

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, auf Genexpressionsebene die Wirkung von chemischen Substanzen mit bekanntem embryotoxischen Potential während der Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden molekulare Endpunkte etabliert, die mit dem validierten Endpunkt des konventionellen Embryonalen Stammzelltests (EST; Spielmann et al., 1997), bei dem die morphologische Differenzierung der Stammzellen mikroskopisch ausgewertet wird, verglichen wurden.

Zur Auswahl von geeigneten Markergenen wurde die Expression von 18 Genen während des zehntägigen Differenzierungszeitraums mit Hilfe der TaqMan-PCR quantitativ untersucht. Aus dieser Gruppe von Kandidaten wurden zwei als Expressionsmarker für die Herzzelldifferenzierung ausgewählt, um zu überprüfen, inwieweit sich die Wirkung von Substanzen mit bekanntem embryotoxischen Potential in Veränderungen der Genexpression widerspiegelt.

Ein Vergleich der molekularen Marker mit dem validierten Endpunkt des EST, der mikroskopischen Auswertung der Kardiomyozytenentwicklung (Spielmann et al., 1997; Genschow et al., 2002), diente dazu, aufzuklären, ob die molekularen Marker die Möglichkeiten des EST für die Prädiktion eines embryotoxischen Potentials von Testsubstanzen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und mechanistischer Erkenntnisse erweitern.

6.1 *In-vitro*-Kultivierung und Differenzierung von D3-Zellen

Zu Beginn der Arbeiten wurde die D3-Zellkultur im Labor etabliert und auf ihre Differenzierungsfähigkeit untersucht. In Anwesenheit von LIF blieben die kultivierten embryonalen Stammzellen der Linie D3 (Doetschman et al., 1985) pluripotent. Die Differenzierungsfähigkeit war das wichtigste Kriterium für die Eignung der D3-Zellen und wurde daher regelmäßig überprüft. Mittels Assaycheck wurde nach dem Auftauen eines neuen Zellaliquots bestätigt, dass reproduzierbar in großer Anzahl Kardiomyozyten gebildet wurden. Dies wurde zusätzlich in jedem durchgeführten Versuch durch die Kontrolle bestätigt, die als Validitätskriterium in mindestens 21 von 24 EBs schlagende Kardiomyozyten enthalten musste.

Der undifferenzierte Status der Zellkultur wurde weiterhin in einem indirekten Nachweis durch die Abwesenheit der Immunreaktion mit dem differenzierungsspezifischen Antikörper TROMA-1 belegt. Der Antikörper TROMA-1 erkennt das 55kD große, zytoplasmatische Cytokeratin K8 und wurde als Marker für Zellen des Trophektoderms isoliert (Bulet et al., 1980). Cytokeratin K8 wird in Blastozysten im Trophektoderm, jedoch nicht in der inneren

Zellmasse, und in Postimplantationsembryos im primitiven Endoderm und seinen Derivaten exprimiert, zu denen das viszerale und parietale Endoderm gehören (Kemler et al., 1981).

Mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie wurde nachgewiesen, dass TROMA-1 nur mit einem geringem Anteil von ca. 5% der Zellpopulation exprimiert wurde. Beide in der vorliegenden Arbeit geprüften D3-Zellchargen zeigten einen niedrigen Prozentsatz TROMA-1-positiver Zellen (zwischen 0,4 und 5,3% an Tag 0). In anderen Arbeiten sind ca. 2% TROMA-1-positiver Zellen in EBs an Tag 3 beschrieben worden (Toumadje et al., 2003). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei Kultivierung in Abwesenheit von LIF der Anteil TROMA-1-positiver Zellen zunahm (Abbildung 9, Seite 52).

Auch die Messung des Stammzellmarkers Oct4, der spezifisch in pluripotenten Zellen exprimiert wird, zeigte, dass die Expression in undifferenzierten Zellen und an den ersten Tagen der Differenzierung am höchsten war und im Laufe des untersuchten Zeitraums wie erwartet abnahm (Abbildung 31). Auf die Expression von Oct4 wird genauer in Punkt 6.2.3.4 eingegangen.

6.2 Genexpressionsprofile ausgewählter Gene der Herzmuskeldifferenzierung

6.2.1 Verwendung der GAPDH-Expression als interne Referenz

Die Auswahl des Referenzgens bildet einen kritischen Schritt bei der Etablierung einer RT-PCR-basierten Messmethode. Für die Bestimmung der Genexpressionsprofile wurde Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen verwendet. Das Produkt dieses *housekeeping*-Gens katalysiert die Umwandlung von Glyceraldehyd-3-phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat. Da dieser Schritt unverzichtbar für die Glykolyse ist, wird das GAPDH-Gen in allen Zellen des Körpers exprimiert.

GAPDH wird weit verbreitet als interner Standard angewendet. Während der spontanen Differenzierung embryonaler Stammzellen in EBs stellt GAPDH ein geeignetes Referenzgen dar, weil seine Expression relativ konstant bleibt (Murphy und Polak, 2002). Auch in Vergleichen mit verschiedenen anderen Referenzgenen hat sich die GAPDH-Expression unter sehr unterschiedlichen Bedingungen als stabil erwiesen, beispielsweise in der Entwicklung humaner Adipozyten (Gorzelnia et al., 2001), in primären Mausfibroblasten nach Stimulierung zur Zellteilung durch Serumzugabe (Edwards und Denhardt, 1985) und in einem Hypertrophie-Modell primärer Rattenkardiomyozyten (Winer et al., 1999).

Allerdings ist auch gezeigt worden, dass die GAPDH-Expression in bestimmten zellulären Systemen beeinflusst werden kann (Bustin, 2002). Effekte wurden z.B. nach Behandlung von embryonalen Herzmuskelzellen des Huhns mit Glucocorticoiden (Oikarinen et al., 1991), in

Abhängigkeit des Zellzyklusses in Fibroblastenzelllinien (Mansur et al., 1993) und in differenzierendem braunen Fettgewebe durch all-*trans*-Retinsäure und Insulin (Barroso et al., 1999) nachgewiesen. Mittlerweile ist bekannt, dass GAPDH an einer Vielzahl zellulärer Vorgänge beteiligt ist, und bei weitem nicht nur das „einfache“ Glykolyse-Gen darstellt (Sirover, 1999).

