

3 Einleitung

3.1 Entwicklung der Reproduktionstoxikologie

Der Begriff Teratologie wurde im 19. Jahrhundert von Étienne Geoffroy Saint-Hilaire geprägt, der als einer der Ersten Tierversuche zur Embryonalentwicklung durchführte: Er bestrich Hühnereier mit Lack und erzeugte so durch Sauerstoffmangel geschädigte Küken. In dieser Zeit wurde systematisch begonnen, Zusammenhänge zwischen äußeren Einflüssen und der Entwicklung des Embryos experimentell zu untersuchen. Mit der Entstehung der experimentellen Embryologie im ersten Drittel des 19. Jahrhunderts wurde eine wissenschaftliche Basis durch die Beschreibung von Entwicklungsvorgängen während der Embryogenese und dem Vergleich zwischen verschiedenen Spezies geschaffen. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts entstanden Atlanten und Handbücher zur Beschreibung und Klassifizierung von kongenitalen Missbildungen (z.B. Förster, 1861; Ahlfeld, 1880).

Eine genauere Vorstellung der schädlichen Folgen von äußeren Einflüssen auf den sich entwickelnden Embryo im Mutterleib bildete sich im 20. Jahrhundert. 1935 beobachtete Hale, dass durch eine Vitamin A-defiziente Diät der Muttertiere Mikro- und Anophtalmie bei Ferkeln hervorgerufen wurde (Hale, 1935). In den 40er Jahren wurde der Zusammenhang zwischen der Infektionskrankheit Röteln und Schädigungen des Kindes im Mutterleib erkannt (Gregg, 1941). Hierdurch wurde nachgewiesen, dass die Plazenta-Schranke den Fetus nicht vollkommen vor äußeren Einflüssen schützt.

Noch bis zum Ende der 50er Jahre gab es jedoch keine speziellen Richtlinien über die Prüfung von Arzneimitteln vor der Zulassung auf embryotoxische Effekte.

Zu Beginn der 60er Jahre wurde das Bewusstsein für die Bedeutung dieses Bereichs durch die Thalidomid-Katastrophe enorm geschärft. Das bis dahin mehrere Jahre lang als sehr nebenwirkungsarmes Schlafmittel angewandte und besonders auch in der Schwangerschaft empfohlene „Contergan“ mit dem Wirkstoff Thalidomid wurde als Ursache für die spezifischen Schädigungen erkannt, die seit Ende der 50er Jahre verstärkt auftraten: Dazu gehörten hauptsächlich Dismelien (Gliedmaßenfehlbildungen) und auch Fehlbildungen im Kopfbereich, wie Dysotie und Mikrophtalmie. Durch Lenz in Deutschland und zeitgleich durch McBride in Australien wurde postuliert, dass die Schädigungen durch die Einnahme von Thalidomid durch die Mutter hervorgerufen wurden, was später bestätigt werden konnte (Lenz, 1961; McBride, 1961). Die unterschiedlichen Schädigungen traten in Abhängigkeit des exponierten Entwicklungsstadiums auf.

Seitdem wurden reproduktionsschädigende Wirkungen als besonders schwerwiegende Nebenwirkungen von Arzneimitteln erkannt, die vor der Zulassung sorgfältig in Tierexperimenten untersucht und möglichst ausgeschlossen werden müssen.

3.2 Verfahren reprotoxikologischer Prüfungen in der Arzneimittelzulassung

Die ersten Richtlinien zur Testung von Arzneimitteln auf teratogene Effekte wurden 1966 durch die Food and Drug Administration (FDA) in den USA eingeführt. An diesen orientierten sich die später folgenden der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung in Europa (OECD), der Europäischen Gemeinschaft (EG) und Japans.

Die Strategien zur Testung des reprotoxikologischen Potentials für die Zulassung von Humanarzneimitteln sind heute festgelegt in Richtlinien der EU (Eudralex, Volume 3, 3BS4A: *Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products*, 1996), basierend auf den Richtlinien der International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) S5A und S5B. In diesen Richtlinien werden Strategien zur Untersuchung von Effekten von Substanzen auf die verschiedenen Bereiche der Reproduktion festgelegt:

- Fertilität und frühe embryonale Entwicklung;
- Embryofetale Entwicklung;
- perinatale Entwicklung und maternale Funktion

Präklinische Studien zur Arzneimittelzulassung erfolgen standardmäßig in zwei Spezies. Dabei ist die Ratte das meist verwendete Modelltier. Als „Nicht-Nager“ dient meist das Kaninchen als zweite Spezies.

Auch vor der Vermarktung von Chemikalien müssen toxikologische Prüfungen erfolgen. Die Durchführung von Standardverfahren ist niedergelegt in den OECD-Richtlinien für die Testung von Chemikalien, Sektion 4 (Health effects):

414 Prenatal Developmental Toxicity Study

415 One-Generation Reproduction Toxicity Study

416 Two-Generation Reproduction Toxicity Study

421 Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test

422 Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test

Die gesetzlich vorgeschriebenen Tierversuche zur Bestimmung des embryotoxischen Potentials von Chemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen *in vivo* erfordern jedoch eine hohe Tierzahl

und sind sehr kostenintensiv und zeitaufwendig. Zudem sind die Versuche häufig stark belastend für die Tiere.

3.3 Anwendungsbereiche von *In-vitro*-Tests

1959 wurden von Russell und Burch Grundsätze für die humanere Durchführung von Tierversuchen und ihren Ersatz erarbeitet (Russell und Burch, 1959). Die Hauptziele dabei wurden als „*refine, reduce, replace*“ zusammengefasst. Damit sind Verbesserungen eingeschlossen, die die Durchführung von Tierversuchen unter möglichst schonenden Bedingungen („*Refinement*“), die Reduktion der eingesetzten Tierzahlen („*Reduction*“) und den Ersatz durch Alternativmethoden („*Replacement*“) betreffen. Diese Herangehensweise ist unter dem Begriff „3R“ bekannt.

Die Entwicklung, Erweiterung und Validierung von *In-vitro*-Methoden ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein wichtiges Thema der Europäischen Union, da das Chemikalienrecht nach dem im Oktober 2003 eingereichten Vorschlag der EU-Kommission für eine Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH; *Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*) erneuert werden soll (COM 2003 0644 [04]). Nach dem REACH-System sollen auch ca. 30 000 Altchemikalien mit einem jährlichen Verkaufsvolumen von über einer Tonne toxikologisch bewertet werden. Diese Stoffe waren bereits vor 1981 auf dem Markt und wurden daher noch nicht systematisch nach den Anforderungen der Richtlinie 67/548/EWG auf toxische Eigenschaften untersucht.

Um Tierversuche zu vermeiden, sollen die nachzuholenden Bewertungen, wenn möglich, auch mit *In-vitro*-Methoden erfolgen. Für einige der toxikologischen Endpunkte existieren bereits validierte und von der OECD anerkannte Ersatzmethoden zum Tierversuch; zu den zugelassenen Prüfverfahren gehören die Testung korrosiver Substanzpotentiale mittels *in vitro* rekonstituierter humaner Hautmodelle (OECD Test Richtlinie 431: *In vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test), die Testung der Absorption von Substanzen mittels Hautmodellen (OECD Test Richtlinie 428: Skin Absorption), sowie die Testung auf phototoxische Eigenschaften anhand von Zellkulturen (OECD Test Richtlinie 432: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test).

Das Gebiet der Reproduktionstoxikologie stellt jedoch einen so komplexen Bereich dar, dass es bisher noch nicht gelungen ist, *In-vitro*-Modelle zu etablieren, die zufrieden stellende Aussagen erlauben. Für die Einschätzung embryotoxischer Effekte existieren bisher keine anerkannten *In-vitro*-Verfahren.

Für die pharmazeutische Industrie sind *In-vitro*-Testsysteme von großem Interesse, mit denen embryotoxische Effekte von potentiellen Wirkstoffen schon in einer frühen Phase der

Arzneimittelentwicklung eingeschätzt werden können und somit Hinweisen auf Kontraindikationen frühzeitig nachgegangen werden kann. Dies gilt besonders für Methoden, die als Screeningverfahren während der Auswahl derartiger Substanzkandidaten eingesetzt werden können, wenn noch keine großen Substanzmengen synthetisiert worden sind.

3.3.1 *In-vitro*-Testsysteme für die Embryotoxizitätsprüfung

Verschiedene *In-vitro*-Methoden sind in den vergangenen Jahren entwickelt worden, die zur Abschätzung embryotoxischer Effekte von Substanzen dienen sollen. Diese Methoden bieten den Vorteil, eine Einschätzung des embryotoxischen Potentials einer Testsubstanz ohne Tierversuch und mit geringem Substanzaufwand zu erlauben. Um dies zuverlässig zu ermöglichen, bedarf es leistungsfähiger Modellsysteme, die die Vorgänge der embryonalen Entwicklung möglichst genau nachvollziehen und eine ähnliche Empfindlichkeit für schädigende Einflüsse wie der sich *in vivo* entwickelnde Embryo aufweisen.

