

**Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin**  
Campus Benjamin Franklin  
aus dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Stahlmann

**Einfluss embryotoxischer Substanzen auf die Expression  
differenzierungsspezifischer Gene in murinen  
embryonalen Stammzellen**

**Etablierung molekularer Marker im Rahmen der  
Weiterentwicklung eines *In-vitro*-Embryotoxizitätstests**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doctor rerum medicarum  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Johanna Kaltenhäuser  
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. G. Schönfelder

Korreferent: Priv.Doiz. Dr. rer. nat. Th. Schulz

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Datum der Promotion: 15.12.2006

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis .....	III
2	Abkürzungsverzeichnis .....	VII
3	Einleitung .....	1
3.1	Entwicklung der Reproduktionstoxikologie.....	1
3.2	Verfahren reprotoxikologischer Prüfungen in der Arzneimittelzulassung .....	2
3.3	Anwendungsbereiche von <i>In-vitro</i> -Tests .....	3
3.3.1	<i>In-vitro</i> -Testsysteme für die Embryotoxizitätsprüfung.....	4
3.3.2	Beschränkungen und Möglichkeiten von <i>In-vitro</i> -Embryotoxizitätstests.....	6
3.4	ES-Zellen als Modell der Embryonalentwicklung.....	7
3.5	Verwendung der Kardiomyozytendifferenzierung im EST .....	9
3.6	Entwicklung des Herzens .....	10
3.7	Auswahl potentieller Markergene .....	12
3.7.1	Komponenten des kontraktiven Apparates .....	13
3.7.1.1	Kardiales $\alpha$ -Actin .....	13
3.7.1.2	Myosin heavy chain (MHC)-Gene.....	13
3.7.1.3	Myosin light chain (MLC)-Gene.....	13
3.7.1.4	$\alpha$ -Actinin .....	13
3.7.1.5	Kardiales Troponin T .....	13
3.7.2	Entwicklungsspezifische Transkriptionsfaktoren .....	14
3.7.2.1	Tbx5 .....	14
3.7.2.2	GATA-4 .....	14
3.7.2.3	Myocardin .....	14
3.7.2.4	Mesoderm Posterior (MesP) 1 und 2.....	15
3.7.2.5	Hand1 und 2 .....	15
3.7.3	Wachstumsfaktoren und Cytokine .....	15
3.7.3.1	cripto-1 .....	15
3.7.3.2	Cardiotrophin-1 .....	15
3.7.4	Nicht-herzspezifische Gene.....	16
3.7.4.1	Oct4 .....	16
3.7.4.2	Neurofilament L (NF-L).....	16
3.8	Embryonalentwicklung und Embryotoxizität .....	16
3.9	Substanzauswahl .....	18
3.9.1	<i>In vivo</i> stark embryotoxische Substanzen .....	19
3.9.1.1	5-Fluorouracil (5-FU).....	19
3.9.1.2	All- <i>trans</i> -Retinsäure (RA; Tretinoin).....	20
3.9.1.3	Cytosinarabiosid (AraC; Cytarabin).....	20
3.9.1.4	6-Aminonikotinamid (6-AN) .....	20
3.9.2	<i>In vivo</i> schwach embryotoxische Substanzen .....	21
3.9.2.1	Diphenylhydantoin (DPH; Phenytoin).....	21
3.9.2.2	Lithiumchlorid (LiCl).....	21
3.9.2.3	Valproinsäure (VPA).....	21
3.9.2.4	Dexamethason (Dex).....	22
3.9.3	<i>In vivo</i> nicht embryotoxische Substanzen .....	22
3.9.3.1	Campher (Cam).....	22
3.9.3.2	Saccharin (Sac).....	22
3.9.3.3	Penicillin G (PenG) .....	22