Bei der Verwendung von GAPDH als Referenzgen musste daher sichergestellt werden, dass es im untersuchten System keiner Regulation unterworfen ist, sondern ausreichend stabil exprimiert wird.

Während des zehntägigen untersuchten Differenzierungszeitraums von undifferenzierten Zellen bis zur Ausbildung von Kardiomyozyten zeigte die GAPDH-Expression keine gerichtete Veränderung des Verlaufs. Jedoch traten Schwankungen auf, die für einzelne Versuchszeitpunkte 3-4 C_T -Werte betragen (Abbildung 34, Seite 70). Dies entspricht Mengenunterschieden von Faktor 8-16 im Ansatz. Da es sich bei den in dargestellten Daten jedoch um Messwerte handelt, repräsentieren Schwankungen zum Teil eine methodische Variabilität und sind nicht notwendigerweise durch eine Veränderung der Zusammensetzung des RNA-Pools der Zellen begründet. Zu den Einflüssen gehören die Lyse der Proben, die RNA-Extraktion, die cDNA-Synthese sowie die TaqMan-PCR selbst. Effekte dieser Art wirken sich aber sowohl auf die Messung des Ziel- als auch des Referenzgens aus und werden durch die anschließend durchgeführte Normalisierung, bei der das Verhältnis beider Gene gebildet wird, eliminiert. Dies ist in Abbildung 48 an einem Beispiel gezeigt. Besonders an den Differenzierungstagen 6-10 sind Schwankungen der GAPDH- C_T -Werte zu sehen, die mit denen der Tbx5-Messung korrelieren. Die Differenz der Mittelwerte von Tbx5 und GAPDH (ΔC_T), die in delogarithmierter und normalisierter Form für die Erstellung des Expressionsprofils eingesetzt wird, ergibt dagegen eine fast kontinuierlich abfallende Kurve.

In den hier beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die GAPDH-Expression während der Differenzierung von ES-Zellen keine gerichtete Veränderung aufweist und daher als interne Referenz geeignet war.

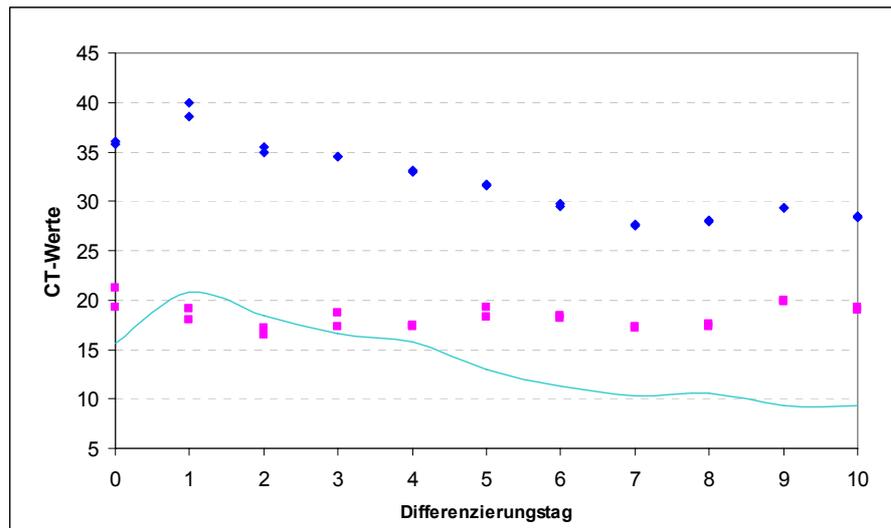


Abbildung 48 C_T -Werte eines Experiments mit Doppelwerten von Zielgen (Tbx5; blau) und Referenzen (GAPDH; magenta). Türkis: Differenz der Mittelwerte von Tbx5 und GAPDH (ΔC_T), die in delogarithmierter und normalisierter Form für die Erstellung des Expressionsprofils eingesetzt wird. Erklärung siehe Text.

6.2.2 Erstellung von Expressionsprofilen

Um einen detaillierten Einblick in die Veränderungen der Expression der Herzmuskelgene zu erhalten, wurden Profile erstellt, die an jedem Tag des Differenzierungszeitraumes einen Messpunkt enthielten.

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten wurden an verschiedenen Tagen Zellen angesetzt, die zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten isoliert wurden. Zum Teil ließ es sich nicht umgehen, unterschiedliche Zellen unterschiedlicher Aliquote einzusetzen. Aus den so erhaltenen Proben wurde cDNA hergestellt und diese wurde anschließend für TaqMan-Messungen zu vollständigen Profilen von Tag 1 bis Tag 10 zusammengestellt. Da es sich bei ES-Zellen während der Differenzierung jedoch um eine heterogene Zellpopulation handelt, können jedoch Unterschiede zwischen Passagen und unterschiedlichen Zellaliquoten bestehen. Daher ist die Schwankung zwischen unabhängig angesetzten Proben größer, als bei solchen, die aus derselben Zellpassage an einem Tag gemeinsam angesetzt und in laufender Folge täglich isoliert wurden.

Nachdem dieses Problem erkannt wurde, wurden zur Überprüfung nochmals Proben aus gemeinsamen Ansätzen fortlaufend isoliert. Diese späteren Versuche zeigten einerseits, dass ein solches Vorgehen vorteilhaft und deutlich weniger schwankungsbehaftet ist, sie bestätigten andererseits den Verlauf der zuvor generierten Expressionsprofile, der trotz der höheren Variabilität nicht grundsätzlich verändert wurde. Trotzdem sind in den meisten Abbildungen ein zusammengestelltes Profil nach der alten und zwei kontinuierliche Profile nach der neuen Methode gezeigt.

6.2.3 Expressionsprofile der ausgewählten Gene

Die Auswertung der in der vorliegenden Arbeit erstellten Expressionsprofile zeigte, dass die Expression der untersuchten Gene während der Kardiomyozytendifferenzierung aus embryonalen Stammzellen charakteristische Verläufe aufweist. Diese werden im Folgenden mit dem Genexpressionsmuster während der frühen Herzzellentwicklung *in vivo* und, falls vorhanden, *in vitro* verglichen.