In einem Workshop des *European Center for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) wurden verschiedene Tests evaluiert, die auf folgende Modellsysteme zurückgreifen (Brown et al., 1995):

- ganze Embryonen von Nichtsäuger- und Säuger-Spezies (z.B. *Xenopus laevis*, Ratte),
- Gewebe von Embryonen (*Micromass*-Assays von Huhn, Maus oder Ratte),
- Zellkulturen oder Zelllinien verschiedener Herkunft.

Oft ist jedoch die Aussagefähigkeit dieser Modelle in Bezug auf den Menschen stark eingeschränkt. Bei Nichtsäugersystemen ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse besonders unsicher, zusätzlich ist bei vielen Tests auch keine Möglichkeit gegeben, zwischen allgemeiner und embryonaler Toxizität zu unterscheiden.

Einige Testsysteme, die diese Einschränkungen berücksichtigen, wurden als viel versprechend eingestuft. Unter diesen befand sich der Embryonale Stammzelltest (EST), der *Micromass* (MM)-Assay und die *Whole Embryo Culture* (WEC). In einer Multicenter-Studie mit mehreren Projektpartnern wurden diese drei Testsysteme validiert.

Beim Embryonalen Stammzelltest (Spielmann et al., 1997) werden als Entwicklungsmodell embryonale Stammzellen der Maus verwendet, die *in vitro* spontan zu schlagenden Herzzellen differenzieren. Auf diesen Test wird im Folgenden noch genauer eingegangen.

Im MM-Assay werden Zellkulturen verwendet, die aus isolierten Extremitätenknospen von Rattenembryonen an Tag 14 der Embryonalentwicklung (E14) stammen. Als Entwicklungsendpunkte wurden die Differenzierung von Chondrozyten mittels *Alcian Blue*-Färbung und die Zytotoxizität im Neutralrot-Assay gemessen.

In der WEC werden ganze Rattenembryonen an Tag 10 der Embryonalentwicklung (E10) präpariert und *in vitro* kultiviert. Verschiedene morphologische, entwicklungsspezifische und funktionelle Parameter werden nach einem Punktesystem bewertet und der resultierende Score nach Substanzbehandlung mit der Kontrolle verglichen.

Zur Validierung der drei Tests wurden Referenzsubstanzen eingesetzt, deren embryotoxisches Potential bekannt war und für die eine gute *In-vivo*-Datenlage existierte. Anhand der *In-vivo*-Daten wurden die Substanzen in drei vorher definierte Klassen als „nicht“, „schwach“ und „stark embryotoxisch“ eingeordnet. Anhand der Ergebnisse der ersten sechs Substanzen wurde für jeden Test ein mathematisches Prädiktionsmodell (PM) erarbeitet, das eine Klassifizierung erlaubte (Genschow et al., 2000). Diese Prädiktionsmodelle wurden mit den Ergebnissen von weiteren 14 blind getesteten Substanzen überprüft und gegebenenfalls modifiziert (Spielmann et al., 2001; Genschow et al., 2002). Mit den *In-vitro*-Tests wurden somit insgesamt 20 Substanzen getestet und den drei Klassen zugeordnet.

Die Ergebnisse der Studie waren sehr viel versprechend (Tabelle 1). Alle drei Tests ermöglichten die Einschätzung eines embryotoxischen Potentials mit vergleichbarer Genauigkeit. Besonders positiv ist zu bewerten, dass die Prädiktivität für stark embryotoxische Stoffe in allen Testsystemen bei 100% lag. Damit entsprachen alle *in vitro* als stark embryotoxisch bewerteten Substanzen auch jeweils *in vivo* als stark embryotoxisch klassifizierten Substanzen.

Gegenüber dem MM-Assay und der WEC besitzt der EST den Vorteil, dass dieser Test rein auf Zellkulturbasis mit zwei permanenten Zelllinien, einer murinen embryonalen Stammzelllinie und einer Fibroblastenlinie, durchgeführt wird. Daher muss zu keinem Zeitpunkt auf trächtige Tiere zurückgegriffen werden. Dies stellt einen ethischen Vorteil dar. Die Verwendung von Zellkulturen ist zudem Kosten sparend, und bietet die Möglichkeit, den Test zu Screeningzwecken einzusetzen.

Tabelle 1: Ergebnisse der Validierung der *In-vitro*-Embryotoxizitätstests EST, Micromass-Assay (MM) und Whole Embryo Culture (WEC) (Ergebnisse nach Genschow et al., 2002).

Test	EST	MM	WEC
Prädiktivität für nicht embryotoxische Substanzen	72 %	57 %	70 %
Prädiktivität f. schwach embryotoxische S.	70 %	71 %	76 %
Prädiktivität f. stark embryotoxische S.	100 %	100 %	100 %
Präzision f. nicht embryotoxische S.	70 %	80 %	80 %
Präzision f. schwach embryotoxische S.	83 %	60 %	65 %
Präzision f. stark embryotoxische S.	81 %	69 %	100 %
Genauigkeit	78 %	70 %	80 %

Prädiktivität: Wahrscheinlichkeit, dass die im Test gefundene Einstufung auch der *In-vivo*-Klassifikation entspricht.
 Präzision: Wahrscheinlichkeit, dass eine *in vivo* klassifizierte Substanz im Test die gleiche Einstufung erhält
 Genauigkeit: Prozentanteil der richtigen Klassifikationen an allen Tests.

3.3.2 Beschränkungen und Möglichkeiten von *In-vitro*-Embryotoxizitätstests

Jedes Modellsystem bildet nur einen begrenzten Ausschnitt der Wirklichkeit ab. Verschiedene, für die reproduktionstoxische Wirkung wichtige Parameter, die *in vivo* die Wirkung einer Testsubstanz beeinflussen, können mit keinem der bisher etablierten Modellsysteme abgeschätzt werden; die Plazentagängigkeit und die metabolische Aktivierung sind dabei wichtige Punkte, auch kann keine Aussage über alle Organsysteme, Zelltypen und Funktionen des Embryos gemacht werden.

Dies schränkt die Aussagekraft von *In-vitro*-Embryotoxizitätstests ein. Aus diesen Gründen können *In-vitro*-Modellsysteme sicher *In-vivo*-Versuche nicht ersetzen, um eine Risikoabschätzung für die Anwendung am Menschen vorzunehmen. Bestimmte Eigenschaften einer Substanz, die auf eine fruchtschädigende Wirkung hinweisen, können jedoch in gut kontrollierbaren Modellsystemen untersucht werden. Auf diese Weise können *In-vitro*-Methoden erste Einschätzungen erlauben und im Rahmen der Auswahl von Kandidaten während der Entwicklung von Arzneimitteln genutzt werden. Der Einsatz von *In-vitro*-Methoden bietet in diesem Zusammenhang die Chance, Tierversuche zu verringern oder gegebenenfalls zu vermeiden.

Zudem können mit *In-vivo*-Studien zwar reproduktionstoxische Effekte nachgewiesen werden, funktionelle Zusammenhänge auf molekularer Ebene, die für das Verständnis des Wirkmechanismus einer Substanz wichtig sind, müssen jedoch meist durch zusätzliche

molekularbiologische Untersuchungen aufgeklärt werden. So existieren bis heute oft nur Hypothesen über die Wirkungsweise von Teratogenen, selbst bei prominenten Beispielen wie Thalidomid. Solche Wissenslücken können jedoch möglicherweise eines Tages durch *In-vitro*-Untersuchungen geschlossen werden.

3.4 ES-Zellen als Modell der Embryonalentwicklung

Bei murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die im EST eingesetzt werden, handelt es sich um undifferenzierte, pluripotente Zellen. Die Etablierung von ES-Zellen erfolgte erstmals zu Beginn der 80er Jahre aus der inneren Zellmasse von Blastozysten (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981; Doetschman et al., 1985). Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu reproduzieren („*self-renewal*“) und über Vorläuferzellen differenzierte Zelltypen auszubilden. Unter geeigneten Kulturbedingungen können die Zellen daher *in vitro* vermehrt werden und bewahren dabei die Fähigkeit, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren.

Pluripotente ES-Zellen haben die Kapazität, alle Zelltypen des Embryos zu bilden; ihnen fehlt jedoch die Fähigkeit trophektodermale Differenzierungswege einzuschlagen, die für den Aufbau bestimmter extraembryonaler Gewebe notwendig sind. Dies unterscheidet sie im Differenzierungsgrad von der befruchteten Eizelle, die allein in der Lage ist, alle für eine erfolgreiche Embryonalentwicklung notwendigen Gewebe zu bilden und als totipotent bezeichnet wird.

