs bei unterschiedlichen Expositionsszenarien.**

hES-MPs wurden in 96-well Platten unter Zugabe steigender Konzentrationen von 5-FU (A–C), NaVPA (D–F) oder PenG (G–I) differenziert. Die Substanzen wurden jeweils von Tag 1–5 (A, D, G), Tag 8–15 (B, E, H) oder Tag 1–15 (C, F, I) appliziert. Die Zellviabilität (rot) und Mineralisierung (blau) wurden am Tag 15 erfasst. Die Werte der Lösungsmittelkontrollen wurden als 100 % gesetzt und die Werte der behandelten Zellen sind als prozentualer Anteil derselben dargestellt. Die mittleren gefitteten Kurven und die einzelnen Datenpunkte von je drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Aus diesen ersten Ergebnissen ließ sich ableiten, dass hES-MPs in einer frühen Phase der Differenzierung besonders sensitiv auf die getesteten Substanzen reagierten. Eine Behandlung über die gesamte Differenzierungsdauer führte im Fall von NaVPA zu einer klareren Darstellung des spezifischen Effekts auf die Mineralisierung. Aus diesen Gründen wurde für weitere Testungen eine Exposition von Tag 1–15 gewählt.

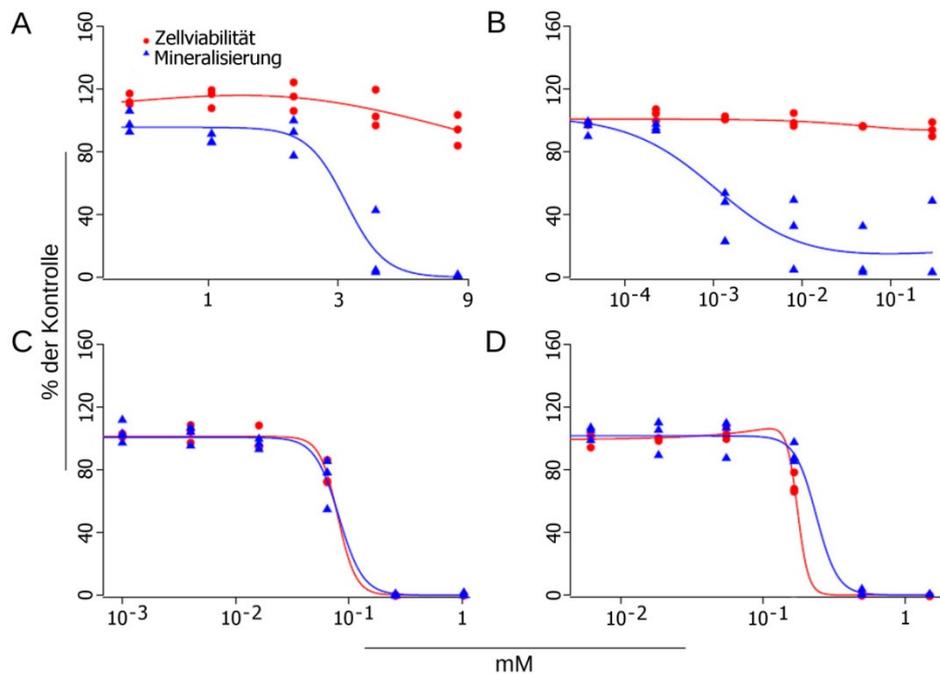
Sowohl für PenG als auch für NaVPA wurde festgestellt, dass bei bestimmten Behandlungszeiträumen die Mineralisierung trotz stark beeinträchtigter Zellviabilität unveränderte oder erhöhte Signale mit der hier angewendeten Methode zeigte. Diese Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit noch etwas näher untersucht und wird in Kapitel 5.4.4.1 wieder aufgegriffen.

### 5.4.3 Testung weiterer Substanzen

Um die Datenbasis für den entwickelten Assay zu erweitern wurde der Einfluss von BA und WAR, für die eine Beeinträchtigung der Knochenentwicklung *in vivo* beschrieben ist, sowie von DPH und MCP, die als nicht-entwicklungstoxisch klassifiziert sind, untersucht.

Die Behandlung mit BA und WAR zeigte eine substanzspezifische Beeinträchtigung der Mineralisierung, da die inhibierenden Konzentrationen deutlich unter denen der Zellviabilität lagen (Abb. 26A und B). WAR supprimierte die Ablagerung von mineralisiertem Material mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 0,0028 mM dabei deutlich stärker als BA und NaVPA, deren mittlere  $EC_{50}$ -Werte 3,2 mM und 0,27 mM betragen (Tab. 2). Die Zellviabilität von hES-MPs wurde durch BA und WAR in dem gewählten Konzentrationsbereich nicht beeinflusst (Abb. 26A und B). Die Effekte auf die Mineralisierung waren daher für beide Substanzen statistisch signifikant ( $p < 0,0049$  und  $p < 0,015$ , Tab. 2).

Die Exposition gegenüber DPH und MCP hatte keinen spezifischen Effekt auf die Mineralisierung, da die Kurven für beide Endpunkte im gleichen bzw. ähnlichen Konzentrationsbereich abfielen (Abb. 26C und D). Dementsprechend erbrachte die statistische Auswertung für beide Substanzen keinen signifikanten Unterschied in den mittleren  $EC_{50}$ -Werten ( $p = 0,46$  und  $p = 0,98$ , Tab. 2).



**Abb. 26: Effekte von Borsäure (BA), Warfarin (WAR), Diphenhydramin (DPH) und Metoclopramid (MCP) auf die Mineralisierung und Zellviabilität von differenzierenden hES-MPs.**

hES-MPs wurden in 96-*well* Platten unter Zugabe steigender Konzentrationen von BA (A), WAR (B), DPH (C) oder MCP (D) differenziert. Die Substanzen wurden jeweils von Tag 1–15 appliziert. Die Zellviabilität (rot) und Mineralisierung (blau) wurden am Tag 15 erfasst. Die Werte der Lösungsmittelkontrollen wurden als 100 % gesetzt und die Werte der behandelten Zellen sind als prozentualer Anteil derselben dargestellt. Die mittleren gefitteten Kurven und die einzelnen Datenpunkte von je drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Die mittleren  $EC_{50}$ -Werte für die Mineralisierung und Zellviabilität der Substanztestungen sowie die Daten der statistischen Auswertung sind in Tab. 2 zusammengestellt.

## Ergebnisse

**Tab. 2: Mittlere EC<sub>50</sub>-Werte, untere und obere Grenze des 95 % Konfidenzintervalls (Klammer) und p-Werte der für hES-MPs getesteten Endpunkte.**

Die Werte wurden aus den Daten von drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Substanz/Behandlungszeitraum	EC <sub>50</sub> Mineralisierung (mM)	EC <sub>50</sub> Zellviabilität (mM)	p-Wert <sup>§</sup>
NaVPA d1–15	0,27 (0,048;1,5)	7,8 (2,4;26)	0,013
BA d1–15	3,2 (1,8;5,8)	> 8,3	< 0,0049 <sup>§</sup>
WAR d1–15	0,0028 (0,000076;0,10)	> 0,3	< 0,015 <sup>§</sup>
5-FU d1–15	0,0091 (0,0016;0,051)	0,0059 (0,0014;0,024)	0,81
DPH d1–15	0,079 (0,052;0,12)	0,080 (0,075;0,084)	0,46
MCP d1–15	0,23 (0,18;0,29)	0,18 (0,17;0,20)	0,98
PenG d1–15	> 4,5	2,5 (2,1;3,0)	1,0 <sup>§</sup>
LEV d1–15 <sup>#</sup>	0,020 (0,014;0,029)	0,65 (0,64;0,67)	0,00034
NaVPA d1–5	3,0 (1,2;7,5)	10 (9,6;11)	0,013
5-FU d1–5	0,012 (0,0048;0,028)	0,011 (0,0032;0,037)	0,68
PenG d1–5	> 4,5	2,9 (1,8;4,5)	> 0,97 <sup>§</sup>
NaVPA d8–15	> 27	13 (7,6;21)	> 0,91 <sup>§</sup>
5-FU d8–15	> 0,17	> 0,17	Nicht verfügbar*
PenG d8–15	> 4,5	> 4,5	Nicht verfügbar*

<sup>§</sup> p-Werte wurden mittels eines einseitigen paarweisen Zweistichproben-t-Tests kalkuliert, um zu testen, ob die Mineralisierung signifikant stärker inhibiert wurde als die Zellviabilität. Bei einem p-Wert < 0,05 wurden die Unterschiede als signifikant erachtet.

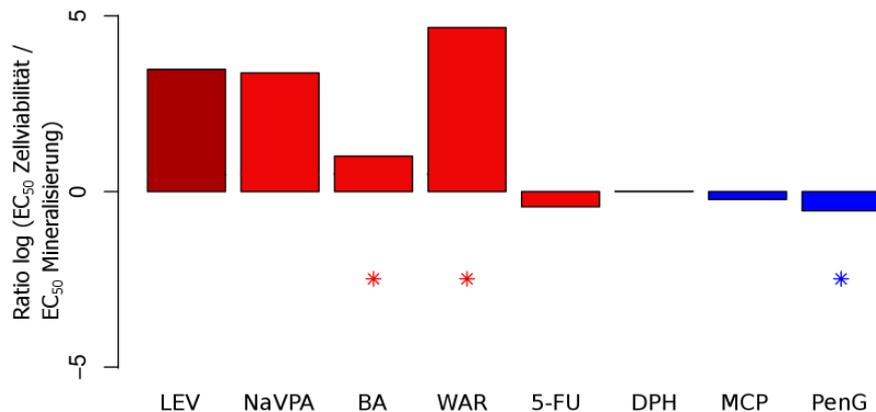
<sup>§</sup> Für einen der Endpunkte konnte kein EC<sub>50</sub>-Wert im getesteten Konzentrationsbereich ermittelt und anhand der verfügbaren Datenpunkte auch nicht adäquat extrapoliert werden. In diesen Fällen wurde die höchste getestete Konzentration zur Berechnung des p-Werts verwendet.

\* Für beide Endpunkte konnte kein EC<sub>50</sub>-Wert im getesteten Konzentrationsbereich ermittelt und anhand der verfügbaren Datenpunkte auch nicht adäquat extrapoliert werden. In diesen Fällen konnte daher kein p-Wert bestimmt werden.

<sup>#</sup> Test-spezifische Positivkontrolle für den Mineralisierungsassay.

Eine zusammenfassende Illustration der Eignung des Tests zur Erfassung von Substanzeffekten auf die Knochenentwicklung bietet Abb. 27. Hier sind die log-transformierten Quotienten der mittleren EC<sub>50</sub>-Werte für die Mineralisierung und Zellviabilität für alle Testsubstanzen bei Zugabe von Tag 1–15 der Differenzierung dargestellt. Substanzen, deren Quotient über null lag, wiesen einen stärkeren Effekt auf die Mineralisierung auf als auf die Zellviabilität. Die Quotienten der Positivkontrolle LEV sowie der entwicklungstoxischen Substanzen

NaVPA, BA und WAR waren über null. Die Werte der nicht-entwicklungstoxischen Stoffe DPH, MCP und PenG hingegen waren darunter. 5-FU war die einzige positive Substanz, deren Quotient den Nullwert nicht überstieg, da die mittleren  $EC_{50}$ -Werte für beide Endpunkte nahezu identisch waren.



**Abb. 27: Vergleich der Mineralisierung und Zellviabilität für die verwendeten Testsubstanzen bei Exposition von Tag 1–15.**

Der log-transformierte Quotient der mittleren  $EC_{50}$ -Werte für die Zellviabilität und Mineralisierung wurde bestimmt. Rote Balken zeigen entwicklungstoxische und blaue Balken nicht-entwicklungstoxische Substanzen. Die Assay-spezifische Positivkontrolle LEV ist als dunkelroter Balken kenntlich gemacht. Für Substanzen, die mit einem Stern markiert sind, konnte einer der  $EC_{50}$ -Werte innerhalb des Konzentrationsbereichs bis zur 2-fachen maximalen Konzentration nicht extrapoliert werden. Für den fehlenden Wert wurde die höchste getestete Konzentration eingesetzt. Substanzen bei denen der Ratio größer als null ist repräsentieren Stoffe mit einem stärkeren Effekt auf die Mineralisierung als auf die Zellviabilität.

Mit dem etablierten Test konnte das entwicklungstoxische Potential für sechs der sieben Testsubstanzen entsprechend ihres *in vivo* Potentials korrekt bestimmt werden und erscheint daher für diese Untersuchungen geeignet zu sein.

#### 5.4.4 Limitierungen des Assays

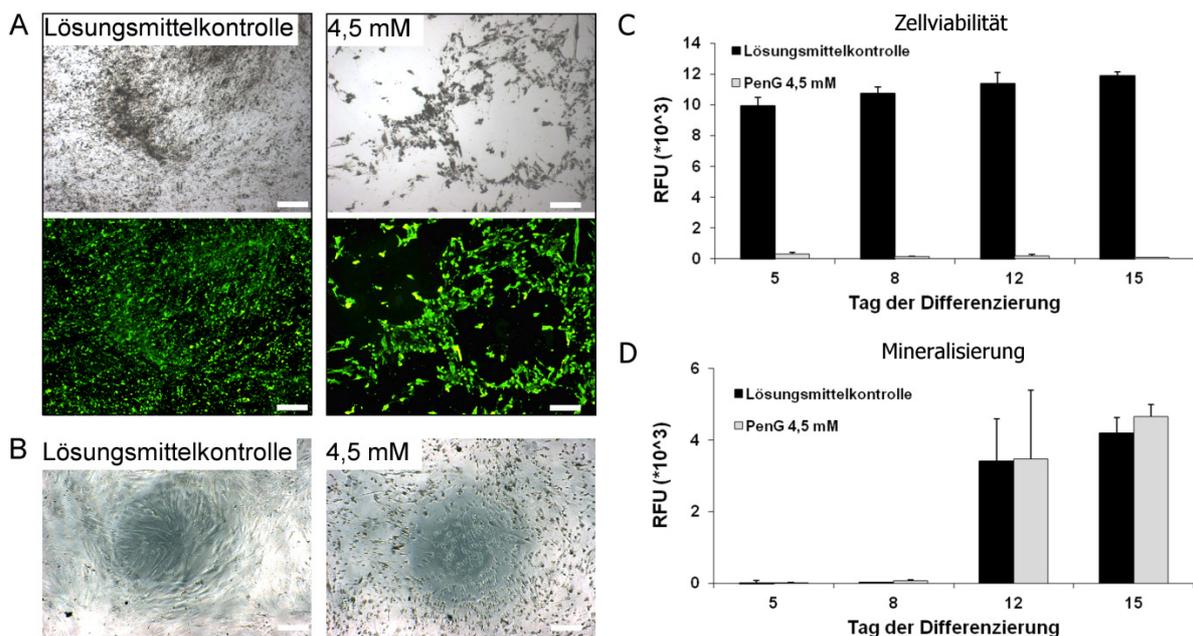
##### 5.4.4.1 Zytotoxische Substanzkonzentrationen

Sowohl PenG als auch NaVPA wiesen für einige Expositionsszenarien bei zytotoxischen Konzentrationen noch starke Mineralisierungssignale im OsteoImage Assay auf (Abb. 25E, G und I). Um diese Beobachtung etwas näher zu untersuchen, wurden hES-MPs betrachtet, die mit sehr hohen Konzentrationen an PenG (4,5 mM) behandelt wurden.

Die mikroskopische Analyse zeigte, dass dunkles, aggregiertes Zellmaterial, welches sich

morphologisch deutlich von den Mineralisierungsbereichen in den nur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollkulturen unterschied, wesentlich zu den Fluoreszenzsignalen der mit PenG exponierten hES-MPs beitrug (Abb. 28A). Am Tag 5 der Differenzierung bereits wiesen die mit PenG behandelten Kulturen keinen konfluenten Zellrasen auf (Abb. 28B). Anstatt dessen war angesammeltes Zellmaterial erkennbar, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um am Plattenboden haftende Zelldebris handelte. Zu diesem Zeitpunkt war die Zellviabilität bereits komplett inhibiert und erholte sich auch für die restliche Differenzierung bis zum Tag 15 nicht mehr (Abb. 28C). Das Signal des Osteoimage Assays stieg gleichzeitig vergleichbar zur Lösungsmittelkontrolle an (Abb. 28D). Basierend auf den gezeigten Daten scheint es sich dabei allerdings nicht um eine reguläre, zellulär vermittelte Formierung einer mineralisierten Knochenmatrix zu handeln, sondern eher eine Folge von Zelltod zu sein.

Zytotoxische Substanzkonzentrationen können daher in Abhängigkeit von der Substanz und dem Expositionszeitraum falsch-positive Signale für die Mineralisierung verursachen.



**Abb. 28: Effekt zytotoxischer Konzentrationen von PenG auf den Mineralisierungsassay.**

hES-MPs wurden für 15 Tage unter Zusatz von 4,5 mM PenG oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle differenziert. (A) Phasenkontrastaufnahmen und die korrespondierenden Fluoreszenzbilder von mit dem Osteoimage Assay gefärbten Zellen am Tag 15. (B) Phasenkontrastaufnahmen von hES-MPs am Tag 5 der Differenzierung. (A und B) Maßstabsbalken entsprechen 200  $\mu\text{m}$ . Messung der Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue Assay (C) und der Mineralisierung mit dem Osteoimage Assay (D) in den Lösungsmittelkontrollen (schwarzer Balken) und den mit PenG behandelten Kulturen (grauer Balken) an verschiedenen Differenzierungstagen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei technischen Replikaten.

#### 5.4.4.2 Lösungsmittelleffekte

Zahlreiche Substanzen, insbesondere pharmazeutische Wirkstoffe, weisen hydrophobe Eigenschaften auf, sodass sich der Einsatz von wasserbasierten Lösungsmitteln für diese Stoffe nicht anbietet (Williams et al., 2013). Anstatt dessen wird häufig DMSO verwendet, bei dem es sich um ein dipolares, aprotisches, organisches Lösungsmittel handelt, das eine geringe Zytotoxizität besitzt.

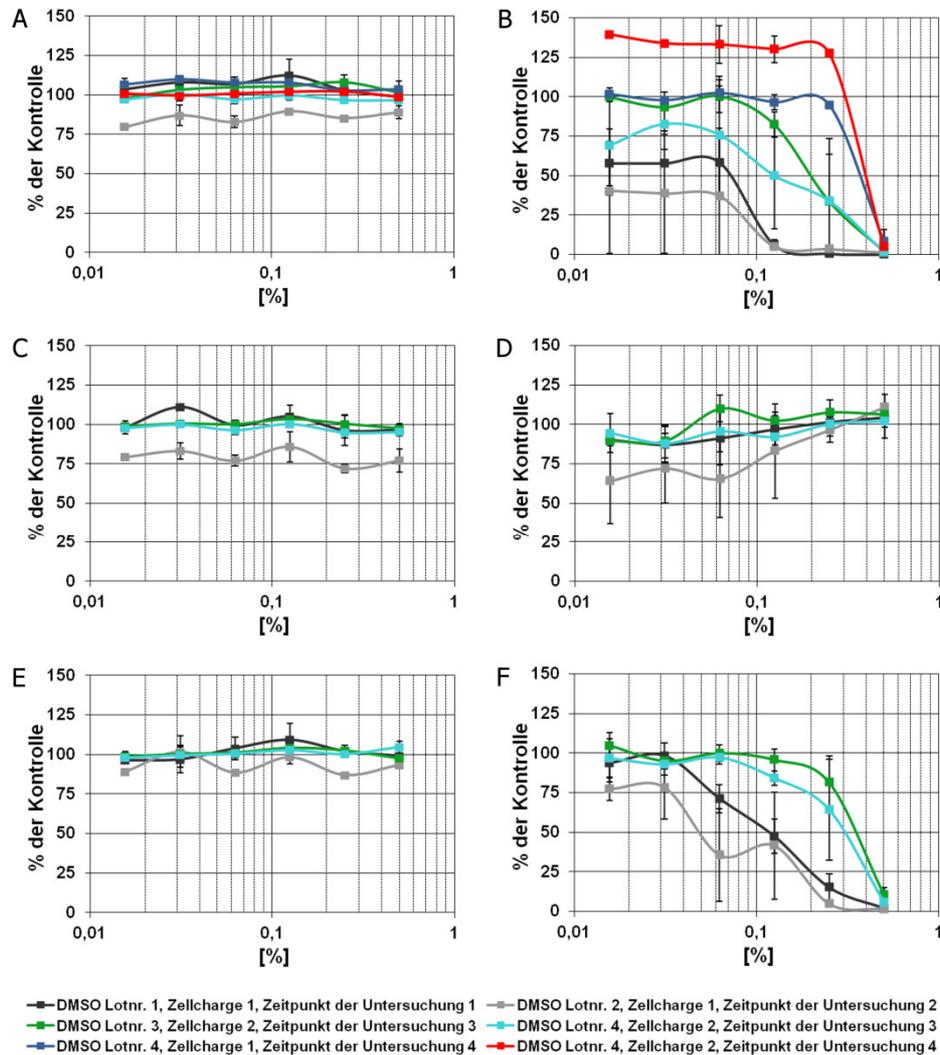
Im Folgenden wurde untersucht, ob DMSO einen Effekt auf die Zellviabilität oder Mineralisierung von induzierten hES-MPs hat und unter welchen Bedingungen es als Lösungsmittel für den beschriebenen Assay einsetzbar ist. Dafür wurden verschiedene Lotnummern von DMSO derselben Produktnummer getestet, ebenso wie zwei hES-MP Chargen. Bezüglich der Konzentrationen wurde in einem Bereich gearbeitet, der üblicherweise für Substanztestungen relevant ist.

DMSO in Konzentrationen von 0,016–0,5 % beeinträchtigte die Zellviabilität der differenzierenden hES-MPs bei Zugabe von Tag 1–15 der Differenzierung nicht (Abb. 29A). Im Gegensatz dazu zeigte das Lösungsmittel konzentrationsabhängig inhibierende Effekte auf die Mineralisierung (Abb. 29B). In welchem Ausmaß und ab welchen Konzentrationen die Beeinträchtigung eintrat war dabei abhängig von der Lotnummer. So hatten die Lotnummern 3 und 4 einen geringen oder keinen Einfluss im Konzentrationsbereich von 0,016–0,064 %, während die Lotnummern 1 und 2 den Mineralisierungsgrad hier deutlich reduzierten. Die technischen Replikate wiesen allerdings große Schwankungen auf. Zwei der Experimente mit Lotnummer 4 zeigten, dass der Effekt nicht von der verwendeten Zellcharge abhängig war (vgl. dunkelblaue und rote Kurve). Allerdings schien der Zeitpunkt des Experiments und damit möglicherweise der Zeitpunkt der Verwendung von DMSO nach dem Öffnen der Flasche eine Rolle zu spielen (vgl. hellblaue und rote Kurve). Eine komplette Inhibierung der Mineralisierung war für alle Experimente bei einer Konzentration von 0,5 % beobachtbar.

In einigen Experimenten wurden parallel kürzere Inkubationszeiten mit DMSO getestet. Eine Zugabe während der Proliferationsphase der hES-MPs von Tag 1–5 schien mit Ausnahme von Lotnummer 2, die leichte Effekte zeigte, keinen negativen Einfluss auf die nachfolgende Mineralisierung zu haben (Abb. 29D). Hingegen zeigte eine Exposition mit der gleichen Dauer, aber zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung (Tag 5–9) eine konzentrationsabhängige Inhibierung (Abb. 29F). Die Beeinträchtigung schien daher vom Differenzierungsstadium der Kulturen abhängig zu sein. Wie bei der Applikation von Tag 1–15 (Abb. 29B) waren das Ausmaß der Inhibierung und die geringste effektive Konzentration auch bei einer

Behandlung von Tag 5–9 von der DMSO Lotnummer abhängig. Die längere Inkubation sorgte allerdings für eine noch stärkere Ausprägung der negativen Effekte.

Der Einsatz von DMSO als Lösungsmittel ist mit dem etablierten Assay daher nur bedingt möglich.

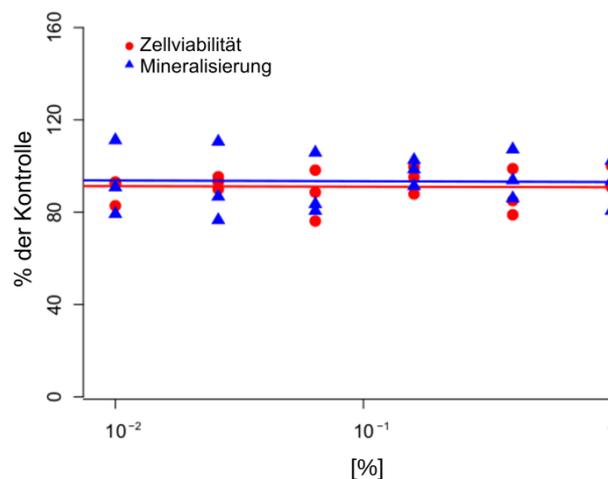


**Abb. 29: Effekt von Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die Zellviabilität und Mineralisierung von hES-MPs.**

hES-MPs wurden in 96-well Platten für 15 Tage differenziert. DMSO wurde jeweils von Tag 1–15 (A, B), Tag 1–5 (C, D) oder Tag 5–9 (E, F) appliziert. Die Zellviabilität (A, C, E) und Mineralisierung (B, D, F) wurden am Tag 15 erfasst. Die Werte der unbehandelten Kontrollen wurden als 100 % gesetzt und die Werte der behandelten Zellen sind als prozentualer Anteil derselben dargestellt. Gezeigt sind die einzelnen Datenpunkte und Konzentrations-Wirkungs-Kurven von vier bis sechs Experimenten, die sich in Bezug auf die verwendete DMSO Lotnummer und/oder Zellcharge und/oder den Zeitpunkt der Untersuchung unterscheiden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf je drei technische Replikate.

Eine weitere Alternative zu wasserbasierten Lösungsmitteln für die Anwendung in der Zellkultur stellt EtOH dar, das, wie Wasser, zu den polaren, protischen Lösungsmitteln gehört. Sein apolarer Kohlenstoffrest ermöglicht die Lösung hydrophober Substanzen.

Für Substanztestungen relevante EtOH-Konzentrationen von 0,01–1 % beeinflussten weder die Zellviabilität noch die Mineralisierung von hES-MPs bei einer Applikation über den gesamten Differenzierungszeitraum von 15 Tagen (Abb. 30).



**Abb. 30: Effekt von Ethanol (EtOH) auf die Mineralisierung und Zellviabilität von hES-MPs.**

hES-MPs wurden in 96-well Platten unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von EtOH für 15 Tage differenziert. Die Zellviabilität (rot) und Mineralisierung (blau) wurden am Tag 15 erfasst. Die Werte der unbehandelten Kontrollen wurden als 100 % gesetzt und die Werte der behandelten Zellen sind als prozentualer Anteil derselben dargestellt. Der mittlere gefittete Verlauf und die einzelnen Datenpunkte von je drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

#### 5.4.5 Initiale weiterführende Untersuchungen

Die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Gene oder Proteine in parallelen Ansätzen, wie sie z. B. in Microarrays erfolgt, bietet die Möglichkeit effizient sowohl potentielle toxikologische Marker als auch molekulare Targets von Substanzen zu identifizieren.

In einem initialen Ansatz wurden in der vorliegenden Arbeit daher PCR Arrays zur Untersuchung der differentiellen Genexpression in hES-MPs mit dem Human Osteogenesis RT<sup>2</sup> Profiler Array von SABiosciences/QIAGEN durchgeführt. In diesem Array werden 84 vorausgewählte Gene analysiert, die eine Funktion in der Skelettentwicklung, der Knochenmineralisierung, dem Zellwachstum, der Differenzierung, dem Aufbau der ECM und der Zelladhäsion haben. hES-MPs wurden dafür über 23 Tage unter Zugabe von AA,  $\beta$ -GP, Dex differenziert und Proben von Tag 7, 15 und 23 aufgearbeitet. Kulturen, denen PBS zugesetzt wurde,

dienten einerseits der Analyse der Genexpressionsänderungen während der Differenzierung und stellten andererseits die Lösungsmittelkontrolle für Experimente zur Untersuchung des Einflusses von NaVPA dar.

#### **5.4.5.1 Identifizierung weiterer molekularer Marker der Differenzierung von hES-MPs**

Die Gene der bereits in Kapitel 5.2.2–5.2.4 und 5.3.2–5.3.3 untersuchten Proteine sind auch in den Array inkludiert. Daher fasst Abb. 31 zunächst die hierfür gewonnenen Daten zusammen.

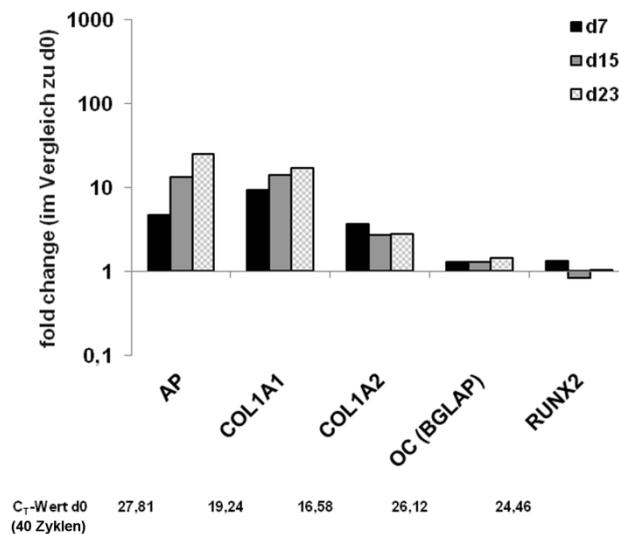
In Übereinstimmung mit der Zunahme der Aktivität (Abb. 14) und der Marker-positiven Zellen (Abb. 22) zeigte auch die Transkription von AP einen Anstieg im Laufe der Differenzierung.

Die  $C_T$ -Werte für COL1A1 und COL1A2 waren bereits in nicht-differenzierenden hES-MPs sehr niedrig (Abb. 31), was für eine hohe mRNA-Expression spricht, und somit die noch vor Induktion der Differenzierung nachweisbare Detektion des Kollagen Typ I-Proteins bestätigt (Abb. 15). Dieses Expressionslevel wurde in Einklang mit der fortlaufenden Deposition von Kollagen Typ I in die ECM über die Differenzierung beibehalten.

Auch die mRNA von OC konnte in nicht-differenzierenden hES-MPs nachgewiesen werden und die Stärke der Transkription wurde über die Differenzierung beibehalten (Abb. 31). Das Protein hingegen war vor Induktion der Differenzierung nur in wenigen einzelnen Zellen detektierbar (Abb. 16). Im Laufe der Differenzierung konnte dann eine Zunahme und eine Akkumulation in der ECM beobachtet werden.

Für Runx2 war die Expression der mRNA ebenfalls bereits in nicht-differenzierenden Zellen zu verzeichnen (Abb. 31), analog zum Nachweis auf Proteinebene (Abb. 13C und D und Abb. 20). Die beobachtete Abnahme des Proteinlevels in den Kulturen scheint allerdings nicht durch eine verminderte Transkription bedingt zu sein.

Ein Nachweis von Dlx5 war im Array nicht möglich, die ermittelten  $C_T$ -Werte lagen zu allen Zeitpunkten bei ca. 35 oder höher (Tab. A1 im Anhang).



**Abb. 31: Genexpression der bereits untersuchten Marker während der Differenzierung von hES-MPs.**

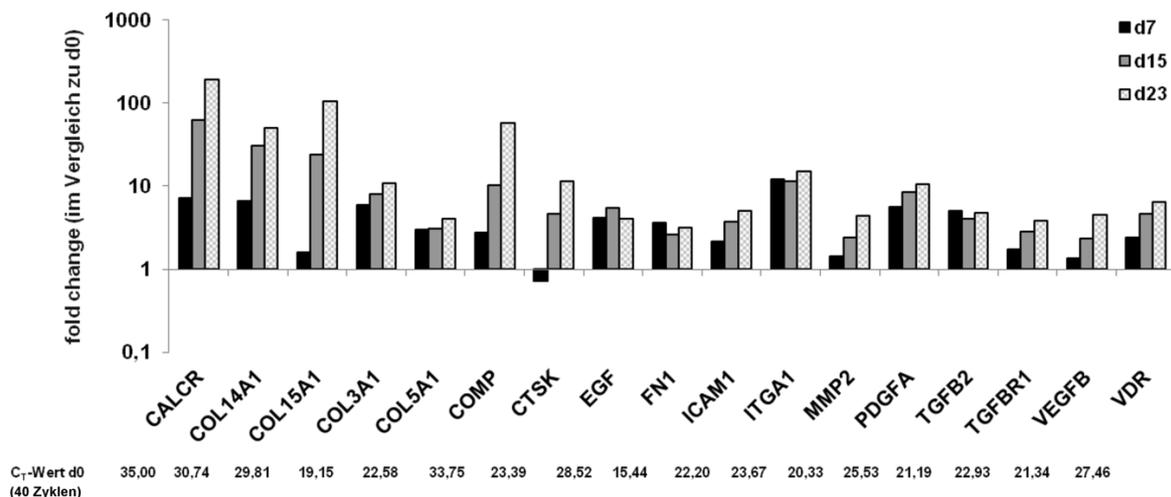
Die mRNA wurde an Tag 7, 15 und 23 aus mit AA,  $\beta$ -GP, Dex induzierten Zellen isoliert und die Genexpression der bereits auf Proteinebene untersuchten Marker mittels dem Human Osteogenesis RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (SABiosciences/QIAGEN) untersucht. Die Werte der Zielgene wurden gegen den mittleren Expressionswert mehrerer Referenzgene normalisiert und sind als *fold change* im Vergleich zu nicht-differenzierenden hES-MPs (d0) angegeben. Gezeigt sind die Daten eines Experiments. BGLAP=*Bone gamma-carboxyglutamic acid protein*; COLNummerANummer=*Collagen type Nummer, alpha-Nummer*.