Zur besseren Unterscheidbarkeit wurden zeitliche Angaben aus *In-vivo*-Versuchen mit „Embryonic day“ E angegeben, *In-vitro*-Versuche an ES-Zellen dagegen mit „Tag“ (der Differenzierung).

6.2.3.1 Komponenten des kontraktilen Apparats

Die Expression der am Aufbau des kontraktilen Apparats beteiligten Gene α -Actin, α -MHC, β -MHC, MLC2v und Troponin T stieg bis zum Ende des Differenzierungszeitraums deutlich an. Meist erfolgte der Anstieg zwischen Tag 4 und Tag 6 und hielt bis Tag 10 an. Die Expression der beiden Gene MLC1 und α -Actinin setzte an Tag 8 ein. Der Anstieg bis Tag 10 war bei beiden Genen schwach und betrug ca. Faktor 10. Der Anstieg der Expression fand in folgender Reihenfolge statt (gemessen an der Expressionssteigerung um Faktor 10 gegenüber Tag 0):

α -Actin (Tag 3), α -MHC, β -MHC und Troponin T (Tag 6), MLC2v (Tag 7) und MLC1 (zwischen Tag 7 und 8; Abbildung 17, Seite 58). α -Actinin lag an Tag 10 knapp unter dieser Marke.

Die Expression von β -MHC in einzelnen EBs konnte von Sanchez et al. bereits an Tag 3 während der ES-Zelldifferenzierung beobachtet werden, während die Expression von α -MHC erst an Tag 8 nachgewiesen wurde (Sanchez et al., 1991). Einen starken Anstieg zwischen Tag 5 und Tag 9 zeigten Daten von zur Nieden et al., wobei zwischen Tag 9 und 10 ein Rückgang der Expression von α - und β -MHC auftrat (zur Nieden et al., 2001).

In Untersuchungen von Hescheler et al. (1997) trat die Expression von α - und β -MHC während der Differenzierung von ES-Zellen an Tag 5 nach Ansetzen der EBs auf, während MLC2v einen langsamen Anstieg zwischen Tag 7 und Tag 12 zeigte. Diese Reihenfolge der Expression von α -MHC, β -MHC und MLC2v ergab sich auch in den vorliegenden Untersuchungen. Allerdings wurde mittels konventioneller RT-PCR bei Hescheler et al. (1997) keine Expression der Gene in undifferenzierten Zellen und an Tag 3 der Differenzierung festgestellt. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die höhere Sensitivität der in den hier gezeigten Versuchen verwendeten qRT-PCR gegenüber konventioneller RT-PCR zurückzuführen.

In vivo wurden Transkripte der herzmuskelspezifischen Gene ab Tag 7 der Embryonalentwicklung (E7) nachgewiesen. Expressionsdaten einiger Herzmuskelgene sind in Abbildung 49 zusammengestellt. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen stimmt überein, dass α -Actin zu einem etwas früheren Zeitpunkt gefunden wurde, als die anderen Gene. Jedoch wurden *in vivo* die MLC-Gene vor den MHC-Genen gefunden (Sassoon et al., 1988; Lyons et al., 1990b).

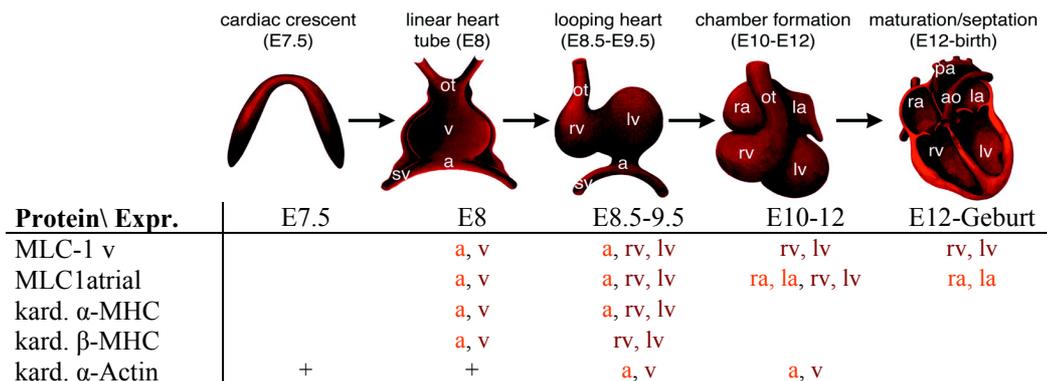


Abbildung 49 Expression von Herzmuskelgenen *in vivo*.

E: *embryonic day*, Tag der Embryonalentwicklung. +: vorhanden; (r/l) ot: *outflow tract*; (r/l) a: (rechtes/ linkes) Atrium; (r/l) v: (rechter/ linker) Ventrikel; ao: Aorta; sv: Sinus venosus; pa: Pulmonalarterie (Actin-Daten aus Sassoon et al., 1988; restliche Daten aus Lyons et al., 1990b; Graphik verändert nach Bruneau, 2002).

6.2.3.2 Entwicklungsspezifische Transkriptionsfaktoren

Das T-Box-Gen *Tbx5* zeigte in den in vorliegenden Untersuchungen einen sehr frühen, ca. hundertfachen Anstieg der Expression von Tag 4 bis Tag 6 mit anschließendem Plateau (Abbildung 25, Seite 64). Ein ähnlicher Verlauf mit einem Anstieg an Tag 4-6 wurde in ES-Zellen der Linie CGR8 mit einem Protokoll gefunden, bei dem die Zellen sechs Tage in den Tropfen verblieben und anschließend ausplattiert wurden (Hakuno et al., 2005).

In vivo wird *Tbx5* ebenfalls frühzeitig im präkardialen Mesoderm und später im Herzen exprimiert, wobei die Expression auf die Atrien und den linken Ventrikel beschränkt bleibt (Bruneau et al., 1999; Yamada et al., 2000). *Tbx5* interagiert mit *Nkx2-5* und wirkt als Aktivator für die Expression des atrialen natriuretischen Faktors (ANF) und des Gap-junction Proteins Connexin40 (Bruneau et al., 2001). Diese beiden Gene waren in *Tbx5*-haploinsuffizienten Embryonen stark herunterreguliert (Bruneau et al., 2001). Außerhalb des Herzens spielt *Tbx5* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der vorderen Extremitäten und des Auges (Rodriguez-Esteban et al., 1999; Koshiba-Takeuchi et al., 2000; Takeuchi et al., 2003a).