Werden embryonale Stammzellen in Wirts-Blastozysten eingebracht und diese einer scheinträchtigen Maus eingesetzt, können sie zu allen Geweben des Embryos beitragen (Robertson et al., 1986; Pease und Williams, 1990). Diese Fähigkeit zur korrekten Differenzierung beweist, dass die ES-Zellen rezeptiv gegenüber Differenzierungssignalen ihrer Umgebung sind, als auch, dass sie, anders als Tumorzellen, weiterhin der Kontrolle durch Ihre Umgebung unterliegen. Die Blastozysten-Injektionstechnik bildet z.B. die Grundlage für die Herstellung von *Knock-out*-Mäusen, indem genetisch veränderte ES-Zellen verwendet werden, denen ein bestimmtes Gen fehlt.

ES-Zellen, die *in vitro* vermehrt werden, beginnen spontan, sich in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren. Um ES-Zellen während der Kultur im undifferenzierten Zustand zu erhalten, gibt es mehrere Möglichkeiten. Entweder können Fibroblasten als *Feeder*-Zellen eingesetzt werden, die zuvor bestrahlt wurden, um sie teilungsunfähig zu machen. Diese Zellen geben Faktoren in das Kulturmedium ab, die die Differenzierung der ES-Zellen inhibieren. Die zweite, inzwischen weit verbreitete Möglichkeit besteht darin, dem Kulturmedium den differenzierungsinhibierenden Faktor LIF (*Leukaemia inhibitory factor*) zuzusetzen. Dieses

Cytokin aus der Interleukin 6-Familie verhindert ein Ausdifferenzieren der ES-Zellen und erhält ihre Pluripotenz (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988; Gough et al., 1989).

Unter jeweils angepassten Kulturbedingungen können ES-Zellen *in vitro* unterschiedliche Zelltypen bilden, die *in vivo* den drei Keimblättern Endo-, Meso- und Ektoderm zugeordnet werden (Doetschman et al., 1985). Verschiedene Differenzierungsvorgänge sind bisher untersucht worden, von denen eine Auswahl im Folgenden kurz skizziert wird.

Spontan kommt es in vielen ES-Zelllinien in Abwesenheit von LIF zur Bildung von Herzmuskelzellen, die durch rhythmische Kontraktionen unter dem Mikroskop detektiert werden können (Doetschman et al., 1985; Review in Boheler et al., 2002). Die Expression von Herzmuskelproteinen wurde nachgewiesen, und es konnte gezeigt werden, dass eine mit der *In-vivo*-Entwicklung vergleichbare Organisation sarkomerischer Strukturen auftritt (Guan et al., 1999). Exprimiert werden sowohl Komponenten des kontraktiven Apparats, wie α -Actinin, kardiales α -Actin, MHC und MLC-Proteine, als auch spezifische Ionenkanäle (Robbins et al., 1990; Miller-Hance et al., 1993; Maltsev et al., 1994; Guan et al., 1999). Die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen zeigte, dass sich *in vitro* sogar unterschiedliche Herzzelltypen ausbilden: sowohl Schrittmacherzellen mit eigener Schlagfrequenz, als auch erregbare atriale und ventrikuläre Zellen (Maltsev et al., 1993; Review in Hescheler, 1997). Dieser Differenzierungsweg wird im EST als Entwicklungsmodell genutzt.

Die Entwicklung von Skelettmuskelzellen aus embryonalen Stammzellen konnte ebenso nachgewiesen werden. Die ES-Zellen der Linie BLC6 können spontan Skelettmuskelzellen bilden. Dabei traten die aus der Muskelentwicklung *in vivo* bekannten Determinierungsfaktoren Myf5, Myogenin, MyoD und Myf6 in der entsprechenden zeitlichen Abfolge auch bei der Muskelzellendifferenzierung *in vitro* auf (Rohwedel et al., 1994).

ES-Zellen werden zur Differenzierung von quergestreiften Muskelzellen ohne LIF und in Aggregaten (den „*Embryoid Bodies*“, EBs) kultiviert; sie können aber durch angepasste Kulturbedingungen auch zur vermehrten Bildung weiterer Zelltypen angeregt werden.

Auch die Differenzierung von ES-Zellen zu neuronalen Zelltypen ist ausgiebig untersucht worden. Neuronale Differenzierung tritt in geringem Maße auch in spontan differenzierenden EBs auf, kann aber durch geeignete Kultivierungsbedingungen verstärkt induziert werden. Zu diesen gehören z.B. die Zugabe von all-*trans*-Retinsäure (RA) in das Kulturmedium (Review in Rohwedel et al., 1999) und die Linienselektion (Okabe et al., 1996; Lee et al., 2000; Ying et al., 2003). Mit beiden Methoden konnte die Entwicklung neuronaler Zellen nachgewiesen werden, die sowohl anhand von zelltypspezifischen Transkripten, als auch durch elektrophysiologische

Eigenschaften identifiziert wurden (Strubing et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Okabe et al., 1996; Finley et al., 1996; Lee et al., 2000; Ying et al., 2003)

Weiterhin werden auch hämatoopoietische Zellen während der Differenzierung von ES-Zellen gebildet, die z.B. anhand der Globin-Expression identifiziert werden können (Doetschman et al., 1985; Schmitt et al., 1991). ES-Zellen wurden als Modell für die Vaskulogenese eingesetzt (Risau et al., 1988; Yamashita et al., 2000), und mit spezifischen Differenzierungsprotokollen und Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren konnte auch die Knochen- und Knorpelzellentwicklung anhand von ES-Zellen studiert werden (zur Nieden et al., 2003; zur Nieden et al., 2005)

3.5 Verwendung der Kardiomyozytendifferenzierung im EST

Das Herz wird während der Embryonalentwicklung als eines der ersten Organe ausgebildet. Es ist ein komplexes Netzwerk von Interaktionen zwischen Proteinen und auch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen notwendig, um ein funktionales Herz zu bilden. Die Vorgänge *in vivo* werden in Abschnitt 3.6. ausführlicher beschrieben.

Aufgrund dieser Komplexität stellt die Kardiomyozytendifferenzierung embryonaler Stammzellen ein geeignetes und sensitives Modellsystem für embryonale Entwicklungsvorgänge dar, das sich zum Nachweis embryotoxischer Effekte im Embryonalen Stammzelltest (EST) eignet. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung mit bekannten embryotoxischen Substanzen die Entwicklung schlagender Herzzellen konzentrationsabhängig inhibiert wird (Spielmann et al., 1997).

Das Ausbleiben einer normalen Herzzelldifferenzierung wird im EST als Parameter für eine embryotoxische Wirkung der Prüfsubstanz verwendet. Zusätzlich zum morphologischen Endpunkt wurden in der vorliegenden Arbeit molekulare Marker auf Genexpressionsebene herangezogen, um Substanzeffekte zu quantifizieren.

In den folgenden Versuchen wurde die *In-vitro*-Differenzierung zu Herzmuskelzellen genutzt. Dazu wurde die ES-Zelllinie D3 verwendet, die sich für die Herzmuskelentwicklung besonders eignet. Die Etablierung dieser Linie erfolgte aus vier Tage alten Blastozysten von 129/Sv-Mäusen (Doetschman et al., 1985). Sie besitzt die Fähigkeit, sich *in vitro* innerhalb von zehn Tagen spontan in kontrahierende Kardiomyozyten zu differenzieren. Es wurde auch gezeigt, dass die Zellen nach Injektion in Blastozysten zur Bildung der Keimzellen beitragen können (Gossler et al., 1986; Pease und Williams, 1990). Diese Keimbahnkompetenz weist nach, dass die Zellen das vollständige Entwicklungspotential besitzen.

3.6 Entwicklung des Herzens

Wie erwähnt wird das Herz als erstes funktionelles Organ während der Embryogenese gebildet. Zu seiner Ausbildung sind komplexe Wachstumsvorgänge und die Bildung vielschichtiger Strukturen notwendig, die von einer Abfolge verschiedener Signalproteine hervorgerufen und reguliert werden, von denen im Weiteren nur einige wichtige genannt werden sollen. Die Kontrolle der Vorgänge auf der molekularen Ebene ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die Entstehung des Gefäßsystems beginnt bei der Maus an Tag 7 und beim Menschen in der dritten Woche der Embryonalentwicklung im mittleren Keimblatt, dem Mesoderm. In diesem frühen Stadium erscheinen noch vor dem Auftreten von Somiten die ersten Blutinseln im anterioren Teil der Keimscheibe im Bereich des viszeralen Mesoderms. In den kardialen Vorläuferzellen kann bereits das Homeodomänenprotein Nkx2-5 nachgewiesen werden, das in *Drosophila* notwendig für die Herzentstehung ist (Lints et al., 1993; Bodmer, 1993). Es wurde auch gezeigt, dass für die Induktion des Herzfeldes Proteine der BMP (*bone morphogenetic protein*)-Familie notwendig sind, die in den angrenzenden Geweben exprimiert werden (Schultheiss et al., 1997).