Für die Identifizierung neuer potentieller Marker wurden die Resultate der mRNA-Transkripte zusammengestellt, die während der Differenzierung eine mindestens 3-fache Steigerung des Expressionslevels im Vergleich zu nicht-differenzierenden hES-MPs aufwiesen und deren C<sub>T</sub>-Werte für einen ausreichenden Nachweis sprachen, d. h. sie lagen am Tag 0 bereits unter 30 oder sanken im Laufe der Differenzierung unter diesen Wert (Abb. 32). Dies betraf 17 Gene. Für die meisten konnte eine konstant ansteigende Transkription mit zunehmender Differenzierung beobachtet werden. Für einige wenige lag ein stabiles Level ab Tag 7 vor, wobei dies insbesondere für Gene galt, deren mRNA bereits eine prominente Expression in nicht-differenzierenden Zellen aufwiesen und/oder die für Wachstumsfaktoren kodieren.

Der stärkste Anstieg (ca. 50-fach oder mehr an mindestens einem der Analysetage) konnte für CALCR, COL14A1, COL15A1 und COMP festgestellt werden. Die ausgeprägte Zunahme ist hier wahrscheinlich zum Teil darauf zurückzuführen, dass in den nicht-differenzierenden Kulturen sehr niedrige bzw. nicht detektierbare Transkriptlevel vorlagen, erkennbar an den hohen C<sub>T</sub>-Werten. COL14A1 kodiert für die alpha-1-Kette von Kollagen Typ XIV, das zu den *fibril-associated collagens with interrupted triple-helices* (FACIT) gehört und sich an Kollagen

Typ I anlagert (Kadler et al., 2007). *COL15A1* kodiert für die alpha-1-Kette von Kollagen Typ XV, das häufig zwischen Kollagenfibrillen und der Basalmembran lokalisiert ist (Kadler et al., 2007). Bei *COMP* handelt es sich um das Gen, das für das oligomere Matrixprotein in Knorpel kodiert. Drei der Marker mit einer gesteigerten Transkription sind daher in der ECM lokalisiert und in dortige Prozesse involviert. *CALCR* hingegen kodiert für den Calcitonin-Rezeptor, der eine Funktion in der Calciumhomöostase besitzt.

Die weiteren in Abb. 32 aufgeführten mRNA-Transkripte zeigten einen maximalen Anstieg in der Expression im Bereich von ca. 3,5- bis 15-fach. Alle wurden bereits stark bis mäßig in nicht-differenzierenden hES-MPs produziert. Es handelte sich dabei um die Genprodukte von verschiedenen Wachstumsfaktoren, die u. a. in der Embryogenese eine Rolle spielen (EGF, PDGFA, TGFB2, VEGFB), fibrillären Kollagensubtypen (COL3A1, COL5A1), in der ECM aktiven Proteasen (CTSK, MMP2), Proteinen mit Funktionen in der Zelladhäsion (FN1, ICAM1, ITGA1) und Rezeptoren (TGFB1, VDR).



**Abb. 32: Marker mit hochregulierter Genexpression während der Differenzierung von hES-MPs.** Die mRNA wurde an Tag 7, 15 und 23 aus mit AA,  $\beta$ -GP, Dex induzierten Zellen isoliert und die Genexpression verschiedener Marker mittels dem Human Osteogenesis RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array untersucht. Die Werte der Zielgene wurden gegen den mittleren Expressionswert mehrerer Referenzgene normalisiert und sind als *fold change* im Vergleich zu nicht-differenzierenden hES-MPs (d0) angegeben. Dargestellt sind Marker, deren C<sub>T</sub>-Wert an mindestens einem der analysierten Zeitpunkte unter 30 lag und die eine 3-fache Steigerung des Transkriptlevels an mindestens einem der Analysetage aufwiesen. Gezeigt sind die Daten eines Experiments. CALCR=Calcitonin-Rezeptor; COLNummerA1=Collagen type Nummer, alpha-1; COMP=Cartilage oligomeric matrix protein; CTSK=Cathepsin K; EGF=Epidermal growth factor; FN1=Fibronectin; ICAM1=Intercellular adhesion molecule 1; ITGA1=Integrin, alpha-1; MMP2=Matrixmetalloprotease 2; PDGFA=Platelet-derived growth factor A; TGFB2=Transforming growth factor beta 2; TGFB1=Transforming growth factor beta receptor 1; VEGFB=Vascular epidermal growth factor beta; VDR=Vitamin-D-Rezeptor.

#### 5.4.5.2 Effekt von Natriumvalproat auf spezifische Marker während der Differenzierung von hES-MPs

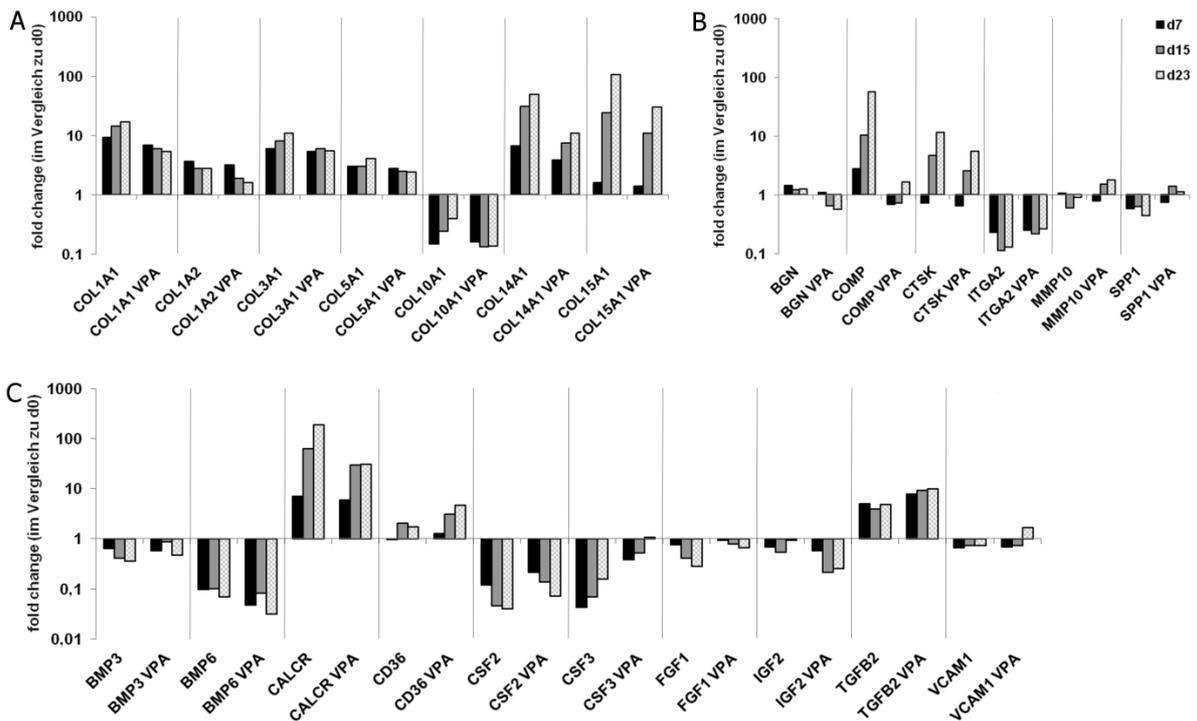
Für die Untersuchung des Einflusses von NaVPA auf die Genexpression wurde eine Konzentration von 0,18 mM gewählt, da diese bei Applikation von Tag 1–15 die Zellviabilität von hES-MPs nicht beeinträchtigte, die Mineralisierung jedoch inhibierte (Abb. 25F).

Die auffälligste Beobachtung war, dass die Testsubstanz die Transkription aller im Array adressierten mRNA-Moleküle für Kollagene beeinflusste (Abb. 33A). Das vorwiegend in Knorpel exprimierte COL2A1 konnte aufgrund eines Doppelpeaks in den Dissoziationskurven allerdings nicht in die Auswertung einbezogen werden (Tab. A1 im Anhang). In den meisten Fällen wurde durch NaVPA die zeitabhängige Zunahme der mRNA vermindert. Für das hauptsächlich von hypertrophen Chondrozyten exprimierte COL10A1 erfolgte eine stärkere Abnahme der mRNA. Den deutlichsten Einfluss hatte NaVPA auf COL1A1, COL14A1 und COL15A1 mit *fold changes* > 3 für mindestens einen Zeitpunkt. Die jeweilige mRNA der beiden letztgenannten wurde in nicht-differenzierenden hES-MPs nur geringfügig nachgewiesen (Abb. 32) und wies eine deutliche Zunahme im Laufe der Differenzierung auf.

NaVPA zeigte zudem Effekte auf weitere Marker mit einer Funktion in der ECM (Abb. 33B). Den stärksten Einfluss hatte die Substanz dabei auf COMP, dessen prominente Transkriptzunahme komplett inhibiert wurde. Als weiterer Kollagen-bindender Marker wurde die Genexpression von BGN beeinträchtigt. CTSK, das eine katabolische Funktion in der ECM besitzt, unterlag ebenfalls einer verminderten Transkription. Die mRNA-Expression von ITGA2, einem Kollagen-bindenden Transmembranrezeptor, MMP10, einem proteolytischen Enzym, und SPP1, einem mineralisierungsinhibierenden Glykoprotein, wurde hingegen weniger stark vermindert bzw. stimuliert.

Weitere Marker, die durch NaVPA beeinflusst wurden, sind in Abb. 33C zusammengestellt. Hierbei handelte es sich vorrangig um Wachstumsfaktoren (BMP3, BMP6, CSF2, CSF3, FGF1, IGF2, TGFB2), aber auch Zelladhäsionsproteine (CD36, VCAM1). Die mRNA-Expression von CALCR, die während der Differenzierung stark zunahm, erfuhr durch NaVPA einen verminderten Anstieg.

## Ergebnisse



**Abb. 33: Effekt von NaVPA auf die Genexpression ausgewählter Marker.**

Die mRNA wurde an Tag 7, 15 und 23 aus mit 0,18 mM NaVPA oder PBS behandelten Zellen isoliert und die Genexpression verschiedener Marker mittels dem Human Osteogenesis RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array untersucht. (A) zeigt die Resultate für Kollagene, (B) für Marker mit einer Funktion in der ECM und (C) für weitere Marker. Die Werte der Zielgene wurden gegen den mittleren Expressionswert mehrerer Referenzgene normalisiert und sind als *fold change* im Vergleich zu nicht-differenzierenden hES-MPs (d0) angegeben. Dargestellt sind Marker, deren C<sub>T</sub>-Wert an mindestens einem der analysierten Zeitpunkte unter 30 lag und die einen 2-fachen (B, C) oder 1,5-fachen (A) Unterschied im Vergleich zur Kontrolle an mindestens einem der Analysetage aufwiesen. Gezeigt sind die Daten eines Experiments. BGN=Biglykan; BMPNummer=*Bone morphogenetic protein Nummer*; CALCR=Calcitonin-Rezeptor; COLNummerANummer=*Collagen type Nummer, alpha-Nummer*; COMP=*Cartilage oligomeric matrix protein*; CSFNummer=*Colony-stimulating factor Nummer*; CTSK=Cathepsin K; FGF1=*Fibroblast growth factor 1*; IGF2=*Insulin-like growth factor 2*; ITGA2=Integrin, alpha-2; MMP10=Matrixmetalloprotease 10; SPP1=*Secreted phosphoprotein 1*; TGFB2=*Transforming growth factor beta 2*; VCAM1=*Vascular cell adhesion molecule 1*.

Mit diesen initialen Experimenten konnten, insbesondere mit CALCR, COL14A1, COL15A1, CTSK und COMP, potentielle weitere Marker identifiziert werden, die für die Etablierung zusätzlicher Endpunkte in Betracht gezogen werden können und es konnten erste Informationen zu molekularen Angriffspunkten von NaVPA in differenzierenden hES-MPs gewonnen werden.

## 6 Diskussion

Für die Erkennung und Bewertung des toxischen Potentials von industriell produzierten Substanzen, wie Pharmazeutika und Chemikalien, auf die humane Reproduktion und Entwicklung werden konventionell Tierversuche eingesetzt. Diese erfordern den Einsatz einer großen Anzahl an Versuchstieren, sind kosten- und zeitaufwändig und ermöglichen nur einen geringen Durchsatz. Darüber hinaus weisen sie nur eine limitierte Prädiktivität für den Menschen auf. Die Implementierung standardisierter und zuverlässiger humanrelevanter *in vitro* Testsysteme ist daher notwendig und gewünscht. Anomalien des Skeletts gehören zu den am häufigsten beobachteten Geburtsdefekten. Zudem ist die Untersuchung skelettaler Veränderungen ein integraler Bestandteil der regulatorisch geforderten pränatalen Entwicklungstoxizitätsstudien an Versuchstieren. Ein validiertes alternatives Testsystem zur Detektion von toxischen Effekten auf die Knochenentwicklung existiert bisher nicht und erste Ansätze zur Etablierung eines *in vitro* Assays nutzten nur nicht-humane Zellen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, inwieweit sich aus humanen ES Zellen gewonnene mesenchymale Progenitorzellen als Testmodell eignen und toxikologische Endpunkte zu identifizieren, die sich für die Erfassung von adversen Effekten auf die osteogene Entwicklung anbieten. Dafür wurde die Differenzierung von hES-MPs zu mineralisiertem Gewebe näher charakterisiert, die Eignung verschiedener Biomarker evaluiert, Methoden zu ihrer Quantifizierung etabliert und die Prädiktivität des etablierten Assays mit einer Auswahl an Substanzen überprüft. Diese Arbeiten sollen die Basis für ein alternatives Testsystem zur sicherheitstoxikologischen Prüfung von Effekten auf die Knochenentwicklung bilden.

### 6.1 Eignung von hES-MPs als Zellmodell für die Etablierung eines osteogenen *in vitro* Testsystems

#### 6.1.1 Etablierung und Optimierung der osteogenen Differenzierung von hES-MPs

Als Grundlage für die osteogene Differenzierung der hES-MPs wurde ein von de Peppo et al. (2010a) publiziertes Protokoll verwendet. Dieses sieht eine Kultivierung der Zellen auf unbeschichteten Zellkulturgefäßen in DMEM mit 1 g/l Glucose und 10 % FCS und eine initiale Aussaat von 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> vor. Die Differenzierung wird dabei durch Zugabe von 45 µM AA, 10 mM β-GP und 1 µM Dex stimuliert. Es handelt sich im Kern um Kulturbedingungen, die üblicherweise für die *in vitro* Differenzierung von aus Knochenmark gewonnenen adulten

humanen MSCs eingesetzt werden (Jaiswal et al., 1997).

#### 6.1.1.1 Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter

Sowohl das verwendete FCS als auch die Zelldichte und die Beschichtung der Kulturgefäße haben einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierungskapazität und -effizienz von Zellen.

So konnten Aronow et al. (1990) z. B. zeigen, dass unterschiedliche **FCS** Lotnummern die Synthese osteogener Proteine und den Beginn und das Ausmaß der Mineralisierung in fetalen Ratten-Calvariazellen deutlich beeinflussten. Es muss daher vorab ein für eine spezifische Anwendung geeignetes FCS identifiziert werden. Die Testung des FCS verschiedener Anbieter und Chargen für die osteogene Differenzierung war vor Beginn der Arbeiten mit den hES-MPs mit Maus ES Zellen der Linie D3 durchgeführt worden. Initiale Experimente zeigten, dass das gewählte Serum auch in den humanen Kulturen für ein solides Wachstum und eine effiziente Mineralisierung sorgte. Es wurde daher für alle nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

In der ersten Publikation zu hES-MPs wurde für die osteogene Differenzierung eine **initiale Zelleinsaat** von 4.000 Zellen/cm<sup>2</sup> verwendet (Karlsson et al., 2009), während de Peppo et al. (2010a) mit einer 2,5-fach höheren Dichte arbeiteten. Letztere unterstützte stärker die Ausbildung kalzifizierter Bereiche (Abb. 9A und D). Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch von Jaiswal et al. (1997) mit humanen MSCs gemacht, wobei dies nicht auf höhere Zellzahlen zu späteren Zeitpunkten oder eine gesteigerte AP-Aktivität zurückzuführen war. Die Autoren vermuteten, dass der Grund für den höheren Mineralisierungsgrad eine veränderte Zell-Zell-Interaktion und/oder die Ausschüttung para- und autokriner Faktoren war.

Unabhängig von der initialen Zelldichte kam es insbesondere nach einer längeren Differenzierungszeit häufig zu einem teilweisen oder kompletten Ablösen des Zellrasens von hES-MPs (Abb. 9A und D). Auch diese Beobachtung ist nicht ungewöhnlich für konfluente osteogene Kulturen (Jaiswal et al., 1997). Eine **Beschichtung** der Zellkulturgefäße mit Gelatine verbesserte die Anhaftung deutlich, ohne dabei die Mineralisierung zu beeinflussen (Abb. 9B). Gelatine besteht zum Großteil aus denaturiertem fibrillärem Kollagen und unterstützt über unspezifische Proteinbindungen die Adhäsion von Zellen. Interessanterweise resultierte eine Beschichtung bereits während der Expansion der hES-MPs in einer etwas verminderten Mineralisierung (Abb. 9C). Die einzelnen hES-MP Zellen zeigten auf beschichteten Platten eine breitere Morphologie und somit eine frühere Konfluenz als die Kulturen auf unbeschichteten Platten.

tetem Material, ohne dass sich dabei die Teilungsraten wesentlich unterschieden (Daten nicht gezeigt). Veränderte Zell-Zell-Kontakte während der Expansion könnten daher ein möglicher Grund für die verminderte Mineralisierung während der Differenzierung gewesen sein.

### 6.1.1.2 Einfluss verschiedener osteogener Induktoren

Unter *in vitro* Bedingungen wird für die osteoblastäre Differenzierung von Tumorzelllinien, Primärzellen, wie z. B. Calvariazellen oder MSCs, und ES Zellen in der Regel eine Kombination aus spezifischen osteogenen Induktoren verwendet (Boskey und Roy, 2008; Czekanska et al., 2012; Duplomb et al., 2007; Heng et al., 2004). Dabei handelt es sich sowohl um Faktoren, die die Knochenentwicklung auch natürlicherweise im Körper fördern, als auch um künstliche Induktoren. Die genaue Zusammensetzung, die Konzentration einzelner Komponenten sowie der Beginn und die Dauer der Exposition hängen u. a. vom Reifungsgrad, der Spezies, dem ursprünglichen Gewebetyp und der Applikation des verwendeten Zellmodells ab. AA und  $\beta$ -GP stellen in den meisten Protokollen die grundlegenden Supplemente dar.

**AA** stimuliert sowohl die Sezernierung und Prozessierung von Prokollagen als auch die posttranslationale Modifikation von Kollagenmolekülen (Franceschi et al., 1994; Hulmes, 2008) und unterstützt damit wesentlich den Aufbau einer funktionalen ECM. Das Vitamin zeigte darüber hinaus auch positive Effekte auf die Matrix-vermittelte Induktion der Biosynthese osteoblastärer Proteine, wie AP und OC, in den Zelllinien MC3T3 und MG-63 und auf die Mineralisierung von humanen MSCs (Choi et al., 2008; Franceschi et al., 1994; Takamizawa et al., 2004).

Die im Basalmedium (meist alpha-MEM oder DMEM)+10 % FCS vorhandenen Phosphatkonzentrationen reichen für die meisten Zellmodelle nicht aus, um die Mineralisierung zu induzieren. Es hat sich daher als hilfreich erwiesen  **$\beta$ -GP** als organische Phosphatquelle dem Medium zuzusetzen (Bellows et al., 1991). Zumeist werden dabei Konzentrationen von 2–10 mM gewählt, wobei die physiologische Relevanz der gebildeten Mineralablagerungen umstritten ist (Boskey und Roy, 2008).  $\beta$ -GP wird von AP als Substrat genutzt und das aus der Hydrolyse entstehende anorganische Phosphat kann dann mit Calcium unter spezifischen Bedingungen Minerale bilden.

Bei **Dex** handelt es sich um ein synthetisches Glucocorticoid. Glucocorticoide sind Steroidhormone, die an spezifische intrazelluläre Rezeptoren binden und so die Gentranskription und proinflammatorische Signalwege regulieren (Cooper et al., 2016). Die Wirkung von Glucocorticoiden auf Knochengewebe ist sehr vielfältig. Sie können bereits nach wenigen

Monaten Therapie und einer mittleren Dosierung Knochenschwund und Osteoporose verursachen. Dabei wird sowohl die Osteoklastogenese stimuliert als auch die Osteoblastenzahl und -funktion inhibiert (Canalis und Delany, 2002). In *in vitro* Experimenten hatte Dex unterschiedliche und teilweise konträre Effekte auf die osteogene Differenzierung (zusammengefasst in Hong et al., 2008). Dies scheint neben der eingesetzten Konzentration insbesondere auch vom Entwicklungsstadium der Zellen und der Spezies abhängig zu sein. Zu den beschriebenen positiven Effekten gehören eine gesteigerte AP-Aktivität, ein ausgeprägterer osteoblastärer Phäno- und Genotyp sowie eine erhöhte Mineralisierung (Alm et al., 2012; BATTERY et al., 2001; Eijken et al., 2006; Kärner et al., 2007).

Dex wurde von der U.S. FDA in die Schwangerschaftsrisikokategorie C – im Tierversuch weist die Substanz adverse Effekte auf den Fetus auf, es liegen jedoch keine oder nur unzureichende Studien zur Wirkung im menschlichen Fetus vor – eingeteilt. Um einen möglichen synergistischen Effekt mit Testsubstanzen zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit durch Untersuchung der Mineralisierungseffizienz geprüft, ob auf die Zugabe des Glucocorticoids verzichtet werden kann (Abb. 10).

Die alleinige Applikation von  $\beta$ -GP war bereits ausreichend, um eine Mineralisierung in hES-MP Kulturen nach ca. drei Wochen Differenzierung zu induzieren (Abb. 10B). Die ergänzende Gabe von AA schien keinen zusätzlichen positiven Effekt auf das Ausmaß der Ossifikation zu haben, unterstützte jedoch eine frühere Detektion (Abb. 10C). Nichtsdestotrotz waren Mineralisierungsbeginn und -grad deutlich verzögert bzw. geringer als bei zusätzlicher Induktion mit Dex (Abb. 10D). Ursache dafür scheint zu sein, dass die Zugabe von AA und  $\beta$ -GP nicht ausreicht, um die AP-Aktivität in den hES-MP Kulturen zu stimulieren (vgl. Abb. A2 im Anhang mit Abb. 14). Für die Etablierung von toxikologischen Assays ist ein ausreichend großes Messfenster zur Quantifizierung erforderlich und ein möglichst früher Messzeitpunkt wünschenswert. Beides war unter den gewählten experimentellen Bedingungen durch eine alleinige Induktion mit AA und  $\beta$ -GP nicht gegeben und dieser Ansatz wurde in den nachfolgenden Untersuchungen daher nicht weiterverfolgt.

Ein alternativer Induktor zu Dex ist **1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>**, die physiologisch aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub>. Es bindet an nukleäre Vitamin-D-Rezeptoren, die nach Heterodimerisierung mit Retinoid-X-Rezeptoren die Transkription spezifischer Zielgene regulieren. *In vivo* ist 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> essentiell für die Calciumhomöostase und damit entscheidend an der Knochenformierung und Mineralisierung beteiligt. Für *in vitro* Experimente zur Generierung von Osteoblasten wird es seltener eingesetzt als Dex, stimuliert aber nachweislich die Differenzierung von verschie-

denen Zellmodellen (Olivares-Navarrete et al., 2012; Owen et al., 1991; Siggelkow et al., 1999; Woeckel et al., 2010; zur Nieden et al., 2003). Dabei wurden die Induktion der Genexpression charakteristischer Marker, wie z. B. AP, BSP, Kollagen oder OC, die Ausbildung eines osteoblastären Phänotyps und eine verstärkte Mineralisierung beobachtet. Wie für Dex sind die Auswirkungen der Supplementierung mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stark abhängig von der Konzentration, der Expositionsdauer, dem Entwicklungsstadium der Zellen und der Spezies (Owen et al., 1991; Woeckel et al., 2010; Zhang et al., 1997).

Ob  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in der Lage ist, die osteogene Differenzierung von hES-MPs zu induzieren und welche zellphysiologischen Veränderungen damit einhergehen, wurde bisher noch nicht untersucht. Daher wurden  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Dex in den Charakterisierungsexperimenten in dieser Arbeit vergleichend verwendet. Dabei zeigte  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  insgesamt eine weitgehend vergleichbare Wirkung wie Dex in Bezug auf den Verlauf und die Stärke der Differenzierung (Abb. 10E). Unterschiede zu Dex konnten dahingehend beobachtet werden, dass die Anzahl an AP-positiven Zellen zu späten Zeitpunkten nur halb so hoch war (Abb. 22), Runx2 weniger stark herunterreguliert wurde (Abb. 13D) und der Mineralisierungsbeginn etwas verzögert war (Abb. 17).

Aufgrund dieser Daten wurde für den *Proof of Concept* im Rahmen der Substanztestungen mit der Induktorkombination AA,  $\beta$ -GP, Dex weitergearbeitet. Insbesondere die frühere Mineralisierung unter Zugabe von Dex war von Relevanz, da dies als Endpunkt gewählt wurde. Ein weiteres Argument, das für die Verwendung von Dex sprach, war eine insgesamt umfangreichere Datenlage im Vergleich zu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , da die initiale Charakterisierung von de Peppo et al. (2010a) bereits mit diesem Supplement durchgeführt wurde. Zudem wiesen die hier eingesetzten Konzentrationen von Dex keine embryotoxische Aktivität in der WEC oder dem EST auf (Genschow et al., 2004; Hansen und Grafton, 1988).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , das die Osteogenese über einen anderen molekularen Signalweg induziert als Dex, könnte zukünftig eine geeignete Alternative darstellen im Fall, dass sich keine eindeutigen Resultate in Substanzexperimenten mit dem Dex-basierten Protokoll ergeben.

## 6.1.2 Charakterisierung der osteogenen Differenzierung von hES-MPs

### 6.1.2.1 Präsenz und zeitlicher Verlauf typischer osteogener Differenzierungsprozesse in hES-MPs

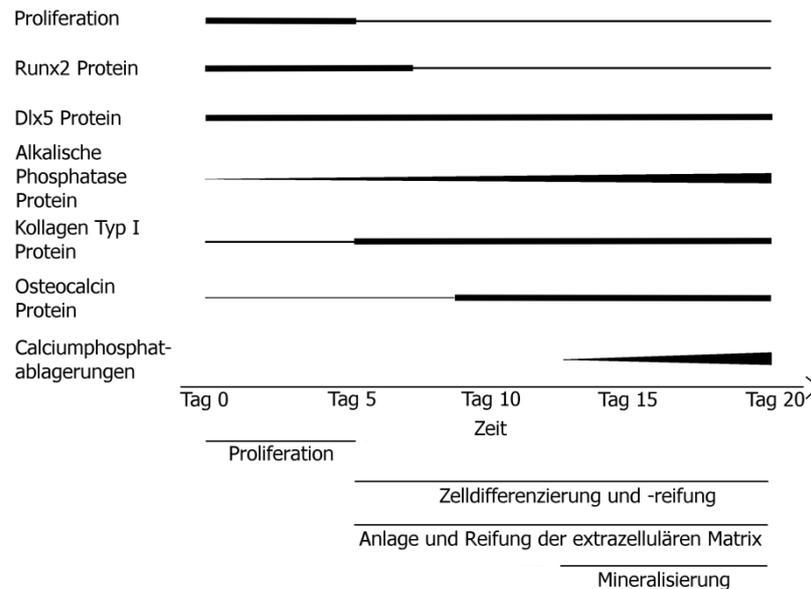
Die essentiellen Schritte der osteogenen Differenzierung beinhalten die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen, ihre graduelle Differenzierung in funktionelle Osteoblasten, die Anlage und Reifung des organischen Teils der ECM und die nachfolgende Mineralisierung der Matrix (Stein et al., 2004). Diese Vorgänge sind durch die differentielle Biosynthese einer Vielzahl von molekularen Markern gekennzeichnet, die oft essentielle regulatorische Funktionen besitzen.

Erste Hinweise darauf, dass hES-MPs diese fundamentalen Prozesse *in vitro* rekapitulieren können, wurden von de Peppo et al. (2010a) erbracht, die zeigen konnten, dass der zeitliche Verlauf der Genexpression und das Mineralisierungsprofil ähnlich zu denen von humanen MSCs sind. Um das Potential von hES-MPs als Modellsystem für toxikologische Testungen besser abschätzen zu können, wurden die spezifischen Zeitfenster der für die osteogene Differenzierung typischen Prozesse in diesen Zellen näher untersucht. Dies hilft nicht nur dabei die zugrunde liegenden molekularen Prozesse besser zu verstehen, sondern kann auch Informationen zu entwicklungs- und substanzspezifischen sensitiven Perioden bei Exposition gegenüber chemischen Noxen liefern.

Dafür wurden molekulare Marker, die unterschiedliche Signalwege und Stadien der Knochenentwicklung repräsentieren, betrachtet. Es handelte sich dabei um die Transkriptionsfaktoren Dlx5 und Runx2, das Enzym AP, die ECM-Proteine Kollagen Typ I und OC sowie die Mineralisierung. Die Untersuchung erfolgte dabei, soweit für den Marker relevant, auf Proteinebene, da dies sowohl die Erfassung von transkriptional als auch (post)translational bedingten Veränderungen ermöglicht. Dieses Vorgehen trägt außerdem zur Erweiterung der Datenbasis für hES-MPs bei, deren osteogene Differenzierung bisher nur im Hinblick auf die Genexpression analysiert wurde (de Peppo et al., 2010a).

Eine hohe Proliferation von hES-MPs wurde zwei Tage nach der initialen Einsaat gemessen (Abb. 11A). Mit Konfluenz der Zellen ab Tag 5 sank die Zellteilungsrate und blieb auf diesem niedrigeren Level für die restliche Differenzierungszeit (Abb. 11A und Abb. 17). Ab Tag 5 erfolgte dann eine starke Zunahme von AP (Anzahl Marker-positiver Zellen und Aktivität) als Indikator für die Zellreifung (Abb. 14 und Abb. 22) und der Deposition von Kollagen Typ I als Maß für die Anlage der ECM (Abb. 15). Die weitere Reifung der ECM wird durch die Sezer-

nierung von OC illustriert (Abb. 16). Alle genannten Prozesse lieferten die Basis für die nachfolgende Mineralisierung, die ab Tag 12–13 detektierbar war und sukzessive zunahm (Abb. 17 und Abb. 23). Eine zusammenfassende Darstellung der osteogenen Differenzierung von hES-MPs und des Verlaufs der Bildung/Entwicklung der untersuchten Marker ist in Abb. 34 gegeben. Die weiter oben beschriebene Abfolge der Prozesse der Knochenentwicklung konnte somit auch für hES-MPs bestätigt werden.



**Abb. 34: Schematische Darstellung der osteogenen Differenzierung von hES-MPs und Verlauf der Bildung/Entwicklung typischer osteogener Marker basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Daten.**

### 6.1.2.2 Bildung ausgewählter osteogener Marker in hES-MPs

#### 6.1.2.2.1 Dlx5

Bei Dlx5 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der insbesondere in der Entwicklung kraniofazialer Knochen, aber auch der des axialen und appendikulären Skeletts, eine Rolle spielt und sowohl während der frühen als auch voranschreitenden osteoblastären Differenzierung gebildet wird.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass Dlx5 bereits in allen Zellen der nicht-differenzierenden hES-MPs nachweisbar war (Abb. 13A). Dies ist in Übereinstimmung damit, dass dieser Transkriptionsfaktor ein direkter *upstream* Regulator von Runx2 ist (Lee et al., 2005), das ebenfalls bereits detektiert werden

konnte. Das Proteinlevel von Dlx5 blieb über einen Differenzierungszeitraum von 18 Tagen weitgehend konstant und wurde auch durch die Induktion mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Dex nicht bedeutend verändert (Abb. 13B). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die bereits hohe Biosynthese nicht zusätzlich stimuliert werden konnte. Weiterhin konnten Lee et al. (2003) in Studien mit prämyoblastären C2C12 Zellen zeigen, dass Dlx5 ein spezifisches Ziel von BMPs ist und durch zahlreiche andere osteogene Induktoren, u. a.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Dex, nicht induziert wird. Die mRNA von Dlx5 konnte mit dem eingesetzten PCR Array nicht detektiert werden (Tab. A1 im Anhang). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass im Array für die Transkription aller 84 Gene dieselben PCR Bedingungen verwendet wurden, die möglicherweise nicht optimal für die inkludierten Primer zur Vervielfältigung von Dlx5 waren.

### 6.1.2.2.2 Runx2

Der Transkriptionsfaktor Runx2 ist ein maßgeblicher Regulator der Osteogenese, wobei verschiedene Isoformen existieren, die sich im zeitlichen Expressionsmuster unterscheiden.

In Übereinstimmung mit seiner Funktion in der mesenchymalen bzw. frühen osteoblastären Gewebespezifizierung wurde Runx2 bereits von allen Zellen der nicht-differenzierenden hES-MPs gebildet (Abb. 13C). Die Daten des PCR Arrays zeigten, dass die mRNA-Expression im Laufe der induzierten Differenzierung weitgehend unverändert blieb (Abb. 31), was auch von de Peppo et al. (2010a) beobachtet wurde. Das Proteinlevel hingegen nahm entsprechend der Western-Blot und durchflusszytometrischen Analysen ab (Abb. 13D und Abb. 20). Eine unterschiedliche Regulation zwischen mRNA und Protein von Runx2 ist bereits in anderen Studien beobachtet worden und könnte auf den Einfluss von diversen posttranslationalen Modifikationen auf die Proteinstabilität zurückzuführen sein (Jonason et al., 2009).