3.9.4	<i>In vivo</i> nicht klassifizierte Substanzen .....	23
3.9.4.1	Y27632 .....	23
3.9.4.2	Staurosporin (STS) .....	23
3.10	Ziele der Arbeit .....	24
4	Material und Methoden .....	26
4.1	Material .....	26
4.1.1	Zelllinien .....	26
4.1.2	Zellkulturmaterialien .....	26
4.1.3	Zellkulturmedien und -zusätze .....	27
4.1.3.1	Zusätze .....	27
4.1.3.2	Kulturmedien .....	27
4.1.3.3	Einfriermedien .....	28
4.1.4	Verbrauchsmaterial .....	28
4.1.5	Feinchemikalien .....	28
4.1.6	Antikörper .....	29
4.1.7	Lösungen, Ansätze, Puffer .....	29
4.1.8	RNA-Isolierung .....	29
4.1.9	cDNA-Synthese .....	29
4.1.10	Primer und Sonden für die TaqMan-PCR .....	30
4.1.11	TaqMan-PCR .....	30
4.2	Methoden .....	31
4.2.1	Zellkulturmethoden .....	31
4.2.1.1	Auftauen von Zellen .....	31
4.2.1.2	Passagieren der 3T3-Zellen .....	31
4.2.1.3	Passagieren der D3-Zellen .....	31
4.2.1.4	Einfrieren von Zellen .....	32
4.2.1.5	Bestimmung der Zellzahl .....	32
4.2.2	Differenzierungsassay der D3-Zellen im Embryonalen Stammzelltest .....	32
4.2.2.1	Assaycheck .....	34
4.2.2.2	Expressionsprofile .....	34
4.2.2.3	Substanztestungen .....	35
4.2.2.3.1	Durchführung der Zytotoxizitätstests .....	36
4.2.2.3.2	Auswertung des Zytotoxizitätsassays der D3- und 3T3-Zellen .....	37
4.2.3	Molekularbiologische Arbeiten .....	38
4.2.3.1	Lyse der Proben .....	38
4.2.3.2	RNA-Isolierung .....	38
4.2.3.3	Überprüfung der RNA-Qualität mittels Gelelektrophorese .....	38
4.2.3.4	cDNA-Synthese .....	38
4.2.3.5	Immunfluoreszenzfärbung .....	39
4.2.3.6	Durchflusszytometrie .....	39
4.2.3.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	40
4.2.3.8	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) .....	40
4.2.3.8.1	Referenzgene .....	41
4.2.3.8.2	Auswahl von Primern und Sonden der Zielgene .....	42
4.2.3.8.3	Primer- und Sonden-Optimierung .....	42
4.2.3.8.4	Erstellung der Genexpressionsprofile .....	43
4.2.3.8.5	Erstellung der Konzentrationswirkungskurven .....	43
4.2.4	Bestimmung des embryotoxischen Potentials mittels Prädiktionsmodell .....	44
4.2.5	Biostatistik .....	45