Die kardiogene Zone entsteht im vorderen Abschnitt eines hufeisenförmigen Plexus aus kleinen Gefäßen. Verschiedene Stadien der Herzentwicklung sind in Abbildung 1 dargestellt. Durch die Einfaltung des Vorderdarms gelangt die Herzanlage erst in die Hals- und später in die Thoraxregion, während sich das Vorderhirn und die Pharyngealmembran nach kranial vorstülpen. Außer Nkx2-5 werden in den Zellen weitere Transkriptionsfaktoren exprimiert, die für die Herzentwicklung notwendig sind. Zu ihnen gehören der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor GATA-4 und das T-Box-Protein Tbx5 (Heikinheimo et al., 1994; Lin et al., 1997; Horb und Thomsen, 1999). Die Transkriptionsfaktoren MesP (*Mesoderm Posterior*)1 und 2 werden nicht nur in Herzvorläuferzellen exprimiert, sind jedoch auch erforderlich für die Herzbildung: Beim Fehlen beider Proteine in *Knock-out*-Mäusen werden keine mesodermalen Strukturen gebildet (Kitajima et al., 2000); fehlt nur MesP1 verwachsen die Schenkel der hufeisenförmigen kardiogenen Zone nicht, sodass zwei getrennte Herzanlagen bestehen bleiben (Saga et al., 1999). Verläuft die Entwicklung jedoch ungestört, wird durch die Vereinigung von Gefäßen der kardiogenen Region ein Herzschlauch gebildet. Auch GATA-4 ist für die Bildung des Herzschlauchs notwendig. Schon in diesem Stadium beginnt das Herz zu kontrahieren und die muskelspezifischen Proteine kardiales α -Actin, α - und β -MHC, sowie MLC-Proteine werden exprimiert (Sassoon et al., 1988; Lyons et al., 1990b). Für die weitere Entwicklung des Embryos ist ein funktionierendes Kreislaufsystem unerlässlich. In Ultraschalluntersuchungen am

Menschen wurde bereits an Entwicklungstag 23, wenn der Embryo erst ca. 2 mm misst, Herztätigkeit wahrgenommen (O'Rahilly und Müller, 1999). In der Maus entspricht dieses Stadium etwa Tag 8.

Im weiteren Verlauf der Herzentwicklung kommt es zur Bildung der Herzschleife (*looping*). Der kraniale Abschnitt des Herzschlauchs krümmt sich nach ventral und kaudal, während der zuvor kaudale Vorhofabschnitt eine Krümmung nach dorsokranial und links erfährt. Nun erst liegt die Region, die die späteren Atrien bildet, kranial der Ventrikel. In der 4. Woche beim Menschen und nach etwa 11 Tagen in der Maus ist die Bildung der Herzschleife abgeschlossen. An der Ausbildung der Asymmetrie sind Gene wie *lefty*, *nodal* und *pitx2* beteiligt. Auch die Expression von *Nkx2-5* und *GATA-4* ist für das *looping* notwendig (Review in Harvey, 2002).

Die Herzschleife ist die Voraussetzung für die Umwandlung des zu Beginn seriell arbeitenden Herzens in zwei parallel geschaltete Blutströme (Lungen- und Körperkreislauf). Durch Fusion zellulärer „Polster“ und durch Ausbildung von Septen kommt es zu einer Unterteilung des ursprünglichen Schlauchs in ein vierkammeriges Herz. Verschiedene Proteine werden spezifisch in einem Teil des Herzens exprimiert. Zu Ihnen gehören z.B. die Proteine *Heart and neural crest derivative* (*Hand*)1 und 2, deren Expression jeweils auf den linken, bzw. rechten Ventrikel beschränkt ist. Die Umorganisation ist mit ca. 7 Wochen beim Menschen und ca. 15 Tagen bei der Maus abgeschlossen. Bis zur Geburt verbleibt eine Öffnung zwischen rechtem und linkem Atrium (Foramen ovale), sowie eine Verbindung des *Truncus pulmonalis* in die Aortenbögen, sodass die noch funktionsunfähige Lunge verringert durchblutet wird. Nach der Geburt verschließen sich beide Strukturen mit dem Einsetzen der Luftatmung innerhalb einiger Tage.

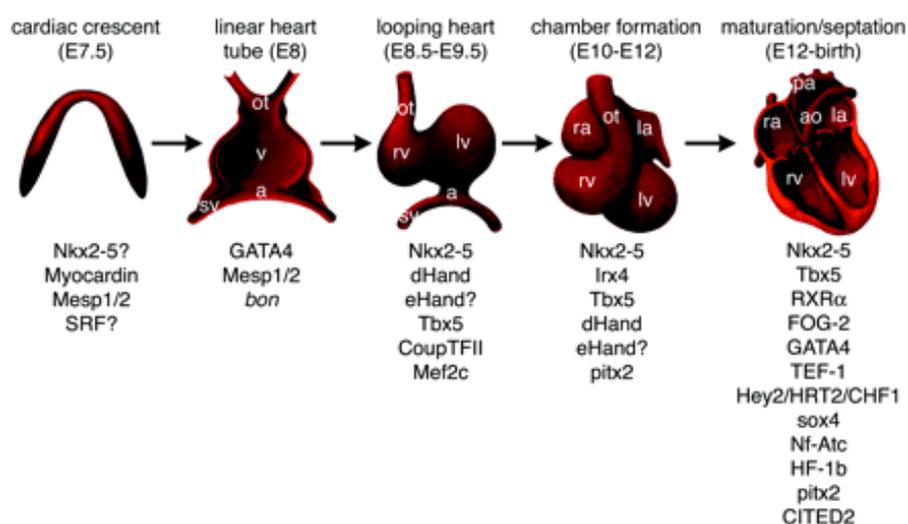


Abbildung 1: Stadien der Herzentwicklung mit einigen exprimierten Transkriptionsfaktoren

ot: *outflow tract* (Ausflussbahn); (r/l) a: (rechtes/ linkes) Atrium; (r/l) v: (rechter/ linker) Ventrikel; ao : Aorta; *Sinus venosus*; pa : Pulmonalarterie. Die angegebenen Transkriptionsfaktoren werden im jeweiligen Stadium exprimiert und sind wichtig für die Herzentwicklung. Um in der notwendigen Kürze die Übersichtlichkeit zu bewahren, wird im Text nur auf einige eingegangen. (aus Bruneau, 2002)

3.7 Auswahl potentieller Markergene

Die kurze Darstellung der *in-vivo*-Entwicklung zeigt, dass eine Vielzahl von Genen an den Vorgängen während der Herzentwicklung beteiligt ist. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Kardiomyozytendifferenzierung im ES-Zellmodell wurden Gene ausgewählt, deren Funktion während der Herzzellentwicklung anhand von Daten aus der Literatur in verschiedene Gruppen eingeteilt werden konnte. Als Kandidaten wurden insgesamt 18 Gene ausgewählt, die während der embryonalen Entwicklung exprimiert werden und größtenteils eine spezifische Rolle bei der Herzentwicklung spielen. Die Produkte dieser Gene lassen sich in folgende vier Kategorien einteilen:

1. Komponenten des kontraktile Apparates
2. Transkriptionsfaktoren
3. Wachstumsfaktoren und Cytokine
4. nicht-herzspezifische Proteine

Eine zentrale Stellung nahm die Untersuchung von Genen ein, deren Produkte an der Bildung des kontraktile Apparats in funktionellen Herzzellen beteiligt sind. Diese Gruppe wurde von kardialen α -Actin, kardialen α - und β -MHC, MLC1, MLC2v, α -Actinin und Troponin T gebildet. Aber, wie oben dargestellt, sind auch vor dem Auftreten von kontraktionsfähigen Kardiomyozyten Genprodukte, z.B. Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren notwendig, um den Differenzierungsweg der Zelle und die Expression der späteren Gene zu steuern. Diese wurden als zweite und dritte Gruppe untersucht. Als Transkriptionsfaktoren wurden Tbx5, GATA-4, Myocardin, MesP1 und 2 sowie Hand1 und 2 gewählt. Es wurde ein Wachstumsfaktor, *cripto-1*, und ein Cytokin, *cardiotrophin-1* untersucht, die beide für die Herzentwicklung notwendig sind. Zusätzlich wurden als vierte Gruppe zwei Gene ausgewählt, deren Expression nicht mit der Kardiomyozytenentwicklung in Zusammenhang steht, und deren Expressionsprofile Auskunft über andere Differenzierungsvorgänge innerhalb der Zellpopulation geben sollten. Zum einen wurde die Expression von Oct4 untersucht, dessen Expression mit der Pluripotenz embryonaler Stammzellen korreliert, und zum anderen wurde NF-L (Neurofilament light) ausgewählt, dessen Genprodukt für neuronale Zellen spezifisch ist.

Eine Auflistung der Markergene befindet sich in Tabelle 2. Im Folgenden werden die Gene und die Funktionen der Genprodukte kurz vorgestellt.