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass die Abnahme der Proteinlevel die Folge einer verminderten Anzahl an Runx2-produzierenden hES-MPs war und dies nicht an einer generellen Reduktion der Proteinmenge in Runx2-positiven Zellen lag (Abb. 20). Ab Tag 11 waren nur noch 60 % der Zellen positiv für den Marker. Dies könnte, in Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen Rückgang von Runx2 in reifen Osteoblasten (Komori, 2010), für eine schnell voranschreitende Ausdifferenzierung einer Subpopulation der hES-MPs sprechen. Es sollte dabei beachtet werden, dass die Resultate den Gesamtstatus an zellulärem Runx2 widerspiegeln, da der hier verwendete AK, wie auch alle bisher beschriebenen AK, keine ausschließliche Spezifität für nur eine Isoform besitzt.

#### **6.1.2.2.3 Alkalische Phosphatase**

Das Enzym AP hat eine wichtige Funktion in der Mineralisierung von Knochengewebe. Es wird bereits in frühen osteoblastären Stadien gebildet und nimmt mit voranschreitender Differenzierung sukzessive zu.

In Übereinstimmung damit konnte AP nur in wenigen Zellen der nicht-differenzierenden hES-MPs nachgewiesen werden, erfuhr eine rasche Induktion mit Einleitung der Differenzierung und nahm im Verlauf der Reifung der Kulturen konstant zu (Abb. 14, Abb. 22 und Abb. 31). Die Zugabe von Dex oder  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  war dabei für eine Steigerung der AP-Produktion und Aktivität essentiell, wobei Dex ein stärkeres induktives Potential zu späteren Zeitpunkten besaß. Entsprechend ihrer physiologischen Funktion im Knochen ging die Zunahme an AP der Bildung kalzifizierter Bereiche voraus und Experimente mit dem Inhibitor LEV zeigten, dass ihre Enzymaktivität unerlässlich für die Mineralisierung der hES-MP Kulturen war (Abb. 24).

#### **6.1.2.2.4 Kollagen Typ I**

Kollagen Typ I ist das prominenteste Protein in der ECM von Knochengewebe. Es wird bereits von Präosteoblasten gebildet, erfährt die stärkste Synthese jedoch durch nachfolgende osteoblastäre Stadien.

hES-MPs wiesen bereits vor Induktion der Differenzierung eine starke Expression der mRNA-Transkripte für die Kollagen Typ I-Untereinheiten auf (Abb. 31) und auch das Protein wurde in einem Großteil der Zellen detektiert (Abb. 15A). In Übereinstimmung mit dem von de Peppo et al. (2010a) beschriebenen Verlauf blieb die mRNA-Expression während der Differenzierung auf diesem hohen Niveau (Abb. 31) und auf Proteinebene war die Ausbildung eines dichten Netzwerks aus Kollagenfibrillen in der ECM erkennbar (Abb. 15). Da dies sowohl für die induzierten als auch die Kontrollkulturen beobachtet wurde, scheint die Bildung und Sezernierung von Kollagen Typ I unabhängig von der Anwesenheit von AA, aber auch von Dex oder  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu sein. Ein möglicher Grund könnte die frühe und hohe Biosynthese von *Dlx5* und *Runx2* sein, die beide über die Bindung an spezifische Elemente in den Promoterregionen von *COL1A1* und/oder *COL1A2* die Bildung von Kollagen Typ I stimulieren können (Kern et al., 2001; Tadic et al., 2002, 2001).

#### **6.1.2.2.5 Osteocalcin**

Als weiterer ECM-lokalisierter Marker wurde in der vorliegenden Arbeit OC untersucht, ein

die Gla-Domäne enthaltendes Protein, das von reifen Osteoblasten gebildet wird und an Hydroxyapatit bindet.

Nicht-differenzierende hES-MPs exprimierten die mRNA von OC bereits auf einem niedrigen Level und dieser Status blieb in Übereinstimmung mit den Daten von de Peppo et al. (2010a) während der Differenzierung konstant (Abb. 31). Auf Proteinebene wurde OC nur in wenigen Zellen der nicht-differenzierenden hES-MPs nachgewiesen, akkumulierte im Laufe der Differenzierung jedoch in den induzierten und den Kontrollkulturen (Abb. 16). D. h. auch hier war, ähnlich wie für Kollagen Typ I, keine induktionsbedingte Veränderung der Biosynthese zu beobachten. Die Produktion von OC wird ebenfalls durch Runx2 und Dlx5 reguliert (Jang et al., 2012; Makita et al., 2008; Newberry et al., 1998), daher kann die starke Präsenz beider Transkriptionsfaktoren von Beginn an auch hier eine mögliche Erklärung sein. Im Gegensatz zu den Kontrollkulturen wiesen die induzierten hES-MPs jedoch mit zunehmender Differenzierung eine Veränderung im Färbemuster auf. OC schien hier verstärkt in die ECM sezerniert zu werden, wo es akkumulierte und positiv gefärbte Cluster bildete. Da dies zeitlich mit dem Einsetzen der Mineralisierung korrelierte, die bei den Kontrollkulturen nicht auftrat, könnte diese Verteilung für eine Bindung an extrazelluläre kalzifizierende Strukturen sprechen.

### 6.1.2.2.6 Mineralisierung

Die Bildung spezifischer Calciumphosphatverbindungen (Hydroxyapatit) in der ECM ist eine charakteristische Eigenschaft von Knochen. Dass die Mineralisierung von hES-MPs durch die Formierung von Hydroxyapatit gekennzeichnet ist, konnte mittels *Time-of-Flight* Sekundärionenmassenspektrometrie (ToF-SIMS) nachgewiesen werden (de Peppo et al., 2010a). In der vorliegenden Arbeit bildeten hES-MPs nach Induktion mit Dex oder  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  innerhalb einer dreiwöchigen Differenzierungszeit eine flächige Mineralisierung mit einzelnen Bereichen größerer Dichte aus (Abb. 17). Sie ähnelt damit strukturell derjenigen von humanen MSCs (de Peppo et al., 2010a; Jaiswal et al., 1997). Der frühe Mineralisierungsbeginn ab ca. Tag 12–13 und die starke Zunahme innerhalb einer Woche spricht für eine schnelle Reifung von zumindest einer Subpopulation an Zellen in den hES-MP Kulturen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hES-MPs charakteristische osteogene Marker, die unterschiedliche Entwicklungsstadien und Signalwege repräsentieren, in einem zeitlich gestaffelten Muster bilden, das den in der Literatur beschriebenen Verlauf der osteogenen

Differenzierung weitgehend reflektiert. Bisher waren diese Marker in hES-MPs nur mittels Genexpressionsanalyse untersucht worden (de Peppo et al., 2010a). Die hier vorgenommene Betrachtung auf Proteinebene konnte dazu beitragen den Differenzierungsverlauf dieser Zellen besser zu charakterisieren, da die Regulation der jeweiligen mRNA und des zugehörigen Proteins sich für viele der untersuchten Marker unterschied.

### 6.1.2.3 Erkenntnisse zum Entwicklungsstadium von hES-MPs

Basierend auf einem Vergleich des Genexpressionsprofils von hES-MPs mit dem der parental humanen ES Zelllinie und dem von humanen MSCs haben de Peppo und Kollegen das Entwicklungsstadium dieser Zellen als „an intermediate differentiation state between embryonic and adult stem cells“ mit „signs of lineage commitment into the mesodermal lineage“ (de Peppo et al., 2010b) beschrieben.

Insbesondere die in der vorliegenden Arbeit festgestellte starke Präsenz von Dlx5, Runx2 und Kollagen Typ I in nicht-differenzierenden hES-MPs weist darauf hin, dass diese Zellen bereits bis zu einem gewissen Grad eine Spezifizierung zu einem osteogenen Zelltyp durchlaufen haben. Diese Hypothese wird zusätzlich durch die prominente Produktion von Kollagen Typ I und OC während der Differenzierung in den Kontrollkulturen und durch den relativ frühen Anstieg sowohl der OC-Proteinlevel als auch der Mineralisierung unterstützt. Auch der mRNA-Nachweis typischer osteogener Marker, wie CDH11 (di Benedetto et al., 2010; Okazakis et al., 1994), PHEX (Ecarot und Desbarats, 1999; Ruchon et al., 2000), SP7 (Kaback et al., 2008; Nakashima et al., 2002) und SPP1 (Yamate et al., 1997), in den nicht-differenzierenden hES-MPs spricht dafür (Tab. A1 im Anhang). Darüber hinaus wurde von der Arbeitsgruppe um Karlsson beschrieben, dass die Zellen *in vitro* eine geringere Kapazität zur Differenzierung in Chondrozyten und Adipozyten unter den von ihnen angewendeten Kulturbedingungen aufwiesen (de Peppo et al., 2010a; Karlsson et al., 2009).

Ein etwas fortgeschritteneres Entwicklungsstadium kann vorteilhaft in Bezug auf die Homogenität und damit einhergehend die Differenzierungseffizienz des Zellmodells sein. Auf der anderen Seite kann dies jedoch die Anwendbarkeit des Systems limitieren, da Substanzen, die ausschließlich auf frühe Entwicklungsvorgänge wirken, möglicherweise nicht detektiert werden können. Vergleichsstudien, bei denen auch undifferenzierte, pluripotente humane ES Zellen für die Differenzierung eingesetzt werden, könnten helfen den letztgenannten Aspekt näher zu untersuchen.

## **6.2 Etablierung toxikologischer Endpunkte für osteogen differenzierende hES-MPs**

Die Entwicklung toxikologischer Endpunkte umfasst einerseits die Identifizierung geeigneter Biomarker und zum andern die Etablierung von sensitiven Methoden zu ihrer Quantifizierung.

Ein potentieller Biomarker für gewebespezifische Entwicklungsprozesse zeichnet sich im besten Fall durch folgende Eigenschaften aus: Spezifität für das jeweilige Gewebe, geringe Basallevel, eine differenzierungsbedingte Veränderung (möglichst eine Zunahme) sowie eine gute Nachweisbarkeit, die mit einem großen Messfenster im Vergleich zur Kontrolle und einem frühen Messzeitpunkt einhergeht. Zudem sollte eine spezifische und sensitive Quantifizierung des Markers möglich sein mit einer Methodik, die optimalerweise einfach, schnell und transferierbar ist.

Für Knochengewebe stellen einige dieser Aspekte eine besondere Herausforderung dar. So sind z. B. in der Literatur zwar zahlreiche charakteristische molekulare Marker beschrieben, jedoch kommt keiner von diesen ausschließlich im Knochengewebe vor. Andere Gewebesysteme, wie beispielsweise Neuronen oder Herzmuskelzellen, bieten hier durch die Existenz exklusiver Marker zunächst bessere Voraussetzungen. Allein OC wird häufig als spezifischer Knochenmarker genannt, wird allerdings in geringem Umfang auch in anderen Geweben gebildet (zusammengefasst in Neve et al., 2012). Da es sich bei hES-MPs um ein relativ homogenes Zellsystem handelt, das bereits in Richtung Mesenchym spezifiziert ist und zudem eine Supplementierung mit osteogenen Induktoren erfolgt, liegt die Vermutung nahe, dass ein Nachweis der Marker in diesen Zellen in erster Linie auf der Formierung von knochenähnlichem Gewebe beruht.

Weiterhin handelt es sich bei den meisten charakteristischen Markern um Proteine, die in die ECM sezerniert werden oder als Transkriptionsfaktoren dienen. Hier kann die Isolierbarkeit aus verknöcherten Strukturen und/oder Quantifizierbarkeit eine Herausforderung darstellen. So verlangt ein AK-basierter Nachweis von nukleär vorliegenden Transkriptionsfaktoren zumeist eine elaboriertere Aufarbeitung der Proben. Der quantitative Nachweis von extrazellulären Markern ist durch Medienwechsel und variierenden Verhältnissen von in die ECM eingelagertem versus mobilem Protein möglicherweise höheren Schwankungen unterworfen. Eine bedeutende technische Hürde ist zudem die zunehmende Verknöcherung, die z. B. die Isolation von mRNA und Proteinen, insbesondere in späteren Entwicklungsstadien, erschweren kann (Belluoccio et al., 2013; Cleland et al., 2012).

Die in Kapitel 6.1.2 diskutierten Experimente dienten neben der Charakterisierung der Differenzierung von hES-MPs auch der Identifizierung geeigneter molekularer Marker und der Etablierung von Methoden zu ihrer Quantifizierung. Die Untersuchung auf Proteinebene hat auch für diesen Aspekt den Vorteil, dass damit sowohl transkriptional als auch (post)translational bedingte Veränderungen und mögliche Substanzwirkungen darauf erfasst werden. Zudem hat sich für andere *in vitro* Testsysteme die Quantifizierung von Proteinen mittels Durchflusszytometrie und Proteomanalysen als geeigneter prädiktiver Ansatz erwiesen (Buesen et al., 2009; Groebe et al., 2010a).

### 6.2.1 Eignung der näher untersuchten molekularen Marker und der Methoden zu ihrer Quantifizierung

Aufgrund seiner frühen und ausgeprägten Präsenz in nicht-differenzierenden hES-MPs und der gleichbleibenden Proteinlevel im Verlauf der Differenzierung schien **Dlx5** nicht als toxikologischer Marker geeignet zu sein (Abb. 13A und B). Zudem konnte keine durchflusszytometrische Methodik identifiziert werden, die eine ausreichend gute Quantifizierung des Proteins ermöglichte (Daten nicht gezeigt).

Auch **Runx2** bot sich wegen seiner frühen starken Präsenz und der Abnahme des Proteinlevels mit zunehmender Differenzierung nicht als toxikologischer Marker für die hier vorgestellte Machbarkeitsstudie an (Abb. 13C und D). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit ein durchflusszytometrisches Protokoll etabliert werden, dass eine solide Quantifizierung der Veränderung in der Bildung ermöglichte (Abb. 20). Vorausgesetzt dem Nachweis, dass Runx2 im Hinblick auf die Detektion substanzspezifischer Effekte einen Mehrwert bietet, könnte die Erfassung dieses Markers daher zukünftig in Kombination mit weiteren Endpunkten erfolgen.

Im Gegensatz zu den beiden Transkriptionsfaktoren stellte **AP** durch eine prominente und frühe Zunahme im Differenzierungsverlauf sowie der hohen und gut reproduzierbaren Signale in der Durchflusszytometrie einen attraktiven toxikologischen Marker für hES-MPs dar (Abb. 14 und Abb. 22). Für den *Proof of Concept* wurde jedoch die Mineralisierung gewählt, da, wie nachfolgend beschrieben, die Methode zur Quantifizierung weniger umfangreich ist und die Möglichkeit zur Hochdurchsatzmessung bietet. AP könnte, unter Voraussetzung des Nachweises von Prädiktivität für substanzbedingte Beeinträchtigungen, als zusätzlicher Marker dienen.

Die ECM-Proteine **Kollagen Typ I** und **OC** zeigten zwar eine differenzierungsbedingte Zu-

nahme, allerdings nicht nur in den induzierten, sondern auch in den Kontrollkulturen (Abb. 15 und Abb. 16). Im Fall von OC war visuell eine Unterscheidung in Bezug auf die Verteilung des Proteins in den Kulturen möglich, deren Quantifizierung jedoch schwierig ist. Kollagen Typ I und OC qualifizierten sich daher nur eingeschränkt als toxikologische Marker für hES-MPs.

Die **Mineralisierung** von hES-MPs zeigte durch Zugabe der osteogenen Induktoren eine starke Zunahme im Laufe der Differenzierung, die reproduzierbare, hohe Signale im Vergleich zu den Kontrollen lieferte (Abb. 23). Zudem war eine vergleichsweise frühe Quantifizierung mit einer fluoreszenzbasierten Analytik möglich, die sich gut für einen hohen Probenumsatz eignet, keine umfangreichen Aufarbeitungsschritte benötigt und leicht transferierbar ist (Abb. 23B–D). Weiterhin sprach dafür, dass es sich bei der Mineralisierung um eine wesentliche Besonderheit der Knochenentwicklung handelt, die von der funktionellen Interaktion verschiedener zellulärer und molekularer Prozesse abhängig ist und sich bereits als prädiktiv für andere osteoblastäre Zellsysteme erwiesen hat (zur Nieden et al., 2010a).

In Betrachtung aller in dieser Arbeit gewonnenen Daten und Beobachtungen stellte die fluoreszenzbasierte Quantifizierung der Mineralisierung den attraktivsten toxikologischen Endpunkt dar und wurde daher für den *Proof of Concept*, die Substanztestungen, verwendet.

### 6.2.2 Identifizierung potentieller weiterer molekularer Marker

Zusätzlich zu den im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Untersuchungen wurde in einer Pilotstudie mit Hilfe eines PCR Arrays nach weiteren potentiellen molekularen Markern gescreent. Kandidaten sollten dabei niedrige Expressionslevel in nicht-differenzierenden hES-MPs, eine deutliche Zunahme der mRNA-Level mit voranschreitender Differenzierung, eine Sensitivität gegenüber der hier durchgeführten Substanztestung mit NaVPA und eine gewisse Spezifität für Knochengewebe aufweisen.

Alle oder der Großteil dieser Kriterien trafen für den Calcitonin-Rezeptor (CALCR), Cathepsin K (CTSK), das *Cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), Kollagen Typ XIV, alpha-1 (COL14A1) und Kollagen Typ XV, alpha-1 (COL15A1) zu (Abb. 32 und Abb. 33). Die C<sub>T</sub>-Werte lagen für die mRNA dieser Marker, mit Ausnahme von CTSK, in nicht-differenzierenden Zellen zumeist bei ca. 30 oder höher. Bis Tag 15 der Differenzierung erfolgte eine Expressionssteigerung um das 4,5- bis 62-fache der Kontrolle, bis Tag 23 war ein 11- bis 190-facher Unterschied vorhanden. Alle Marker erfuhren durch NaVPA eine Verminderung

der mRNA-Expression um das 2- bis 14-fache am Tag 15 und das 2- bis 57-fache am Tag 23.

Keines dieser Proteine wird ausschließlich in Knochengewebe synthetisiert, allerdings scheinen sie alle auch eine Funktion in diesem Organ zu besitzen.

**CALCR** gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist an der Calciumhomöostase beteiligt. Er ist funktionell in verschiedenen Entwicklungsstadien des Organismus aktiv und wird von unterschiedlichen Zelltypen gebildet (Wookey, 2009). In Knochen ist CALCR ein typischer Marker für die Differenzierung von Osteoklasten, die aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden. Allerdings ist in der Literatur auch beschrieben, dass sein Ligand Calcitonin die Knochenformierung *in vitro* direkt stimulieren kann (Farley et al., 1991, 1988) und CALCR von humanen Osteoblasten und murinen Osteozyten produziert wird (Plotkin et al., 1999; Villa et al., 2002).

Die lysosomale Cysteinprotease **CTSK** ist ebenfalls hauptsächlich als Marker für Osteoklasten bekannt. Sie degradiert ECM-Proteine, wie z. B. Kollagen Typ I, und ist damit in die Knochenresorption involviert (Fonovi und Turk, 2014). Neuere Studien zeigen jedoch, dass CTSK auch von primären humanen Osteoblasten und osteogen differenzierenden humanen MSCs gebildet wird (Goia-Socol et al., 2013; Imer et al., 2009; Mandelin et al., 2006; Staudt et al., 2012).

Das Vorhandensein von Osteoklasten-ähnlichen Zellen lässt sich für das verwendete Zellkulturmodell nicht ausschließen. Mehrere Faktoren sprechen jedoch gegen diese Möglichkeit. Zum einen zeigten nicht-differenzierende hES-MPs keine Produktion des hämatopoetischen Vorläuferzellmarkers CD117 (Abb. 7) und sind eine relativ homogene Zellpopulation, die nahezu zu 100 % Runx2 und Dlx5 als osteoblastentypische Marker synthetisiert. Zum anderen wird die Osteoklastendifferenzierung durch von Osteoblasten sezernierte parakrine Faktoren stimuliert (Boyle et al., 2003), die im PCR Array nur zum Teil nachgewiesen werden konnten. Während CSF1 (M-CSF) in gleichbleibendem Maße während der Differenzierung detektiert wurde, konnte eine Expression des kritischen Faktors TNFSF11 (RANKL) zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden (Tab. A1 im Anhang).

**COMP** gehört zu den Thrombospondinen, einer Familie von sezernierten Calcium-bindenden Proteinen (Acharya et al., 2014). Es wird hauptsächlich im Knorpelgewebe gebildet, reguliert dort den Aufbau der ECM und spielt somit eine Rolle in der enchondralen Knochenbildung. Entsprechend seiner Lokalisation produzieren vor allem Chondrozyten dieses Protein. Di Cesare et al. (2000) konnten zudem zeigen, dass COMP auch von humanen fetalen und

adulten Osteoblasten sowie Osteosarkomzellen produziert wird. Lisignoli et al. (2009) bestätigten eine hohe Biosynthese dieses Proteins in primären humanen Osteoblasten im Vergleich zu MSCs.

Ähnlich wie die Osteoklastogenese lässt sich auch die Differenzierung einer Subpopulation von hES-MPs in einen chondrozytären Typus nicht ausschließen. Allerdings sprechen auch hier verschiedene Faktoren dagegen. Die gerichtete *in vitro* Differenzierung von MSCs zu Chondrozyten ist anspruchsvoll und erfordert eine ausbalancierte Zugabe an Wachstumsfaktoren und Induktoren, eine 3D-Kultivierung und den Einsatz von Biomaterialien (Yu et al., 2012). Zudem beschrieb die Gruppe um Karlsson, dass unter den von ihnen gewählten Kulturbedingungen hES-MPs eine geringe Kapazität zur Knorpeldifferenzierung *in vitro* aufwiesen (de Peppo et al., 2010a; Karlsson et al., 2009). Darüber hinaus zeigten die charakteristischen chondrozytären Marker SOX9 und COL2A1 im PCR Array eine Abnahme im Laufe der osteogenen Differenzierung von hES-MPs bzw. konnten nicht detektiert werden (Tab. A1 im Anhang).

*COL14A1* kodiert für die alpha-1-Kette von **Kollagen Typ XIV**, einem Homotrimer, das sich aus kollagenen und nicht-kollagenen Domänen zusammensetzt und zu den FACIT-Kollagenen gehört (Wälchli et al., 1994). Kollagen Typ XIV ist mit Kollagen Typ I assoziiert und reguliert vermutlich die Anordnung, das Wachstum und die Interaktion von Kollagenfibrillen (Aumailley und Gayraud, 1998; Colige et al., 1995; Wälchli et al., 1994). Es ist daher in den entsprechenden Geweben lokalisiert und wird von verschiedenen Zelltypen, wie z. B. Muskel-, Leber-, Darm- oder periostealen Zellen, synthetisiert (Schuppan et al., 1990; Wälchli et al., 1994). Wälchli et al. (1994) konnten in Hühnern zeigen, dass Kollagen Typ XIV in der frühen Embryonalentwicklung nur sehr geringfügig gebildet wird, in einem späten Embryonalstadium aber ausgeprägt vorhanden ist.

*COL15A1* kodiert für die alpha-1-Kette von **Kollagen Typ XV**, bei dem es sich um ein nicht-fibrilläres Mitglied dieser Proteinfamilie handelt, das zu den Multiplexinen (multiple tripelhelikale Domänen mit Unterbrechungen) gehört (Clementz und Harris, 2013). Es kommt in verschiedenen Gewebetypen vor und wird insbesondere markant in der Basalmembran zwischen Epi-, Meso- bzw. Endothel und dem Bindegewebe produziert. Seine Funktion ist bisher weitgehend unbekannt. Bisherige Studien und strukturelle Merkmale weisen auf eine Rolle in der Zelladhäsion, der Interaktion mit fibrillärem Kollagen und der Rekrutierung von Zytokinen hin (Clementz und Harris, 2013; Myers et al., 2007). In einer Studie von Lisignoli et al. (2009) war *COL15A1* der prominenteste hochregulierte Marker in primären humanen

Osteoblasten im Vergleich zu MSCs und nahm während der osteogenen Differenzierung der letztgenannten deutlich zu. In Übereinstimmung mit den Daten für hES-MPs erfolgte die höchste Steigerung zwischen der ersten und zweiten Woche der Differenzierung, kurz vor Beginn der Mineralisierung.

CALCR, CTSK, COMP, COL14A1 und COL15A1 scheinen nach diesen ersten Analysen ein vielversprechendes Potential als toxikologische Marker für ein hES-MP Testsystem zu besitzen. Eine Verifikation der mittels PCR Array gewonnenen Daten auf mRNA- und/oder Proteinebene sowie Untersuchungen im Hinblick darauf welche Differenzierungsstadien von hES-MPs die Marker bilden sind jedoch noch erforderlich zur besseren Abschätzung ihrer Eignung.

### **6.3 Eignung des etablierten *in vitro* Assays zur Erfassung von substanz-induzierten Effekten auf die Knochendifferenzierung**

Zur Überprüfung, ob die Quantifizierung der Mineralisierung in osteogen differenzierenden hES-MPs ein geeigneter Assay zur spezifischen Vorhersage von chemisch induzierten Effekten auf die Knochenentwicklung ist, wurde eine Auswahl an Modellsubstanzen getestet. Dies umfasste mit NaVPA, BA, WAR und 5-FU vier Stoffe, die bekanntermaßen die skelettale Entwicklung schädigen, sowie die drei nicht-entwicklungstoxischen Substanzen DPH, MCP und PenG. Die Messung der Zellviabilität wurde als Endpunkt zur Bestimmung von zytotoxischen Effekten integriert. Damit sollte eine spezifische Wirkung von Substanzen auf die Mineralisierung/Differenzierung von generellen toxischen Effekten abgegrenzt werden. Die Auswertung der Substanztestungen erfolgte mit Hilfe von Konzentrations-Wirkungs-Profilen und einer vergleichenden statistischen Analyse der ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte.

In Vortests mit dem AP-Inhibitor LEV konnte zunächst demonstriert werden, dass der Nachweis einer spezifischen Beeinträchtigung der Mineralisierung mit diesem Assay möglich ist (Abb. 24). Gleichzeitig konnte damit eine positive Standardreferenzsubstanz für den Endpunkt identifiziert werden. Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Behandlungszeiträume für 5-FU, NaVPA und PenG zeigte zudem, dass sich eine Applikation über den gesamten Differenzierungszeitraum als das geeignetste Expositionsszenarium erwiesen hat (Abb. 25).

Eine sehr gute Separierung zwischen den beiden Endpunkten konnte für NaVPA, BA und WAR festgestellt werden (Abb. 25F, Abb. 26A und B, Tab. 2), was für eine spezifische Wirkung dieser Stoffe auf die osteogene Differenzierung und/oder Mineralisierung spricht. Im

Gegensatz dazu beeinträchtigten 5-FU, DPH, MCP und PenG die Mineralisierung im Vergleich zur Zellviabilität nicht signifikant (Abb. 25C und I, Abb. 26C und D, Tab. 2).

### **6.3.1 Diskussion der Resultate für die einzelnen Testsubstanzen**

#### **6.3.1.1 Valproinsäure**

Das humane Teratogen VPA ist vergleichsweise gering zytotoxisch und das hier verwendete Natriumsalz inhibierte die Zellviabilität von hES-MPs erst in hohen Konzentrationen mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 7,8 mM (Tab. 2). Die Mineralisierung war im Vergleich dazu mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 0,27 mM spezifisch und signifikant beeinträchtigt ( $p = 0,013$ ). In anderen Studien zeigte VPA in einem ähnlichen Konzentrationsbereich eine Schädigung der neuronalen, kardialen und endothelialen Differenzierung von humanen und Maus ES Zellen (de Jong et al., 2012; Festag et al., 2007; Genschow et al., 2004; Hayess et al., 2013; Palmer et al., 2013; Waldmann et al., 2014; zur Nieden et al., 2004). Dies spricht für einen gemeinsamen zugrunde liegenden Mechanismus für die verschiedenen entwicklungstoxischen Effekte, der möglicherweise auf die HDAC-inhibitorische Funktion der Substanz zurückgeführt werden kann. Im Vergleich zu den beiden bisher beschriebenen Knochendifferenzierungsassays mit Maus ES Zellen zeigte der hES-MP Assay eine bessere Prädiktivität für VPA, da bei diesen kein oder nur ein geringer Unterschied zwischen dem Differenzierungs- und dem Zytotoxizitätspunkt festgestellt werden konnte (de Jong et al., 2012; zur Nieden et al., 2004).

Eine Behandlung mit VPA von Tag 1–5 der Differenzierung von hES-MPs war essentiell für die Beobachtung der Verminderung der Mineralisierung und dieser Effekt wurde durch eine Exposition über den gesamten Kultivierungszeitraum verstärkt (Abb. 25D und F). Eine Applikation ab Tag 8 hatte hingegen keinen negativen Einfluss auf die Entstehung von mineralisierten Bereichen (Abb. 25E). Die Wirkung von VPA scheint daher in erster Linie auf eine Interferenz mit der Proliferations- und frühen Differenzierungsphase zurückzuführen zu sein. Dies ist in Übereinstimmung damit, dass HDAC-Inhibitoren insbesondere auf schnell proliferierende Zellen wirken und DNA-Schädigungen, Zellzyklusarrest und Apoptose in adulten MSCs aus Knochenmark induzieren (zusammengefasst in Bradley et al., 2011).

Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass HDAC-Inhibitoren zwar die Knochenentwicklung und -homöostase *in vivo* beeinträchtigen, in zahlreichen *in vitro* und *ex vivo* Zellkulturen die Genexpression osteogener Marker und die Mineralisierung jedoch stimulieren. Für VPA wurde dies u. a. mit humanen adulten MSCs aus Nabelschnurblut, Knochenmark und Fettge-

webe und der aus Mausembryonen gewonnenen mesenchymalen Zelllinie C3H10T1/2 gezeigt (Cho et al., 2005; Hatakeyama et al., 2011; Lee et al., 2009). Bradley et al. (2011) führen diese divergierende Beobachtung auf eine höhere Sensitivität von Progenitorpopulationen gegenüber HDAC-Inhibitoren im Vergleich zu reiferen Zellen zurück. Basierend auf den differenzierungsinhibitorischen Effekten, die VPA auf hES-MPs zeigte, wäre es denkbar, dass Unterschiede ebenfalls zwischen embryonalen und adulten Zellen bestehen, allerdings wurde dies bisher noch nicht systematisch adressiert. Festzuhalten bleibt, dass die Wahl des Zellsystems ein entscheidender Faktor für die beobachteten Auswirkungen von VPA ist und dass das hier angewandte Modell eine korrekte Vorhersage des entwicklungstoxischen Potentials dieser Substanz ermöglicht.

Die initialen Experimente mit dem PCR Array erbrachten Hinweise auf mögliche Zielgene und molekulare Prozesse, die in hES-MPs durch VPA beeinflusst werden. Die auffälligste Beobachtung war hier eine zeitabhängige Inhibierung der mRNA-Expression von allen knochenrelevanten Kollagengenen, die im Array inkludiert waren (Abb. 33A). Eine Beeinträchtigung der Bildung von individuellen Kollagentypen bei Exposition gegenüber VPA ist in der Literatur bereits für immortalisierte fetale Osteoblasten (Humphrey et al., 2013), Fibroblasten (Fuller et al., 2010), hepatische Zellen (Watanabe et al., 2011) und den Implantationsbereich von Embryonen (Gürgen et al., 2012) beschrieben worden. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit auch mehrere nicht-kollagene Marker, die eine Rolle sowohl im Auf- als auch Abbau der ECM spielen, durch die Substanz beeinflusst (Abb. 33B). Basierend auf diesen Daten kann vermutet werden, dass VPA mit der Formierung und Funktionalität der ECM in osteogen differenzierenden hES-MPs interferiert. Dies könnte aufgrund des strukturellen und funktionalen Stellenwerts der ECM für die Mineralisierung eine mögliche Ursache für die beobachtete Inhibition dieses Endpunkts sein.

### **6.3.1.2 Borsäure**

Wie VPA ist auch die teratogene Substanz BA vergleichsweise gering zytotoxisch und eine deutliche Beeinträchtigung der Zellviabilität von hES-MPs konnte bis zur höchsten getesteten Konzentration von 8,3 mM nicht festgestellt werden (Tab. 2). Die Mineralisierung war im Vergleich dazu mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 3,2 mM spezifisch und signifikant beeinträchtigt ( $p < 0,0049$ ). Eine frühere Studie zeigte, dass BA ebenfalls die osteogene Differenzierung von Maus ES Zellen negativ beeinflusst (de Jong et al., 2014). Dabei wurde mit Genexpressionsanalysen als Endpunkt gearbeitet und der substanzspezifisch sensitivste Marker für die Auswertung herangezogen, was eine mögliche Erklärung für den ca. 5-fach gering-

eren  $EC_{50}$ -Wert sein kann. Zudem war der Behandlungszeitraum ca. eine Woche länger. Darüber hinaus zeigte eine Studie mit humanen Zellen, dass die Ausprägung von Borat-induzierter Zytotoxizität von der Stärke der Biosynthese von Borattransportern abhängig ist (Park et al., 2004). Es wird vermutet, dass diese Proteine ubiquitär in Säugetieren gebildet werden. Es ist daher denkbar, dass spezies- und/oder gewebespezifische Unterschiede in der zellulären Menge dieser Transporter möglicherweise eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber BA mit sich bringen.

Es ist wenig darüber bekannt, ob Borverbindungen direkt in die physischen Mineralisierungsvorgänge eingreifen können. Bor kann in Knochengewebe akkumulieren und dort in 2- bis 3-fach höheren Konzentrationen vorliegen als im Plasma oder anderen Geweben (Hsu et al., 2011; Krieger, 2010). Dies liegt sehr wahrscheinlich an seiner hohen Affinität zu *cis*-Hydroxygruppen, die auch ein Bestandteil von Hydroxyapatit sind. Ob und welche Auswirkungen die Anreicherung von Bor auf die mechanischen Eigenschaften von Knochen oder lokale molekulare und zellbiologische Prozesse hat, ist bisher noch nicht geklärt.