5	Ergebnisse.....	47
5.1	<i>In-vitro</i> -Kultivierung und Differenzierung von D3-Zellen.....	47
5.1.1	Kontrolle der Differenzierungsfähigkeit.....	48
5.1.2	Nachweis des differenzierungsspezifischen Markers TROMA-1.....	48
5.1.2.1	TROMA-1-Expression in der Immunfluoreszenz.....	49
5.1.2.2	Analyse der TROMA-1-Expression mittels Durchflusszytometrie.....	50
5.2	Untersuchungen zur Expression ausgewählter Entwicklungsgene während der ES-Zelldifferenzierung.....	53
5.2.1	Expression von Komponenten des kontraktiles Apparates.....	53
5.2.1.1	Kardiales $\alpha$ -Actin.....	53
5.2.1.2	Myosin heavy chain (MHC)-Gene.....	53
5.2.1.3	Myosin light chain (MLC)-Gene.....	56
5.2.1.4	$\alpha$ -Actinin.....	56
5.2.1.5	Kardiales Troponin T.....	56
5.2.1.6	Zusammenfassende Betrachtung.....	57
5.2.2	Expression entwicklungspezifischer Transkriptionsfaktoren.....	59
5.2.2.1	Tbx5.....	59
5.2.2.2	GATA-4.....	59
5.2.2.3	Myocardin.....	59
5.2.2.4	Mesoderm Posterior (MesP)1 und 2.....	62
5.2.2.5	Hand1 und 2.....	62
5.2.3	Expression der ausgewählten Wachstumsfaktoren und Cytokine.....	65
5.2.3.1	cripto-1.....	65
5.2.3.2	Cardiotrophin-1.....	66
5.2.4	Messung nicht-herzspezifischer Gene.....	67
5.2.4.1	Oct4.....	67
5.2.4.2	Neurofilament L (NF-L).....	68
5.2.5	Verwendung der Referenzgene.....	69
5.2.5.1	GAPDH.....	69
5.2.5.2	18S rRNA.....	69
5.3	Einfluss von Substanzen auf Kardiomyozytendifferenzierung und Expression ausgewählter Gene.....	71
5.3.1	Verwendung potentieller Markergene anhand der Expressionsprofile.....	71
5.3.2	Durchführung der Substanztestungen.....	71
5.3.3	Testung stark embryotoxischer Substanzen.....	72
5.3.3.1	5-Fluorouracil (5-FU).....	72
5.3.3.2	All- <i>trans</i> -Retinsäure (Tretinoin) (RA).....	73
5.3.3.3	Cytosinarabinosid (AraC; Cytarabin).....	75
5.3.3.4	6-Aminonikotinamid (6-AN).....	75
5.3.4	Testung schwach embryotoxischer Substanzen.....	77
5.3.4.1	Diphenylhydantoin (DPH; Phenytoin).....	77
5.3.4.2	Lithiumchlorid (LiCl).....	77
5.3.4.3	Valproinsäure (VPA).....	79
5.3.4.4	Dexamethason (Dex).....	79
5.3.5	Testung nicht embryotoxischer Substanzen.....	81
5.3.5.1	Campher (Cam).....	81
5.3.5.2	Saccharin (Sac).....	81
5.3.5.3	Penicillin G (PenG).....	83
5.3.6	Testung der nicht klassifizierten Substanzen.....	85
5.3.6.1	Y27632.....	85

5.3.6.2	Staurosporin (STS).....	85
5.3.7	Zusammenfassung der resultierenden ID <sub>50</sub> - und IC <sub>50 Exp</sub> -Werte .....	87
5.3.8	Klassifizierung des embryotoxischen Potentials der untersuchten Substanzen ...	88
6	Diskussion .....	93
6.1	<i>In-vitro</i> -Kultivierung und Differenzierung von D3-Zellen.....	93
6.2	Genexpressionsprofile ausgewählter Gene der Herzmuskeldifferenzierung .....	94
6.2.1	Verwendung der GAPDH-Expression als interne Referenz .....	94
6.2.2	Erstellung von Expressionsprofilen .....	96
6.2.3	Expressionsprofile der ausgewählten Gene.....	97
6.2.3.1	Komponenten des kontraktile Apparats .....	97
6.2.3.2	Entwicklungsspezifische Transkriptionsfaktoren .....	98
6.2.3.3	Wachstumsfaktoren und Cytokine .....	101
6.2.3.4	Messung der nicht-herzspezifischen Gene .....	102
6.2.4	Abschließende Diskussion der Expressionsprofile .....	104
6.3	Untersuchungen mit Referenzsubstanzen .....	104
6.3.1	Auswahl potentieller Markergene anhand der Expressionsprofile .....	104
6.3.2	Untersuchungen der ausgewählten Substanzen.....	105
6.3.2.1	<i>In vivo</i> stark embryotoxische Substanzen .....	106
6.3.2.1.1	5-Fluorouracil (5-FU).....	106
6.3.2.1.2	All-trans-Retinsäure (RA).....	107
6.3.2.1.3	Cytosinarabinosid (AraC) .....	108
6.3.2.1.4	6-Aminonikotinamid (6-AN) .....	109
6.3.2.2	<i>In vivo</i> schwach embryotoxische Substanzen .....	109
6.3.2.2.1	Diphenylhydantoin (DPH) .....	109
6.3.2.2.2	Lithiumchlorid (LiCl).....	109
6.3.2.2.3	Valproinsäure (VPA).....	110
6.3.2.2.4	Dexamethason (Dex).....	111
6.3.2.3	<i>In vivo</i> nicht embryotoxische Substanzen .....	111
6.3.2.3.1	Campher (Cam).....	111
6.3.2.3.2	Saccharin (SAC).....	111
6.3.2.3.3	Penicillin G (PenG) .....	112
6.3.2.4	Substanzen mit <i>in vivo</i> ungeklärtem embryotoxischen Potential.....	112
6.3.2.4.1	Y27632 .....	112
6.3.2.4.2	Staurosporin (STS).....	113
6.3.3	Klassifizierung des embryotoxischen Potentials der untersuchten Substanzen ..	114
6.3.4	Abschließende Diskussion der Substanztests.....	115
6.4	Ausblick .....	116
7	Zusammenfassung .....	118
8	Summary.....	120
9	Literaturverzeichnis .....	122
	Danksagung.....	133
	Lebenslauf.....	134
	Erklärung.....	135