3.7.1 Komponenten des kontraktilen Apparates

3.7.1.1 Kardiales α -Actin

Bei α -Actin handelt es sich um ein globuläres Protein (G-Actin), das zu Actinfilamenten polymerisieren kann (F-Actin) und in dieser Form die dünnen Filamente der Myofibrillen bildet. Die hier gemessene Isoform des α -Actin wird *in vivo* im embryonalen und adulten Myokard und im embryonalen Skelettmuskel exprimiert (Minty et al., 1982; Sassoon et al., 1988).

3.7.1.2 Myosin heavy chain (MHC)-Gene

MHC- und MLC-Proteine bilden das Myosin der dicken Filamente in Muskelzellen und sind notwendig für das Auftreten von funktionalen Kardiomyozyten. Herz- und Skelettmuskel unterscheiden sich anhand der Isoformen von MHC-Genen, die am Aufbau des kontraktilen Apparats beteiligt sind. Die kardialen MHC-Formen α -MHC und β -MHC werden vorwiegend im Herzmuskel exprimiert und können spezifisch nachgewiesen werden. Gemessen wurden die kardialen Isoformen von α - und β -MHC.

3.7.1.3 Myosin light chain (MLC)-Gene

Im Gegensatz zu den MHC-Genen werden während der Entwicklung dieselben MLC-Gene in Herz- und Skelettmuskel koexprimiert. So wird z.B. MLC1 (atriale/fetale Form) im Herzschauch exprimiert und zusätzlich im embryonalen Skelettmuskel (Lyons et al., 1990a). Da die Bildung des Skelettmuskels jedoch später einsetzt als die des Herzmuskels, ergibt sich ein Zeitfenster, in dem die Bildung von Kardiomyozyten auch anhand dieses Gens spezifisch nachgewiesen werden kann, bevor Skelettmuskelzellen ausgebildet sind (Lyons et al., 1990a; Lyons et al., 1990b)

3.7.1.4 α -Actinin

α -Actinin stabilisiert und quervernetzt die Actin-Filamente nahe der Z-Scheibe, die die einzelnen Sarkomere miteinander verbindet.

3.7.1.5 Kardiales Troponin T

Die Untereinheiten Troponin T, I und C bilden das funktionale Troponin des Muskels, welches dafür sorgt, dass ohne Muskerregung und Calcium-Ausschüttung keine Bindung von Myosin an Actin erfolgt. Der Komplex besteht aus Troponin TnC (kalziumbindend), TnT (an Tropomyosin bindend), und TnI (inhibitorisch; verhindert in Ruhe die Brückenbildung zwischen Myosin und Actin). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der kardialen Isoform von Troponin T untersucht.

Tabelle 2: Ausgewählte Gene, deren Expression während der D3-Zelldifferenzierung mittels qRT-PCR (TaqMan) untersucht wurde.

Kontraktiler Apparat	Transkriptionsfaktoren	Wachstumsfaktoren Cytokine	Nicht-herzspezifische Gene
Kard. α -Actin	GATA-4	Cripto-1 (<i>tdgf1</i>)	Oct4 (<i>Pou5f1</i>)
Kard. α -MHC	Tbx5	Cardiotrophin-1	Neurofilament L
Kard. β -MHC	Hand1		
MLC1	Hand2		
MLC2v	MesP1		
Kard. Troponin T	MesP2		
α -Actinin	Myocardin		

3.7.2 Entwicklungsspezifische Transkriptionsfaktoren

3.7.2.1 Tbx5

Mutationen dieses Transkriptionsfaktors aus der T-Box-Genfamilie werden beim Menschen in Verbindung mit dem Holt-Oram-Syndrom gebracht, einer Erbkrankheit, bei der Defekte am Herzen und den oberen Extremitäten auftreten (Li et al., 1997; Basson et al., 1997; Basson et al., 1999). Die Inaktivierung des Gens in der Maus erwies sich in homozygoten Knockout-Mäusen als embryonal letal (Bruneau et al., 2001). Tbx5 interagiert mit Nkx2-5 und ist beteiligt an der Spezifikation des linken Ventrikels während der Herzentwicklung (Bruneau et al., 2001; Takeuchi et al., 2003b).

3.7.2.2 GATA-4

GATA-4 gehört zur GATA-Familie von Transkriptionsfaktoren. Diese Zinkfinger-Proteine sind an verschiedenen Entwicklungsvorgängen beteiligt (Review in Charron und Nemer, 1999). Zusammen mit GATA-5 und GATA-6 wurde *in vivo* die Expression in myokardialen und endokardialen Geweben an Tag 7,5 in der Embryonalentwicklung nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass sich in homozygot GATA-4-defizienten Mausembryonen zwar Herzmuskelzellen formten, jedoch die Migration der Zellen zur ventralen Mittellinie nicht erfolgte, so dass kein funktionales Herz gebildet wurde (Kuo et al., 1997; Molkenin et al., 1997).

3.7.2.3 Myocardin

Myocardin ist ein Coaktivator für SRF (*Serum Response Factor*)-abhängige Transkription, dessen Expression während der Embryogenese auf Herz- und glatte Muskelzellen beschränkt ist (Wang et al., 2001). Myocardin ist notwendig, um die SRF-abhängige Expression von Genen in Herz- und glatten Muskelzellen zu regulieren (Wang et al., 2001).

3.7.2.4 Mesoderm Posterior (MesP) 1 und 2

Bei MesP1 und 2 handelt es sich um Transkriptionsfaktoren mit *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH)-Motiv, die zu einem frühen Zeitpunkt in der mesodermalen Entwicklung benötigt werden (Kitajima et al., 2000). Eine Inaktivierung des *Mesp1*-Gens während der Embryonalentwicklung der Maus führt zum Auftreten von *Cardia bifida*, einem Defekt, bei dem die im viszeralen Mesoderm liegenden paarigen kardiogenen Zonen nicht miteinander verwachsen, so dass zwei Herzschräuche gebildet werden. (Saga et al., 1999). Beide Gene spielen auch eine Rolle bei der Somitogenese (Saga et al., 1997). Ein Doppel-Knockout der Gene in der Maus verhinderte die Bildung von Kardiomyozyten und anderen mesodermalen Strukturen und führte zu embryonaler Letalität (Kitajima et al., 2000).

3.7.2.5 Hand1 und 2

Die Proteine Hand1 (eHand) und Hand2 (dHand) wurden nach ihren Wirkungsorten "heart and neural crest derivatives" genannt. Beide Proteine enthalten eine DNA-bindende bHLH-Domäne. In der Entwicklung des Herzens sind sie notwendig für die Spezifizierung der Zelltypen der beiden Ventrikel: während dieser Phase wird Hand1 auf den linken und Hand2 auf den rechten Ventrikel beschränkt exprimiert (Srivastava et al., 1997).

3.7.3 Wachstumsfaktoren und Cytokine

3.7.3.1 *cripto-1*

Bei *cripto-1* handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, der eine „EGF-like“-Domäne besitzt. In der Maus wurde die Expression von Tag 6 kurz vor Beginn der Gastrulation bis Tag 10 nachgewiesen, wobei sie an Tag 6,5 auf das Mesoderm des Primitivstreifens beschränkt war und an Tag 8,5 auf das Myokard (Dono et al., 1993). Ein Knockout des *cripto-1*-Gens erwies sich als homozygot letal, und es entwickelten sich keine schlagenden Herzzellen mehr. Das Fehlen von *cripto-1* beeinflusste auch die Expression verschiedener herzmuskelspezifischer Gene: so wurde keine Expression der muskelspezifischen MHC-Gene, *MLC2a* und *MLC2v* mehr festgestellt (Xu et al., 1999).

3.7.3.2 *Cardiotrophin-1*

Cardiotrophin-1 ist ein Cytokin aus der IL-6-Familie, zu der auch die Interleukine IL-6 und IL-11, sowie *Leukaemia Inhibitory Factor* (LIF) gehören. Mitglieder dieser Familie haben Einfluss auf die Differenzierung und das Wachstum verschiedener Zelltypen. *Cardiotrophin-1* wurde aufgrund seiner Eigenschaft entdeckt, eine Hypertrophie von Kardiomyozyten zu induzieren

(Pennica et al., 1995). Es fördert jedoch auch während der Entwicklung das Überleben von Kardiomyozyten (Sheng et al., 1996).

3.7.4 Nicht-herzspezifische Gene

3.7.4.1 Oct4

Octamer binding Protein 4 (Oct4), das Produkt des Gens *Pou5f1*, ist ein Marker für pluripotente Stammzellen. *In vivo* wird Oct4 in den Gameten, in der Zygote, in allen Zellen der frühen Embryonalstadien bis zur Blastozyste, dann in der Inneren Zellmasse und später nur noch in den primordialen Keimzellen exprimiert (Scholer et al., 1990; Nichols et al., 1998). Auch embryonale Stammzellen *in vitro* sind Oct4-positiv und verlieren diese Eigenschaft während der Differenzierung (Niwa et al., 2000; Toumadje et al., 2003).

Oct4-defiziente Embryonen entwickeln sich bis zum Blastozystenstadium, enthalten aber keine pluripotente innere Zellmasse. Stattdessen werden nur trophektodermale Zellen ausgebildet (Nichols et al., 1998).