### 6.3.1.3 Warfarin

Das humane Teratogen WAR beeinträchtigte von den hier verwendeten Testsubstanzen die Ausbildung mineralisierter Bereiche in hES-MP Kulturen am stärksten mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 0,0028 mM (Tab. 2). Ein Effekt auf die Zellviabilität hingegen konnte bis zu einer Konzentration von 0,3 mM nicht beobachtet werden (Abb. 26B). WAR inhibierte die Mineralisierung daher spezifisch und signifikant ( $p < 0,015$ ). Ein mineralisierungsinhibierendes Potential zeigte WAR bei vergleichbaren Konzentrationen auch in chronisch behandelten Kulturen von Rattenosteoblasten (Barone et al., 1994) und in mit Vitamin K1 oder Vitamin K2 und  $1,25(OH)_2D_3$  induzierten primären humanen Osteoblasten (Atkins et al., 2009; Koshihara und Hoshi, 1997). Als mögliche Ursache könnten die reduzierte Carboxylierung von OC (Koshihara und Hoshi, 1997), eine verminderte Akkumulation dieses Proteins in der ECM (Amizuka et al., 2009; Koshihara und Hoshi, 1997) und aber auch Effekte auf die osteoblastäre Genexpression, nicht nur von OC, sondern auch von AP, Kollagen Typ I und MGP (Barone et al., 1994; Jeong et al., 2011), in Betracht gezogen werden.

Die teratogenen Eigenschaften von WAR manifestieren sich im Menschen bei ca. 80- bis 400-fach niedrigeren Dosen als diejenigen von VPA (Ornoy, 2009; van Driel et al., 2002). In den osteogen differenzierenden hES-MPs inhibierte WAR die Mineralisierung bei einer ca. 100-fach geringeren Konzentration als NaVPA (Tab. 2). Die hohe Potenz von WAR zur

Induktion adverser Effekte konnte daher auch mit dem hier verwendeten *in vitro* Modell abgebildet werden.

#### 6.3.1.4 5-Fluorouracil

In Übereinstimmung mit Browns (2002) Klassifizierung als stark embryotoxische Substanz zeigten die differenzierenden hES-MPs eine hohe Sensitivität gegenüber 5-FU. Die Mineralisierung wurde bei Behandlung von Tag 1–15 mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 0,0091 mM in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie bei WAR inhibiert (Tab. 2). Die Zellviabilität war mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 0,0059 mM vergleichbar stark betroffen und beide Endpunkte unterschieden sich daher nicht signifikant ( $p = 0,81$ ). Daraus kann geschlossen werden, dass 5-FU nicht spezifisch auf die Mineralisierung bzw. Differenzierung von hES-MPs wirkt, sondern vermutlich seine umfassend beschriebenen Eigenschaften als Inhibitor von Zellteilung, -wachstum und -metabolismus auch in diesem Zellsystem zum Tragen kommen.

Osteogen differenzierende Maus ES Zellen zeigten in den beiden bisher beschriebenen *in vitro* Assays für Knochentoxizität eine höhere Sensitivität gegenüber 5-FU als hES-MPs, da toxische Effekte bei ca. 25- bis 200-fach geringeren Konzentrationen auftraten (de Jong et al., 2014; zur Nieden et al., 2010b). Eine Unterscheidung zwischen dem jeweiligen Differenzierungsendpunkt und dem gewählten Zytotoxizitätendpunkt war hier möglich, allerdings vermuteten auch zur Nieden et al. eine generelle zytotoxische Wirkung als Ursache (zur Nieden et al., 2010b).

Ein vorrangiger Effekt von 5-FU auf die Zellteilung von hES-MPs wird durch die zwei folgenden Beobachtungen gestützt. Die erste ist, dass eine Behandlung in der proliferativen Phase der hES-MPs (Tag 1–5) entscheidend war für die inhibitorische Aktivität von 5-FU auf beide Endpunkte (Abb. 25A). Eine postproliferative Exposition (Tag 8–15) hingegen zeigte im selben Konzentrationsbereich kaum Effekte auf die Zellviabilität und Mineralisierung (Abb. 25B). Zudem führte eine konstante Behandlung von Tag 1–15 zu keiner Verstärkung der beobachteten Effekte bei Exposition von Tag 1–5 (vgl. Abb. 25A und C). Die zweite Beobachtung ist, dass bei den beiden höchsten 5-FU Konzentrationen im Fall des frühen und des durchgängigen Behandlungsschemas eine stagnierende Zellviabilität um die 25 % am Auswertungstag (Tag 15) vorlag (Abb. 25A und C). In Bezug darauf konnte mikroskopisch beobachtet werden, dass die am Tag 0 ausgesäten hES-MPs zwar am Plattenboden adhärten und keinen Zelltod zeigten, eine Zunahme der Zellzahl jedoch nicht stattfand (Daten nicht ge-

zeigt). Die Anwendung einer spezifischen Methode zur Bestimmung der Teilungsraten könnte helfen die vermutete Wirkung von 5-FU auf hES-MPs zu bestätigen. Zudem könnte ein Proliferationsassay ein geeigneter Endpunkt sein, um die Effekte von 5-FU und entwicklungstoxischen Stoffen mit ähnlichen Mechanismen auf hES-MPs spezifisch nachweisen zu können.

### **6.3.1.5 Diphenhydramin**

DPH zeigte, wie erwartet, keinen spezifischen Effekt auf die Mineralisierung von osteogen differenzierenden hES-MPs (Abb. 26C). Der mittlere  $EC_{50}$ -Wert für diesen Endpunkt lag mit 0,079 mM im gleichen Konzentrationsbereich wie der für die Zellviabilität (0,080 mM) und beide unterschieden sich daher nicht signifikant ( $p = 0,46$ , Tab. 2). DPH inhibierte die Zellviabilität bei geringeren Konzentrationen als NaVPA, BA und WAR und schien damit unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eine stärkere generelle Zytotoxizität aufzuweisen als die drei Teratogene (Tab. 2). Dieselbe Beobachtung wurde auch für Maus ES Zellen im klassischen EST gemacht (Genschow et al., 2004; Marx-Stoelting et al., 2009). Zudem erwies sich DPH als potenter Inhibitor der Zellviabilität in anderen humanen und murinen Zelllinien und induzierte Fehlbildungen und Mortalität bei geringen Konzentrationen in komplexeren Modellen, wie der WEC und dem Zebrafischembryo (Palmer et al., 2013; Piersma et al., 2004; Selderslaghs et al., 2012; Walmod et al., 2004). Die toxischen Effekte von DPH traten dabei in allen Systemen in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich wie dem in dieser Studie verwendeten auf, was vermuten lässt, dass ein gemeinsamer zugrunde liegender Mechanismus verantwortlich ist.

### **6.3.1.6 Metoclopramid**

Den Erwartungen entsprechend hatte MCP keinen spezifischen negativen Einfluss auf die Ausbildung mineralisierter Bereiche in differenzierenden hES-MP Kulturen (Abb. 26D). Die Zellviabilität war mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 0,18 mM geringfügig stärker betroffen als die Mineralisierung mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 0,23 mM (Tab. 2). Daher war der letztgenannte Endpunkt nicht signifikant beeinträchtigt ( $p = 0,98$ ). Wie DPH inhibierte auch MCP die Zellviabilität bei geringeren Konzentrationen als NaVPA, BA und WAR und schien damit unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ebenfalls ein ausgeprägteres zytotoxisches Potential zu besitzen als diese Substanzen (Tab. 2). Derselbe Sachverhalt wurde auch für Maus ES Zellen im klassischen EST beobachtet (Genschow et al., 2004; Marx-Stoelting et al., 2009).

### 6.3.1.7 Penicillin G

PenG inhibierte die Zellviabilität von differenzierenden hES-MPs mit einem mittleren  $EC_{50}$ -Wert von 2,5 mM bei einer Exposition von Tag 1–15 erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen (Tab. 2). Erstaunlicherweise wurde die Mineralisierung bei diesen zytotoxischen Konzentrationen nicht negativ beeinträchtigt und wies sogar leicht erhöhte Werte auf (Abb. 25I). Die Kalzifizierung und/oder Differenzierung von hES-MPs wurde somit, wie erwartet, nicht spezifisch durch PenG geschädigt ( $p = 1$ ). Zum gleichen Resultat gelangten die Studien zu den osteogenen *in vitro* Assays mit Maus ES Zellen (de Jong et al., 2012; zur Nieden et al., 2010b). Die möglichen Ursachen für die hohen Mineralisierungssignale bei hES-MPs werden im nachfolgenden Kapitel 6.3.2.1 näher diskutiert.

Alle der hier verwendeten Modellsubstanzen wurden bereits im validierten EST getestet (Genschow et al., 2004; Marx-Stoelting et al., 2009). Dabei wurden MCP, DPH und WAR nicht korrekt entsprechend ihres *in vivo* Potentials eingestuft. Für die nicht-embryotoxischen Substanzen MCP und DPH war dies vermutlich auf eine Interferenz mit der Kontraktion der Kardiomyozyten zurückzuführen, da beide als Muskelrelaxantien wirken können (Riebeling et al., 2012). Im Fall von WAR könnte die Ursache darin bestehen, dass die molekularen Zielproteine der Substanz vor allem eine Rolle in Knochen- und Knorpelgewebe und späteren Entwicklungsstadien spielen (Riebeling et al., 2012). Im Gegensatz zum EST konnten diese drei Substanzen mit dem hier vorgestellten Assay in Bezug auf ihr entwicklungstoxisches Potential korrekt eingeordnet werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der hES-MP Assay sechs der sieben ausgewählten Testsubstanzen korrekt als entwicklungstoxisch oder nicht-entwicklungstoxisch entsprechend ihres *in vivo* Potentials identifizierte. Dieses Resultat konnte dabei mit einer alleinigen vergleichenden Analyse der zwei Endpunkte Mineralisierung und Zellviabilität erzielt werden. Osteogen differenzierende hES-MPs scheinen daher prinzipiell für eine Anwendung als *in vitro* Modell für Toxizitätstestungen geeignet zu sein.

## 6.3.2 Limitierungen des Assays

### 6.3.2.1 Zytotoxische Substanzkonzentrationen

Sowohl für zytotoxische Konzentrationen von PenG als auch von NaVPA konnten Mineralisierungssignale beobachtet werden, die vergleichbar oder etwas höher waren als die der Lösungsmittelkontrollen (Abb. 25E, G und I). Das Auftreten dieses Effekts schien dabei nicht nur vom Stoff, sondern auch vom Expositionsszenario abhängig zu sein, was darauf hindeutet, dass sowohl der substanzspezifische Mechanismus zur Einleitung von Zelltod als auch das Entwicklungsstadium der Zellen eine Rolle spielen.

Anhand weiterer Untersuchungen mit PenG konnte gezeigt werden, dass diese Beobachtung nicht darauf zurückzuführen ist, dass die Zellen unter den hohen Substanzkonzentrationen zunächst regulär differenzierten und mineralisierten und erst zu einem späteren Zeitpunkt der Zelltod eintrat (Abb. 28). Zudem unterschieden sich die mineralisierten Bereiche in den behandelten Kulturen morphologisch deutlich von denen in den Kontrollen, was dafür spricht, dass es sich nicht um eine reguläre Mineralisierung handelte. Es wurde daher vermutet, dass sich hier ein artifizieller Effekt zeigte, der durch einen substanzinduzierten Zelltod von hES-MPs ausgelöst wurde.

Die Vermutung, dass Zelltod Kalzifizierungen und Mineralisierungsprozesse sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen triggern kann, wird seit langem diskutiert (Kim, 1995). In Bezug auf die physiologische Knochenentwicklung könnte dies möglicherweise bei der Initiierung der Ossifikation durch hypertrophe Chondrozyten in der Wachstumsfuge eine Rolle spielen, da diese Zellen in den Bereichen des Längenwachstums von Röhrenknochen Apoptose begehen (Kirsch et al., 2003). Eine Zelltod-vermittelte Formierung von kristallinen Strukturen wurde darüber hinaus auch als einer von verschiedenen Mineralisierungsprozessen in organoiden Kulturen von fetalen Calvariazellen der Ratte beobachtet (Zimmermann et al., 1991). Pathologische Kalzifizierungen treten bei einer ganzen Reihe von Krankheitsbildern, wie z. B. Arteriosklerose, Aortenstenose, Nephrokalzinose oder Neoplasie, auf (Kim, 1995). Es wird angenommen, dass die Degeneration oder akute Schädigung des Gewebes dabei bei allen Erkrankungen eine entscheidende Ursache ist.

Angesichts dessen scheint es nicht unwahrscheinlich, dass auch exogene Noxen durch Induktion von Zelltod in der Lage sind, die Kalzifizierung in mineralisierungskompetenten Zelltypen zu triggern. Dies konnte bereits für eine Reihe von Chemikalien gezeigt werden (de Jong et al., 2012; Kirsch et al., 2003; Kupcsik et al., 2009; Proudfoot et al., 2000), wobei in

allen Fällen ein Zusammenhang mit apoptotischen Mechanismen untersucht und festgestellt werden konnte. Wie auch in der vorliegenden Arbeit unterschieden sich die substanzinduzierten Mineralablagerungen morphologisch von denen der Kontrollkulturen. Ebenso zeigten die quantitativen Analysen der Kalzifizierung vergleichbare oder höhere Signale im Vergleich zu den Kontrollen.

Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch weitestgehend ungeklärt. Kim (1995) formulierte eine Theorie dazu: In einer gesunden zellulären Umwelt liegt Calcium vorwiegend extrazellulär vor, während Phosphat in höheren Konzentrationen intrazellulär zu finden ist. Diese Separierung beider Ionen könnte, neben anderen Faktoren, eine Kalzifizierung verhindern. Der Autor vermutet, dass eine Schädigung der Plasmamembran im Zuge von Zelltodprozessen das lokale Produkt aus beiden Ionen erhöht und somit eine initiale Nukleation induzieren kann. Gleichzeitig gehen Zellschädigungen und Apoptose mit einem Anstieg an Calcium und Phosphat einher, sodass ein ideales Milieu für Mineralisierung geschaffen ist. Die Formierung von Kristallen kann im Zuge einer sogenannten heterogenen Nukleation zudem durch feste Partikel mit einer möglichst großen Oberfläche katalysiert werden. Diese stehen in geschädigten Zellkulturen durch membranöse zelluläre Abbauprodukte zur Genüge zur Verfügung. Auch eine Akkumulation von Calcium und Phosphat im Zytoplasma absterbender permeabler Zellen (Speer und Giachelli, 2004) oder an der Außenmembran von apoptotischen Körperchen (Kirsch et al., 2003) wäre denkbar, die als Nukleationsort und geschützte Strukturen für ein weiteres Kristallwachstum dienen können.

Die meisten Untersuchungen zu Zelltod-vermittelter Kalzifizierung wurden *in vitro/ex vivo* durchgeführt. In welchem Ausmaß diese Beobachtungen *in vivo* tatsächlich eine Rolle spielen ist bisher nicht gut verstanden. In gesundem Gewebe existieren zudem Mechanismen, um die negativen Auswirkungen von Zelltod einzudämmen und um Mineralisierungsprozesse zu kontrollieren. Apoptotische Körperchen werden durch Makrophagen eliminiert, die auch in der Lage sind Apatit zu phagozytieren (van der Meulen und Koerten, 1994). Außerdem führt das Blutserum Mineralisierungsinhibitoren, wie Fetuin-A,  $PP_i$  und MGP, die die Kalzifizierung von extraskelettalem Gewebe unterbinden (Kornak, 2011). In einfachen Zellkulturmodellen spielen diese Mechanismen aufgrund der fehlenden vaskulären Strukturen keine oder, im Fall der Inhibitoren, möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle. Es ist daher denkbar, dass eine Zelltod-vermittelte Mineralisierung hier ausgeprägter in Erscheinung tritt. Darüber hinaus könnten zur Induktion von Mineralisierung zugesetzte Phosphatquellen, wie  $\beta$ -GP, den Effekt zusätzlich verstärken.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zytotoxische Substanzkonzentrationen aufgrund einer artifiziellen, Zelltod-vermittelten Mineralisierung falsch-positive Resultate bedingen können. Als Konsequenz ergibt sich, dass für toxikologische Endpunkte, die auf einer Quantifizierung von Calcium oder Mineralablagerungen in der ECM beruhen, nur nicht-zytotoxische Konzentrationen verwendet werden sollten. Um spezifische Effekte zu erfassen wird zwar bei toxikologischen Untersuchungen im Allgemeinen versucht in einem Konzentrationsbereich zu testen, der keine generelle Toxizität verursacht, allerdings ist dies nicht immer möglich, da entwicklungs- bzw. gewebespezifische und generelle Toxizität eng beieinander liegen können. Die Integration weiterer Endpunkte in den hES-MP Assay könnte dabei helfen auch Aussagen über zytotoxische Substanzkonzentrationen zu ermöglichen.

### **6.3.2.2 Effekt von Dimethylsulfoxid auf die Mineralisierung**

DMSO wird häufig als alternatives Lösungsmittel für nicht oder nur schwer in Wasser lösliche Substanzen verwendet. In dem hier vorgestellten Assay zeigte DMSO jedoch einen inhibierenden Effekt auf die Mineralisierung von osteogen differenzierenden hES-MPs (Abb. 29) in einem Konzentrationsbereich, der für zellbiologische Experimente mit Substanzzugabe relevant ist (0,016–0,5 %). Das Eintreten und das Ausmaß des Effekts waren dabei von der Konzentration und dem Expositionszeitraum abhängig. Zudem spielten möglicherweise die DMSO Lotnummer und das Alter des DMSO nach Anbruch des Gefäßes eine Rolle.

Aus Studien mit einer Vielzahl von Modellsystemen ist bekannt, dass sich DMSO auf zahlreiche zelluläre und molekulare Prozesse auswirken kann (Santos und Saldanha, 2003). Eine der am besten beschriebenen Eigenschaften ist der Einfluss auf die Stabilität und Dynamik von biologischen Membranen (Yu und Quinn, 1998). In Abhängigkeit von der Konzentration kann DMSO die Membranstärke verringern und die Fluidität des innen liegenden hydrophoben Kerns erhöhen, transiente Wasserporen induzieren und zur Desintegration der Bilayerstruktur führen (Gurtovenko und Anwar, 2007). Dadurch werden die Barriereigenschaften herabgesetzt und die Permeabilität erhöht. Diese Auswirkungen wurden allerdings insbesondere für Konzentrationen im zweistelligen prozentualen Bereich beschrieben, die untere Grenze scheint in etwa bei 2,5 % zu liegen (Gurtovenko und Anwar, 2007).

Einen weiteren Effekt zeigt DMSO auf intra- und extrazelluläre Ionenkonzentrationen von Calcium, Kalium und Natrium (Santos und Saldanha, 2003; Yu und Quinn, 1994), wobei die Funktion von membranständigen Transportern eine Rolle spielen könnte (Santos und

Saldanha, 2003). Der Konzentrationsbereich, in dem diese Effekte beobachtet wurden, liegt niedriger als für die Beeinflussung von Biomembranen, in etwa bei 0,2–2 %.

Beide beschriebenen Wirkungen können mögliche Ursachen dafür sein, dass DMSO auch das Differenzierungsverhalten von Zellen beeinflussen kann (Yu und Quinn, 1994). Funktionale Auswirkungen auf die Differenzierung wurden für verschiedene Zellmodelle beschrieben und die Effekte waren sowohl stimulierend (Grunt et al., 1991; Mareschi et al., 2006; Santos und Saldanha, 2003) als auch inhibitorisch (Blau und Epstein, 1979; Wang und Scott, 1993; Yang et al., 2015). Eine Abhängigkeit vom Zelltyp, dem Entwicklungsstadium, der DMSO-Konzentration und der Expositionszeit ist daher naheliegend (Shu et al., 2015). So konnten Pal et al. (2012) z. B. zeigen, dass DMSO-Konzentrationen von 0,01 und 0,1 % die Genexpression von mesodermalen Markern in *embryoid bodies* aus humanen ES Zellen erhöhten, während 1 % für eine Abnahme sorgte.

In Bezug auf die Knochenbildung wurde bisher beschrieben, dass DMSO in Konzentrationen von 0,15–1 % die Differenzierung der murinen Vorläuferzelllinie MC3T3 induziert (Cheung et al., 2006; Stephens et al., 2011). Dies zeigte sich an einer gesteigerten Bildung und Aktivität osteogener Marker und einer erhöhten Mineralisierung. Auch die AP-Aktivität und Mineralisierung von primären humanen Osteoblasten und MSCs aus dem Fettgewebe von Mäusen wurden durch 0,35–0,8 % DMSO stimuliert (Stephens et al., 2011). Das steht im Widerspruch zu den hier vorgestellten Beobachtungen mit hES-MPs. In Anbetracht der Tatsache, dass bereits vergleichsweise niedrige Konzentrationen von DMSO den Differenzierungsverlauf von Zellen modulieren können, wäre dies ein denkbarer Erklärungsansatz für die Effekte auf hES-MPs. Allerdings können damit nicht die hohen Schwankungen des inhibitorischen Effekts auf die Mineralisierung zwischen verschiedenen Experimenten erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit könnte daher sein, dass eine zellunabhängige Wirkung von DMSO verantwortlich ist.

Neben der Interaktion mit makromolekularen Strukturen könnten auch Wechselwirkungen mit kleinen Molekülen und Ionen eine Ursache sein. So ist die Assoziation zwischen einem DMSO- und einem Wassermolekül stärker als zwischen jeweils zwei DMSO- bzw. Wassermolekülen. Dies liegt an der Wasserstoffbrückenbindung der polaren Sulfoxidgruppe des DMSO mit Wassermolekülen (Somasundaran, 2006). Zudem adsorbiert DMSO in niedrigen Konzentrationen an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Gasphase in DMSO-Wassergemischen und kann dadurch die Oberflächenspannung verändern (Dabkowski et al., 1996).

Beide Eigenschaften können die Evaporation von Wasser beeinflussen, was wiederum Auswirkungen auf Mineralisierungsprozesse haben kann. In diesem Zusammenhang ist eine Studie von Jaiswal et al. (1997) zu erwähnen, in der beschrieben ist, dass ein geringeres Mediumvolumen in den Zellkulturplatten die Mineralisierung von differenzierenden humanen MSCs signifikant erhöhte. Die Autoren vermuteten, dass eine Aufkonzentration auto- und parakriner Faktoren hierfür verantwortlich war. Die Verdunstung von Wasser aus dem Medium, die bei einer mehrtägigen Inkubation der Zellkulturen bei 37 °C regulär stattfindet, kann daher vermutlich die Mineralisierung unterstützen, möglicherweise nicht nur durch die Aufkonzentration von sezernierten Molekülen, sondern auch von wachstums- und differenzierungsfördernden Komponenten des FCS und von Ionen wie Calcium und Phosphat. Faktoren, die die Verdunstung beeinflussen, könnten sich daher auch auf die Mineralisierung auswirken. Die Vertiefungen von Mikrotiterplatten sind von Verdunstungseffekten entsprechend ihrer Lokalisation unterschiedlich stark betroffen (Esser, 1988). Auch wenn die äußeren Vertiefungen zur Verringerung dieses Effekts mit PBS anstatt der Zellkultur gefüllt werden, ist dies nicht vollständig vermeidbar und hängt von zahlreichen externen Faktoren ab. Möglicherweise könnte dies eine Ursache für die Schwankungen des mineralisierungsinhibierenden Effekts in verschiedenen Experimenten gewesen sein.

Des Weiteren ist DMSO in der Lage Komplexe mit Calcium einzugehen (Jakl et al., 2014) und es wäre denkbar, dass dadurch die Verfügbarkeit des Ions für die Salzbildung mit Phosphat reduziert wird. Die Phosphatquelle bildete in der vorliegenden Arbeit  $\beta$ -GP. Es wurde beobachtet, dass mit  $\beta$ -GP, das länger als neun Monate bei -20 °C gelagert wurde, keine Mineralisierung mehr induziert werden konnte. Obwohl grundsätzlich mit  $\beta$ -GP gearbeitet wurde, das wesentlich kürzer gelagert wurde, könnten die Schwankungen in der durch DMSO ausgelösten Inhibition der Mineralisierung eventuell durch Unterschiede in den verwendeten  $\beta$ -GP Lösungen verursacht worden sein.

Abgesehen davon ist DMSO stark hygroskopisch und kann bei längerer Lagerung zu Dimethylsulfid reduziert werden. Unterschiedliche Lotnummern können in Abhängigkeit von der Lagerung daher unterschiedliche Qualitäten aufweisen und möglicherweise experimentelle Schwankungen verursachen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Einsatz von DMSO als Lösungsmittel bei einer Quantifizierung der Mineralisierung als Endpunkt nur eingeschränkt möglich ist. Die verwendeten Lotnummern müssen regelmäßig auf Interferenz mit der Mineralisierung geprüft

werden und DMSO sollte nur in möglichst geringen Konzentrationen (unter 0,2 %) eingesetzt werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Substanztestungen wurde DMSO nur zur Solubilisierung von WAR verwendet. Die entsprechende Lotnummer zeigte keine Auswirkungen auf die Mineralisierung bei einer Konzentration von 0,065 %.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , das als osteogener Induktor für die Charakterisierung der Differenzierung von hES-MPs eingesetzt wurde, war ebenfalls in DMSO gelöst. Die DMSO-Konzentration betrug hier 0,04 %. Auch in diesem Fall konnten keine Einschränkungen festgestellt werden, da in allen durchgeführten Experimenten eine reproduzierbare und ausgeprägte Mineralisierung beobachtet werden konnte. Nach Möglichkeit sollten jedoch alternative Lösungsmittel eingesetzt werden, wie z. B. EtOH, das nicht mit der Ausbildung mineralisierter Bereiche interferierte (Abb. 30).

#### **6.4 Zusammenfassende Bewertung der Eignung des hES-MP Assays zur Vorhersage von Entwicklungsknochentoxizität**

hES-MPs weisen zahlreiche Eigenschaften auf, die sie für einen Einsatz als *in vitro* Testmodell qualifizieren.

Ein erster Punkt ist, dass sie kommerziell als qualitätsgesicherte Zelllinie erhältlich sind, die nicht den regulatorischen Einschränkungen für humane ES Zellen unterworfen ist, wie sie z. B. in Deutschland gelten. Bisher etablierte *in vitro* Assays zur Erfassung von Schädigungen der Knochenentwicklung basieren auf Maus ES Zellen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei hES-MPs um ein humanes Modell, eine Fehlbewertung von Substanzen aufgrund von Interspeziesdifferenzen kann somit vermieden werden.

Weiterhin stellen hES-MPs aufgrund des Selektionsprozesses während ihrer Generierung ein vergleichsweise homogenes Zellsystem dar. Dieser Selektionsprozess führte zu einer Anreicherung von Zellen, die phäno- und genotypische Merkmale der mesenchymalen Linie aufweisen. Daten aus der vorliegenden Arbeit zur Biosynthese osteogener Markerproteine lassen vermuten, dass hES-MPs bereits eine weitergehende Spezifizierung zu einem osteogenen Zelltyp durchlaufen haben. Das mag ein Grund sein, dass sie in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten im Vergleich zu Maus ES Zellen eine wesentlich reproduzierbarere und stabilere osteogene Differenzierung zeigten, die außerdem in einer höheren Ausbeute an mineralisiertem Knochenmaterial resultierte. Eine mögliche Einschränkung dieser Spezifizierung ist, dass Substanzen, die ausschließlich auf frühe Entwicklungsvorgänge wirken, eventuell nicht detektiert werden können. In den bisherigen Substanztestungen schien

dies allerdings noch nicht von Bedeutung gewesen zu sein.

Sowohl die Kultivierung als auch die Differenzierung von hES-MPs sind zudem im Vergleich zu ES Zellen weniger arbeitsaufwendig und bieten sich sehr gut für Messungen im Hochdurchsatzverfahren an. Frühere Studien und die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass hES-MPs in relativ kurzer Zeit mineralisiertes Knochenmaterial bilden und typische Prozesse der osteogenen Entwicklung rekapitulieren können. Charakteristische Biomarker weisen dabei eine differenzierungsbedingte Veränderung auf und ermöglichen eine zuverlässige, schnelle und sensitive Quantifizierung als Grundlage für die Etablierung toxikologischer Endpunkte.

Nicht zuletzt sind osteogen differenzierende hES-MPs in der Lage entwicklungstoxische Effekte von Substanzen entsprechend ihres *in vivo* Potentials anzeigen zu können. Dabei zeigten sie für BA eine vergleichbare und für VPA eine höhere Prädiktivität im Vergleich zu den bisher beschriebenen osteogenen *in vitro* Assays mit Maus ES Zellen. Für 5-FU war die Vorhersagekraft geringer, was vermutlich auf die stark proliferationsinhibierende Eigenschaft der Substanz zurückzuführen ist, die mit der hier verwendeten Kombination an Endpunkten nicht von zytotoxischen Effekten abgegrenzt werden kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass der hES-MP Assay für die Substanzen WAR, MCP und DPH eine bessere prädiktive Kapazität besitzt als der klassische EST.

In der vorliegenden Arbeit konnten darüber hinaus die Limitierungen der verwendeten Kombination an Endpunkten näher beschrieben werden. Wie bereits angeführt, scheint zum einen die Detektion von proliferationsinhibierenden Substanzen Einschränkungen zu besitzen. Zum anderen lieferte die als Differenzierungsendpunkt eingesetzte Quantifizierung der Mineralisierung aussagekräftige Resultate nur in nicht-zytotoxischen Konzentrationsbereichen. Ein weiterer Punkt ist, dass Einschränkungen in Bezug auf das verwendete Lösungsmittel bestehen. Die Stärke des Differenzierungsendpunkts Mineralisierung ist einerseits, dass er das kumulierte Endergebnis verschiedener molekularer und zellulärer Prozesse ist, die potentiell durch chemische Noxen beeinträchtigt werden können, und andererseits, dass er einfach und schnell quantifizierbar ist. Um die oben beschriebenen Limitierungen zu kompensieren, ist die Implementierung weiterer toxikologischer Endpunkte empfohlen.

### **6.5 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel die Eignung von humanen aus ES Zellen gewonnenen Progenitorzellen als Testmodell zur Vorhersage von chemisch induzierten Effekten auf die

Knochenentwicklung zu evaluieren und toxikologische Endpunkte zu identifizieren, die sich für die Erfassung dieser Effekte qualifizieren. Diese Arbeiten bilden eine Grundlage für die Entwicklung eines Testsystems. In Abhängigkeit vom Schwerpunkt zukünftiger Forschungsfragestellungen bzw. Anwendungsbereiche gibt es zahlreiche Ansatzpunkte für einen Ausbau und eine Optimierung dieses *in vitro* Assays im Hinblick auf die physiologische Relevanz des Zellmodells, die Prädiktivität des Assays und die mechanistische Untersuchung von Substanzwirkungen.

Die Kultivierung und osteogene Differenzierung von hES-MPs erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach Standardmethoden, wie sie auch für MSCs verwendet werden. Diese Bedingungen resultierten bereits in einer guten Ausbeute an mineralisiertem Knochenmaterial in einem angemessenen Zeitrahmen. Die vergleichende Testung anderer Beschichtungen, Wachstumsfaktoren und Differenzierungsinduktoren könnte jedoch möglicherweise dazu beitragen, die **Differenzierungseffizienz und die Bildung von Biomarkern** noch zu steigern. Im Sinne einer besseren Standardisierung und des Tierwohls ist zudem eine Kultivierung bzw. Differenzierung ohne die Verwendung von FCS wünschenswert. Karlsson et al. (2009) konnten für die Expansion nicht-differenzierender hES-MPs bereits zeigen, dass diese auch mit humanem Serum möglich ist.

Im Zusammenhang mit dem *tissue engineering* existiert insbesondere für Knochengewebe eine umfangreiche Literatur zur **Kultivierung in 3D-Strukturen und dynamischen, perfusionierten Modellen** unter Anwendung von verschiedenen biologischen und synthetischen Gerüsten, Bioreaktorsystemen und biomimetischen Faktoren (Amini et al., 2012; Gaspar et al., 2012; Pirraco et al., 2010). Diese Ansätze sollen das zelluläre Mikromilieu sowie die mechanischen Bedingungen des nativen Gewebes besser widerspiegeln. Sie können über diesen Weg dazu beitragen eine effiziente, physiologisch relevante Differenzierung zu unterstützen (Amini et al., 2012; Wang und Chen, 2013) und das Erkennen des therapeutischen und toxischen Potentials von Wirkstoffkandidaten zu verbessern (Elliott und Yuan, 2011; Roth und Singer, 2014). Initiale Untersuchungen zur Anwendung dieser methodischen Ansätze für die Differenzierung von hES-MPs sind dabei bereits durchgeführt worden (de Peppo et al., 2012; Delaine-Smith et al., 2012; Viswanathan et al., 2015). Im Hinblick auf toxikologische Studien sind solche komplexen *in vitro* Zellmodelle im Vergleich zu herkömmlichen 2D-Zellkulturen allerdings schwieriger zu standardisieren, benötigen elaboriertere Methoden zur Etablierung von Endpunkten und ermöglichen unter Umständen nur einen geringeren Durchsatz (Roth und Singer, 2014).