GATA-4 zeigte eine relativ schwache Induktion um den Faktor 10 an Tag 5-6, die bis zum Ende der Differenzierungsphase anhielt (Abbildung 25). *In vitro* ist das GATA-4-Protein bereits an Tag 5 der Differenzierung von EBs zu Kardiomyozyten nachgewiesen worden (Kawamura et al., 2005).

In vivo wird GATA-4 ab E7.0-7.5 in Herzvorläuferzellen exprimiert. Es wird während der Entwicklung im gesamten Herzen exprimiert und bleibt während der Lebenszeit des Organismus aktiv (Heikinheimo et al., 1994; Charron et al., 1999). GATA-4 ist zusammen mit den Transkriptionsfaktoren Nkx2-5, Tbx5, Mef2 und Hand2 an der Regulation verschiedener herzspezifischer Gene, wie ANF, α -MHC und α -Actin, beteiligt (Peterkin et al., 2005). Die genannten Transkriptionsfaktoren beeinflussen sich auch untereinander. So wurde z.B. in Hand2-Knockout-Embryonen eine starke Reduktion der GATA-4-Expression gemessen, während Nkx2-5 unverändert exprimiert wurde (Srivastava et al., 1997).

Myocardin zeigte in den Versuchen Anstiege ab Tag 5 bis Tag 10 und erreichte etwa an Tag 8 ein Plateau, das etwa hundertfach über der Expression in undifferenzierten Zellen lag (Abbildung 25).

In vivo wurden Myocardin-Transkripte ab E7.75 in präkardialen Strukturen gefunden (Wang et al., 2001). Die Expression blieb in Strukturen des Herzens bis ins adulte Stadium erhalten.

Myocardin ist ein interessantes Gen, weil es wahrscheinlich eine Schlüsselstellung in der Regulation von Genen des Herzmuskels und der glatten Muskulatur einnimmt. Die Promotoren von ANF, MLC2v und α -MHC sowie ein Nkx2-5-Enhancerelement werden durch Myocardin aktiviert (Wang et al., 2001). Dies geschieht durch Interaktion mit *Serum Response Factor* (SRF). Das MADS-Box-Protein SRF wird nicht muskelspezifisch exprimiert, ist jedoch beteiligt an der Regulation muskelspezifischer Gene und notwendig für die Herzentwicklung (Parlakian et al., 2004). Myocardin hat die Fähigkeit, sowohl die Histonacetyltransferase p300 als auch die Histonacetyldeacetylase HDAC5 zu rekrutieren, und ist damit wahrscheinlich in Abhängigkeit der in der Zelle aktiven Signalwege sowohl an Induktion als auch an Repression SRF-regulierter Gene beteiligt (Cao et al., 2005). Diese Wirkung wird auch durch den Transkriptionsfaktor GATA-4 beeinflusst, der die Myocardin-Aktivität moduliert (Oh et al., 2004). Die Expression von Myocardin wiederum wird u. a. von Nkx2-5 gesteuert (Ueyama et al., 2003).

Auch in den vorliegenden Ergebnissen begann der Anstieg der Myocardin-Expression vor dem der α -MHC- und der MLC2v-Expression (Abbildung 50). Durch die zum Teil großen Standardabweichungen stellt diese Aussage jedoch nur einen Trend dar.

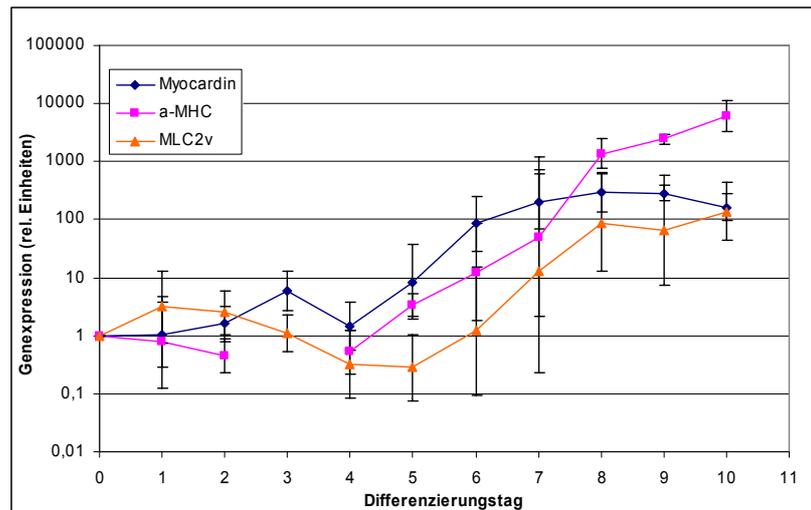


Abbildung 50 Expression von Myocardin und zweier durch Myocardin regulierter Gene. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung der Expressionsprofile.

Die Transkriptionsfaktoren MesP1 und MesP2 zeigten in den Expressionsmessungen den frühesten Anstieg mit einem Maximum an Tag 4-5, wobei die Expression von MesP1 stärker ausgeprägt war als MesP2.

In vivo ist eine Expression von MesP1 im Primitivstreifen und im entstehenden Mesoderm gefunden worden (Saga et al., 1996; Saga et al., 1999; Perea-Gomez et al., 1999). Die Expression nimmt in der Folge schnell ab und ist nach E 7,5 kaum noch zu messen (Saga et al., 1999). Die stärkste Expression findet *in vivo* zwischen E 6,5 und 7,5 statt. Eine spätere Expression tritt während der Somitogenese in präsomitischen Mesoderm auf.

Die Expression von MesP2 ist auch während der Gastrulation im Mesoderm nachweisbar, sie ist jedoch im Vergleich schwächer als MesP1 und wird schon etwas früher (nach E7.0) reprimiert (Kitajima et al., 2000). MesP2 spielt eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Segmentgrenzen während der Somitogenese (Nomura-Kitabayashi et al., 2002; Morimoto et al., 2005). Dieser Vorgang wird über die Regulation des Notch-Signalwegs reguliert (Saga, 1998; Morimoto et al., 2005).