3.7.4.2 Neurofilament L (NF-L)

NF-L gehört zu den neuronenspezifischen Intermediärfilamenten, die am Aufbau des axonalen Zytoskeletts beteiligt sind. Typischerweise werden Triplets aus den drei Proteinen NF-L, NF-M und NF-H (für *light*, *medium* und *heavy polypeptide*) gebildet, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden (68, 160 und 200 kD).

3.8 Embryonalentwicklung und Embryotoxizität

Während der Embryogenese und der Fetalentwicklung laufen vielfältige Prozesse ab, deren Störung zur Beeinträchtigung der Entwicklung in verschiedenem Ausmaß führen kann. Der Zeitpunkt in der Entwicklung, an dem die Störung auftritt, spielt dabei eine wichtige Rolle. Während der Frühentwicklung (bis kurz nach Implantation in den Uterus, beim Menschen 1.-2. Woche) sind schädigende Einflüsse auf den sich entwickelnden Embryo zumeist nicht mit dessen Überleben vereinbar. In der späteren Organogenese (3.-8. Woche) ist die Empfindlichkeit gegenüber teratogenen Einflüssen sehr ausgeprägt. In diesem Zeitraum werden die Körperstrukturen festgelegt, die Organe gebildet und die Extremitäten angelegt. Wird diese Entwicklung gestört, kann es zu schweren morphologischen Anomalien kommen. Toxische Einflüsse während der Fetalphase (9.-38. Woche) führen meist zu funktionellen Defekten oder weniger schwerwiegenden Missbildungen (siehe Abbildung 2).

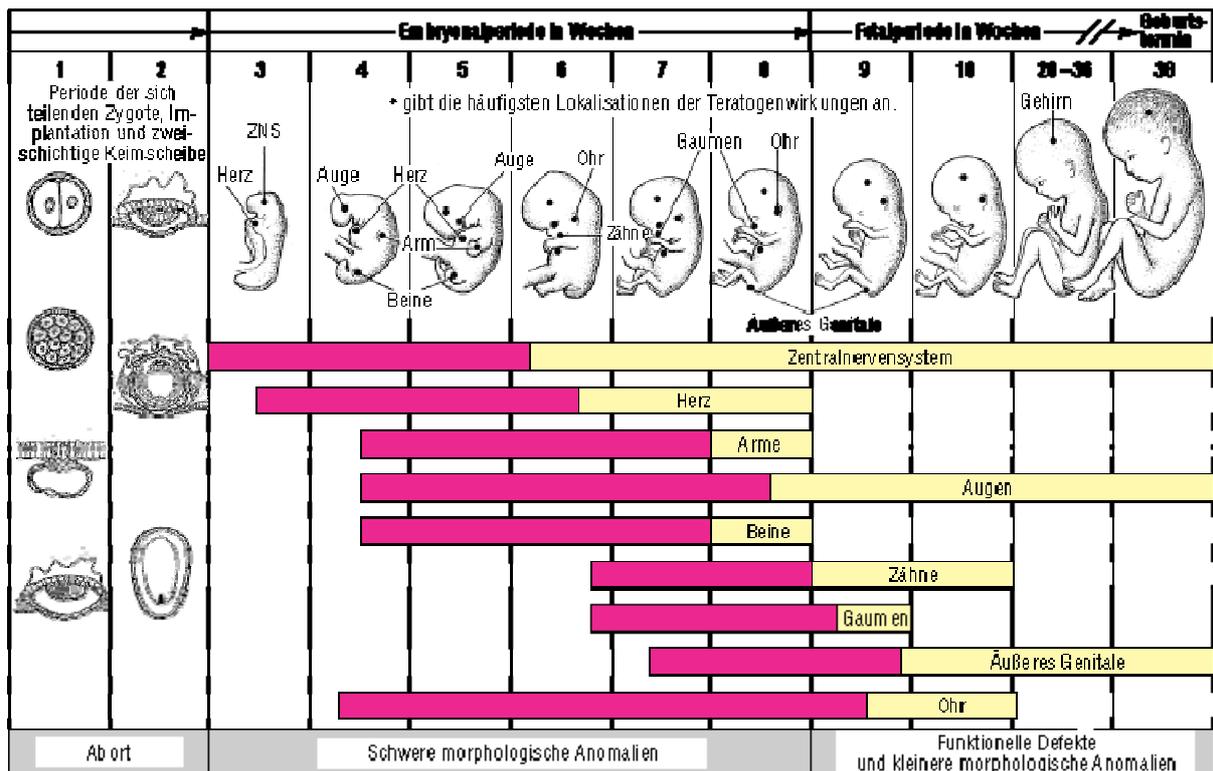


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Embryonal- und Fetalentwicklung beim Menschen mit den besonders sensiblen Phasen für teratogene Schädigungen (aus Speckmann und Wittkowski, 1994).

Substanzen, die embryotoxische Effekte hervorrufen, gehören sehr verschiedenen Substanzklassen an und wirken über unterschiedliche Angriffspunkte. Es ist nur begrenzt möglich, anhand von chemischen Strukturanalysen auf ein embryotoxisches Potential zu schließen. Für viele Stoffklassen oder Einzelstoffe sind zwar typische Schädigungen und Missbildungen beschrieben, nur in wenigen Fällen ist jedoch die genaue Wirkungsweise aufgeklärt. Beispielsweise gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte Schäden durch die substanzbedingte Bildung von Sauerstoffradikalen hervorgerufen werden, z.B. bei Thalidomid und Phenytoin (Winn und Wells, 1995; Parman et al., 1999). Es können jedoch auch spezifische Wechselwirkungen zwischen der Substanz und zellulären Rezeptoren die Ursache sein, wie es bei den Retinoiden der Fall ist. Diese können während der Entwicklung durch Aktivierung des differentiell exprimierten Retinsäure-Rezeptor Veränderungen der Differenzierung von Zellen bewirken.

Mittlerweile sind viele Vorgänge der Embryonalentwicklung auf molekularer Ebene aufgeklärt. Trotzdem ist es im Einzelfall noch nicht bis ins Detail gelungen, die Substanzwirkung, die ein teratologisches Schadensbild zur Folge hat, auf spezifische molekulare Veränderungen zurückzuführen.

Der EST bietet die Möglichkeit, substanzbedingte Effekte, die zu einer Störung der embryonalen Differenzierung führen, mit Veränderungen der Genexpression zu korrelieren. Die grundlegende Annahme hierfür ist, dass die morphologische Differenzierung von Kardiomyozyten, die im EST von D3-Zellen durchlaufen wird, ein Ergebnis der in Höhe und Reihenfolge abgestimmten Expression entwicklungs- und herzmuskelspezifischer Gene darstellt. Verhindert die Behandlung mit einer Substanz das Auftreten von kontrahierenden Herzzellen, so kann demgemäß angenommen werden, dass im vorangegangenen Schritt eine Beeinträchtigung der normalen Genexpression hervorgerufen wurde.

3.9 Substanzauswahl

Die Substanzen, die in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von Effekten auf die Differenzierung und die Expression von Markergenen im ES-Zellmodell eingesetzt wurden, wurden vorwiegend auf der Basis der für die internationale ECVAM-Validierungsstudie zusammengestellten Datenbank ausgewählt (Brown, 2002). Diese Zusammenstellung berücksichtigt die vorhandenen Daten über eine Substanz in mehreren Bereichen: die Wirkung auf den Menschen, falls sie aus Studien bekannt ist, vorhandene Tierversuchsstudien und auch bisher durchgeführte *In-vitro*-Tests. Dies gewährleistete, dass genügend Daten über die Wirkung *in vivo* vorliegen, um die auftretenden Effekte im *In-vitro*-System einschätzen zu können. Zusätzlich ist es von Nutzen, für die Etablierung neuer Endpunkte auf molekularer Ebene auch Substanzen zu verwenden, die schon in anderen *In-vitro*-Studien eingesetzt wurden. Daraus ergibt sich eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit vorhandenen Daten anderer Studien. Zusätzlich wurden noch zwei Substanzen verwendet, für die zwar keine große Datenmenge vorlag, deren Wirkmechanismus jedoch von Interesse war (Staurosporin, Y27632).

Die ausgewählten Substanzen, die sich in ihrer Fähigkeit, embryotoxische Effekte auszulösen unterscheiden, sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die meisten Substanzen finden Anwendung als Pharmaka. Ausnahmen sind das Süßungsmittel Saccharin, Lithiumchlorid (wobei das Li-Ion in verschiedenen Salzen als Arzneimittel zugelassen ist), 6-Aminonikotinamid, das experimentell in der Tumorforschung eingesetzt wird, Y27632, das als Rho-Kinase-Inhibitor, und Staurosporin, das zur Apoptose-Induktion im Labor verwendet wird.

Tabelle 3: Liste der für Substanztests verwendeten Substanzen.