Der Großteil der Knochen im Körper wird über die enchondrale Ossifikation gebildet, d. h. der Aufbau verknöcherten Gewebes findet über eine knorpelige Vorläuferstruktur statt. Die **Integration einer chondrozytären Differenzierung** in das Testsystem wäre daher wünschenswert, um auch diesen Teilschritt der skelettalen Entwicklung adressieren und Substanzen, deren adverse Auswirkungen sich über einen Einfluss auf die Knorpelentwicklung manifestieren, identifizieren zu können. Da die Gruppe um Karlsson mit hES-MPs nur eine geringe Ausbeute an Knorpelmaterial mit der von ihr verwendeten Methode gewinnen konnte (de Peppo et al., 2010a; Karlsson et al., 2009), wäre hier zunächst eine Verbesserung des Differenzierungsprotokolls notwendig. Alternativ könnten auch andere aus humanen ES Zellen gewonnene mesenchymale Progenitoren, die ein besseres Potential für die Chondrogenese besitzen, verwendet werden. Das optimale Szenario im Hinblick auf die Annäherung an eine enchondrale Ossifikation wäre natürlich eine sequentielle chondrogene und osteogene Entwicklung in einem Ansatz, allerdings ist dies aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen der beiden Differenzierungsrouten schwierig. Im Bereich des *tissue engineering* gibt es zumindest erste Ansätze eine Kokultivierung zu gestalten, z. B. in Form von doppelt kompatiblen Gerüsten und 2-Kammer-Bioreaktorsystemen (Lanza et al., 2013).

Die festgestellten Limitierungen des hier etablierten Assays für zytotoxische Substanzkonzentrationen, die Lösungsmittelwahl und die Erfassung proliferationsinhibierender Stoffe sprechen für die **Integration weiterer Endpunkte** in ein hES-MP Testsystem. Zudem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Verwendung multipler molekularer Marker oder Endpunkte hilft die Prädiktivität von *in vitro* Assays zu verbessern, mechanistische Untersuchungen ermöglicht und Informationen zum *mode of action* von Substanzen liefern kann (de Jong et al., 2012; Groebe et al., 2010b; Hayess et al., 2013; Kleinstreuer et al., 2011; Smirnova et al., 2014; Stummann et al., 2009). Potentielle weitere Endpunkte (durchflusszytometrische Quantifizierung von AP und Runx2) und Biomarker (Kollagensubtypen, COMP, CALCR und CTSK, angezeigt durch einen PCR Array) wurden in der vorliegenden Arbeit bereits identifiziert, erfordern jedoch noch eine Evaluierung ihrer Eignung.

Neben der Bestimmung von mRNA und Proteinen können zusätzliche toxikologische Endpunkte auch im Bereich des Proliferationsverhaltens der Zellen und der mechanischen Eigenschaften des gewonnenen Knochenmaterials angesiedelt sein. Letzteres wird z. B. durch Ausbildung von Kollagen *cross-links* beeinflusst, die über biochemische Methoden bestimmt werden können, und hängt vom Verhältnis zwischen der organischen ECM und dem gebildeten mineralisierten Material ab, was über spektrometrische Techniken, wie Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie oder ToF-SIMS, erfassbar ist. Da die Isolation von Makro-

molekülen aus kollagenreichem und verknöchertem Gewebe häufig schwierig ist, ist die Anwendung von Methoden für die Etablierung von Endpunkten wünschenswert, die keine Zerstörung des Zellverbands erfordern. Solche Methoden umfassen z. B. die bereits erwähnten spektrometrischen Techniken zur Analyse der Materialeigenschaften, Impedanzmessungen zur Erfassung zellulärer Parameter oder auch die Untersuchung enzymatischer Aktivitäten und Metabolite in den Zellkulturüberständen.

*In vitro* Testsysteme bestehen nicht nur aus einem experimentellen *in vitro* Assay, sondern inkludieren auch ein **Prädiktionsmodell**, d. h. einen Algorithmus, der die erhobenen Daten in eine Einschätzung zum toxischen Potential von Substanzen übersetzt (Balls et al., 1995; Worth und Balls, 2004). Für die Erstellung solch eines Modells muss eine ausreichende Datenbasis zur Verfügung stehen, nicht nur in Bezug auf die Endpunkte, sondern insbesondere im Hinblick auf die Substanztestungen. Die Testung weiterer Stoffe ist daher notwendig. Im Rahmen dessen können auch Informationen zum **Anwendungsbereich** des Assays gewonnen werden, indem Substanzen verschiedener Klassen und Wirkmechanismen integriert werden.

Im Allgemeinen gilt für *in vitro* Systeme, dass eine zur *in vivo* Situation vergleichbare **Metabolisierung** von Stoffen fehlt. Dies schränkt die Auswahl an Substanzen ein, die getestet werden können. Zu der intrinsischen metabolischen Kapazität von hES-MP Kulturen ist bisher nichts bekannt und eine nähere Charakterisierung daher zunächst erforderlich. Darüber hinaus könnte eine Kombination mit einem metabolisierenden System, z. B. humanen hepatozytären Zellen bzw. deren Kulturüberständen, dabei helfen, die Basis an möglichen Testsubstanzen zu erweitern und relevante *in vivo* Vorgänge besser abzubilden.

Ein möglicher zukünftiger Einsatz des hES-MP Assays könnte darin bestehen den klassischen EST zu ergänzen. Eine weitere Option ist, dass er als ein Teil einer „humanisierten“ *in vitro* Testbatterie zur Erkennung von Entwicklungstoxizität fungiert. In einigen Forschungsprojekten wurden erste Ansätze zur Integration verschiedener gewebespezifischer humaner Testsysteme bereits verfolgt, allerdings waren diese insbesondere auf kardiale, neurale und hepatische Differenzierungswege fokussiert (Gocht und Schwarz, 2015; Rovida et al., 2014). Ein System, das der Detektion von exogenen Einflüssen auf die Knochenentwicklung dient, könnte hier eine sinnvolle Ergänzung darstellen.

## 7 Zusammenfassung

Um eine gesundheitliche Gefährdung für den Menschen abschätzen zu können, müssen Chemikalien und Pharmazeutika hinsichtlich potentieller embryo- und entwicklungstoxischer Effekte in tierexperimentellen Studien untersucht werden. Der Einsatz von alternativen Testmethoden ist aus ethischen, qualitativen, finanziellen und zeitlichen Gründen dringend erforderlich und wird international stark vorangetrieben. Durch teratogene Substanzen induzierte skelettale Anomalien werden sowohl im Menschen als auch in Versuchstieren häufig beobachtet und die Analyse der Knochenentwicklung ist ein integraler Bestandteil entwicklungstoxikologischer Studien.

Ein *in vitro* Testsystem, das diesen Aspekt adressiert, könnte daher ein wertvoller Bestandteil einer modularen Testbatterie für Entwicklungstoxizität sein. Zurzeit existiert hierfür noch kein validierter Assay und erste Forschungsansätze verwendeten embryonale Stammzellen der Maus, was mit einer inadäquaten Prädiktivität aufgrund von Interspeziesdifferenzen einhergehen kann. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Grundlagen für ein *in vitro* Testsystem zur Erfassung von Entwicklungsknochentoxizität zu schaffen, das auf dem Einsatz von humanen embryonalen Zellen beruht.

Als Zellmodell wurden aus humanen ES Zellen generierte mesenchymale Progenitoren (hES-MPs) gewählt, die bisher noch nicht für toxikologische Fragestellungen eingesetzt wurden. Initiale Arbeiten zur Etablierung der osteogenen Differenzierung dieser Zellen und zu ihrer Charakterisierung, insbesondere auf Genexpressionsebene, wurden bereits von der Gruppe um Karlsson et al. publiziert.

Basierend auf diesen Daten wurden zunächst Experimente zur Evaluierung und Optimierung des Differenzierungsprotokolls in Bezug auf die Beschichtung, Zelleinsaat und Kombination an osteogenen Induktoren durchgeführt. Eine Beschichtung mit Gelatine, eine initiale Zelleinsaat von 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> und eine Induktion mit Ascorbinsäure,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason oder 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> unterstützte eine sehr gut reproduzierbare Differenzierung über einen Zeitraum von ca. drei Wochen.

Anschließend erfolgte eine weitergehende Charakterisierung der osteogen differenzierenden hES-MPs hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs des Wachstums der Kulturen, der Biosynthese ausgewählter Proteinmarker und der Mineralisierung. Dies wurde mit Hilfe von zellbasierten und biochemischen Assays, histo- und immunzytochemischen Färbungen, Western-Blot, Durchflusszytometrie und Enzymaktivitätsmessungen durchgeführt.

Undifferenzierte hES-MPs wiesen bereits eine prominente Bildung der frühen Transkriptionsfaktoren Dlx5 und Runx2 auf. Die osteogene Differenzierung war zu Beginn von einer hohen proliferativen Aktivität geprägt, gefolgt von einer sukzessiven Zellreifung mit einer ausgeprägten Zunahme der Produktion und Aktivität von Alkalischer Phosphatase (AP) und einer Abnahme von Runx2. Gleichzeitig erfolgte eine Reifung der extrazellulären Matrix über die Sezernierung und Akkumulation von Kollagen Typ I und Osteocalcin. Diese Prozesse bildeten die Basis für die nachfolgende Mineralisierung, die ab Tag 12–13 sukzessive zunahm. hES-MPs zeigen daher einen zeitlichen und qualitativen Verlauf der osteogenen Differenzierung, der den in der Literatur beschriebenen weitgehend reflektiert. Einige gewonnene Daten weisen allerdings darauf hin, dass hES-MPs in Ansätzen bereits eine Spezifizierung zu einem osteogenen Zelltyp durchlaufen haben.

Darüber hinaus dienten diese Experimente der Identifizierung potentieller molekularer Marker für die Etablierung toxikologischer Endpunkte. Basierend darauf wurden durchflusszytometrische Methoden zur Quantifizierung von AP und Runx2 entwickelt, was auch ein Protokoll zur effizienten Zellvereinzelung der ossifizierten Kulturen umfasst. Die Mineralisierung, die mittels eines einfachen und schnellen Fluoreszenzassays quantifiziert wurde, erschien am geeignetsten als Differenzierungsendpunkt und wurde für die nachfolgenden Substanztestungen verwendet.

Dafür wurden die differenzierenden hES-MPs für 15 Tage mit einer Auswahl an bekannten entwicklungstoxischen (Warfarin, Borsäure, Natriumvalproat, 5-Fluorouracil) und nicht-entwicklungstoxischen (Metoclopramid, Diphenhydramin, Penicillin G) Stoffen exponiert. Neben der Mineralisierung wurde die Zellviabilität zur Abgrenzung spezifischer von zytotoxischen Effekten erfasst. Mit Ausnahme des Proliferationshemmers 5-Fluorouracil inhibierten alle entwicklungstoxischen Substanzen die Mineralisierung signifikant stärker als die Viabilität, während die nicht-entwicklungstoxischen Stoffe keinen spezifischen Einfluss hatten. Sechs der sieben Testsubstanzen wurden daher entsprechend ihres *in vivo* Potentials korrekt erkannt. Dabei zeigte der hES-MP Assay für einige Stoffe eine bessere Prädiktivität als der klassische Embryonale Stammzelltest und osteogene *in vitro* Assays, die embryonale Stammzellen der Maus verwenden.

Als ein weiterer Beitrag wurden Limitierungen des Assays bezüglich zytotoxischer Stoffkonzentrationen, proliferationsinhibierender Substanzen und Lösungsmittel identifiziert und zum Teil näher untersucht. Zudem ermöglichte eine Pilotstudie mit einem mRNA Microarray die Bestimmung von weiteren potentiellen Markern und von molekularen Angriffspunkten des

Teratogens Natriumvalproat in hES-MPs.

Der etablierte hES-MP Assay ist ein vielversprechender Ansatz für einen humanen *in vitro* Test zur Vorhersage von Entwicklungsknochentoxizität. Die Integration weiterer Endpunkte und Substanztestungen ist jedoch noch erforderlich. Zukünftig könnte dieser Test als ein Teil einer alternativen modularen Teststrategie zur Erfassung von Entwicklungstoxizität dienen.

## 8 Summary

To assess the hazard potential of chemicals and pharmaceuticals on human embryonic and infant development, animal experimentation is commonly conducted. The application of alternative test methods is urgently required not only due to ethical reasons, but also because these studies are costly, time-consuming and, more importantly, have a limited predictive capacity. Therefore, research regarding alternatives and their implementation is strongly promoted internationally. Skeletal anomalies resulting from exposure to a teratogen are frequently observed in humans as well as laboratory animals, and the analysis of bone development is an integral part of developmental toxicity studies.

Thus, an *in vitro* test which addresses this issue could be a valuable part of a modular test battery for the detection of developmental toxicity. Until now, no validated assay exists for this purpose and preliminary research approaches focused on the use of mouse embryonic stem cells, which could entail an inadequate predictivity due to differences between species. Therefore, the aim of the present doctoral thesis was to build the basis for an *in vitro* test system to assess developmental bone toxicity which employs human embryonic cells.

Mesenchymal progenitors which were derived from human embryonic stem cells (hES-MPs) were used as the cell model. These cells have not yet been applied in toxicological studies. Initial research regarding the establishment of the osteogenic differentiation of hES-MPs and their characterization, thereby focusing on gene expression, was previously published by the group of Karlsson et al.

Based on the data obtained in these studies, first experiments of the present doctoral thesis addressed the evaluation and optimization of the differentiation protocol with respect to the coating, the initial cell number and the combination of osteogenic inducers. Coating with gelatine, cell numbers of 10,000 cells/cm<sup>2</sup> and supplementation with ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and dexamethasone or 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> supported a highly reproducible differentiation over a period of three weeks.

Subsequently, the osteogenic differentiation of hES-MPs was further characterized with respect to the temporal progression of culture growth, biosynthesis of selected protein markers and mineralization. This was done by applying cell-based and biochemical assays, histo- and immunocytochemical stainings, Western blotting, flow cytometry and enzyme activity measurements.

Non-differentiating hES-MPs already exhibited a prominent production of the early transcription factors *Dlx5* and *Runx2*. The osteogenic differentiation was characterized by a high proliferative activity at early stages, followed by a successive cell maturation which involved a strong increase in the protein formation and activity of alkaline phosphatase (AP) and a decrease in *Runx2*. At the same time, maturation of the extracellular matrix progressed by the secretion and accumulation of collagen type I and osteocalcin. These processes provided the basis for mineral deposition which substantially increased from day 12–13 onwards. Therefore, the temporal and qualitative progress of osteogenic differentiation of hES-MPs largely resembles those described in the literature. Some results also suggest that hES-MPs are already primed and committed toward the osteoblastic lineage to a certain extent.

In addition, these characterization experiments were used to identify potential molecular markers for the establishment of toxicological endpoints. Based on the obtained results, methods for the quantification of AP and *Runx2* via flow cytometry were developed which also includes a protocol for an efficient cell isolation out of an ossified matrix. Mineralization was quantified with an easy-to-use fluorescence-based assay and appeared to be the most suitable differentiation endpoint.

Accordingly, it was used as read-out for subsequent compound testing experiments. Differentiating hES-MPs were exposed for 15 days toward selected developmental toxicants (warfarin, boric acid, sodium valproate, 5-fluorouracil) and non-developmental toxicants (metoclopramide, diphenhydramine, penicillin G). In addition to mineralization as differentiation endpoint, the cell viability was measured to determine general cytotoxicity. With the exception of the antiproliferative substance 5-fluorouracil, all developmental toxicants inhibited mineralization more specifically than cell viability. In contrast, non-developmental toxicants had no particular impact. Accordingly, the teratogenic potential of six of the seven test compounds was correctly predicted with regard to the corresponding *in vivo* data. Notably, the hES-MP assay exhibited a better predictive capacity for several substances than the classical Embryonic Stem Cell Test and osteogenic *in vitro* assays which use mouse embryonic stem cells.

As an additional contribution, limitations of the assay relating to cytotoxic substance concentrations, proliferation-inhibiting compounds and solvents were identified and partly further investigated. Also, a pilot study using a mRNA microarray enabled the identification of additional potential markers and of molecular targets of sodium valproate in hES-MPs.

## Summary

---

The established hES-MP assay appears to be a promising approach for a human *in vitro* test to detect developmental bone toxicity. However, further research is required regarding the integration of additional endpoints and compound tests. In the future, this test could become a part of an alternative modular testing strategy to assess developmental toxicity.

## 9 Literaturverzeichnis

- Acampora, D., Merlo, G.R., Paleari, L., Zerega, B., Postiglione, M.P., Mantero, S., Bober, E., Barbieri, O., Simeone, A., Levi, G., 1999. Craniofacial, Vestibular and Bone Defects in Mice Lacking the Distal-less-related Gene *Dlx5*. *Development* 126, 3795–3809.
- Acharya, C., Yik, J.H.N., Kishore, A., van Dinh, V., di Cesare, P.E., Haudenschild, D.R., 2014. Cartilage Oligomeric Matrix Protein and Its Binding Partners in The Cartilage Extracellular Matrix: Interaction, Regulation and Role in Chondrogenesis. *Matrix Biol.* 37, 102–111.
- Akaike, H., 1998. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle, in: Parzen, E., Tanabe, K., Kitagawa, G. (Eds.), *Breakthroughs in Statistics, Vol. 1 Foundations and Basic Theory*. Springer-Verlag, New York, pp. 199–213.
- Alm, J.J., Heino, T.J., Hentunen, T.A., Väänänen, H.K., Aro, H.T., 2012. Transient 100 nM Dexamethasone Treatment Reduces Inter- and Intraindividual Variations in Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow-derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng. Part C Methods* 18, 658–666.
- Amini, A.R., Laurencin, C.T., Nukavarapu, S.P., 2012. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40, 363–408.
- Amizuka, N., Li, M., Hara, K., Kobayashi, M., de Freitas, P.H.L., Ubaidus, S., Oda, K., Akiyama, Y., 2009. Warfarin Administration Disrupts the Assembly of Mineralized Nodules in the Osteoid. *J. Electron Microsc.* (Tokyo). 58, 55–65.
- Aronow, M.A., Gerstenfeld, L.C., Owen, T.A., Tassinari, M.S., Stein, G.S., Lian, J.B., 1990. Development of the Osteoblast Phenotype in Cultured Fetal Rat Calvaria Cells. *J. Cell. Physiol.* 143, 213–221.
- Arrowsmith, J., 2011. Phase II Failures: 2008 – 2010. *Nat. Rev. Drug Discov* 10, 328–329.
- Atkins, G.J., Welldon, K.J., Wijenayaka, A.R., Bonewald, L.F., Findlay, D.M., 2009. Vitamin K Promotes Mineralization, Osteoblast-to-osteocyte Transition, and an Anticatabolic Phenotype by {Gamma}-carboxylation-dependent and -independent Mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297, C1358–C1367.
- Augustine-Rauch, K., 2007. Alternative Experimental Approaches for Interpreting Skeletal Findings in Safety Studies. *Birth Defects Res. Part B* 80, 497–504.
- Aumailley, M., Gayraud, B., 1998. Structure and Biological Activity of the Extracellular Matrix. *J. Mol. Med.* 76, 253–265.
- Bailey, J., Knight, A., Balcombe, J., 2005. The Future of Teratology Research Is In Vitro. *Biog. Amin.* 19, 97–145.

- Bailey, J., Thew, M., Balls, M., 2014. An Analysis of the Use of Animal Models in Predicting Human Toxicology and Drug Safety. *ATLA* 42, 181–199.
- Bala, Y., Farlay, D., Boivin, G., 2013. Bone Mineralization: From Tissue to Crystal in Normal and Pathological Contexts. *Osteoporos. Int.* 24, 2153–2166.
- Ball, J.S., Stedman, D.B., Hillegass, J.M., Zhang, C.X., Panzica-Kelly, J., Coburn, A., Enright, B.P., Tornesi, B., Amouzadeh, H.R., Hetheridge, M., Gustafson, A.-L., Augustine-Rauch, K.A., 2014. Fishing for Teratogens: A Consortium Effort for a Harmonized Zebrafish Developmental Toxicology Assay. *Toxicol. Sci.* 139, 210–219.
- Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielders, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., Zucco, F., 1995. Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. *ATLA* 23, 129–147.
- Balmer, N. V, Weng, M.K., Zimmer, B., Ivanova, V.N., Chambers, S.M., Nikolaeva, E., Jagtap, S., Sachinidis, A., Hescheler, J., Waldmann, T., Leist, M., 2012. Epigenetic Changes and Disturbed Neural Development in a Human Embryonic Stem Cell-based Model Relating to the Fetal Valproate Syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4104–4114.
- Bal-Price, A., Crofton, K.M., Leist, M., Allen, S., Arand, M., Buetler, T., Delrue, N., FitzGerald, R.E., Hartung, T., Heinonen, T., Hogberg, H., Hougaard Bennekou, S., Lichtensteiger, W., Oggier, D., Paparella, M., Axelstad, M., Piersma, A., Rached, E., Schilter, B., Schmuck, G., Stoppini, L., Tongiorgi, E., Tiramani, M., Monnet-Tschudi, F., Wilks, M.F., Ylikomi, T., Fritsche, E., 2015. International STakeholder NETwork (ISTNET): Creating a Developmental Neurotoxicity (DNT) Testing Road Map for Regulatory Purposes. *Arch. Toxicol.* 89, 269–287.
- Banerjee, C., Javed, A., Choi, J.-Y., Green, J., Rosen, V., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B., Stein, G.S., 2001. Differential Regulation of the Two Principal Runx2/Cbfa1 N-Terminal Isoforms in Response to Bone Morphogenetic Protein-2 during Development of the Osteoblast Phenotype. *Endocrinology* 142, 4026–4039.
- Barberi, T., Willis, L.M., Socci, N.D., Studer, L., 2005. Derivation of Multipotent Mesenchymal Precursors from Human Embryonic Stem Cells. *PLoS Med.* 2, 554–560.
- Barone, L.M., Aronow, M.A., Tassinari, M.S., Conlon, D., Canalis, E., Stein, G.S., Lian, J.B., 1994. Differential Effects of Warfarin on mRNA Levels of Developmentally Regulated Vitamin K Dependent Proteins, Osteocalcin, and Matrix GLA Protein In Vitro. *J. Cell. Physiol.* 160, 255–264.
- Baumann, J., Gassmann, K., Masjosthusmann, S., DeBoer, D., Bendt, F., Giersiefer, S., Fritsche, E., 2016. Comparative Human and Rat Neurospheres Reveal Species Differences in Chemical Effects on Neurodevelopmental Key Events. *Arch. Toxicol.* 90, 1415–1427.

- BD Stemflow, 2014. [http://www.bdbiosciences.com/ds//ab/others/23-12788-01%20Book\\_Website.pdf](http://www.bdbiosciences.com/ds//ab/others/23-12788-01%20Book_Website.pdf), [WWW Document]. URL [http://www.bdbiosciences.com/ds//ab/others/23-12788-01Book\\_Website.pdf](http://www.bdbiosciences.com/ds//ab/others/23-12788-01Book_Website.pdf) (accessed 1.6.15).
- Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N., 1991. Initiation and Progression of Mineralization of Bone Nodules Formed In Vitro: The Role of Alkaline Phosphatase and Organic Phosphate. *Bone Miner.* 14, 27–40.
- Belluoccio, D., Rowley, L., Little, C.B., Bateman, J.F., 2013. Maintaining mRNA Integrity during Decalcification of Mineralized Tissues. *PLoS One* 8, 1–6.
- Berry, D.L., Theriault, R.L., Holmes, F.A., Parisi, V.M., Booser, D.J., Singletary, S.E., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G.N., 1999. Management of Breast Cancer during Pregnancy Using a Standardized Protocol. *J. Clin. Oncol.* 17, 855–861.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. A Method for the Rapid Determination of Alkaline Phosphatase with Five Cubic Millimeters of Serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321–329.
- Blau, H.M., Epstein, C.J., 1979. Manipulation of Myogenesis In Vitro: Reversible Inhibition by DMSO. *Cell* 17, 95–108.
- Borgers, M., 1973. The Cytochemical Application of New Potent Inhibitors of Alkaline Phosphatases. *J. Histochem. Cytochem.* 21, 812–824.
- Boskey, A.L., Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S.B., Ducey, P., Karsenty, G., 1998. Fourier Transform Infrared Microspectroscopic Analysis of Bones of Osteocalcin-deficient Mice Provides Insight Into the Function of Osteocalcin. *Bone* 23, 187–196.
- Boskey, A.L., Roy, R., 2008. Cell Culture Systems for Studies of Bone and Tooth Mineralization. *Chem. Rev.* 108, 4716–4733.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L., 2003. Osteoclast Differentiation and Activation. *Nature* 423, 337–342.
- Bradley, E.W., McGee-Lawrence, M.E., Westendorf, J.J., 2011. HDAC-mediated Control of Endochondral and Intramembraneous Ossification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 21, 101–113.
- Brannen, K.C., Panzica-Kelly, J.M., Danberry, T.L., Augustine-Rauch, K.A., 2010. Development of a Zebrafish Embryo Teratogenicity Assay and Quantitative Prediction Model. *Birth Defects Res. Part B* 89, 66–77.
- Bremer, S., 2007. The Development of New Concepts for Assessing Reproductive Toxicity Applicable to Large Scale Toxicological Programmes. *Curr. Pharm. Des.* 13, 3047–3058.
- Brown, N.A., 2002. Selection of Test Chemicals for the ECVAM International Validation Study on In Vitro Embryotoxicity Tests. *ATLA* 30, 177–198.

- Buesen, R., Genschow, E., Slawik, B., Visan, A., Spielmann, H., Luch, A., 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. *Toxicol. Sci.* 108, 389–400.
- Bureau for Chemical Substances Poland, 2013. CLH Report. Proposal for Harmonised Classification and Labelling. Substance Name: Boric Acid [WWW Document]. URL <http://echa.europa.eu/documents/10162/7c403c2d-9de2-4e9e-9117-453d05f7c12a> (accessed 16.8.15).
- Buttery, L.D.K., Bourne, S., Xynos, J.D., Wood, H., Hughes, F.J., Hughes, S.P.F., Episkopou, V., Polak, J.M., Path, F.R.C., 2001. Differentiation of Osteoblasts and In Vitro Bone Formation from Murine Embryonic Stem Cells. *Tissue Eng.* 7, 89–99.
- Canalis, E., Delany, A.M., 2002. Mechanisms of Glucocorticoid Action in Bone, in: *Neuroendocrine Immune Basis of the Rheumatic Diseases II: Proceedings of the Second International Conference*. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, pp. 73–81.
- Cancela, M.L., Laizé, V., Conceição, N., 2014. Matrix Gla Protein and Osteocalcin: From Gene Duplication to Neofunctionalization. *Arch. Biochem. Biophys.* 561, 56–63.
- Carney, E.W., Kimmel, C.A., 2007. Interpretation of Skeletal Variations for Human Risk Assessment: Delayed Ossification and Wavy Ribs. *Birth Defects Res. Part B* 80, 473–496.
- Chang, Y.L., Stanford, C.M., Keller, J.C., 2000. Calcium and Phosphate Supplementation Promotes Bone Cell Mineralization: Implications for Hydroxyapatite (HA)-enhanced Bone Formation. *J. Biomed. Mater. Res.* 52, 270–278.
- Chen, G., Deng, C., Li, Y.-P., 2012. TGF- $\beta$  and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 272–288.
- Chenu, C., Colucci, S., Grano, M., Zigrino, E., Barattolo, R., Zambonin, G., Baldini, N., Vergnaud, E., Delmas, E.D., Zallone, A.Z., 1994. Osteocalcin Induces Chemotaxis, Secretion of Matrix Proteins, and Calcium-mediated Intracellular Signaling in Human Osteoclast-like Cells. *J. Cell Biol.* 127, 1149–1158.
- Cheung, W.M.W., Ng, W.W., Kung, A.W.C., 2006. Dimethyl Sulfoxide as an Inducer of Differentiation in Preosteoblast MC3T3-E1 Cells. *FEBS Lett.* 580, 121–126.
- Chiavegatto, S., Oliveira, C.A., Bernardi, M.M., 1997. Prenatal Exposure of Rats to Diphenhydramine: Effects on Physical Development, Open Field, and Gonadal Hormone Levels in Adults. *Neurotoxicol. Teratol.* 19, 511–516.
- Cho, H.H., Park, H.T., Kim, Y.J., Bae, Y.C., Suh, K.T., Jung, J.S., 2005. Induction of Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Histone Deacetylase Inhibitors. *J. Cell. Biochem.* 96, 533–542.

- Choi, K., Seo, Y., Yoon, H., Song, K., Kwon, S., Lee, H., Park, J., 2008. Effect of Ascorbic Acid on Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation. *J. Biosci. Bioeng.* 105, 586–594.
- Choi, K.-Y., Lee, S.-W., Park, M.-H., Bae, Y.-C., Shin, H.-I., Nam, S.-H., Kim, Y.-J., Kim, H.-J., Ryoo, H.-M., 2002. Spatio-temporal Expression Patterns of Runx2 Isoforms in Early Skeletogenesis. *Exp. Mol. Med.* 34, 426–433.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Cirillo, V.J., Tempero, K.F., 1976. Pharmacology and Therapeutic Use of Antihistamines. *Am. J. Hosp. Pharm.* 33, 1200–1207.
- Clark, D.P., 2005. *Molecular Biology. Understanding the Genetic Revolution.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Cleland, T.P., Voegelé, K., Schweitzer, M.H., 2012. Empirical Evaluation of Bone Extraction Protocols. *PLoS One* 7, 1–9.
- Clementz, A.G., Harris, A., 2013. Collagen XV: Exploring Its Structure and Role within the Tumor Microenvironment. *Mol. Cancer Res.* 11, 1481–1486.
- Cohen, M.M., 2006. The New Bone Biology: Pathologic, Molecular, and Clinical Correlates. *Am. J. Med. Genet. Part A* 140A, 2646–2706.
- Colige, A., Beschin, A., Samyn, B., Goebels, Y., Van Beeumen, J., Nusgens, B. V., Lapière, C.M., 1995. Characterization and Partial Amino Acid Sequencing of a 107-kDa Procollagen I N-Proteinase Purified by Affinity Chromatography on Immobilized Type XIV Collagen. *J. Biol. Chem.* 270, 16724–16730.
- Cooper, M.S., Seibel, M.J., Zhou, H., 2016. Glucocorticoids, Bone and Energy Metabolism. *Bone* 82, 64–68.
- Coutu, D.L., Wu, J.H., Monette, A., Rivard, G.-É., Blostein, M.D., Galipeau, J., 2008. Periostin, a Member of a Novel Family of Vitamin K-dependent Proteins, Is Expressed by Mesenchymal Stromal Cells. *J. Biol. Chem.* 283, 17991–18001.
- Czekanska, E.M., Stoddart, M.J., Richards, R.G., Hayes, J.S., 2012. In Search of an Osteoblast Cell Model for In Vitro Research. *Eur. Cells Mater.* 24, 1–17.
- Dabkowski, J., Zagórska, I., Dabkowska, M., Koczorowski, Z., Trasatti, S., 1996. Adsorption of DMSO at The Free Surface of Water: Surface Excesses and Surface Potential Shifts. *J. Chem. Soc.* 92, 3873–3878.
- Dagg, C.P., 1960. Sensitive Stages for the Production of Developmental Abnormalities in Mice with 5-fluorouracil. *Am. J. Anat.* 106, 89–96.

- Daston, G.P., Knudsen, T.B., 2010. Fundamental Concepts, Current Regulatory Design and Interpretation, in: McQueen, C.A. (Ed.), *Comprehensive Toxicology*. Elsevier Ltd., Philadelphia.
- Daston, G.P., Seed, J., 2007. Skeletal Malformations and Variations in Developmental Toxicity Studies: Interpretation Issues for Human Risk Assessment. *Birth Defects Res. Part B* 80, 421–424.
- De Jong, E., Barenys, M., Hermsen, S.A.B., Verhoef, A., Ossendorp, B.C., Bessems, J.G.M., Piersma, A.H., 2011. Comparison of the Mouse Embryonic Stem Cell Test, the Rat Whole Embryo Culture and the Zebrafish Embryotoxicity Test as Alternative Methods for Developmental Toxicity Testing of Six 1, 2, 4-triazoles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253, 103–111.
- De Jong, E., Louisse, J., Verwei, M., Blaauboer, B.J., van de Sandt, J.J.M., Woutersen, R.A., Rietjens, I.M.C.M., Piersma, A.H., 2009. Relative Developmental Toxicity of Glycol Ether Alkoxy Acid Metabolites in the Embryonic Stem Cell Test as Compared with the In Vivo Potency of Their Parent Compounds. *Toxicol. Sci.* 110, 117–124.
- De Jong, E., van Beek, L., Piersma, A.H., 2012. Osteoblast Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells as a Model to Study the Embryotoxic Effect of Compounds. *Toxicol. Vitro.* 26, 970–978.
- De Jong, E., van Beek, L., Piersma, A.H., 2014. Comparison of Osteoblast and Cardiomyocyte Differentiation in the Embryonic Stem Cell Test for Predicting Embryotoxicity In Vivo. *Reprod. Toxicol.* 48, 62–71.
- De Peppo, G.M., Marcos-Campos, I., Kahler, D.J., Alsalman, D., Shang, L., Vunjak-Novakovic, G., Marolt, D., 2013. Engineering Bone Tissue Substitutes from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PNAS* 110, 8680–8685.
- De Peppo, G.M., Marolt, D., 2013. Modulating the Biochemical and Biophysical Culture Environment to Enhance Osteogenic Differentiation and Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-derived Mesenchymal Progenitors. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 1–11.
- De Peppo, G.M., Sjövall, P., Lennerås, M., Strehl, R., Hyllner, J., Thomsen, P., Karlsson, C., 2010a. Osteogenic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells and Human Embryonic Stem Cell-derived Mesodermal Progenitors: A Tissue Engineering Perspective. *Tissue Eng. Part A* 16, 3413–3426.
- De Peppo, G.M., Sladkova, M., Sjövall, P., Palmquist, A., Oudina, K., Hyllner, J., Thomsen, P., Petite, H., Karlsson, C., 2012. Human Embryonic Stem Cell-derived Mesodermal Progenitors Display Substantially Increased Tissue Formation Compared to Human Mesenchymal Stem Cells under Dynamic Conditions in a Packed bed/column Bioreactor. *Tissue Eng Part A* 1, 1–57.
- De Peppo, G.M., Svensson, S., Lennerås, M., Synnergren, J., Stenberg, J., Strehl, R., Hyllner, J., Thomsen, P., Karlsson, C., 2010b. Human Embryonic Mesodermal Progenitors Highly Resemble Human Mesenchymal Stem Cells and Display High Potential for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng. Part A* 16, 2161–2182.