Die in dieser Arbeit beschriebene *In-vitro*-Expression von MesP1 und 2 stimmt gut mit den *In-vivo*-Daten überein (vergleiche Abb. 20 und 21, Seite 60f). Die Expression beider Gene zeigte einen ähnlichen Verlauf mit einem zeitlich begrenzten Maximum an Tag 4-5, wobei, wie *in vivo*, die Expression von MesP1 deutlich stärker war als die von MesP2. Daten zur Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren in ES-Zellen lagen von anderen Autoren nicht vor.

Die beiden ventrikelspezifischen bHLH-Transkriptionsfaktoren Hand1 und Hand2 stiegen in den Experimenten bis Tag 6 sehr stark an und blieben bis Tag 10 stark exprimiert (Abbildung 27, Seite 64).

In vivo wird Hand1 während der Embryogenese im Herzen, im extraembryonalen Membranen und in Derivaten der Neuralleistenzellen exprimiert (Cserjesi et al., 1995). Hand2 wird an E 7,5 zunächst im mütterlichen Gewebe (der Dezidua), aber nicht in embryonalen oder extraembryonalen Geweben gefunden. Die embryonale Expression beginnt an E 7,75 im lateralen Mesoderm, ist an E 8,5 im Herzen, besonders im Bulbus cordis und Truncus aorticus zu beobachten, wird dann, ähnlich wie Hand1, hauptsächlich in Derivaten der Neuralleiste, wie dem Truncus sympathicus und dem Nebennierenmark, gefunden und verschwindet schließlich nach Tag 16 ganz (Srivastava et al., 1995).

In der Phase der Herzschleifenbildung (E 8-9 in der Maus) sind beide Gene differenziell exprimiert, wobei Hand1 im künftigen linken und Hand2 im rechten Ventrikel exprimiert werden (Srivastava et al., 1997).

Die *in vitro* hier gefundene Expression stimmt gut mit der Tatsache überein, dass Hand1 und 2 erst zu einer etwas späteren Phase der Herzentwicklung eine Rolle spielen. Daten aus anderen Arbeiten zur Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren in ES-Zellen lagen nicht vor.

6.2.3.3 Wachstumsfaktoren und Cytokine

Der untersuchte Wachstumsfaktor Cripto-1 zeigte in den ersten 5 Tagen der Differenzierung eine gleich bleibende Expression. Ab Tag 5 wurde ein Absinken der Transkription registriert. An Tag 10 waren noch ca. 1% der ursprünglichen Expression vorhanden.

In vivo wurde die früheste Expression von Cripto-1 bereits vor der Gastrulation in Trophoblast und innerer Zellmasse an Tag 4 der Embryonalentwicklung nachgewiesen (Johnson et al., 1994). Cripto-1 spielt in diesem frühen Stadium eine Rolle bei der Festlegung der anterior/posterioren Achse (Ding et al., 1998). In späteren Stadien findet sich Cripto-1 jedoch auf das Herz beschränkt (Dono et al., 1993; Johnson et al., 1994). Der hier *in vitro* gezeigte Verlauf deckt sich demnach mit der *In-vivo*-Situation, wonach die Cripto-1-Expression zwar für die Herzentwicklung notwendig ist, aber trotzdem eine zunehmende Beschränkung von einer breiten Expression auf bestimmte Zelltypen erfolgt (Johnson et al., 1994).

Das Cripto-1-Protein wurde in ES-Zellen der Linie R1 in einem vergleichbaren Zeitrahmen bis Tag 5 der Differenzierung nachgewiesen, wobei ein Peak an Tag 4 auftrat (Parisi et al., 2003). Auch in ES-Zellen ist der Wachstumsfaktor für die Kardiomyozytenbildung notwendig; so

verlieren Cripto-1-defiziente ES-Zellen die Fähigkeit, Kardiomyozyten zu bilden, während die Zugabe von rekombinantem Cripto-1-Protein zu einem frühen Zeitpunkt der Differenzierung geeignet ist, die Kardiomyozytendifferenzierung wiederherzustellen (Xu et al., 1998).

Das Cytokin Cardiotrophin-1 (Ct-1) gehört zur IL-6-Familie, zu der u. a. auch *Leukaemia inhibitory factor* (LIF) gehört. Mitglieder dieser Familie haben Einfluss auf die Differenzierung und das Wachstum verschiedener Zelltypen. Ct-1 wurde aufgrund seiner Eigenschaft entdeckt, eine Hypertrophie von Kardiomyozyten zu induzieren (Pennica et al., 1995). Während der Entwicklung fördert Ct-1 *in vivo* jedoch auch das Überleben von Kardiomyozyten (Sheng et al., 1996).

Die mRNA von Ct-1 konnte in dieser Arbeit in allen Differenzierungstagen nachgewiesen werden. Eine Veränderung der Genexpression gegenüber Tag 0 wurde während der zehntägigen Differenzierung jedoch nicht festgestellt.

Die Messung der relativen Menge an Ct-1-Protein in EBs von Tag 2 bis 8 mittels Immunfluoreszenz von Sauer et al. ergab eine Erhöhung zwischen Tag 2 und Tag 5 um Faktor 2, die bis Tag 8 anhielt (Sauer et al., 2004). Die eigenen Ergebnisse zeigen auf Genexpressionsebene keinen Trend zu einer Erhöhung in der zweiten Hälfte der Differenzierung. In der Maus wurde das Protein Ct-1 an Tag 8.5 der Embryonalentwicklung spezifisch im Herzschauch nachgewiesen und zusätzlich in plazentalem Gewebe (Sheng et al., 1996). In späteren Stadien wurde die Expression zunehmend auch in anderen Geweben, wie dem peripheren Nervensystem, Knorpel und Skelettmuskel gefunden (Sheng et al., 1996).

6.2.3.4 Messung der nicht-herzspezifischen Gene

Die beiden Gene Octamer binding Protein 4 (Oct4) und Neurofilament-light (NF-L) wurden ausgewählt, um Vorgänge zu untersuchen, die nicht mit der Kardiomyozytenentwicklung in Zusammenhang stehen. Zum einen wurde die Expression von Oct4 untersucht, dessen Expression mit der Pluripotenz embryonaler Stammzellen korreliert, und zum anderen wurde NF-L ausgewählt, das für neuronale Zellen spezifisch ist und während der Herzzelldifferenzierung nicht exprimiert werden sollte.