Testsubstanz	Abk.	CAS-Nr	embryotox. Potential	MW
5-Fluorouracil	5-FU	51-21-8	stark	130,1
all- <i>trans</i> -Retinsäure	RA	302-79-4	stark	300,4
Cytosinarabinosid	AraC	69-74-9	stark	279,7
6-Aminonikotinamid	6-AN	329-89-5	stark	137,1
Diphenylhydantoin	DPH	630-93-3	schwach	274,3
Lithiumchlorid	LiCl	7447-41-8	schwach	42,4
Valproinsäure	VPA	99-66-1	schwach	144,2
Dexamethason	Dex	50-02-2	schwach	392,5
D-(+)-Campher	Cam	464-49-3	nicht	152,2
Saccharin Natriumhydrat	Sac	82385-42-0	nicht	223,2
Penicillin G	Pen	69-57-8	nicht	356,4
Y27632	Y	146986-50-7	?	338,3
Staurosporin	STS	62996-74-1	?	466,5

3.9.1 *In vivo* stark embryotoxische Substanzen

Stark embryotoxische Substanzen zeichneten sich dadurch aus, dass sie in allen getesteten Spezies Entwicklungsstörungen hervorriefen und meist multiple Effekte erzeugten. Zudem wirkten sie in geringeren Konzentrationen fruchtschädigend als allgemein toxisch. Aus dem Verhältnis der niedrigsten Dosis mit erkennbarer schädlicher Wirkung (*Lowest observed adverse effect level*; LOAEL) auf den maternalen Organismus zum embryonalen LOAEL wird die A/D-Ratio (*adult/ developmental toxicity ratio*) berechnet: Stark embryotoxische Substanzen weisen eine A/D-Ratio größer 1 auf (Brown, 2002).

3.9.1.1 5-Fluorouracil (5-FU)

5-FU wird medizinisch hauptsächlich bei der Therapie und Palliativbehandlung fortgeschrittener Tumore, z.B. der Mamma, des Colons und des Magens, eingesetzt. Das in Position 5 fluorierte Uracil wird im Organismus zum Nukleotid umgewandelt und in die RNA, sowie nach Umwandlung zu 5-FdUTP in die DNA eingebaut. Die Hauptwirkung besteht jedoch in einer Hemmung der Thymidylatsynthetase, wodurch die Bereitstellung von Thymin für die DNA-Synthese verhindert wird (Parker und Cheng, 1990).

Embryotoxische Effekte in verschiedenen Spezies, wie z.B. Induktion von Polydaktylie und Gaumenspalten in verschiedenen Maus-Stämmen, sind schon seit den 60er Jahren untersucht worden (Dagg, 1960; Dagg, 1967; Shah und MacKay, 1978; Grafton et al., 1987). Es ist wahrscheinlich, dass die embryotoxischen Effekte durch dieselben Wirkmechanismen vermittelt werden, wie die pharmakologischen, wobei die Hemmung der DNA-Synthese besonders in schnellwachsenden Geweben zu einer Proliferationshemmung und über diesen Weg zu einer Veränderung der morphologischen Entwicklung führt (Shuey et al., 1994; Lau et al., 2001).

3.9.1.2 All-trans-Retinsäure (RA; Tretinoin)

All-*trans*-Retinsäure gehört zur Gruppe der Vitamin A-Derivate und wird im Organismus auch endogen aus Retinol gebildet. Auf molekularer Ebene ist RA der Ligand der Retinsäure-Rezeptoren (RAR; *retinoic acid receptors*), die zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren gehören. Im aktivierten Zustand (mit Ligand) dimerisieren RAR mit *retinoid X receptors* (RXR) und wirken im Zellkern als spezifische Transkriptionsfaktoren.

RA wirkt endogen im Embryo der Wirbeltiere als Morphogen, z.B. bei der Gliedmaßenentwicklung. Darauf u. a. beruht die stark teratogene Wirkung bei Zufuhr exogener Retinoide, die in Tierversuchen und beim Menschen bestätigt ist (Kochhar, 1967; Lammer et al., 1985). Fälle beim Menschen traten besonders bei der Behandlung von Frauen mit dem Akne-Medikament AccutanTM auf, welches das Isomer Isotretinoin (13-*cis*-Retinsäure) enthält, dessen teratogene Wirkung zumindest z. T. auf die Umwandlung zu RA zurückzuführen ist (Nau, 2001). Auswirkungen waren schwere Defekte kraniofazialer Strukturen und des Zentralnervensystems (z.B. Mikrozephalie), der Gliedmassen und auch des Herzens (Lammer et al., 1985).

3.9.1.3 Cytosinarabinosid (AraC; Cytarabin)

Bei Cytosinarabinosid handelt es sich um einen Pyrimidinantagonisten, der besonders in der Therapie verschiedener Leukämien Anwendung findet (Rote Liste, 2005). Neben dem Einbau als Triphosphat (CTP mit Arabinose statt Ribose als Zucker) in RNA und DNA übt AraC eine hemmende Wirkung auf die DNA-Polymerase aus (Cohen, 1977). Auch die Bildung von Desoxynukleotiden wird durch AraC gehemmt (Matsumoto et al., 1990).

Durch AraC hervorgerufene embryotoxische Wirkungen sind besonders die Induktion von Gaumenspalten und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (Chaube et al., 1968; Ortega et al., 1991).

3.9.1.4 6-Aminonikotinamid (6-AN)

6-AN erhöht die Aufnahme von Cisplatin in Tumorzellen (Budihardjo et al., 1998) und wurde daher als Bestandteil chemotherapeutischer Kombinationen in onkologischen Tierstudien verwendet (Stolfi et al., 1992; Colofiore et al., 1995; Nord et al., 1997; Budihardjo et al., 1998). Besonders im Gehirn ist die Wirkung dieser neurotoxisch wirksamen Substanz untersucht worden (Kauffman und Johnson, 1974; Tyson et al., 2000). Aus Tierversuchen an Maus und Ratte ist bekannt, dass 6-AN zum Auftreten von Gaumenspalten bei den Nachkommen führt (Karolyi et al., 1988; Diehl und Erickson, 1997; Erickson et al., 2005). Am Menschen sind für diese Substanz nur äußerliche Anwendungen zur Behandlung der Psoriasis veröffentlicht (Zackheim, 1975; Zackheim, 1978).

3.9.2 *In vivo* schwach embryotoxische Substanzen

Die Kategorie „schwach embryotoxisch“ enthält sehr unterschiedliche Substanzen, die weniger eindeutige embryotoxische Effekte zeigen, als die als stark embryotoxisch klassifizierten Stoffe. Es gehören dazu Substanzen, die in einigen, aber nicht allen getesteten Spezies multiple embryotoxische Effekte hervorriefen und eine A/D-Ratio größer 1 aufwiesen, und auch Substanzen, die Effekte hervorriefen, die sich deutlich von der maternalen Toxizität unterschieden, aber in ähnlichen Konzentrationsbereichen auftraten (Brown, 2002).

3.9.2.1 Diphenylhydantoin (DPH; Phenytoin)

DPH wird als Antikonvulsivum bei der Behandlung der Epilepsie eingesetzt. Das Antiepileptikum blockiert spannungsabhängige Natriumkanäle und ruft dadurch eine Membranstabilisierung hervor (Oberdisse et al., 2002). Beim Menschen sind auftretende teratogene Effekte durch langzeitige Einnahme von Diphenylhydantoin und Hydantoin in der Frühgravidität als Fetales Hydantoin-Syndrom beschrieben worden. Dazu zählen Fehlbildungen an Gesicht und Schädel sowie Gliedmaßendefekte, Minderwuchs, geistige Retardierung und z. T. Herzfehler (Hanson und Smith, 1976; Dansky und Finnell, 1991).

3.9.2.2 Lithiumchlorid (LiCl)

Lithiumionen werden in verschiedenen Salzen bei der Therapie und Prophylaxe manisch-depressiver Erkrankungen und endogener Depressionen eingesetzt (z.B. sind Lithiumhydrogenaspartat, -carbonat und -acetat in Deutschland in zugelassenen Arzneimitteln enthalten).

Zu den adversen Effekten, die auf Lithium zurückgeführt werden, gehören Missbildungen des Herzens (Shepard und Lemire, 2004). Daher war es von besonderem Interesse, die Wirkung von Lithium auf die Expression herzspezifischer Gene zu untersuchen.

3.9.2.3 Valproinsäure (VPA)

VPA gehört zu den wohl am besten untersuchten embryotoxischen Substanzen. Die antikonvulsive Wirkung dieses Antiepileptikums wird auf die Erhöhung der synaptischen GABA-Konzentration und die, ähnlich wie bei Diphenylhydantoin, auftretende Hemmung spannungsabhängiger Natriumkanäle zurückgeführt (Oberdisse et al., 2002).