- Delaine-Smith, R.M., MacNeil, S., Reilly, G.C., 2012. Matrix Production and Collagen Structure Are Enhanced in Two Types of Osteogenic Progenitor Cells by a Simple Fluid Shear Stress Stimulus. *Eur. Cells Mater.* 24, 162–174.
- Deng, Z.-L., Sharff, K.A., Tang, N., Song, W.-X., Luo, J., Luo, X., Chen, J., Bennett, E., Reid, R., Manning, D., Xue, A., Montag, A.G., Luu, H.H., Haydon, R.C., He, T.-C., 2008. Regulation of Osteogenic Differentiation during Skeletal Development. *Front. Biosci.* 13, 2001–2021.
- Di Benedetto, A., Watkins, M., Grimston, S., Salazar, V., Donsante, C., Mbalaviele, G., Radice, G.L., Civitelli, R., 2010. N-cadherin and Cadherin 11 Modulate Postnatal Bone Growth and Osteoblast Differentiation by Distinct Mechanisms. *J. Cell Sci.* 123, 2640–2648.
- Di Cesare, P.E., Fang, C., Leslie, M.P., Tulli, H., Perris, R., Carlson, C.S., 2000. Expression of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) by Embryonic and Adult Osteoblasts. *J. Orthop. Res.* 18, 713–720.
- Di Renzo, F., Broccia, M.L., Giavini, E., Menegola, E., 2010. VPA-related Axial Skeletal Defects and Apoptosis: A Proposed Event Cascade. *Reprod. Toxicol.* 29, 106–112.
- Di Renzo, F., Cappelletti, G., Broccia, M.L., Giavini, E., Menegola, E., 2007. Boric Acid Inhibits Embryonic Histone Deacetylases: A Suggested Mechanism to Explain Boric Acid-related Teratogenicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 178–185.
- Dienelt, A., zur Nieden, N.I., 2011. Hyperglycemia Impairs Skeletogenesis from Embryonic Stem Cells by Affecting Osteoblast and Osteoclast Differentiation. *Stem Cells Dev.* 20, 465–474.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G., 1983. Accurate Transcription Initiation by RNA Polymerase II in a Soluble Extract from Isolated Mammalian Nuclei. *Nucleic Acid Res.* 11, 1475–1489.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., Karsenty, G., 1996. Increased Bone Formation in Osteocalcin-deficient Mice. *Nature* 382, 448–452.
- Duplomb, L., Dagouassat, M., Jourdon, P., Heymann, D., 2007. Concise Review: Embryonic Stem Cells: A New Tool to Study Osteoblast and Osteoclast Differentiation. *Stem Cells* 25, 544–552.
- Ecarot, B., Desbarats, M., 1999. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Down-regulates Expression of Phex, a Marker of the Mature Osteoblast. *Endocrinology* 140, 1192–1199.
- ECHA, 2010. Inclusion of Substances of Very High Concern in the Candidate List (Decision of the Executive Director) [WWW Document]. URL <http://echa.europa.eu/documents/10162/cb5d0f51-2692-4f23-90f6-0ec89a1388fa> (accessed 8.16.15).
- ECHA. Committee for Risk Assessment, 2014. Opinion Proposing Harmonised Classification and Labelling at EU Level of Boric Acid [WWW Document]. URL

- <http://echa.europa.eu/documents/10162/a8b418ec-f00e-4eff-a4e7-5cd489e40eee> (accessed 16.8.15).
- Eijken, M., Koedam, M., van Driel, M., Buurman, C.J., Pols, H.A.P., van Leeuwen, J.P.T.M., 2006. The Essential Role of Glucocorticoids for Proper Human Osteoblast Differentiation and Matrix Mineralization. *Mol. Cell. Endocrinol.* 248, 87–93.
- Elliott, N.T., Yuan, F., 2011. A Review of Three-dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies. *J. Pharm. Sci.* 100, 59–74.
- Environmental Protection Agency, n.d. Toxicity Forecasting (ToxCast) [WWW Document]. URL <http://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-forecasting> (accessed 27.12.15).
- Environmental Protection Agency, n.d. Toxicology Testing in the 21st Century (Tox21) [WWW Document]. URL <http://www.epa.gov/chemical-research/toxicology-testing-21st-century-tox21> (accessed 27.12.15).
- Esser, P., 1988. Evaporation from Cell Culture Plates. *Nunc Bull.* No.2.
- European Commission, 2010. Sixth Report on the Statistics on the Number of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes in the Member States of the European Union [WWW Document]. URL [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/reports\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/reports_en.htm) (accessed 19.5.15).
- European Commission, 2013. Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes in the Member States of the European Union [WWW Document]. URL [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/reports\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/reports_en.htm) (accessed 19.5.15).
- European Parliament and Council, 2003. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 Amending Council Directive 76/768/EEC on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Cosmetic Products. *Off. J. Eur. Union* L66/26–35.
- European Parliament and Council, 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 Concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). *Off. J. Eur. Union* L396/1–849.
- European Parliament and Council, 2008. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures. *Off. J. Eur. Union* L353/1–1355.
- European Parliament and Council, 2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products. *Off. J. Eur. Union* L 342/59–209.
- EuroStemCell, n.d. Regulation of Stem Cell Research in Europe [WWW Document]. URL <http://www.eurostemcell.org/stem-cell-regulations> (accessed 24.11.15).

- EU-ToxRisk, n.d. An Integrated European “Flagship” Program Driving Mechanism-based Toxicity Testing and Risk Assessment for the 21st Century [WWW Document]. URL <http://www.eu-toxrisk.eu/> (accessed 27.12.15).
- Fallon, M.D., Whyte, M.P., Teitelbaum, S.L., 1980. Stereospecific Inhibition of Alkaline Phosphatase by L-tetramisole Prevents In Vitro Cartilage Calcification. *Lab. Invest.* 43, 489–494.
- Farley, J.R., Tarbaux, N.M., Hall, S.L., Linkhart, T.A., Baylink, D.J., 1988. The Anti-bone-resorptive Agent Calcitonin Also Acts In Vitro to Directly Increase Bone Formation and Bone Cell Proliferation. *Endocrinology* 123, 159–167.
- Farley, J.R., Wergedal, J.E., Hall, S.L., Herring, S., Tarbaux, N.M., 1991. Calcitonin Has Direct Effects on  $^3\text{H}$ -thymidine Incorporation and Alkaline Phosphatase Activity in Human Osteoblast-line Cells. *Calcif. Tissue Int.* 48, 297–301.
- Felsenberg, D., 2001. Struktur und Funktion des Knochens. *Pharm. Unserer Zeit* 30, 488–494.
- Felter, S.P., Daston, G.P., Euling, S.Y., Piersma, A.H., Tassinari, M.S., 2015. Assessment of Health Risks Resulting from Early-life Exposures: Are Current Chemical Toxicity Testing Protocols and Risk Assessment Methods Adequate? *Crit. Rev. Toxicol.* 45, 219–44.
- Festag, M., Viertel, B., Steinberg, P., Sehner, C., 2007. An In Vitro Embryotoxicity Assay Based on the Disturbance of the Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells into Endothelial Cells. II. Testing of Compounds. *Toxicol. Vitro.* 21, 1631–1640.
- Fleischer, M., 2007. Testing Costs and Testing Capacity According to the REACH Requirements – Results of a Survey of Independent and Corporate GLP Laboratories in the EU and Switzerland. *J. Bus. Chem.* 4, 96–108.
- Fonovi, M., Turk, B., 2014. Cysteine Cathepsins and Extracellular Matrix Degradation. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2560–2570.
- Franceschi, R.T., Iyer, B.S., Cui, Y., 1994. Effects of Ascorbic Acid on Collagen Matrix Formation and Osteoblast Differentiation in Murine MC3T3-E1 Cells. *J. Bone Miner. Res.* 9, 843–854.
- Franco, B., Meroni, G., Parenti, G., Levilliers, J., Bernard, L., Gebbia, M., Cox, L., Maroteaux, P., Sheffield, L., Rappold, G.A., Andria, G., Petit, C., Ballabio, A., 1995. A Cluster of Sulfatase Genes on Xp22.3: Mutations in Chondrodysplasia Punctata (CDPX) and Implications for Warfarin Embryopathy. *Cell* 81, 15–25.
- Frith, J., Genever, P., 2008. Transcriptional Control of Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Transfus. Med. Hemotherapy* 35, 216–227.
- Fuller, H.R., Man, N.T., Lam, L.T., Shamanin, V.A., Androphy, E.J., Morris, G.E., 2010. Valproate and Bone Loss: iTRAQ Proteomics Show that Valproate Reduces Collagens and Osteonectin in SMA Cells. *J. Proteome Res.* 9, 4228–4233.

- Garba, M.T., Marie, P.J., 1986. Alkaline Phosphatase Inhibition by Levamisole Prevents 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-stimulated Bone Mineralization in the Mouse. *Calcif. Tissue Int.* 38, 296–302.
- Gaspar, D.A., Gomide, V., Monteiro, F.J., 2012. The Role of Perfusion Bioreactors in Bone Tissue Engineering. *Biomatter* 2, 1–9.
- Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Pohl, I., Seiler, A., Clemann, N., Bremer, S., Becker, K., 2004. Validation of the Embryonic Stem Cell Test in the International ECVAM Validation Study on Three In Vitro Embryotoxicity Tests. *ATLA* 32, 209–244.
- Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Brady, M., Clemann, N., Huuskonen, H., Paillard, F., 2002. The ECVAM International Validation Study on In Vitro Embryotoxicity Tests: Results of the Definitive Phase and Evaluation of Prediction Models. *ATLA* 30, 151–176.
- Gilboa, S.M., Strickland, M.J., Olshan, A.F., Werler, M.M., Correa, A., 2009. Use of Antihistamine Medications during Early Pregnancy and Isolated Major Malformations. *Birth Defects Res. Part A* 85, 137–150.
- Gill, S.K., Einarson, A., 2007. The Safety of Drugs for the Treatment of Nausea and Vomiting of Pregnancy. *Expert Opin. Drug Saf.* 6, 685–694.
- Gocht, T., Schwarz, M. (Eds), 2015. *Seurat-1 Annual Report, Volume 5*.
- Goia-Socol, M., Duncea, I., Goia-Socol, M.-A., Hazi, G., Leucu, D.-C., Tomoaia, G., Şuteu, M., Georgescu, C.E., 2013. Effects of Glucose Concentrations on Cathepsin K and Alkaline Phosphatase Activities in Primary Human Osteoblastic Cell Cultures. *Ann. RSCB XVIII*, 75–81.
- Golub, E.E., 2011. Biomineralization and Matrix Vesicles in Biology and Pathology. *Semin. Immunopathol.* 33, 409–417.
- Gonzalez, R.J., Tarloff, J.B., 2001. Evaluation of Hepatic Subcellular Fractions for Alamar Blue and MTT Reductase Activity. *Toxicol. Vitro.* 15, 257–259.
- Groebe, K., Hayess, K., Klemm-Manns, M., Schwall, G., Wozny, W., Steemans, M., Peters, A.K., Sastri, C., Jaeckel, P., Stegmann, W., Zengerling, H., Schöpf, R., Poznanovic, S., Stummann, T.C., Seiler, A., Spielmann, H., Schrattenholz, A., 2010a. Unexpected Common Mechanistic Pathways for Embryotoxicity of Warfarin and Lovastatin. *Reprod. Toxicol.* 30, 121–130.
- Groebe, K., Hayess, K., Klemm-Manns, M., Schwall, G., Wozny, W., Steemans, M., Peters, A.K., Sastri, C., Jaeckel, P., Stegmann, W., Zengerling, H., Schöpf, R., Poznanovic, S., Stummann, T.C., Seiler, A., Spielmann, H., Schrattenholz, A., 2010b. Protein Biomarkers for In Vitro Testing of Embryotoxicity. *J. Proteome Res.* 9, 5727–5738.
- Grunt, T.W., Somay, C., Pavelka, M., Ellinger, A., Dittrich, E., Dittrich, C., 1991. The Effects of Dimethyl Sulfoxide and Retinoic Acid on The Cell Growth and The Phenotype of Ovarian Cancer Cells. *J. Cell Sci.* 100, 657–666.

- Gürgen, S.G., Erdoğan, D., Coşkun, Z.K., Cansu, A., 2012. The Effect of Valproic Acid and Oxcarbazepine on the Distribution of Adhesion Molecules in Embryo Implantation. *Toxicology* 292, 71–77.
- Gurtovenko, A.A., Anwar, J., 2007. Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *J. Phys. Chem. B* 111, 10453–10460.
- Gustafson, A., Stedman, D.B., Ball, J., Hillegass, J.M., Flood, A., Zhang, C.X., Panzica-Kelly, J., Cao, J., Coburn, A., Enright, B.P., Tornesi, M.B., Hetheridge, M., Augustine-Rauch, K.A., 2012. Inter-laboratory Assessment of a Harmonized Zebrafish Developmental Toxicology Assay – Progress Report on Phase I. *Reprod. Toxicol.* 33, 155–164.
- Hansen, D.K., Grafton, T.F., 1988. Attenuation of 5-fluorouracil-induced Embryotoxicity by Exogenous Thymidine In Vitro. *Toxicol. Vitro.* 2, 249–258.
- Harkness, L., Mahmood, A., Ditzel, N., Abdallah, B.M., Nygaard, J. V., Kassem, M., 2011. Selective Isolation and Differentiation of a Stromal Population of Human Embryonic Stem Cells with Osteogenic Potential. *Bone* 48, 231–241.
- Hartung, T., Rovida, C., 2009. Chemical Regulators Have Overreached. *Nature* 460, 1080–1081.
- Hassan, M.Q., Javed, A., Morasso, M.I., Karlin, J., Montecino, M., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., Stein, J.L., Lian, J.B., 2004. Dlx3 Transcriptional Regulation of Osteoblast Differentiation: Temporal Recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 Homeodomain Proteins to Chromatin of the Osteocalcin Gene. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9248–9261.
- Hatakeyama, Y., Hatakeyama, J., Takahashi, A., Oka, K., Tsuruga, E., Inai, T., Sawa, Y., 2011. The Effect of Valproic Acid on Mesenchymal Pluripotent Cell Proliferation and Differentiation in Extracellular Matrices. *Drug Target Insights* 5, 1–9.
- Hauschka, P.V., Carr, S.A., 1982. Calcium-dependent Alpha-helical Structure in Osteocalcin. *Biochemistry* 21, 2538–2547.
- Hayess, K., Riebeling, C., Pirow, R., Steinfath, M., Sittner, D., Slawik, B., Luch, A., Seiler, A.E.M., 2013. The DNT-EST: A Predictive Embryonic Stem Cell-based Assay for Developmental Neurotoxicity Testing In Vitro. *Toxicology* 314, 135–147.
- Heindel, J.J., Price, C.J., Schwetz, B.A., 1994. The Developmental Toxicity of Boric Acid in Mice, Rats, and Rabbits. *Environ. Health Perspect.* 102, 107–112.
- Hendrickx, A.G., Nau, H., Binkerd, P., Rowland, J.M., Rowland, J.R., Cukierski, M.J., Cukierski, M.A., 1988. Valproic Acid Developmental Toxicity and Pharmacokinetics in the Rhesus Monkey: An Interspecies Comparison. *Teratology* 38, 329–345.
- Heng, B.C., Cao, T., Stanton, L.W., Robson, P., Olsen, B., 2004. Strategies for Directing the Differentiation of Stem Cells into the Osteogenic Lineage In Vitro. *J. Bone Miner. Res.* 19, 1379–1394.

- Hoemann, C.D., El-Gabalawy, H., McKee, M.D., 2009. In Vitro Osteogenesis Assays: Influence of the Primary Cell Source on Alkaline Phosphatase Activity and Mineralization. *Pathol. Biol.* 57, 318–323.
- Höfer, T., Gerner, I., Gundert-Remy, U., Liebsch, M., Schulte, A., Spielmann, H., Vogel, R., Wettig, K., 2004. Animal Testing and Alternative Approaches for the Human Health Risk Assessment under the Proposed New European Chemicals Regulation. *Arch. Toxicol.* 78, 549–564.
- Holleville, N., Quilhac, A., Bontoux, M., Monsoro-Burq, A.-H., 2003. BMP Signals Regulate Dlx5 during Early Avian Skull Development. *Dev. Biol.* 257, 177–189.
- Hong, D., Chen, H.-X., Ge, R.-S., Li, J.-C., 2008. The Biological Roles of Extracellular and Intracytoplasmic Glucocorticoids in Skeletal Cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 111, 164–170.
- Howe, A.M., Webster, W.S., 1992. The Warfarin Embryopathy: A Rat Model Showing Maxillofacial Hypoplasia and Other Skeletal Disturbances. *Teratology* 46, 379–390.
- Hsu, C.F., Lin, S.Y., Peir, J.J., Liao, J.W., Lin, Y.C., Chou, F.I., 2011. Potential of Using Boric Acid as a Boron Drug for Boron Neutron Capture Therapy for Osteosarcoma. *Appl. Radiat. Isot.* 69, 1782–1785.
- Hulmes, D.J.S., 2008. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly, in: Fratzl, P. (Ed.), *Collagen: Structure and Mechanics*. Springer Science+Business Media, LLC, pp. 15–47.
- Humphrey, E.L., Morris, G.E., Fuller, H.R., 2013. Valproate Reduces Collagen and Osteonectin in Cultured Bone Cells. *Epilepsy Res.* 106, 446–450.
- Hunter, G.K.H., Hauschka, P. V, Poole, A.R., Rosenberg, L.C., Goldberg, H.A., 1996. Nucleation and Inhibition of Hydroxyapatite Formation by Mineralized Tissue Proteins. *Biochem. J.* 317, 59–64.
- ICH, 2005. Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility S5(R2), Step 4 Version [WWW Document]. URL <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html> (accessed 19.3.15).
- Ilmer, M., Karow, M., Geissler, C., Jochum, M., Neth, P., 2009. Human Osteoblast-derived Factors Induce Early Osteogenic Markers in Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A* 15, 2397–2409.
- International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research, 2012. Annual Report 2012. Roma, Italy.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P., 1997. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *J. Cell. Biochem.* 64, 295–312.
- Jakl, M., Straka, M., Dyrtrtová, J.J., Roithová, J., 2014. Formation and Stability of Calcium Complexes of Dimethyl Sulfoxide in Water. *Int. J. Mass Spectrom.* 360, 8–14.

- Jang, W.-G., Kim, E.-J., Kim, D.-K., Ryoo, H.-M., Lee, K.-B., Kim, S.-H., Choi, H.-S., Koh, J.-T., 2012. BMP2 Protein Regulates Osteocalcin Expression via Runx2-mediated Atf6 Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* 287, 905–915.
- Jeong, H.M., Cho, D.H., Jin, Y.H., Chung, J.O., Chung, M.Y., Chung, D.J., Lee, K.Y., 2011. Inhibition of Osteoblastic Differentiation by Warfarin and 18- $\alpha$ -Gly-cyrrhretinic Acid. *Arch. Pharm. Res.* 34, 1381–1387.
- Jonason, J.H., Xiao, G., Zhang, M., Xing, L., Chen, D., 2009. Post-translational Regulation of Runx2 in Bone and Cartilage. *J. Dent. Res.* 88, 693–703.
- Kaback, L.A., Soung, D.Y., Naik, A., Smith, N., Schwarz, E.M., O’Keefe, R.J., Drissi, H., 2008. Osterix/Sp7 Regulates Mesenchymal Stem Cell Mediated Endochondral Ossification. *J. Cell. Physiol.* 214, 173–182.
- Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., Raymond, P., 2007. Collagens at a Glance. *J. Cell Sci.* 120, 1955–1958.
- Kalajzic, I., Staal, A., Yang, W.-P., Wu, Y., Johnson, S.E., Feyen, J.H.M., Krueger, W., Maye, P., Yu, F., Zhao, Y., Kuo, L., Gupta, R.R., Achenie, L.E.K., Wang, H.-W., Shin, D.-G., Rowe, D.W., 2005. Expression Profile of Osteoblast Lineage at Defined Stages of Differentiation. *J. Biol. Chem.* 280, 24618–24626.
- Kao, J., Brown, N.A., Schmid, B., Goulding, E.H., Fabro, S., 1981. Teratogenicity of Valproic Acid: In Vivo and In Vitro Investigations. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 1, 367–382.
- Kaplow, L.S., 1968. Leukocyte Alkaline Phosphatase Cytochemistry: Applications and Methods. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 155, 911–947.
- Karaplis, A.C., 2002. Embryonic Development of the Bone and the Molecular Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation, in: Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. (Eds.), *Principles of Bone Biology*. Academic Press, Cambridge, pp. 33–58.
- Karlsson, C., Emanuelsson, K., Wessberg, F., Kajic, K., Axell, M.Z., Eriksson, P.S., Lindahl, A., Hyllner, J., Strehl, R., 2009. Human Embryonic Stem Cell-derived Mesenchymal Progenitors-Potential in Regenerative Medicine. *Stem Cell Res.* 3, 39–50.
- Kärner, E., Unger, C., Sloan, A.J., Ährlund-Richter, L., Sugars, R. V, Wendel, M., 2007. Bone Matrix Formation in Osteogenic Cultures Derived from Human Embryonic Stem Cells In Vitro. *Stem Cells Dev.* 16, 39–52.
- Karnofsky, D.A., Murphy, M.L., Lacon, C.R., 1958. Comparative Toxicologic and Teratogenic Effects of 5-fluoro-substituted Pyrimidines in the Chick Embryo and Pregnant Rat. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2, 312–313.
- Keller, G., 2005. Embryonic Stem Cell Differentiation: Emergence of a New Era in Biology and Medicine. *Genes Dev.* 19, 1129–1155.

- Kern, B., Shen, J., Starbuck, M., Karsenty, G., 2001. Cbfa1 Contributes to the Osteoblast-specific Expression of Type I Collagen Genes. *J. Biol. Chem.* 276, 7101–7107.
- Kidd, P.M., 2010. Vitamins D and K as Pleiotropic Nutrients: Clinical Importance to the Skeletal and Cardiovascular Systems and Preliminary Evidence for Synergy. *Altern. Med. Rev.* 15, 199–222.
- Kim, K.M., 1995. Apoptosis and Calcification. *Scanning Microsc.* 9, 1137–1178.
- Kim, Y.-J., Lee, M.-H., Wozney, J.M., Cho, J.-Y., Ryoo, H.-M., 2004. Bone Morphogenetic Protein-2-induced Alkaline Phosphatase Expression Is Stimulated by Dlx5 and Repressed by Msx2. *J. Biol. Chem.* 279, 50773–50780.
- Kirsch, T., Wang, W., Pfander, D., 2003. Functional Differences between Growth Plate Apoptotic Bodies and Matrix Vesicles. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1872–1881.
- Kleinstreuer, N.C., Smith, A.M., West, P.R., Conard, K.R., Fontaine, B.R., Weir-Hauptman, A.M., Palmer, J.A., Knudsen, T.B., Dix, D.J., Donley, E.L.R., Cezar, G.G., 2011. Identifying Developmental Toxicity Pathways for a Subset of ToxCast Chemicals Using Human Embryonic Stem Cells and Metabolomics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257, 111–121.
- Knight, A., 2007. Systematic Reviews of Animal Experiments Demonstrate Poor Human Clinical and Toxicological Utility. *ATLA* 35, 641–659.
- Knight, J., Rovida, C., 2014. Safety Evaluations under the Proposed US Safe Cosmetics and Personal Care Products Act of 2013: Animal Use and Cost Estimates. *ALTEX* 31, 177–208.
- Kola, I., Landis, J., 2004. Can the Pharmaceutical Industry Reduce Attrition Rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 711–715.
- Komori, T., 2010. Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol.* 658, 43–49.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.-H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., Kishimoto, T., 1997. Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturation Arrest of Osteoblasts. *Cell* 89, 755–764.
- Kornak, U., 2011. Animal Models with Pathological Mineralization Phenotypes. *Jt. Bone Spine* 78, 561–567.
- Koshihara, Y., Hoshi, K., 1997. Vitamin K2 Enhances Osteocalcin Accumulation in the Extracellular Matrix of Human Osteoblasts In Vitro. *J. Bone Miner. Res.* 12, 431–438.
- Kraus, P., Lufkin, T., 2006. Dlx Homeobox Gene Control of Mammalian Limb and Craniofacial Development. *Am. J. Med. Genet. Part A* 140, 1366–1374.
- Krieger, R. (Ed.), 2010. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, Volume 1, 3rd ed.* Academic Press, Waltham, USA.

- Krug, A.K., Balmer, N. V., Matt, F., Schönenberger, F., Merhof, D., Leist, M., 2013a. Evaluation of a Human Neurite Growth Assay as Specific Screen for Developmental Neurotoxicants. *Arch. Toxicol.* 87, 2215–2231.
- Krug, A.K., Kolde, R., Gaspar, J.A., Rempel, E., Balmer, N. V., Meganathan, K., Vojnits, K., Baquié, M., Waldmann, T., Ensenat-Waser, R., Jagtap, S., Evans, R.M., Julien, S., Peterson, H., Zagoura, D., Kadereit, S., Gerhard, D., Sotiriadou, I., Heke, M., Natarajan, K., Henry, M., Winkler, J., Marchan, R., Stoppini, L., Bosgra, S., Westerhout, J., Verwei, M., Vilo, J., Kortenkamp, A., Hescheler, J., Hothorn, L., Bremer, S., van Thriel, C., Krause, K.-H., Hengstler, J.G., Rahnenführer, J., Leist, M., Sachinidis, A., 2013b. Human Embryonic Stem Cell-derived Test Systems for Developmental Neurotoxicity: A Transcriptomics Approach. *Arch. Toxicol.* 87, 123–143.
- Kupcsik, L., Meurya, T., Flury, M., Stoddart, M., Alini, M., 2009. Statin-induced Calcification in Human Mesenchymal Stem Cells Is Cell Death Related. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 4465–4473.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J.P. (Eds.), 2013. *Principles of Tissue Engineering*, 4th ed. Academic Press, Waltham, Massachusetts.
- Lau, C., Mole, M.L., Copeland, M.F., Rogers, J.M., Kavlock, R.J., Shuey, D.L., Cameron, A.M., Ellis, D.H., Logsdon, T.R., Merriman, J., Setzer, R.W., 2001. Toward a Biologically Based Dose-response Model for Developmental Toxicity of 5-fluorouracil in the Rat: Acquisition of Experimental Data. *Toxicol. Sci.* 59, 37–48.
- Lee, A.J., Hodges, S., Eastell, R., 2000. Measurement of Osteocalcin. *Ann. Clin. Biochem.* 37, 432–446.
- Lee, H.-Y., Inselman, A.L., Kanungo, J., Hansen, D.K., 2012. Alternative Models in Developmental Toxicology. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58, 10–22.
- Lee, M.-H., Kim, Y.-J., Kim, H.-J., Park, H.-D., Kang, A.-R., Kyung, H.-M., Sung, J.-H., Wozney, J.M., Ryoo, H.-M., 2003. BMP-2-induced Runx2 Expression Is Mediated by Dlx5, and TGF- $\beta$ 1 Opposes the BMP-2-induced Osteoblast Differentiation by Suppression of Dlx5 Expression. *J. Biol. Chem.* 278, 34387–34394.
- Lee, M.-H., Kim, Y.-J., Yoon, W.-J., Kim, J.-I., Kim, B.-G., Hwang, Y.-S., Wozney, J.M., Chi, X.-Z., Bae, S.-C., Choi, K.-Y., Cho, J.-Y., Choi, J.-Y., Ryoo, H.-M., 2005. Dlx5 Specifically Regulates Runx2 Type II Expression by Binding to Homeodomain-response Elements in the Runx2 Distal Promoter. *J. Biol. Chem.* 280, 35579–35587.
- Lee, S., Park, J.-R., Seo, M.-S., Roh, K.-H., Park, S.-B., Hwang, J.-W., Sun, B., Seo, K., Lee, Y.-S., Kang, S.-K., Kang, K.-S., 2009. Histone Deacetylase Inhibitors Decrease Proliferation Potential and Multilineage Differentiation Capability of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cell Prolif.* 42, 711–720.

- Leonard, H., Downs, J., Jian, L., Bebbington, A., Jacoby, P., Nagarajan, L., Ravine, D., Woodhead, H., 2010. Valproate and Risk of Fracture in Rett Syndrome. *Arch. Dis. Child* 95, 444–448.
- Li, Q., Mitchell, A.A., Werler, M.M., Yau, W.P., Hernández-Díaz, S., 2013. Assessment of Antihistamine Use in Early Pregnancy and Birth Defects. *J. Allergy Clin. Immunol. Pr.* 1, 666–674.
- Lian, Q., Lye, E., Suan Yeo, K., Khia Way Tan, E., Salto-Tellez, M., Liu, T.M., Palanisamy, N., El Oakley, R.M., Lee, E.H., Lim, B., Lim, S.-K., 2007. Derivation of Clinically Compliant MSCs from CD105+, CD24- Differentiated Human ESCs. *Stem Cells* 25, 425–436.
- Liggett, W.H., Lian, J.B., Greenberger, J.S., Glowacki, J., 1994. Osteocalcin Promotes Differentiation of Osteoclast Progenitors from Murine Long-term Bone Marrow Cultures. *J. Cell. Biochem.* 55, 190–199.
- Lindner, U., Schlenke, P., Rohwedel, J., 2010. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus. Med. Hemotherapy* 37, 75–83.
- Lisignoli, G., Codeluppi, K., Todoerti, K., Manferdini, C., Piacentini, A., Zini, N., Grassi, F., Cattini, L., Piva, R., Rizzoli, V., Facchini, A., Giuliani, N., Neri, A., 2009. Gene Array Profile Identifies Collagen Type XV as a Novel Human Osteoblast-secreted Matrix Protein. *J. Cell. Physiol.* 220, 401–409.
- Liu, Y., Goldberg, A.J., Dennis, J.E., Gronowicz, G.A., Kuhn, L.T., 2012. One-step Derivation of Mesenchymal Stem Cell (MSC)-like Cells from Human Pluripotent Stem Cells on a Fibrillar Collagen Coating. *PLoS One* 7, e33225.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT Method. *Methods* 25, 402–408.
- Long, F., 2012. Building Strong Bones: Molecular Regulation of the Osteoblast Lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 27–38.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G., 2003. 5-fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338.
- Mahmood, A., Harkness, L., Schröder, H.D., Abdallah, B.M., Kassem, M., 2010. Enhanced Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Mesenchymal Progenitors by Inhibition of TGF-beta/activin/nodal Signaling Using SB-431542. *J. Bone Miner. Res.* 25, 1216–1233.
- Makita, N., Suzuki, M., Asami, S., Takahata, R., Kohzaki, D., Kobayashi, S., Hakamazuka, T., Hozumi, N., 2008. Two of Four Alternatively Spliced Isoforms of RUNX2 Control Osteocalcin Gene Expression in Human Osteoblast Cells. *Gene* 413, 8–17.
- Malone, J.D., Teitelbaum, S.L., Griffin, G.L., Senior, R.M., Kahn, A.J., 1982. Recruitment of Osteoclast Precursors by Purified Bone Matrix Constituents. *J. Cell Biol.* 92, 227–230.

- Mandelin, J., Hukkanen, M., Li, T.-F., Korhonen, M., Liljeström, M., Sillat, T., Hanemaaijer, R., Salo, J., Santavirta, S., Konttinen, Y.T., 2006. Human Osteoblasts Produce Cathepsin K. *Bone* 38, 769–777.
- Mareschi, K., Novara, M., Rustichelli, D., Ferrero, I., Guido, D., Carbone, E., Medico, E., Madon, E., Vercelli, A., Fagioli, F., 2006. Neural Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: Evidence for Expression of Neural Markers and Eag K<sup>+</sup> Channel Types. *Exp. Hematol.* 34, 1563–1572.
- Marx-Stoelting, P., Adriaens, E., Bremer, S., Gelbke, H.-P., Piersma, A., Pellizzer, C., Reuter, U., Schenk, B., Schwengberg, S., Seiler, A., Spielmann, H., Stedman, D.B., Vanparys, P., Vericat, J.A., Weimer, M., Schwarz, M., 2009. A Review of the Implementation of the Embryonic Stem Cell Test (EST). *ATLA* 37, 313–328.
- Matok, I., Gorodischer, R., Koren, G., Sheiner, E., Wiznitzer, A., Levy, A., 2009. The Safety of Metoclopramide Use in the First Trimester of Pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 360, 2528–2535.
- McGee-Russell, S.M., 1958. Histochemical Methods for Calcium. *J. Histochem. Cytochem.* 6, 22–42.
- Menegola, E., Di Renzo, F., Broccia, M.L., Prudenziati, M., Minucci, S., Massa, V., Giavini, E., 2005. Inhibition of Histone Deacetylase Activity on Specific Embryonic Tissues as a New Mechanism for Teratogenicity. *Birth Defects Res. Part B* 74, 392–398.
- Millán, L., 2012. The Role of Phosphatases in the Initiation of Skeletal Mineralization. *Calcif. Tissue Int.* 93, 299–306.
- Miller, R.K., Peters, P.W., Schäfer, C.E., 2007. General Commentary on Drug Therapy and Drug Risks in Pregnancy, in: Miller, R.K., Peters, P.W., Schäfer, C.E. (Eds.), *Drugs During Pregnancy and Lactation*. Elsevier Ltd., Philadelphia, pp. 2–24.
- Moors, M., Rockel, T.D., Abel, J., Cline, J.E., Gassmann, K., Schreiber, T., Schuwald, J., Weinmann, N., Fritsche, E., 2009. Human Neurospheres as Three-dimensional Cellular Systems for Developmental Neurotoxicity Testing. *Environ. Health Perspect.* 117, 1131–1138.
- Moraes, A.P., Schwarz, A., Spinosa, H.S., Florio, J.C., Bernardi, M.M., 2004. Maternal Exposure to Diphenhydramine during the Fetal Period in Rats: Effects on Physical and Neurobehavioral Development and on Neurochemical Parameters. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 681–692.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263–273.
- Mundlos, S., 2005. Molekulare Genetik von Fehlbildungen und Wachstumsstörungen des Skeletts bei Neugeborenen, in: Ganten, Ruckpaul, Wauer (Eds.), *Molekularmedizinische Grundlagen von Fetalen und Neonatalen Erkrankungen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 199–228.