## 2 Abkürzungsverzeichnis

$\mu$	Mikro, $10^{-6}$
<b>5-FU</b>	5-Fluorouracil
<b>6-AN</b>	6-Aminonikotinamid
<b>A/D-Ratio</b>	Verhältnis der maternalen zur embryonalen Toxizität einer Substanz ( <i>Adult/developmental toxicity ratio</i> )
<b>AraC</b>	Cytosinarabinosid
<b>ATCC</b>	<i>American-Type Culture Collection</i>
<b>BfR</b>	Bundesinstitut für Risikobewertung
<b>BgVV</b>	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (seit 2002 BfR)
<b>bHLH</b>	<i>basic Helix-Loop-Helix</i> ; Proteinmotiv, das nach Dimerisierung zur DNA- Bindung dient
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>Cam</b>	D-(+)-Campher
<b>cDNA</b>	DNA, die mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus Gesamt- oder mRNA hergestellt wird und dieser komplementär ist ( <i>complementary DNA</i> )
<b>C<sub>T</sub></b>	PCR-Zyklus, bei dem der Fluoreszenzschwellenwert erreicht wird ( <i>Cycle of Threshold</i> )
<b>D</b>	Dalton
<b>Dex</b>	Dexamethason
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTP</b>	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
<b>DPH</b>	Diphenylhydantoin
<b>E</b>	<i>Embryonic day</i> ; Tag der Embryonalentwicklung
<b>EB</b>	<i>Embryoid Body</i>
<b>ECVAM</b>	<i>European Center for the Validation of Alternative Methods</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EG</b>	Europäische Gemeinschaft
<b>ES-Zellen</b>	Embryonale Stammzellen
<b>FAM</b>	5'-Carboxyfluorescein
<b>FCS</b>	fetales Kälberserum ( <i>Fetal calf serum</i> )
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FVS</b>	Fetales Valproinsäure-Syndrom
<b>g</b>	Gramm
<b>*g</b>	Vielfaches der Erdbeschleunigung (entspr. $9,81\text{m/s}^2$ )
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GATA</b>	DNA-Konsensussequenz, die von Mitglieder der gleichnamigen Proteinfamilie erkannt wird
<b>Hand</b>	<i>Heart and neural crest derivative</i>
<b>HDAC</b>	Histondeacetylase
<b>IC<sub>50</sub></b>	Halbhemmkonzentration ( <i>Inhibition concentration</i> )
<b>IC<sub>50 Exp</sub></b>	Halbhemmkonzentration der Genexpression
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
<b>ICM</b>	Innere Zellmasse ( <i>Inner cell mass</i> )