Nach Einnahme von VPA im ersten Trimenon können charakteristische Missbildungen auftreten, die als Fetales Valproinsäure-Syndrom (FVS) zusammengefasst wurden (DiLiberti et al., 1984; Ardinger et al., 1988). Die häufigsten kongenitalen Fehlbildungen in Zusammenhang mit FVS beinhalten Neuralrohrdefekte (*neural tube defects*; NTDs), Herzmissbildungen und

Gesichtsspalten. Die Wahrscheinlichkeit für Neuralrohrdefekte (*Spina bifida*) in Feten VPA-einnehmender Mütter beträgt beim Menschen ca. 2-5% (Omtzigt et al., 1992; Alsdorf und Wyszynski, 2005). Die Induktion von Neuralrohrdefekten durch VPA-Behandlung ist intensiv in Tierversuchsstudien untersucht worden (Eluma et al., 1984; Ehlers et al., 1992a; Ehlers et al., 1992b; Menegola et al., 1996; Bojic et al., 1996).

3.9.2.4 Dexamethason (Dex)

Dexamethason stellt einen Vertreter der großen Gruppe der synthetischen Glucocorticoide dar. Glucocorticoide werden aufgrund ihrer antiphlogistischen, antiallergischen und immunsuppressiven Wirkung eingesetzt und spielen eine Rolle bei der Behandlung von Asthma, Rheuma und verschiedenen Autoimmunerkrankungen.

Schon früh ist eine erhöhende Wirkung von Hydrocortison auf die Bildung von Lippen- und Gaumenspalten gefunden worden (Fraser und Fainstat, 1951; Fraser et al., 1954), die auch andere Glucocorticoide zeigen.

3.9.3 *In vivo* nicht embryotoxische Substanzen

Diese Kategorie enthält Substanzen, die bei maternal toxischen Konzentrationen keine Embryotoxizität aufweisen oder in einem Maße, das nicht von der maternalen Toxizität zu trennen ist.

3.9.3.1 Campher (Cam)

Cam ist als Bestandteil von Hustensäften und Mottenkugeln ein altbekanntes Hausmittel. Es wird oft als Einreibemittel zur Verbesserung der Durchblutung der Haut verwendet. Es sind keine embryotoxischen Wirkungen beschrieben (Shepard und Lemire, 2004).

3.9.3.2 Saccharin (Sac)

Sac ist ein verbreitetes, kalorienfreies Süßungsmittel, dessen Süßkraft das 300-500fache des Haushaltszuckers beträgt. Es wird nicht metabolisiert und unverändert über die Niere wieder ausgeschieden. Sac weist keine Embryotoxizität auf (Brown, 2002; Shepard und Lemire, 2004).

3.9.3.3 Penicillin G (PenG)

Das β -Laktam-Antibiotikum Penicillin G verhindert das Bakterienwachstum und wirkt so gegen bakterielle Infektionen. Durch Inhibition der Peptidoglykansynthetasen wird die Zellwandsynthese von grampositiven Bakterien gestört. Da vergleichbare Enzyme im Säugerorganismus nicht vorhanden sind, weisen β -Lactam-Antibiotika kaum Toxizität für den

Menschen auf. PenG gehört zu den klassischen Vertretern der Antibiotika und gilt auch während der Schwangerschaft als sicheres Arzneimittel. Reproduktionstoxikologische Studien bei Tieren zeigten keine Risiken für die Feten (Shepard und Lemire, 2004).

3.9.4 *In vivo* nicht klassifizierte Substanzen

3.9.4.1 Y27632

Y27632 wurde als spezifischer Inhibitor der Rho-Kinasen p160ROCK und ROKa/Rho-kinase/ROCK-II gefunden (Uehata et al., 1997). Die Rho-Kinasen sind an unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt, unter anderem an der Regulation des Kontraktionszustands glatter Muskelzellen. Rho-Kinasen inhibieren die Myosin-Phosphatase in glatten Muskelzellen, die dafür sorgt, dass das Myosin dephosphoryliert wird und einen weniger Ca^{2+} -sensitiven Zustand annimmt. Bei Hemmung der Rho-Kinasen durch Y27632 verbleibt die Myosin-Phosphatase im aktiven Zustand. Dies führt zu einer verstärkten Entspannung glatter Muskelzellen, die einen Bestandteil der Blutgefäße bilden. Aufgrund dieses Effekts führt die Behandlung mit Rho-Kinase-Inhibitoren zu einer Dilatation von Blutgefäßen und wirkt im Hypertensionsmodell der Ratte blutdrucksenkend (Uehata et al., 1997). Ein anderer Rho-Kinase Inhibitor (Fasudil) wird für die Behandlung von myokardialer Ischämie eingesetzt (Hirooka und Shimokawa, 2005).

Für Y27632 sind in experimentellen Arbeiten adverse Effekte auf die Entwicklung des Herzens und des Nervensystems gezeigt worden (Wei et al., 2001).

3.9.4.2 Staurosporin (STS)

Bei STS handelt es sich um einen breit wirksamen Protein-Kinase-Inhibitor. STS induziert Apoptose in Mausembryonen in der Whole Embryo Culture (WEC), was auf ein mögliches embryotoxisches Potential der Substanz hinweist (Little und Mirkes, 2002). In WEC mit Rattenembryonen an Tag 9 der Entwicklung induzierten STS-Konzentrationen über $0,1 \mu\text{M}$ *Situs inversus* und Konzentrationen ab $0,5 \mu\text{M}$ zystenartige Läsionen am Mesenzephalon und die Bildung sekundärer Somiten (Fujinaga et al., 1994). In adulten Ratten bedingten Konzentrationen im Bereich von $0,1$ - $1,0 \text{ mg/kg}$ einen Blutdruckabfall, der bei Dosen von 5 und 10 mg/kg letal war (Secrest et al., 1991).

Es liegen zwar keine *In-vivo*-Daten vor, die ein embryotoxisches Potential belegen, jedoch ist es aufgrund der Eigenschaften sehr wahrscheinlich, dass STS differenzierungsspezifische Effekte hervorruft. STS wirkt schon in sehr geringen Konzentrationen inhibitorisch auf verschiedene

Proteinkinasen, besonders auf die Protein-Kinase C (PKC)-Isoenzyme (Tamaoki et al., 1986), die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind.

3.10 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Untersuchung sollte einen Beitrag zur Etablierung von Tierversuchsalternativen für die Testung von Substanzen auf ein embryotoxisches Potential leisten.

Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, welche Wirkung von Referenzsubstanzen mit bekanntem embryotoxischen Potential auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten ausgeht. Hierzu sollten geeignete Genexpressionsmarker gefunden werden, die die Veränderungen nach Substanzeinwirkung in differenzierenden murinen embryonalen Stammzellen anzeigen. Weiterhin sollte getestet werden, inwieweit diese molekularen Marker zur Prädiktion eines embryotoxischen Potentials eingesetzt werden können. Insbesondere sollten die molekularen Marker die Herzentwicklung repräsentieren, da die Kardiomyozytenentwicklung den validierten Endpunkt des Embryonalen Stammzelltests (EST) darstellt. Durch die Etablierung neuer Parameter sollte die Grundlage für die Prädiktion eines embryotoxischen Potentials von Testsubstanzen erweitert werden. Es sollte des Weiteren untersucht werden, inwieweit substanzspezifische Wirkmechanismen sich im gewählten *In-vitro*-Modell abbilden lassen.

Die Zielstellung wurde in folgenden Abschnitten bearbeitet:

1. Identifizierung von entwicklungsspezifischen Genen in differenzierenden D3-Zellen

Als erstes wurde die Expression von differenzierungsspezifischen Genen während der Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen zu Herzmuskelzellen untersucht. Als Modellsystem wurde die *In-vitro*-Differenzierung von D3-Zellen zu kontrahierenden Kardiomyozyten verwendet. Dabei wurde besonderes Gewicht auf Gene der frühen mesodermalen Entwicklung sowie auf herzmuskelspezifische Gene gelegt.

2. Erstellung von Expressionsprofilen geeigneter Gene

Die Höhe der Expression der als Marker für spätere Substanztests in Frage kommenden Gene wurde während der zehn Tage dauernden Entwicklung verfolgt und diente dazu, charakteristische Expressionsprofile für die *In-vitro*-Differenzierung zu erstellen.

3. Verwendung ausgewählter Markergene in Substanztestungen

Um eine Korrelation zwischen substanzbedingter Hemmung der Kardiomyozytendifferenzierung und der veränderten Expression herzspezifischer Gene experimentell nachzuweisen, wurden D3-

Zellen mit Substanzen behandelt, deren Wirkung aus reproduktionstoxikologischen Studien *in vivo* bekannt war. Als Parameter für eine gestörte Herzzelldifferenzierung dienten Veränderungen sowohl in der Expression der untersuchten Gene als auch im Auftreten von kontrahierenden Kardiomyozyten.

4. Vergleich molekularer und morphologischer Parameter

Die konzentrationsabhängig durch die getesteten Substanzen hervorgerufene Genexpressionsveränderung der ausgewählten Markergene wurde verglichen mit dem validierten Endpunkt der Kardiomyozytendifferenzierung.