- Murray, E., Provvedini, D., Curran, D., Catherwood, B., Sussman, H., Manolagas, S., 1987. Characterization of a Human Osteoblastic Osteosarcoma Cell Line (SAOS-2) with High Bone Alkaline Phosphatase Activity. *J. Bone Miner. Res.* 2, 231–238.
- Myers, J.C., Amenta, P.S., Dion, A.S., Sciancalepore, J.P., Nagaswami, C., Weisel, J.W., Yurchenco, P.D., 2007. The Molecular Structure of Human Tissue Type XV Presents a Unique Conformation among the Collagens. *Biochem. J.* 404, 535–544.
- Nahum, G.G., Uhl, K., Kennedy, D.L., 2006. Antibiotic Use in Pregnancy and Lactation: What Is and Is not Known about Teratogenic and Toxic Risks. *Obs. Gynecol.* 107, 1120–1138.
- Nakano, Y., Addison, W.N., Kaartinen, M.T., 2007. ATP-mediated Mineralization of MC3T3-E1 Osteoblast Cultures. *Bone* 41, 549–561.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., 2002. The Novel Zinc Finger-containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 108, 17–29.
- Narotsky, M.G., Schmid, J.E., Andrews, J.E., Kavlock, R.J., 1998. Effects of Boric Acid on Axial Skeletal Development in Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 66, 373–394.
- National Research Council, 2007. *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*, 1st ed. The National Academies Press, Washington, DC.
- Neve, A., Corrado, A., Cantatore, F.P., 2012. Osteocalcin: Skeletal and Extra-Skeletal Effects. *J. Cell. Physiol.* 228, 1149–1153.
- Newberry, E.P., Latifi, T., Towler, D.A., 1998. Reciprocal Regulation of Osteocalcin Transcription by the Homeodomain Proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry* 37, 16360–16368.
- NTP, 1981. Study TER82069: Teratologic Evaluation of Diphenhydramine Hydrochloride (CAS No. 147-24-0) in CD-1 Mice [WWW Document]. URL <http://ntp.niehs.nih.gov/testing/types/dev/abstracts/pages/ter82069/index.html> (accessed 19.3.15).
- NTP, 1982. Study TER82068: Teratologic Evaluation of Diphenhydramine Hydrochloride (CAS No. 147-24-0) Administered to CD-1 mice on Gestational Days 11 through 14 [WWW Document]. URL <http://ntp.niehs.nih.gov/testing/types/dev/abstracts/pages/ter82068/index.html> (accessed 19.3.15).
- NTP, 1983. Study TER82067: Teratologic Evaluation of Diphenhydramine Hydrochloride (CAS No. 147-24-0) in CD Rats [WWW Document]. URL <http://ntp.niehs.nih.gov/testing/types/dev/abstracts/pages/ter82067/index.html> (accessed 19.3.15).
- Nudelman, F., Lausch, A.J., Sommerdijk, N., Sone, E.D., 2013. In Vitro Models of Collagen Biomineralization. *J. Struct. Biol.* 183, 258–269.

- OECD, 2001. Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study [WWW Document]. URL [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-414-prenatal-development-toxicity-study\\_9789264070820-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-414-prenatal-development-toxicity-study_9789264070820-en) (accessed 19.3.15).
- Okazakis, M., Takeshita, S., Kawai, S., Kikuno, R., Tsujimura, A., Kudo, A., Amann, E., 1994. Molecular Cloning and Characterization of OB-cadherin, a New Member of Cadherin Family Expressed in Osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 12092–12098.
- Olivares-Navarrete, R., Sutha, K., Hyzy, S.L., Hutton, D.L., Schwartz, Z., McDevitt, T., Boyan, B.D., 2012. Osteogenic Differentiation of Stem Cells Alters Vitamin D Receptor Expression. *Stem Cells Dev.* 21, 1726–1735.
- Olivier, E.N., Rybicki, A.C., Bouhassira, E.E., 2006. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Bipotent Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 24, 1914–1922.
- Olson, H., Betton, G., Stritar, J., Robinson, D., 1998. The Predictivity of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans from Animal Data – An Interim Assessment. *Toxicol. Lett.* 102-103, 535–538.
- Ornoy, A., 2009. Valproic Acid in Pregnancy: How Much Are we Endangering the Embryo and Fetus? *Reprod. Toxicol.* 28, 1–10.
- Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W.H., Beddington, R.S.P., Mundlos, S., Olsen, B.R., Selby, P.B., Owen, M.J., 1997. *Cbfa1*, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell* 89, 765–771.
- Owen, T.A., Aronow, M.S., Barone, L.M., Bettencourt, B., Stein, G.S., Lian, J.B., 1991. Pleiotropic Effects of Vitamin D on Osteoblast Gene Expression Are Related to the Proliferative and Differentiated State of the Bone Cell Phenotype: Dependency upon Basal Levels of Gene Expression, Duration of Exposure, and Bone Matrix Competency in Normo. *Endocrinology* 128, 1496–1504.
- Pal, R., Mamidi, K.M., Das, A.K., Bhonde, R., 2012. Diverse Effects of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on the Differentiation Potential of Human Embryonic Stem Cells. *Arch. Toxicol.* 86, 651–661.
- Palmer, J.A., Smith, A.M., Egnash, L.A., Conard, K.R., West, P.R., Burrier, R.E., Donley, E.L.R., Kirchner, F.R., 2013. Establishment and Assessment of a New Human Embryonic Stem Cell-based Biomarker Assay for Developmental Toxicity Screening. *Birth Defects Res. Part B* 98, 343–363.
- Paquette, J.A., Kumpf, S.W., Streck, R.D., Thomson, J.J., Chapin, R.E., Stedman, D.B., 2008. Assessment of the Embryonic Stem Cell Test and Application and Use in the Pharmaceutical Industry. *Birth Defects Res. Part B* 83, 104–111.

- Park, M., Li, Q., Shcheynikov, N., Zeng, W., Muallem, S., 2004. NaBC1 Is a Ubiquitous Electrogenic Na<sup>+</sup>-Coupled Borate Transporter Essential for Cellular Boron Homeostasis and Cell Growth and Proliferation. *Mol. Cell* 16, 331–341.
- Parker, S.E., Mai, C.T., Canfield, M.A., Rickard, R., Wang, Y., Meyer, R.E., Anderson, P., Mason, C.A., Collins, J.S., Kirby, R.S., Correa, A., 2010. Updated National Birth Prevalence Estimates for Selected Birth Defects in the United States, 2004-2006. *Birth Defects Res. Part A* 88, 1008–1016.
- Parker, W.B., Cheng, Y.C., 1990. Metabolism and Mechanism of Action of 5-fluorouracil. *Pharmacol. Ther.* 48, 381–395.
- Pasternak, B., Svanström, H., Mølgaard-Nielsen, D., Melbye, M., Hviid, A., 2013. Metoclopramide in Pregnancy and Risk of Major Congenital Malformations and Fetal Death. *JAMA*. 310, 1601–1611.
- Pedersen, F., de Bruijn, J., Sharon, M., van Leeuwen, K., 2003. Assessment of Additional Testing Needs under REACH. Effects of (Q)SARS, Risk Based Testing and Voluntary Industry Initiatives. European Commission, Joint Research Centre. EUR 20863. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection.
- Pfizer, 2012. Material Safety Data Sheet: Metoclopramide Injection [WWW Document]. URL [http://www.pfizer.com/system/files/products/material\\_safety\\_data/PZ00172.pdf](http://www.pfizer.com/system/files/products/material_safety_data/PZ00172.pdf) (accessed 21.9.15).
- Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Klein, P.S., 2001. Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J. Biol. Chem.* 276, 36734–36741.
- Piersma, A.H., Genschow, E., Verhoef, A., Spanjersberg, M.Q.I., Brown, N.A., Brady, M., Burns, A., Clemann, N., Seiler, A., Spielmann, H., 2004. Validation of the Postimplantation Rat Whole-embryo Culture Test in the International ECVAM Validation Study on Three In Vitro Embryotoxicity Tests. *ATLA* 32, 275–307.
- Pirracò, R.P., Marques, A.P., Reis, R.L., 2010. Cell Interactions in Bone Tissue Engineering. *J. Cell Mol. Med.* 14, 93–102.
- Plotkin, L.I., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Roberson, P.K., Manolagas, S.C., Bellido, T., 1999. Prevention of Osteocyte and Osteoblast Apoptosis by Bisphosphonates and Calcitonin. *J. Clin. Invest.* 104, 1363–1374.
- Porstmann, T., Ternynck, T., Avrameas, S., 1985. Quantitation of 5-Bromo-2-Deoxyuridine Incorporation into DNA: An Enzyme Immunoassay for the Assessment of the Lymphoid Cell Proliferative Response. *J. Immunol. Methods* 82, 169–179.

- Price, C.J., Strong, P.L., Marr, M.C., Myers, C.B., Murray, F.J., 1996. Developmental Toxicity NOAEL and Postnatal Recovery in Rats Fed Boric Acid during Gestation. *Fundam. Appl. Toxicol.* 32, 179–193.
- Price, P.A., Toroian, D., Lim, J.E., 2009. Mineralization by Inhibitor Exclusion. *J. Biol. Chem.* 284, 17092–17101.
- Proudfoot, D., Shanahan, C.M., 2006. Molecular Mechanisms Mediating Vascular Calcification: Role of Matrix Gla Protein. *Nephrology* 11, 455–461.
- Proudfoot, D., Skepper, J.N., Hegyi, L., Bennett, M.R., Shanahan, C.M., Weissberg, P.L., 2000. Apoptosis Regulates Human Vascular Calcification In Vitro: Evidence for Initiation of Vascular Calcification by Apoptotic Bodies. *Circ. Res.* 87, 1055–1062.
- Rampersad, S.N., 2012. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* 12, 12347–12360.
- Ray Sarkar, B.C., Chauhan, U.P.S., 1967. A New Method for Determining Micro Materials Quantities of Calcium in Biological Materials. *Anal. Biochem.* 20, 155–166.
- Riebeling, C., 2001. Mechanisms of Regulation of Phospholipase D Isoforms – Involvement in Differentiation and Apoptosis. Inaugural-Dissertation. Freie Universität Berlin.
- Riebeling, C., Fischer, K., Luch, A., Seiler, A.E.M., 2015. Classification of Reproductive Toxicants with Diverse Mechanisms in the Embryonic Stem Cell Test. *J. Toxicol. Sci.* 40, 809–815.
- Riebeling, C., Hayess, K., Peters, A.K., Steemans, M., Spielmann, H., Luch, A., Seiler, A.E.M., 2012. Assaying Embryotoxicity in the Test Tube: Current Limitations of the Embryonic Stem Cell Test (EST) Challenging its Applicability Domain. *Crit. Rev. Toxicol.* 42, 443–464.
- 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., Seiler, A., 2011. The Embryonic Stem Cell Test as Tool to Assess Structure-dependent Teratogenicity: The Case of Valproic Acid. *Toxicol. Sci.* 120, 360–370.
- Ritz, C., Streibig, J., 2005. Bioassay Analysis Using R. *J. Stat. Softw.* 12, 1–22.
- Robledo, R.F., Rajan, L., Li, X., Lufkin, T., 2002. The Dlx5 and Dlx6 Homeobox Genes Are Essential for Craniofacial, Axial, and Appendicular Skeletal Development. *Genes Dev.* 16, 1089–1101.
- Romberg, R.W., Werness, P.G., Riggs, B.L., Mann, K.G., 1986. Inhibition of Hydroxyapatite Crystal Growth by Bone-specific and Other Calcium-binding Proteins? *Biochemistry* 25, 1176–1180.
- Roth, A., Singer, T., 2014. The Application of 3D Cell Models to Support Drug Safety Assessment: Opportunities & Challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69-70, 179–189.

- Rovida, C., Hartung, T., 2009. Re-Evaluation of Animal Numbers and Costs for In Vivo Tests to Accomplish REACH Legislation Requirements for Chemicals – A Report by the Transatlantic Think Tank for Toxicology (t4). ALTEX 26, 187–208.
- Rovida, C., Longo, F., Rabbit, R.R., 2011. How Are Reproductive Toxicity and Developmental Toxicity Addressed in REACH Dossiers? ALTEX 28, 273–294.
- Rovida, C., Vivier, M., Garthoff, B., Hescheler, J., 2014. ESNATS Conference — The Use of Human Embryonic Stem Cells for Novel Toxicity Testing Approaches. ATLA 42, 97–113.
- Ruchon, A.F., Tenenhouse, H.S., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Aubin, J.E., Desgroseillers, L., Crine, P., Boileau, G., 2000. Developmental Expression and Tissue Distribution of Phex Protein: Effect of the Hyp Mutation and Relationship to Bone Markers. J. Bone Miner. Res. 15, 1440–1450.
- Russel, W.M.S., Burch, R.L., 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London.
- Ryoo, H.M., Hoffmann, H.M., Beumer, T., Frenkel, B., Towler, D.A., Stein, G.S., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Lian, J.B., 1997. Stage-specific Expression of Dlx-5 during Osteoblast Differentiation: Involvement in Regulation of Osteocalcin Gene Expression. Mol. Endocrinol. 11, 1681–1694.
- Santos, N.C., Saldanha, C., 2003. Multidisciplinary Utilization of Dimethyl Sulfoxide: Pharmacological, Cellular, and Molecular Aspects. Biochem. Pharmacol. 65, 1035–1041.
- Schäfer, C., 2005. Umweltbedingte Vorgeburtliche Entwicklungsschäden, in: Ganten, Ruckpaul, Wauer (Eds.), Molekularmedizinische Grundlagen von Fetalen und Neonatalen Erkrankungen. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Schäfer, C., Spielmann, H., Vetter, K., Weber-Schöndorfer, C., 2012. Arzneimittel in Schwangerschaft und Stillzeit, 8th ed. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München.
- Schakowsky, Markey, Blumenauer, Chu, Conyers, Ellison, Grijalva, Hastings, Huffman, Lowenthal, Michaud, Moran, Norton, Pingree, Wasserman-Schultz, Speier, 2013. H. R. 1385 To Amend Title VI of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act to Ensure the Safe Use of Cosmetics, and for Other Purposes.
- Schardein, J.L., Hentz, D.L., Petre, J.A., Kurtz, S.M., 1971. Teratogenesis Studies with Diphenhydramine HCl. Toxicol. Appl. Pharmacol. 18, 971–976.
- Schenk, B., Weimer, M., Bremer, S., van der Burg, B., Cortvrint, R., Freyberger, A., Lazzari, G., Pellizzer, C., Piersma, A., Schäfer, W.R., Seiler, A., Witters, H., Schwarz, M., 2010. The ReProTect Feasibility Study, a Novel Comprehensive In Vitro Approach to Detect Reproductive Toxicants. Reprod. Toxicol. 30, 200–218.

- Schoonen, W.G.E.J., Westerink, W.M.A., Horbach, G.J., 2009. High-throughput Screening for Analysis of In Vitro Toxicity, in: Luch, A. (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, Volume 1: Molecular Toxicology. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 401–452.
- Schuppan, D., Cantaluppi, M.C., Becker, J., Veit, A., Bunte, T., Troyer, D., Schuppan, F., Schmid, M., Ackermann, R., Hahn, E.G., 1990. Undulin, an Extracellular Matrix Glycoprotein Associated with Collagen Fibrils. *J. Biol. Chem.* 265, 8823–8832.
- Seiler, A.E.M., Spielmann, H., 2011. The Validated Embryonic Stem Cell Test to Predict Embryotoxicity In Vitro. *Nat. Protoc.* 6, 961–978.
- Selderslaghs, I.W.T., Blust, R., Witters, H.E., 2012. Feasibility Study of the Zebrafish Assay as an Alternative Method to Screen for Developmental Toxicity and Embryotoxicity Using a Training Set of 27 Compounds. *Reprod. Toxicol.* 33, 142–154.
- Shah, R.M., MacKay, R.A., 1978. Teratological Evaluation of 5-fluorouracil and 5-bromo-2-deoxyuridine on Hamster Fetuses. *J. Embryol. exp. Morph.* 43, 47–54.
- Sheth, R.D., Wesolowski, C.A., Jacob, J.C., Penney, S., Hobbs, G.R., Riggs, J.E., Bodensteiner, J.B., 1995. Effect of Carbamazepine and Valproate on Bone Mineral Density. *J. Pediatr.* 127, 256–262.
- Shu, Z., Heimfeld, S., Gao, D., 2015. Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Cryopreserved Grafts: Adverse Reactions after Transplantation and Cryoprotectant Removal Prior to Infusion. *Bone Marrow Transplant.* 49, 469–476.
- Shuey, D.L., Lau, C., Logsdon, T.R., Zucker, R.M., Elstein, K.H., Narotsky, M.G., Setzer, R.W., Kavlock, R.J., Rogers, J.M., 1994. Biologically Based Dose-response Modeling in Developmental Toxicology: Biochemical and Cellular Sequelae of 5-fluorouracil Exposure in the Developing Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126, 129–144.
- Shuren, J., 2008. Content and Format of Labeling for Human Prescription Drug and Biological Products; Requirements for Pregnancy and Lactation Labeling. *Fed. Regist.* 73, 18–55.
- Siggelkow, H., Schulz, H., Kaesler, S., Benzler, K., Atkinson, M.J., Hüfner, M., 1999. 1,25 Dihydroxyvitamin-D3 Attenuates the Confluence-dependent Differences in the Osteoblast Characteristic Proteins Alkaline Phosphatase, Procollagen I Peptide, and Osteocalcin. *Calcif. Tissue Int.* 64, 414–421.
- Simeone, A., Acampora, D., Pannese, M., D'Esposito, M., Stornaiuolo, A., Gulisano, M., Mallamaci, A., Kastury, K., Druck, T., Huebner, K., Boncinelli, E., 1994. Cloning and Characterization of Two Members of the Vertebrate Dlx Gene Family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 2250–2254.
- Sipes, N.S., Padilla, S., Knudsen, T.B., 2011. Zebrafish — As an Integrative Model for Twenty-first Century Toxicity Testing. *Birth Defects Res. Part C* 93, 256–267.

- Smirnova, L., Block, K., Sittka, A., Oelgeschläger, M., Seiler, A.E.M., Luch, A., 2014. MicroRNA Profiling as Tool for In Vitro Developmental Neurotoxicity Testing: The case of Sodium Valproate. *PLoS One* 9, e98892.
- Smith, M.K., Kimmel, G.L., Kochhar, D.M., Shepard, T.H., Spielberg, S.P., Wilson, J.G., 1983. A Selection of Candidate Compounds for In Vitro Teratogenesis Test Validation. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 3, 461–480.
- Smith, N., Dong, Y., Lian, J.B., Pratap, J., Kingsley, P.D., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Schwarz, E.M., O’Keefe, R.J., Stein, G.S., Drissi, M.H., 2005. Overlapping Expression of Runx1 (Cbfa2) and Runx2 (Cbfa1) Transcription Factors Supports Cooperative Induction of Skeletal Development. *J. Cell. Physiol.* 203, 133–143.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Sogorb, M.A., Pamies, D., de Lapuente, J., Estevan, C., Estévez, J., Vilanova, E., 2014. An Integrated Approach for Detecting Embryotoxicity and Developmental Toxicity of Environmental Contaminants Using In Vitro Alternative Methods. *Toxicol. Lett.* 1–12.
- Soltanoff, C.S., Chen, W., Yang, S., Li, Y.-P., 2009. Signaling Networks that Control the Lineage Commitment and Differentiation of Bone Cells. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 19, 1–46.
- Somasundaran, P., 2006. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Volume 7.* Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- Sottile, V., Thomson, A., McWhir, J., 2003. In Vitro Osteogenic Differentiation of Human ES Cells. *Cloning Stem Cells* 5, 149–155.
- Speer, M.Y., Giachelli, C.M., 2004. Regulation of Cardiovascular Calcification. *Cardiovasc. Pathol.* 13, 63–70.
- Spielmann, H., 2009. The Way forward in Reproductive/Developmental Toxicity Testing. *ATLA* 37, 641–656.
- Spielmann, H., Genschow, E., Brown, N.A., Piersma, A.H., Verhoef, A., Spanjersberg, M.Q.I., Huuskonen, H., Paillard, F., Seiler, A., 2004. Validation of the Rat Limb Bud Micromass Test in the International ECVAM Validation Study on Three In Vitro Embryotoxicity Tests. *ATLA* 32, 245–274.
- Spielmann, H., Pohl, I., Döring, B., Liebsch, M., Moldenhauer, F., 1997. The Embryonic Stem Cell Test, an In Vitro Embryotoxicity Test Using Two Permanent Mouse Cell Lines: 3T3 Fibroblasts and Embryonic Stem Cells. *In Vitro Toxicol.* 10, 119–127.
- Springer, A., Herrmann, H., Sittner, D., Herbst, U., Schulte, A., 2015. REACH Compliance: Data Availability of REACH Registrations, Part 1: Screening of Chemicals > 1000 tpa. Dessau.

- Staudt, N.D., Maurer, A., Spring, B., Kalbacher, H., Aicher, W.K., Klein, G., 2012. Processing of CXCL12 by Different Osteoblast-Secreted Cathepsins. *Stem Cells Dev.* 21, 1924–1935.
- Stein, G.S., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Montecino, M., Javed, A., Zaidi, S.K., Young, D.W., Choi, J.-Y., Pockwinse, S.M., 2004. Runx2 Control of Organization, Assembly and Activity of the Regulatory Machinery for Skeletal Gene Expression. *Oncogene* 23, 4315–4329.
- Stephens, A.S., Stephens, S.R., Hobbs, C., Hutmacher, D.W., Bacic-Welsh, D., Woodruff, M.A., Morrison, N.A., 2011. Myocyte Enhancer Factor 2C, an Osteoblast Transcription Factor Identified by Dimethyl Sulfoxide (DMSO)-enhanced Mineralization. *J. Biol. Chem.* 286, 30071–30086.
- Stephens, J.D., Golbus, M.S., Miller, T.R., Wilber, R.R., Epstein, C.J., 1980. Multiple Congenital Anomalies in a Fetus Exposed to 5-fluorouracil during the First Trimester. *Am. J. Obs. Gynecol.* 137, 747–749.
- Strikwold, M., Woutersen, R.A., Spenkelink, B., Punt, A., Rietjens, I.M.C.M., 2012. Relative Embryotoxic Potency of P-substituted Phenols in the Embryonic Stem Cell Test (EST) and Comparison to their Toxic Potency In Vivo and in the Whole Embryo Culture (WEC) Assay. *Toxicol. Lett.* 213, 235–242.
- Stummann, T.C., Hareng, L., Bremer, S., 2009. Hazard Assessment of Methylmercury Toxicity to Neuronal Induction in Embryogenesis Using Human Embryonic Stem Cells. *Toxicology* 257, 117–126.
- Tadic, T., Dodig, M., Erceg, I., Marijanovic, I., Mina, M., Kalajzic, Z., Velonis, D., Kronenberg, M.S., Koshier, R.A., Ferrari, D., Lichtler, A.C., 2002. Overexpression of Dlx5 in Chicken Calvarial Cells Accelerates Osteoblastic Differentiation. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1008–1014.
- Tadic, T., Erceg, I., Stover, M.L., Rowe, D.W., Lichtler, A.C., 2001. Dlx5 Induces Expression of COL1A1 Promoter Contained in a Retrovirus Vector. *Croat. Med. J.* 42, 436–439.
- Takamizawa, S., Maehata, Y., Imai, K., Senoo, H., Sato, S., Hata, R., 2004. Effects of Ascorbic Acid and Ascorbic Acid 2-phosphate, a Long-acting Vitamin C Derivative, on the Proliferation and Differentiation of Human Osteoblast-like Cells. *Cell Biol. Int.* 28, 255–265.
- Team, R.C., 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [WWW Document] <http://www.R-project.org/>. (accessed 19.3.2015).
- Theunissen, P.T., Schulpen, S.H.W., van Dartel, D.A.M., Hermsen, S.A.B., van Schooten, F.J., Piersma, A.H., 2010. An Abbreviated Protocol for Multilineage Neural Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells and its Perturbation by Methyl Mercury. *Reprod. Toxicol.* 29, 383–392.
- Tonini, M., Cipollina, L., Poluzzi, E., Crema, F., Corazza, G.R., De Ponti, F., 2004. Clinical Implications of Enteric and Central D2 Receptor Blockade by Antidopaminergic Gastrointestinal Prokinetics. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19, 379–390.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350–4354.
- U. S. FDA, 2014. Content and Format of Labeling for Human Prescription Drug and Biological Products; Requirements for Pregnancy and Lactation Labeling. *Fed. Regist.* 1–149.
- Van den Bulck, K., Hill, A., Mesens, N., Diekman, H., de Schaepdrijver, L., Lammens, L., 2011. Zebrafish Developmental Toxicity Assay: A Fishy Solution to Reproductive Toxicity Screening, or Just a Red Herring? *Reprod. Toxicol.* 32, 213–219.
- Van der Jagt, K., Munn, S., Torslov, J., de Bruijn, J., 2004. Alternative Approaches Can Reduce the Use of Test Animals under REACH. European Commission, Joint Research Centre. EUR 21405 EN.
- Van der Meulen, J., Koerten, H.K., 1994. Inflammatory Response and Degradation of Three Types of Calcium Phosphate Ceramic in a Non-osseous Environment. *J. Biomed. Mater. Res.* 28, 1455–1463.
- Van Driel, D., Wesseling, J., Sauer, P.J.J., Touwen, B.C.L., van der Veer, E., Heymans, H.S.A., 2002. Teratogen Update: Fetal Effects after In Utero Exposure to Coumarins Overview of Cases, Follow-up Findings, and Pathogenesis. *Teratology* 66, 127–140.
- Villa, I., Dal Fiume, C., Maestroni, A., Rubinacci, A., Ravasi, F., Guidobono, F., 2002. Human Osteoblast-like Cell Proliferation Induced by Calcitonin-related Peptides Involves PKC Activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E627–E633.
- Visan, A., Hayess, K., Sittner, D., Pohl, E.E., Riebeling, C., Slawik, B., Gulich, K., Oelgeschlaeger, M., Luch, A., Seiler, A.E.M., 2012. Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells as a Tool to Assess Developmental Neurotoxicity In Vitro. *Neurotoxicology* 33, 1135–1146.
- Viswanathan, P., Ondeck, M.G., Chirasatitsin, S., Ngamkham, K., Reilly, G.C., Engler, A.J., Battaglia, G., 2015. Biomaterials 3D Surface Topology Guides Stem Cell Adhesion and Differentiation. *Biomaterials* 52, 140–147.
- Vorhees, C. V., 1987. Teratogenicity and Developmental Toxicity of Valproic Acid in Rats. *Teratology* 35, 195–202.
- Wälchli, C., Koch, M., Chiquet, M., Odermatt, B.F., Trueb, B., 1994. Tissue-specific Expression of the Fibril-associated Collagens XII and XIV. *J. Cell Sci.* 107, 669–681.
- Waldmann, T., Rempel, E., Balmer, N. V., König, A., Kolde, R., Gaspar, J.A., Henry, M., Hescheler, J., Sachinidis, A., Rahnenführer, J., Hengstler, J.G., Leist, M., 2014. Design Principles of Concentration-dependent Transcriptome Deviations in Drug-exposed Differentiating Stem Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 408–420.

- Walker, L., Baumgartner, L., Keller, K.C., Ast, J., Trettner, S., zur Nieden, N.I., 2015. Non-human Primate and Rodent Embryonic Stem Cells Are Differentially Sensitive to Embryotoxic Compounds. *Toxicol. Reports* 2, 165–174.
- Walmod, P.S., Gravemann, U., Nau, H., Berezin, V., Bock, E., 2004. Discriminative Power of an Assay for Automated In Vitro Screening of Teratogens. *Toxicol. Vitro* 18, 511–525.
- Wang, H., Scott, R.E., 1993. Inhibition of Distinct Steps in the Adipocyte Differentiation Pathway in 3T3 T Mesenchymal Stem Cells by Dimethyl Sulphoxide (DMSO). *Cell Prolif.* 26, 55–66.
- Wang, Y.-K., Chen, C.S., 2013. Cell Adhesion and Mechanical Stimulation in the Regulation of Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *J. Cell Mol. Med.* 17, 823–832.
- Watanabe, T., Tajima, H., Hironori, H., Nakagawara, H., Ohnishi, I., Takamura, H., Ninomiya, I., Kitagawa, H., Fushida, S., Tani, T., Fujimura, T., Ota, T., Wakayama, T., Iseki, S., Harada, S., 2011. Sodium Valproate Blocks the Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1 Autocrine Loop and Attenuates the TGF- $\beta$ 1-induced Collagen Synthesis in a Human Hepatic Stellate Cell Line. *Int. J. Mol. Med.* 28, 919–925.
- Watson, R.E., DeSesso, J.M., Hurtt, M.E., Cappon, G.D., 2006. Postnatal Growth and Morphological Development of the Brain: A Species Comparison. *Birth Defects Res. Part B* 77, 471–484.
- Wéry, N., Narotsky, M.G., Pacico, N., Kavlock, R.J., Picard, J.J., Gofflot, F., 2003. Defects in Cervical Vertebrae in Boric Acid-exposed Rat Embryos Are Associated with Anterior Shifts of Hox Gene Expression Domains. *Birth Defects Res. Part A* 67, 59–67.
- Whyte, M.P., 2010. Physiological Role of Alkaline Phosphatase Explored in Hypophosphatasia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192, 190–200.
- Williams, H.D., Trevaskis, N.L., Charman, S.A., Shanker, R.M., Charman, W.N., Pouton, C.W., Porter, C.J.H., 2013. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacol. Rev.* 65, 315–499.
- Wiltse, J., 2005. Mode of Action: Inhibition of Histone Deacetylase, Altering WNT-dependent Gene Expression, and Regulation of Beta-catenin — Developmental Effects of Valproic Acid. *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 727–738.
- Woeckel, V.J., Alves, R.D.A.M., Swagemakers, S.M.A., Eijken, M., Chiba, H., van der Eerden, B.C.J., van Leeuwen, J.P.T.M., 2010. 1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  Acts in the Early Phase of Osteoblast Differentiation to Enhance Mineralization via Accelerated Production of Mature Matrix Vesicles. *J. Cell. Physiol.* 225, 593–600.
- Wolpert, L., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J., 2007. Principles of Development. Springer-Verlag, Heidelberg.

- Wookey, P.J., 2009. A Review of Calcitonin Receptor Expression in Embryonic, Foetal and Adult Tissues, with an Hypothesis on the Connection between Expression during Foetal Development and Disease. *Open Zool. J.* 2, 53–61.
- Worth, A.P., Balls, M., 2004. The Principles of Validation and the ECVAM Validation Process. *ATLA* 32, 623–629.
- Xian, C.J., Cool, J.C., Pyragius, T., Foster, B.K., 2006. Damage and Recovery of the Bone Growth Mechanism in Young Rats Following 5-fluorouracil Acute Chemotherapy. *J. Cell. Biochem.* 99, 1688–1704.
- Yamashita, A., Inada, H., Chihara, K., Yamada, T., Deguchi, J., Funabashi, H., 2014. Improvement of the Evaluation Method for Teratogenicity Using Zebrafish Embryos. *J. Toxicol. Sci.* 39, 453–464.
- Yamashita, A., Takada, T., Narita, J., Yamamoto, G., Torii, R., 2005. Osteoblastic Differentiation of Monkey Embryonic Stem Cells In Vitro. *Cloning Stem Cells* 7, 232–237.
- Yamate, T., Mocharla, H., Taguchi, Y., Igietseme, J.U., Manolagas, S.C., Abe, E., 1997. Osteopontin Expression by Osteoclast and Osteoblast Progenitors in the Murine Bone Marrow: Demonstration of Its Requirement for Osteoclastogenesis and Its Increase After Ovariectomy. *Endocrinology* 138, 3047–3055.
- Yang, C., Madhu, V., Thomas, C., Yang, X., Du, X., Dighe, A.S., Cui, Q., 2015. Inhibition of Differentiation and Function of Osteoclasts by Dimethyl Sulfoxide (DMSO). *Cell Tissue Res.* 362, 577–585.
- Young, M.F., 2003. Bone Matrix Proteins: Their Function, Regulation, and Relationship to Osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 14, 35–42.
- Yu, D.-A., Han, J., Kim, B.-S., 2012. Stimulation of Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Stem Cells* 5, 16–22.
- Yu, Z.-W., Quinn, P.J., 1994. Dimethyl Sulphoxide: A Review of Its Applications in Cell Biology. *Biosci. Rep.* 14, 259–281.
- Yu, Z.-W., Quinn, P.J., 1998. The Modulation of Membrane Structure and Stability by Dimethyl Sulphoxide (Review). *Mol. Membr. Biol.* 15, 59–68.
- Zhang, R., Ducy, P., Karsenty, G., 1997. 1,25-dihydroxyvitamin D3 Inhibits Osteocalcin Expression in Mouse through an Indirect Mechanism. *J. Biol. Chem.* 272, 110–116.
- Zhang, S., Xiao, Z., Luo, J., He, N., Mahlios, J., Quarles, L.D., 2009. Dose-dependent Effects of Runx2 on Bone Development. *J. Bone Miner. Res.* 24, 1889–1904.
- Zimmermann, B., Wachtel, C., Noppe, C., 1991. Patterns of Mineralization In Vitro. *Cell Tissue Res.* 263, 483–493.