Oct4 zeigte eine abfallenden Expression während des Differenzierungszeitraumes. Innerhalb der ersten 6 Tage erfolgte eine Reduktion der relativen Transkriptmenge auf ca. 10%, nach 10 Tagen betrug sie ca. 1%.

Embryonale Stammzellen *in vitro* sind Oct4-positiv und verlieren diese Eigenschaft sukzessive, sobald die Differenzierung einsetzt (Niwa et al., 2000; Toumadje et al., 2003). In EBs, die sich in Abwesenheit von LIF und ohne Feeder-Zellen aus D3-Zellen spontan bildeten, fanden Toumadje et al. (2003) an Tag 3 mittels Durchflusszytometrie 86% Oct-4-positive Zellen, deren Anzahl mit fortschreitender Differenzierung abnahm. An Tag 7 enthielten noch 65% der Zellen Oct4-Protein. Dieser Anteil reduzierte sich auf ca. 2% bis Tag 21. Kürzlich wurden mittels konventioneller RT-PCR gemessene Daten veröffentlicht, die auf Transkriptionsebene einen Abfall der Oct4-Expression in ES-Zellen während der Differenzierung um ca. 80% nach 7 Tagen zeigten (Adler et al., 2006). Dies stimmt sehr gut mit den eigenen Messungen überein.

Oct4 ist ein Regulator für den Erhalt der Pluripotenz von Zellen. Oct4 wird in den Gameten, in der Zygote, in allen Zellen der frühen Embryonalstadien bis zur Blastozyste, dann in der Inneren Zellmasse, die das Ausgangsmaterial für die Etablierung von ES-Zellen darstellt und später nur noch in den primordialen Keimzellen exprimiert (Scholer et al., 1990; Nichols et al., 1998). Oct4-defiziente Embryonen entwickeln sich bis zum Blastozystenstadium, enthalten aber keine pluripotente innere Zellmasse. Stattdessen werden nur trophektodermale Zellen ausgebildet (Nichols et al., 1998).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigen zudem, dass die Etablierung der ES-Zellkultur im Hinblick auf die Pluripotenz der Zellen stabil erfolgt war und die D3-Zellen ihren pluripotenten Status erst während der Differenzierung verloren. Dies steht in Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen der TROMA-1-Färbung.

NF-L gehört zu den neuronenspezifischen Intermediärfilamenten, die am Aufbau des axonalen Zytoskeletts beteiligt sind. Typischerweise werden Triplets aus 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). In der Ratte wurde die erste Expression an E12 nachgewiesen, in der Maus wurde NF-L auch an E10.5 nachgewiesen (Carden et al., 1987; White et al., 2003).

Da während des untersuchten Differenzierungszeitraumes keine neuronale Differenzierung zu erwarten war, diente NF-L als Negativ-Kontrolle, die keine Veränderung zeigen sollte. Tatsächlich ließ sich keine eindeutige Veränderung der Expression von NF-L finden. Jedoch wurde ein spezifisches Signal an jedem Differenzierungstag nachgewiesen. Dies entspricht der Tatsache, dass eine geringe Expression der meisten untersuchten Gene in diesem Versuchsaufbau schon in undifferenzierten und frühen differenzierenden D3-Zellen nachgewiesen werden konnte.

6.2.4 Abschließende Diskussion der Expressionsprofile

Mit der Messung der herz- und entwicklungsspezifischen Gene konnten verschiedene Facetten der kardialen Entwicklung nachvollzogen werden. Dabei wurden zeitliche Abläufe gemessen, die z. T. vergleichbar während der *In-vitro*-Differenzierung in ES-Zellen gefunden wurden und die gut mit *In-vivo*-Daten der Entwicklung der Maus übereinstimmen. Transkriptionsfaktoren, die für die Aktivierung der herzspezifischen Gene notwendig sind, zeigten generell einen früheren Anstieg ihrer Transkripte als die eigentlichen Struktur gebenden Gene der kontraktilen Zellen und erreichten meist geringere absolute Expressionshöhen. Die Herzmuskelgene des kontraktilen Apparats wurden in übereinstimmender Weise am Ende des Differenzierungszeitraumes am stärksten exprimiert.

In allen Fällen konnte eine Expression der Gene in undifferenzierten Zellen an Tag 0 nachgewiesen werden, auch wenn sie an den Tagen 1-3 abnahm oder nicht mehr messbar war (wie bei α -MHC). In der Literatur weisen mit konventioneller RT-PCR durchgeführte Expressionsmessungen in undifferenzierten ES-Zellen meist keine transkriptspezifische Bande auf (z.B. Hescheler, 1997). Das deutet darauf hin, dass möglicherweise ein geringer Anteil differenzierter Zellen in der Kultur vorhanden war, so dass mit der sehr sensitiven Methode der qRT-PCR ein Signal erfasst wurde. Einer Verunreinigung mit genomischer DNA wurde durch einen routinemäßigen DNase-Verdau bei der Probenaufarbeitung vorgebeugt, so dass dies als Fehlerquelle ausgeschlossen werden kann.

6.3 Untersuchungen mit Referenzsubstanzen

6.3.1 Auswahl potentieller Markergene anhand der Expressionsprofile

Die endgültige Auswahl von Markergenen für die Erfassung embryotoxischer Effekte sollte die folgenden Kriterien erfüllen:

1. Die Expression musste innerhalb des Testsystems der Herzmuskelentwicklung messbar sein.
2. Im zeitlichen Verlauf der Differenzierung sollte die Expression markante Veränderungen aufweisen.
3. Eine Veränderung der Expression des Gens musste nach Behandlung der Zellen mit embryotoxischen Referenzsubstanzen messbar sein, was durch Untersuchungen mit Referenzsubstanzen zu überprüfen war.