ID <sub>50</sub>	Halbhemmkonzentration der Differenzierung ( <i>Inhibition of Differentiation</i> )
Ig	Immunglobulin
iPM	Mathematisches Prädiktionsmodell zur Klassifizierung von Substanzen mit dem EST ( <i>improved Prediction Model</i> ). Darin werden die Kategorien nicht, schwach und stark embryotoxisch verwendet.
LiCl	Lithiumchlorid
LIF	<i>Leukaemia inhibitory factor</i>
LOAEL	niedrigste Dosis mit erkennbarer schädlicher Wirkung ( <i>Lowest observed adverse effect level</i> )
MesP	<i>Mesoderm Posterior</i>
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
MLC	<i>Myosin light chain</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NAA	Nichtessentielle Aminosäuren ( <i>Nonessential Amino Acids</i> )
NF-L	<i>Neurofilament light</i>
nt	Nukleotide
NTD	<i>Neural tube defect</i> ; Neurahlrohrdefekt
Oct	<i>Octamer binding protein</i>
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung ( <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PDAR	<i>Predeveloped TaqMan<sup>®</sup> Assay Reagents</i>
PFA	Paraformaldehyd
RA	All- <i>trans</i> -Retinsäure ( <i>Retinoic acid</i> )
RNA	Ribonucleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
Sac	Saccharin
SRF	<i>Serum response factor</i>
SSEA	<i>Stage specific embryonic antigen</i>
STS	Staurosporin
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Tbx	<i>T-Box transcription factor</i>
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur ( <i>Melting temperature</i> )
VPA	Valproinsäure ( <i>Valproic acid</i> )
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch
β-ME	β-Mercaptoethanol



## Danksagung

Die Arbeit wurde in der Abteilung Experimentelle Toxikologie der Schering AG Berlin angefertigt, deren Leiter Herrn Dr. Schweinfurth ich für diese Möglichkeit sehr danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Klaus Becker für die Überlassung des Themas und die Betreuung des Projekts; insbesondere auch für die vielen halben Stunden, die er zwischendurch für Diskussionen zu Verfügung stand, wenn ich „kurz mal fünf Minuten“ etwas fragen wollte.

Bei Professor Dr. Gilbert Schönfelder möchte ich mich für die Bereitschaft bedanken, die Arbeit zu betreuen und bei Professor Dr. Ibrahim Chahoud für sein Interesse an der Arbeit, das letztendlich beitrug, einen geeigneten Betreuer zu finden.

Herrn Professor Dr. Spielmann, Frau Dr. Seiler und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe an der ZEBET (BfR) danke ich sehr für die gute Kooperation. Insbesondere möchte ich mich herzlich bei Dr. Roland Buesen bedanken, der mir durch seine Anmerkungen und Korrekturvorschläge beim Zusammenschreiben eine große Hilfe war, sowie bei Anke Visan für die Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der Durchflusszytometrie. Dr. Elke Genschow danke ich für ihre Hilfe besonders beim Ringen mit auf komplizierteste Weise verknüpften Excel-Spreadsheets.

Während der Anfangszeit der Arbeit waren mir besonders Nadine Köppe und Anja Piecha eine große Hilfe. Den beiden „Pionieren“ auf dem Projekt möchte ich für die Einarbeitung und Unterstützung während dieser Zeit herzlich danken.

Ein Dankeschön geht auch an die Mitarbeiter der „Tox“ im 7. Stock Jana Ullm, Claudia Steinhoff, Gabi Gehrman und Dr. Andreas Sutter für die angenehme Arbeitsatmosphäre; Jana möchte ich zusätzlich für die Unterstützung im technischen Bereich danken und Gabi für die Bereitstellung von über die Jahre schier unerschöpflichen Vorräten an glukosehaltiger „Nervennahrung“.

Danken möchte ich auch einigen weiteren Kollegen bei Schering, deren Hilfs- und Diskussionsbereitschaft mir eine große Hilfe waren, besonders Michael Schneider, Julia Eschenbrenner und Anja Walzer.

Ein großes Dankeschön geht an Mounia El Hachoumi, Viktoria Bergschmidt, Ruth Stirati, Sabine Kock und Natalie Kohzer, die mich an manchen frustrierenden Tagen außerhalb des Labors wieder aufgemuntert haben.

Ganz besonders danke ich meiner Mutter Dagmar Kaltenhäuser für ihre Unterstützung und ihren ungebrochenen Optimismus und meinem Freund Hans-Georg Schlosser, der mir während der Zeit zur Seite stand und ohne den mir Vieles schwerer gefallen wäre.

## **Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Erklärung

„Ich, Johanna Kaltenhäuser, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Johanna Kaltenhäuser