- Zoetis, T., Tassinari, M.S., Bagi, C., Walthall, K., Hurtt, M.E., 2003. Species Comparison of Postnatal Bone Growth and Development. *Birth Defects Res. Part B* 68, 86–110.
- Zur Nieden, N.I., Baumgartner, L., 2010. Assessing Developmental Osteotoxicity of Chlorides in the Embryonic Stem Cell Test. *Reprod. Toxicol.* 30, 277–283.
- Zur Nieden, N.I., Davis, L.A., Rancourt, D.E., 2010a. Comparing Three Novel Endpoints for Developmental Osteotoxicity in the Embryonic Stem Cell Test. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247, 91–97.
- Zur Nieden, N.I., Davis, L.A., Rancourt, D.E., 2010b. Monolayer Cultivation of Osteoprogenitors Shortens Duration of the Embryonic Stem Cell Test while Reliably Predicting Developmental Osteotoxicity. *Toxicology* 277, 1–27.
- Zur Nieden, N.I., Kempka, G., Ahr, H.J., 2003. In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells into Mineralized Osteoblasts. *Differentiation* 71, 18–27.
- Zur Nieden, N.I., Kempka, G., Ahr, H.J., 2004. Molecular Multiple Endpoint Embryonic Stem Cell Test – A Possible Approach to Test for the Teratogenic Potential of Compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 194, 257–269.

## 10 Publikationsverzeichnis

### Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit

---

Sittner, D., Huhse, B., Steinfath, M., Luch, A., Seiler, A. (2016) Osteogenic differentiation of human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitor cells as a model for assessing developmental bone toxicity *in vitro*. *Applied In Vitro Toxicology*. 2(3), 127–142

Butzke, D., Grune, B., Kugler, J., Oelgeschlaeger, M., Seiler, A.E., Sittner, D., Liebsch, M., and Luch, A. (2013) The Advent of the Golden Era of Animal Alternatives. In: Conn, M.P. (Ed.). *Animal Models for the Study of Human Disease*. Academic Press. Cambridge, Massachusetts. 49–66

### Weitere Publikationen

---

Springer, A., Herrmann, H., Sittner, D., Herbst, U., Schulte, A. (2015) REACH compliance: Data availability of REACH registrations part 1: Screening of chemicals > 1000 tpa. Umweltbundesamt. Dessau. 1–185

Rupprecht, A., Sittner, D., Smorodchenko, A., Hilse, K., Goyn J., Moldzio, R., Seiler, A.E., Braeuer, A., and Pohl, E.E. (2014) Uncoupling protein 2 and 4 expression pattern during stem cell differentiation provides new insight into their putative function. *PLoS One*. 9(2):e88474

Hayess, K., Riebeling, C., Pirow, R., Steinfath, M., Sittner, D., Slawik, B., Luch, A., and Seiler, A.E. (2013). The DNT-EST, a predictive embryonic stem cell-based method for developmental neurotoxicity testing. *Toxicology*. 314(1), 135–47

Visan, A., Hayess, K., Sittner, D., Pohl, E.E., Riebeling, C., Slawik, B., Gulich, K., Oelgeschlaeger, M., Luch, A., and Seiler, A.E. (2012). Neural differentiation of mouse embryonic stem cells as a tool to assess developmental neurotoxicity *in vitro*. *Neurotoxicology*. 33(5), 1135–46

### Vorträge im Rahmen der Doktorarbeit

---

Einsatz von Stammzellen zur Prädiktion von Entwicklungsosteotoxizität *in vitro*. BfR Seminar, Berlin, Deutschland, 05.12.2012

Toward the development of a human cell-based assay to assess developmental bone toxicity. ESTIV2012 – International Conference of the European Society of Toxicology in Vitro 2012, Lissabon, Portugal, 16.10.–19.10.2012

Entwicklung eines stammzellbasierten *in vitro* Tests zur Prüfung auf Entwicklungsosteotoxizität. BfR Seminar, Berlin, Deutschland, 07.12.2011

### Weitere Vorträge

---

Availability of health and environmental data for high tonnage chemicals under REACH: Results from the human health endpoints. BfR workshop "Mind the gap – data availability in REACH registrations", Berlin, Deutschland, 02.03.2015

### Posterbeiträge im Rahmen der Doktorarbeit

---

Sittner, D., Huhse, B., Luch, A., Seiler, A. Human multipotent progenitors – a promising cell model for assessing developmental osteotoxicity *in vitro*. 7th International Meeting of the Stem Cell Network North Rhine Westphalia, Köln, Deutschland, 23.04.–24.04.2013

Sittner, D., Huhse, B., Luch, A., Seiler, A. Human multipotent progenitors – a promising cell model for assessing developmental osteotoxicity *in vitro*. EUSAAT 2012 – the 14th Annual Congress of EUSAAT, LINZ 2012 – the 17th Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz, Österreich, 05.09.–08.09.2012

Sittner, D., Huhse, B., Kretlow, A., Luch, A., Seiler, A. Toxicological endpoints to assess developmental bone toxicity *in vitro*. ESTIV 2010 – the 16th International Congress on *In Vitro* Toxicology, EUSAAT 2010 – the 13th Annual Congress of EUSAAT, LINZ 2010 – the 16th Congress

on Alternatives to Animal Testing, Linz, Österreich, 02.09.–04.09.2010

### Weitere Posterbeiträge

---

Müller, A.-K., Sittner, D., Springer, A., Kaßner, F., Herbst, U., Schulte, A. Data availability of REACH registrations: Adaptations of information requirements for high tonnage chemicals. SETAC Europe 26th Annual Meeting, Nantes, Frankreich, 22.05.–26.05.2016

Müller, A.-K., Sittner, D., Springer, A., Herrmann, H., Herbst, U., Schulte, A. Waiving of information requirements for high tonnage chemicals under REACH. 82st Annual Congress of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology e. V. (DGPT), Berlin, Deutschland, 29.02.–03.03.2016

Springer, A., Sittner, D., Herrmann, H., Herbst, U., Schulte, A. REACH registration dossiers for high tonnage chemicals: A journey to its insides. 81st Annual Congress of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology e. V. (DGPT), Kiel, Deutschland, 10.03.–12.03.2015

Rupprecht, A., Sittner, D., Smorodchenko, A., Hilse, K.E., Moldzio, R., Seiler, A., Braeuer, A.U., Pohl, E.E. The correlation between UCP expression and cellular metabolism. 58th Annual Meeting of the Biophysical-Society, San Francisco, California, 15.02.–19.02.2014

Seiler, A., Gulich, K., Hayess, K., Pirow, R., Riebeling, C., Sittner, D., Slawik, B., Steinfath, M., Visan, A., Luch, A. The DNT-EST: a predictive embryonic stem cell test for developmental neurotoxicity testing *in vitro*. EUSAAT 2012 – the 15th Annual Congress of EUSAAT, LINZ 2012 – the 18th Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz, Österreich, 15.09.–18.09.2013

Rupprecht, A., Sittner, D., Braeuer, A., Smorodchenko, A., Moldzio, R., Seiler, A., Pohl, E.E. Distribution of UCP2 and UCP4 correlates with a certain type of cell metabolism. 9th European Biophysics Congress, Lissabon, Portugal, 13.07.–17.07.2013

Leich, N., Spätlich, S., Sittner, D., Doerendahl, A., Skolik, S., Grune, B., Butzke, D. '3R-good information retrieval practice' module for training of supervisors (FELASA C). EUSAAT 2012 – the 14th Annual Congress of EUSAAT, LINZ 2012 – the 17th Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz, Österreich, 05.09.–08.09.2012

Spätlich, S., Leich, N., Sittner, D., Doerendahl, A., Skolik, S., Grune, B., Butzke, D. Diversification of focus: AnimAlt-ZEBET to retrieve alternatives in basic sciences. EUSAAT 2012 – the 14th Annual Congress of EUSAAT, LINZ 2012 – the 17th Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz, Österreich, 05.09.–08.09.2012

Rupprecht, A., Sittner, D., Goyn, J., Smorodchenko, A., Bräuer, A.U., Seiler, A., Pohl, E.E. UCP2 expression pattern in mouse tissue. 16th European Bioenergetics Conference, Warschau, Polen, 17.07.–22.07.2010

Pommerencke, T., Westphal, K., Ernst, C., Steinberg, T., Tomakidi, P., Sittner, D., Kandarova, H., Pfuhrer S., Hayden, P., Grabe, N. Fluorescence based spatial biomarker profiling of HSP27 for quantification and classification of mild skin irritation. Symposium 20th Anniversary of ZEBET at BfR and 50 Years of the 3Rs Principle, Berlin, Deutschland, 26.10.–27.10.2009

Hayess, K., Slawik, B., Visan, A., Sittner, D., Spielmann, H., Luch, A. and Seiler, A. Mouse embryonic stem cells in reproductive toxicology: Establishment of a predictive *in vitro* test module for developmental neurotoxicity testing. VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rom, Italien, 31.08.–03.09.2009

Visan, A., Hayess, K., Slawik, B., Sittner, D., Pohl, E., Spielmann, H., Luch, A. and Seiler, A. Towards the differentiation of mouse embryonic stem cells into functional neurons for developmental neurotoxicity testing *in vitro*. VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rom, Italien, 31.08.–03.09.2009

Smorodchenko, A., Sittner, D., Rupprecht, A., Goyn, J., Seiler, A., Bräuer, A.U., Pohl, E.E. Expression of uncoupling proteins (UCPs) during neuronal differentiation and brain development. European Biophysics Congress, Genua, Italien, 11.07.–15.07.2009

Seiler, A., Hayess, K., Visan, A., Sittner, D., Slawik, B., Spielmann, H., and Luch, A. Murine embryonic

stem cells as a model for *in vitro* developmental neurotoxicity. Meeting TestSmart DNT2, Reston, U.S.A., 11.11.–14.11.2008

Hayess, K., Sittner, D., Slawik, B., Visan, A., Spielmann, H., Luch, A., and Seiler, A. Development of a predictive *in vitro* test module for developmental neurotoxicity testing using mouse embryonic stem cells. 15th Congress on Alternatives to Animal Testing, zet, Linz, Österreich, 19.09.–21.09.2008

### 11 Danksagung

Prof. Dr. Dr. Andreas Luch danke ich für die Möglichkeit, dass ich diese Arbeit am BfR in der Fachgruppe ZEBET anfertigen konnte und für die Unterstützung während der Zeit der experimentellen Arbeiten.

Dr. Andrea Seiler danke ich sehr für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, die stetige Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge und Diskussionen.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Günther Weindl für die freundliche Übernahme der Erstbegutachtung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Horst Spielmann möchte ich mich für die Übernahme der Zweitbegutachtung und die nützlichen Hinweise zur Anfertigung der Dissertationsschrift herzlich bedanken.

Für die Förderung im Rahmen eines Promotionsstipendiums möchte ich mich zudem sehr bei der Sonnenfeld Stiftung bedanken. Dem ehemaligen Vorstandsvorsitzenden Prof. Dr. Dr. Hansjürgen Frhr. von Villiez bin ich insbesondere dankbar für seinen Zuspruch und seine interessierte Unterstützung.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Bettina Huhse, die meine tägliche wissenschaftliche Arbeit begleitet hat, und an Dr. Christian Riebeling. Eure unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, die vielen Ratschläge und Anregungen und die optimale Symbiose aus Motivation und Kritik sowie Temperament und Besonnenheit waren sehr wertvoll und unerlässlich für alle Etappen dieser Arbeit.

Sehr herzlich danken möchte ich zudem allen weiteren (ehemaligen) Mitarbeitern bei ZEBET für ihre Hilfe und Unterstützung und eine besondere Arbeitsatmosphäre. Besonders Dr. Katrin Hayess und Dr. Michael Oelgeschläger danke ich sehr dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für Fragen und Diskussionen hatten. Bei Dr. Matthias Steinfath möchte ich mich für die biostatistische Auswertung der Substanzdaten bedanken. Konrad Gulich danke ich dafür, dass er immer mit Rat und Tat zur Stelle war bei allen Belangen rund ums Labor. Josephine Kugler verdient einen großen Dank für ihre Unterstützung bei der Durchführung des PCR Arrays, den Ideenaustausch und ihre liebenswerte Art zu motivieren.

Für das Korrekturlesen der Arbeit möchte ich mich sehr bei Dr. Andrea Seiler, Dr. Bettina Huhse, Dr. Anke Visan und Josephine Kugler bedanken.

## Danksagung

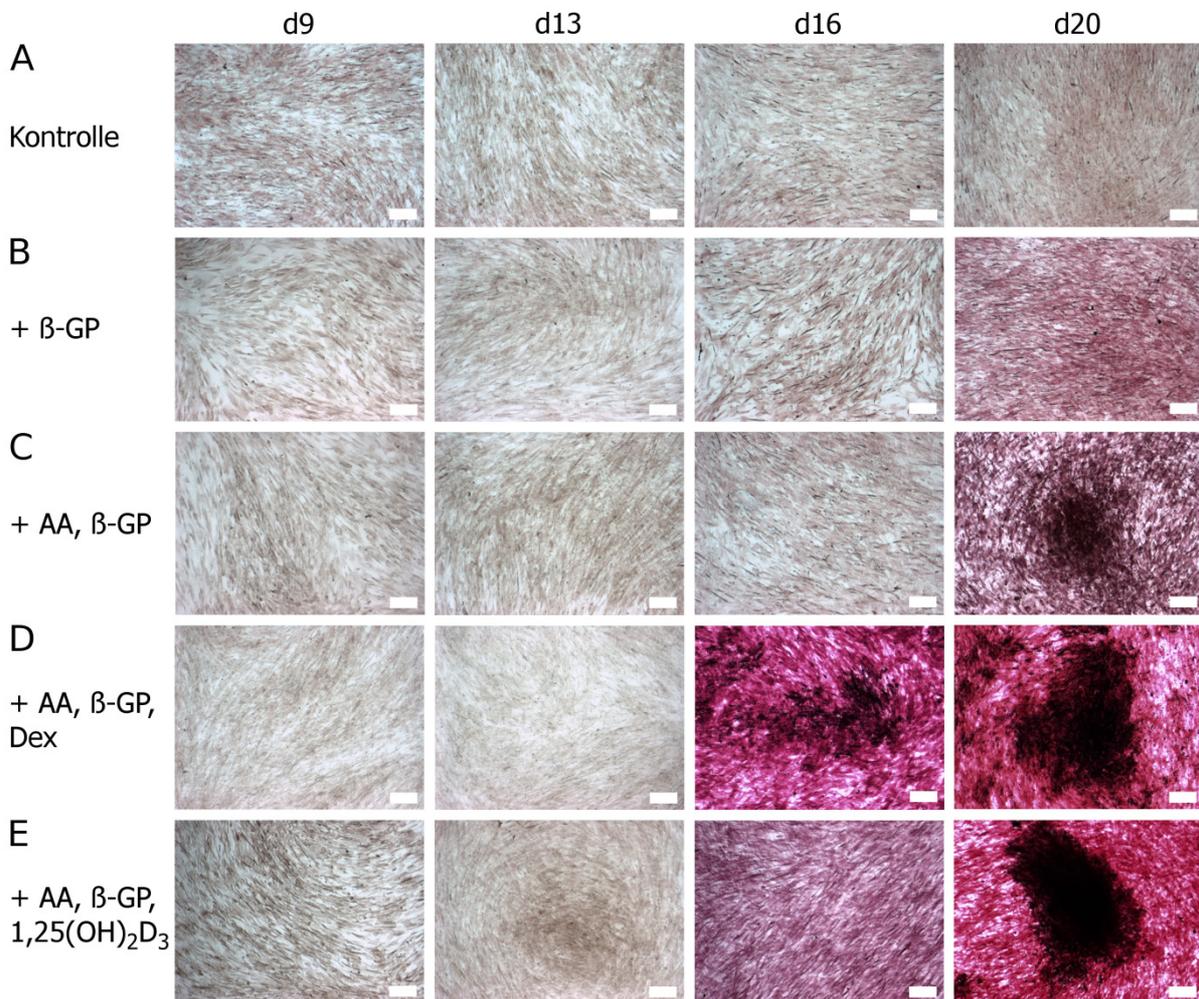
---

Dem „harten Kern“ des Doktorandenstammtischs danke ich zudem für abwechslungsreiche Abende und den amüsanten Frustrationsaustausch.

Meinen Freunden gebührt ein herzlicher Dank für die aufmunternden Worte, die Motivation und die willkommene Abwechslung zwischendurch.

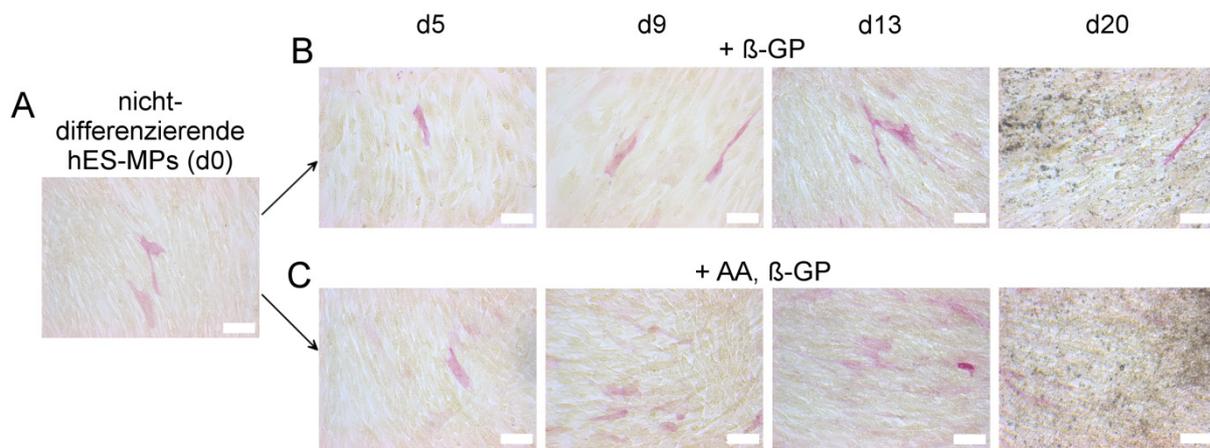
Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie und Wieland, die mich in allen Dingen unterstützen und mir den nötigen Rückhalt geben.

## 12 Anhang



**Abb. A1: Alizarin Rot S Färbung der Differenzierung von hES-MPs unter Zugabe verschiedener Induktorkombinationen.**

Die Zellen wurden (A) ohne Supplemente (Kontrolle), (B) mit  $\beta$ -GP, (C) mit AA und  $\beta$ -GP, (D) mit AA,  $\beta$ -GP und Dex oder (E) mit AA,  $\beta$ -GP und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  differenziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert und es erfolgte ein Nachweis der Mineralisierung mit der Alizarin Rot S Färbung. Maßstabsbalken entsprechen 200  $\mu\text{m}$ .



**Abb. A2: Enzymaktivität von AP in hES-MPs induziert mit  $\beta$ -GP oder AA und  $\beta$ -GP.**

Nicht-differenzierende (A) sowie differenzierende Zellen mit Zugabe von  $\beta$ -GP (B) oder AA,  $\beta$ -GP (C) wurden in 24-Well Platten kultiviert, mit Citrat/Aceton/Formaldehyd fixiert und mit einem Naphthol AS-BI/Fast Red Violet LB-basierten Alkaline Phosphatase Kit (Sigma) gefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu$ m.

**Tab. A1: Expressionsdaten aller mittels PCR Array untersuchten Gene in differenzierenden hES-MPs.**

Es sind die  $C_T$ -Werte sowie der *fold change* im Vergleich zu nicht-differenzierenden hES-MPs (d0) für die einzelnen Analysezeitpunkte der Expositionen gegenüber NaVPA und PBS (Kontrolle) gezeigt.

Gen-symbol	$C_T$ -Wert	Kontrolle d7		Kontrolle d15		Kontrolle d23		NaVPA d7		NaVPA d15		NaVPA d23	
	d0	$C_T$ -Wert	<i>fold change</i>	$C_T$ -Wert	<i>fold change</i>	$C_T$ -Wert	<i>fold change</i>	$C_T$ -Wert	<i>fold change</i>	$C_T$ -Wert	<i>fold change</i>	$C_T$ -Wert	<i>fold change</i>
ACVR1	22,64	23,18	1,06	22,85	1,20	22,84	1,49	23,02	1,24	22,63	1,49	22,55	1,67
AHSG*	34,63	34,9	1,29	34,87	1,18	35	1,33	34,49	1,79	35	1,15	33,86	2,70
ALPL	27,81	26,23	4,63	24,55	13,37	23,95	24,89	25,7	7,02	24,43	15,43	23,89	23,93
ANXA5	17,37	17,46	1,46	17,14	1,64	17,34	1,76	17,45	1,54	16,92	2,02	17,16	1,83
BGLAP (OC)	26,12	26,38	1,29	26,21	1,31	26,37	1,44	26,88	0,95	26,39	1,23	26,39	1,31
BGN	21,25	21,37	1,43	21,45	1,22	21,69	1,27	21,81	1,10	22,45	0,65	22,71	0,57
BMP1	23,3	22,78	2,22	22,64	2,20	22,56	2,87	23,19	1,75	23,16	1,63	22,92	2,06
BMP2	30,22	31,45	0,66	31,53	0,56	31,64	0,64	30,99	0,95	30,19	1,51	30,38	1,41
BMP3	28,92	30,22	0,63	30,68	0,41	31,18	0,36	30,41	0,57	29,68	0,87	30,67	0,47
BMP4	33,65	32,49	3,45	31,59	5,81	30,61	14,10	34,72	0,77	31,97	4,73	31,14	8,99
BMP5	31,2	31,18	1,58	35	0,10	35	0,12	31,32	1,49	35	0,11	35	0,11
BMP6	28,79	32,78	0,10	32,57	0,10	33,43	0,07	33,87	0,05	32,94	0,08	34,42	0,03
BMP7*	35	35	1,55	35	1,39	35	1,71	35	1,62	35	1,48	35	1,58
BMPR1A	22,46	22,81	1,21	22,74	1,15	22,67	1,49	22,93	1,17	22,52	1,42	22,45	1,59
BMPR1B	25,72	25,94	1,33	25,26	1,92	24,99	2,85	26,02	1,31	25,52	1,69	25,69	1,61
BMPR2	21,22	22,18	0,79	22,17	0,72	21,96	1,03	22,02	0,93	21,77	1,01	21,69	1,14
CALCR	35	32,8	7,09	29,52	62,02	28,21	190,21	33,13	5,91	30,68	29,65	30,72	30,64
CD36	28,47	29,15	0,97	27,94	2,02	28,46	1,72	28,84	1,25	27,41	3,08	26,89	4,71
CDH11	21,39	21,62	1,32	21,45	1,34	21,32	1,80	21,71	1,30	22,17	0,86	21,82	1,17
CHRD*	35	35	1,55	35	1,39	34,37	2,66	35	1,62	35	1,48	35	1,58
COL10A1	27,43	30,81	0,15	29,94	0,24	29,54	0,40	30,77	0,16	30,89	0,13	30,98	0,13

## Anhang

Gen-symbol	Kontrolle d7			Kontrolle d15			Kontrolle d23			NaVPA d7		NaVPA d15		NaVPA d23	
	C <sub>T</sub> -Wert d0	C <sub>T</sub> -Wert	fold change	C <sub>T</sub> -Wert	fold change	C <sub>T</sub> -Wert	fold change	C <sub>T</sub> -Wert	fold change	C <sub>T</sub> -Wert	fold change	C <sub>T</sub> -Wert	fold change	C <sub>T</sub> -Wert	fold change
COL14A1	30,74	28,64	6,67	26,26	31,09	25,88	49,68	29,49	3,86	28,41	7,47	27,97	10,79		
COL15A1	29,81	29,75	1,61	25,71	23,93	23,86	105,88	30,02	1,40	26,92	10,96	25,55	30,24		
COL1A1	19,24	16,66	9,29	15,89	14,18	15,95	16,76	17,16	6,82	17,24	5,92	17,49	5,31		
COL1A2	16,58	15,35	3,65	15,61	2,74	15,9	2,75	15,6	3,21	16,22	1,91	16,58	1,58		
COL2A1*	34,9	32,72	6,99	35	1,30	33,14	5,81	35	1,51	35	1,38	35	1,47		
COL3A1	19,15	17,2	5,98	16,63	7,99	16,49	10,80	17,41	5,41	17,16	5,90	17,36	5,47		
COL5A1	22,58	21,62	3,03	21,46	3,04	21,33	4,07	21,81	2,76	21,85	2,46	21,95	2,45		
COMP	33,75	32,9	2,78	30,85	10,40	28,69	57,15	35	0,68	34,79	0,72	33,67	1,66		
CSF1	24,52	25,15	1,00	24,39	1,53	24,22	2,12	25,52	0,81	24,58	1,43	23,8	2,61		
CSF2	27,76	31,46	0,12	32,68	0,05	33,18	0,04	30,7	0,21	31,18	0,14	32,24	0,07		
CSF3	29,82	35	0,04	34,17	0,07	33,25	0,16	31,88	0,39	31,33	0,52	30,36	1,09		
CTSK	23,39	24,49	0,72	21,64	4,68	20,65	11,40	24,7	0,65	22,61	2,55	21,57	5,58		
DLX5	34,92	35	1,47	35	1,32	35	1,63	35	1,54	35	1,40	35	1,50		
EGF	28,52	27,12	4,11	26,54	5,51	27,27	4,09	26,77	5,46	26,19	7,44	26,92	4,79		
EGFR	22,33	24,33	0,39	24,25	0,37	24,4	0,41	24,4	0,39	24,16	0,41	23,81	0,56		
FGF1	22,62	23,64	0,76	24,36	0,42	25,21	0,28	23,43	0,92	23,52	0,79	23,88	0,66		
FGF2	21,28	21,38	1,45	21,48	1,22	21,79	1,21	21,26	1,64	20,62	2,35	20,7	2,36		
FGFR1	22,96	23,95	0,78	23,28	1,12	22,68	2,09	24,14	0,71	23,5	1,02	22,96	1,58		
FGFR2	35	34,46	2,25	33,73	3,37	32,91	7,30	35	1,62	35	1,48	33,87	3,46		
FLT1	24,16	23,71	2,11	23,47	2,25	23,59	2,55	23,36	2,83	22,78	3,86	22,52	4,94		
FN1	15,44	14,23	3,59	14,52	2,63	14,55	3,17	14,28	3,61	14,54	2,75	14,63	2,75		
GDF10	34,48	34,22	1,86	32,21	6,76	34,73	1,44	35	1,13	34,42	1,55	35	1,10		
GLI1	29,71	31,37	0,49	30,74	0,68	30,84	0,78	30,68	0,83	31,47	0,44	30,73	0,78		
ICAM1	22,2	21,72	2,15	20,78	3,72	20,65	5,00	21,42	2,79	20,5	4,80	20,15	6,51		
IGF1	35	34,82	1,76	33,88	3,02	31,31	22,08	35	1,62	35	1,48	34,49	2,25		
IGF1R	23,28	24,18	0,83	23,91	0,90	23,63	1,34	24,24	0,83	24,14	0,81	23,67	1,20		
IGF2	26,72	27,88	0,70	28,08	0,54	27,61	0,92	28,22	0,57	29,51	0,21	29,37	0,25		
IHH*	35	35	1,55	35	1,39	35	1,71	35	1,62	35	1,48	35	1,58		
ITGA1	23,67	20,68	12,24	20,64	11,31	20,53	15,04	20,66	13,00	20,66	11,89	20,52	13,92		
ITGA2	19,97	22,71	0,23	23,6	0,11	23,71	0,13	22,68	0,25	22,76	0,21	22,54	0,27		
ITGA3	21,67	22,28	1,01	21,87	1,21	21,62	1,78	22,14	1,17	21,46	1,71	21,16	2,25		
ITGAM	33,91	34,68	0,91	34,83	0,74	34,51	1,13	34,38	1,17	34,66	0,88	34,27	1,23		
ITGB1	15,82	16,13	1,25	15,97	1,26	15,93	1,59	16,01	1,42	15,79	1,52	15,87	1,53		
MMP10	29,74	30,27	1,07	30,96	0,60	30,68	0,90	30,77	0,79	29,71	1,52	29,56	1,80		
MMP2	20,33	20,45	1,42	19,54	2,41	18,97	4,40	20,67	1,27	19,76	2,19	19,42	2,95		
MMP8	32,37	32,59	1,32	31,23	3,06	31,72	2,68	31,01	4,15	30,77	4,50	31,51	2,87		
MMP9	30,88	31,31	1,15	33,79	0,19	35	0,10	30,71	1,83	33,61	0,22	33,38	0,28		
NFKB1	24,17	25,31	0,70	25,34	0,62	25,38	0,74	25,31	0,73	25,43	0,62	25,35	0,70		
NOG	23,95	27,35	0,15	26,87	0,18	26,81	0,24	27,71	0,12	27,84	0,10	27,43	0,14		
PDGFA	25,53	23,67	5,62	22,93	8,47	22,9	10,68	24,17	4,16	23,14	7,76	22,94	9,55		
PHEX	27,79	28,12	1,23	27,44	1,77	27,89	1,60	27,95	1,45	27	2,57	27,29	2,23		
RUNX2	24,46	24,67	1,34	25,22	0,82	25,22	1,02	24,71	1,36	24,93	1,07	24,88	1,18		
SERPINH1	18,23	17,51	2,54	17,32	2,61	17,44	2,96	17,66	2,40	17,61	2,27	18,02	1,82		
SMAD1	22,53	24,2	0,49	24,34	0,40	24,51	0,44	24,33	0,47	24,28	0,44	24,4	0,43		
SMAD2	21,24	21,55	1,26	21,23	1,40	21,33	1,61	21,56	1,30	21,18	1,55	21,33	1,49		
SMAD3	25,59	28,54	0,20	29,27	0,11	28,93	0,17	29,31	0,12	29,55	0,10	29,55	0,10		

## Anhang

Gen-symbol	C <sub>T</sub> -Wert d0	Kontrolle d7		Kontrolle d15		Kontrolle d23		NaVPA d7		NaVPA d15		NaVPA d23	
		C <sub>T</sub> -Wert	fold change										
SMAD4	21,72	22,53	0,88	22,53	0,79	22,63	0,91	22,69	0,83	22,57	0,82	22,42	0,97
SMAD5	21,55	22,67	0,71	22,88	0,55	22,89	0,67	22,76	0,70	22,85	0,60	22,63	0,74
SOX9	23,19	26,57	0,15	25,96	0,20	25,83	0,27	26,64	0,15	26,37	0,16	26,12	0,21
SP7	30,11	30,25	1,41	30,14	1,37	29,99	1,85	29,85	1,93	29,63	2,07	30,15	1,53
SPP1	23,37	24,8	0,58	24,51	0,64	25,32	0,45	24,5	0,74	23,44	1,42	23,88	1,11
TGFB1	22,01	23,34	0,62	22,9	0,75	23,01	0,86	23,7	0,50	23,51	0,52	23,57	0,54
TGFB2	21,19	19,5	5,00	19,67	4,00	19,72	4,76	18,94	7,68	18,56	9,20	18,53	9,97
TGFB3	27,28	27,15	1,70	27,3	1,38	27,47	1,50	27,97	1,00	27,74	1,08	27,64	1,24
TGFBR1	22,93	22,71	1,81	22,38	2,04	22,21	2,82	22,82	1,75	22	2,83	21,66	3,82
TGFBR2	20,97	22,25	0,64	22,25	0,57	21,94	0,87	22	0,79	21,52	1,01	21,4	1,17
TNF	32,56	35	0,29	35	0,26	35	0,32	35	0,30	35	0,27	35	0,29
TNFSF11	34,89	34,28	2,37	34,13	2,35	34,84	1,77	34,17	2,67	33,6	3,62	34,22	2,51
TWIST1	22,96	23,57	1,01	23,65	0,86	23,79	0,96	23,89	0,85	24,2	0,63	23,94	0,80
VCAM1	26,47	27,69	0,66	27,4	0,73	27,72	0,72	27,7	0,69	27,49	0,73	26,39	1,66
VDR	27,46	26,84	2,38	25,71	4,68	25,54	6,49	27,25	1,87	25,85	4,50	25,77	5,07
VEGFA	20,84	22,64	0,45	21,76	0,74	22,16	0,69	22,81	0,41	21,66	0,84	21,75	0,84
VEGFB	21,34	21,64	1,26	20,4	2,66	20,2	3,77	21,6	1,35	20,67	2,36	19,81	4,55
ACTB	14,76	15,52	0,91	15,95	0,61	16,44	0,53	15,7	0,84	16,17	0,56	16,53	0,46
B2M	18,18	17,51	2,47	16,48	4,52	16,62	5,05	17,37	2,83	16,39	5,12	15,89	7,71
GAPDH	15,4	16,34	0,81	16,24	0,78	16,7	0,70	16,67	0,67	16,61	0,64	17,15	0,47
HPRT1	22,3	23,65	0,61	23,58	0,57	23,84	0,59	23,62	0,65	23,36	0,71	23,37	0,75
RPLP0	14,9	15,68	0,90	15,68	0,81	15,82	0,91	15,65	0,96	15,83	0,77	15,9	0,79

\* Daten wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da Dissoziationskurven in mehreren Proben Doppelpeaks aufwiesen. Dies korrelierte in allen Fällen mit hohen C<sub>T</sub>-Werten (sehr niedriger bis kein Nachweis der mRNA).