Die ersten zwei Kriterien wurden herangezogen, um anhand der unter 5.2 beschriebenen Expressionsprofile Kandidatengene auszuwählen, mittels derer der Einfluss embryotoxischer

Substanzen überprüft wurde. Dabei sollte sich unter den Kandidaten zum einen ein Gen befinden, das möglichst früh in der Entwicklung exprimiert wurde, um schon zu einem frühen Zeitpunkt eine Genexpressionsveränderung zu detektieren, und zum anderen ein Herzmuskelgen, das zum Zeitpunkt der morphologisch sichtbaren Differenzierung exprimiert wird, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit mit dem mikroskopischen Endpunkt zu erreichen.

Für eine Überprüfung des dritten Kriteriums wurden MesP1 und MLC1 als Markergene ausgewählt.

MesP1 zeigte in den Expressionsprofilen eine starke Expression schon an Tag 5, die in den folgenden Tagen wieder absank. Dieser so markante Verlauf eignete sich dazu, auftretende Änderungen gut darzustellen. Auch MesP2 zeigte an Tag 5 einen Anstieg der Genexpression, die Messwerte lagen jedoch niedriger. Die Transkriptionsfaktoren Hand1 und Hand2 zeigten Anstiege an Tag 6 und sollten als Ausweichkandidaten dienen, wenn sich MesP1 als nicht sensitiv erwiesen hätte. In den folgenden Substanztestungen wurde die MesP1-Expression an Tag 5 gemessen, um zu untersuchen, ob schon zu diesem frühen Zeitpunkt Effekte reproduzierbar festzustellen sind.

MLC1 gehört zu den Genen, die für den Aufbau von Herzmuskelzellen notwendig sind. Das Expressionsprofil zeigte einen Anstieg von Tag 7 bis Tag 10. Die Messung erfolgte daher einerseits an Tag 7, um auch in diesen Genen möglichst früh eine Veränderung im Expressionsmuster zu detektieren, andererseits an Tag 10, um eine direkte Korrelation der Expression mit der mikroskopischen Auswertung zu ermöglichen. Andere Gene des kontraktilen Apparats zeigten im Expressionsprofil einen ähnlichen Verlauf und kamen als Ausweichkandidaten in Betracht.

In den ersten Substanztests wurde zusätzlich die Expression von α -MHC gemessen, dessen Expressionsprofil einen sehr starken Anstieg zeigte. Jedoch ergab die Messung von α -MHC nach Substanzbehandlung große Schwankungen (Daten nicht gezeigt). Da die MLC1-Messungen geringere Schwankungen aufwiesen und im Verlauf übereinstimmten, wurden die weiteren Testungen nur mit MLC1 vorgenommen.

6.3.2 Untersuchungen der ausgewählten Substanzen

Jede Substanz wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten getestet. Die vier untersuchten Endpunkte waren die mikroskopische Auswertung an Tag 10 der Differenzierung, die Messung von MesP1 in Proben von Tag 5 sowie die Messung von MLC1 in Proben von Tag 7 und Tag 10 der Differenzierung.

Die resultierenden ID_{50} -Werte der mikroskopischen Auswertung, sowie die $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte der Genexpressionsmessungen sind in Tabelle 8 (Seite 88) dargestellt. Eine Abstufung der Wirksamkeit der Substanzen von den bekannten als nicht embryotoxisch klassifizierten Substanzen, die die höchsten ID_{50} - und $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte aufwiesen, bis zu den stark embryotoxischen Substanzen, die in den niedrigsten Konzentrationen toxische Effekte hervorriefen, war deutlich zu sehen.

Mit einer rangbasierten statistischen Methode (Friedman-Test) wurden die Ergebnisse zusammenfassend quantifiziert, um mögliche Unterschiede zwischen den Endpunkten zu erfassen. Da eine Auswertung der einzelnen Substanzen durch die geringe Anzahl an Wiederholungen nicht zweckmäßig war, wurde mit einem rangbasierten Varianzanalyseverfahren für wiederholte Messungen eine Abschätzung zum Vergleich der Sensitivität der vier Endpunkte vorgenommen. Die Auswertung umfasste 21 der 40 Experimente, in denen allen vier Endpunkten ein Rang zugeordnet werden konnte. Unter ihnen befanden sich Tests mit 9 der 13 Substanzen.

In diesem Kollektiv trat kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der vier Endpunkte auf. Dies weist darauf hin, dass die molekularen Marker dem konventionellen Endpunkt der mikroskopischen Auswertung äquivalent sind, wie es auch durch die Ergebnisse des Prädiktionsmodells gezeigt wurde.

Es ist jedoch offensichtlich, dass eine solche Auswertung in diesem Stadium nur eine vorläufige Aussage erlaubt. Zudem konnten Tests mit Cam, RA, Y27632 und STS nicht einbezogen werden, da keine Experimente vorlagen, in den allen 4 Endpunkten ein Rang zugeordnet werden konnte. Gerade in den Tests mit RA, Cam und STS traten jedoch Unterschiede im Verlauf der Konzentrationswirkungskurven auf. Für eine detailliertere, aussagekräftigere Auswertung müssten in weiteren Untersuchungen mehr Wiederholungen durchgeführt werden, so dass jede Substanz einzeln bewertet werden kann.

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse der einzelnen Substanztests eingegangen.

6.3.2.1 *In vivo* stark embryotoxische Substanzen

6.3.2.1.1 *5-Fluorouracil (5-FU)*

Da die zytotoxische Wirkung von 5-FU in der Zellkultur in ähnlichen Konzentrationsbereichen auftrat wie die Differenzierungsinhibierung, war es schwierig, bei höheren Konzentrationen genügend RNA zu isolieren. Die Größe der EBs nahm unter 5-FU-Behandlung stark ab, und um bei Konzentrationen von 0,06 und 0,07 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU noch RNA isolieren zu können, mussten

deutlich mehr Tropfenschalen an Tag 0 angesetzt werden, als die standardmäßig notwendige Anzahl (ca. 70 Tropfenplatten statt ca. 50 für einen vollständigen Test mit allen vier Endpunkten).

Die in den gezeigten Konzentrations-Wirkungskurven bestimmten ID_{50} - bzw. $IC_{50\text{ Exp}}$ -Werte lagen in einem Bereich von 0,05-0,07 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU (Abbildung 35, Seite 74). Diese Werte stimmen gut mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die Halbhemmkonzentrationen der Kardiomyozytendifferenzierung von 0,009 $\mu\text{g/ml}$ (zur Nieden et al., 2004) bis 0,052 (Seiler et al., 2004) ergaben.

Nach Behandlung mit 5-FU wurde in mehreren Fällen eine konzentrationsabhängige Induktion der Genexpression bis 0,05 $\mu\text{g/ml}$ gemessen. Dies ist wahrscheinlich darin begründet, dass die Zytotoxizität von 5-FU ab einer Konzentration von 0,03 $\mu\text{g/ml}$ zu einer Größenabnahme der EBs führt, während auch in den Proben von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU noch 100% der EBs kontrahierende Bereiche enthielten. In Verbindung mit der Beobachtung, dass nach 5-FU-Behandlung die schlagenden Areale in den nicht oder kaum durch Zytotoxizität betroffenen Konzentrationen von 0,02 -0,03 $\mu\text{g/ml}$ erhöht schienen, ergibt sich der Schluss, dass sich der relative Anteil der Herzmuskelzellen in den zunehmend kleiner werdenden EBs erhöhte, sodass auch der relative Anteil herzmuskelspezifischer Transkripte an der Gesamt-cDNA anstieg.

Dieser Befund deckt sich damit, dass 5-FU hauptsächlich über eine Hemmung der DNA-Synthese wirkt. Durch diese werden insbesondere proliferierende Zellen geschädigt, während differenzierende Zellen wahrscheinlich im Verhältnis weniger stark betroffen sind.

6.3.2.1.2 All-trans-Retinsäure (RA)

RA hat in undifferenzierten embryonalen Stammzellen eine ausgeprägte induktive Wirkung auf die Entwicklung neuronaler Zelltypen, während gleichzeitig die Kardiomyozytendifferenzierung gehemmt wird (Rohwedel et al., 1999; Glaser und Brustle, 2005). Werden jedoch ES-Zellen, die sich bereits differenzieren, ab Tag 5 mit RA behandelt, kommt es zu einer Induktion der Kardiomyozytendifferenzierung (Wobus et al., 1997; Rohwedel et al., 1999).

Bei der Auswertung von Substanztests mit RA trat in der mikroskopischen Auswertung der ungewöhnliche Effekt auf, dass es bei mittleren Konzentrationen (ab 0,05 ng/ml ; ca. 0,2 nM) zu einer Verringerung von EBs mit Kardiomyozyten kam, eine Erhöhung der RA-Konzentration jedoch führte im Bereich von Konzentrationen oberhalb 0,5 ng/ml (ca. 2 nM) wieder zu einer Zunahme (Abbildung 36, Seite 74). In Experiment 1 traten bei der höchsten getesteten Konzentration von 14 ng/ml wieder in fast ebenso vielen EBs Kardiomyozyten auf, wie in der Kontrolle (in 22 von 24 EBs). Dieser Kurvenverlauf ließ sich bei der Expression von MLC1 an

Tag 10 nachvollziehen, während MesP1 an Tag 5 und MLC1 an Tag 7 ab Konzentrationen von 0,02 ng/ml (ca. 0,07 nM) RA deutlich reprimiert wurde.

Der Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven der verschiedenen Endpunkte zeigt, dass die Wirkung von RA im untersuchten System eine zeit- und konzentrationsabhängige Komponente besaß. Mittlere bis hohe Konzentrationen führten in den frühen Differenzierungsstadien zu einer vollständigen Hemmung der Expression von MesP1 und MLC1. Da RA eine geringere Zytotoxizität aufweist, starben diese Zellen jedoch nicht ab, sondern entwickelten sich weiter. Unter dem Einfluss hoher RA-Konzentrationen veränderte sich der Differenzierungsverlauf. Es trat eine Induktion der Kardiomyozytendifferenzierung auf, wie sie nach Behandlung differenzierender ES-Zellen ab Tag 5 mit 1 nM bis 10 nM RA beobachtet wurde (Wobus et al., 1997; Rohwedel et al., 1999). Der zweite Anstieg in den eigenen Untersuchungen trat im selben Konzentrationsbereich ab einer Konzentration von ca. 2 nM (0,5 µg/ml) RA auf.

Die vorliegenden Daten decken sich nicht mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, in denen die Untersuchung schlagender Kardiomyozyten keinen Anstieg bei höheren Konzentrationen zeigte (Scholz et al., 1999; Seiler et al., 2004; zur Nieden et al., 2004). Die in diesen Arbeiten angegebenen ID₅₀-Werte lagen im Bereich von 0,1-0,4 ng/ml. Der Mittelwert der sechs in den vorliegenden Tests bestimmten IC_{50 Exp}-Werte von MesP1 an Tag 5 und MLC1 an Tag 7 lag mit 0,06 +/-0,027 ng/ml niedriger.

Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der beobachtete Effekt auf die Differenzierung auf einen Zerfall von RA durch Lichteinwirkung im Labor zurückzuführen ist, da wegen der bekannten Lichtempfindlichkeit von RA bei der Laborarbeit darauf geachtet wurde, Ansätze, die RA enthalten, nur möglichst kurz dem Licht auszusetzen. Lösungen mit RA wurden zudem immer in dunklen Reaktionsgefäßen gelagert. Es wurden auch Versuche mit unterschiedlichen Chargen der Substanz durchgeführt, um auszuschließen, dass eine beeinträchtigte Substanzcharge den aufgetretenen Effekt verursachte. Die Bildung von Kardiomyozyten trat daher offensichtlich trotz der Behandlung mit RA auf und wurde nicht durch eine schlechte Wirksamkeit oder Fehlbehandlung hervorgerufen.

6.3.2.1.3 Cytosinarabinosid (AraC)

Die drei durchgeführten Substanztests mit AraC ergaben bei der mikroskopischen Auswertung ID₅₀-Werte, die in einem sehr engen Bereich zwischen 0,02 und 0,07 µg/ml lagen (Abbildung 37, Seite 76). Die aus den Messungen der Genexpression resultierenden IC_{50 Exp}-Werte zeigten eine sehr hohe Übereinstimmung sowohl zwischen den einzelnen Wiederholungen wie auch im Verhältnis zur mikroskopischen Auswertung.

Die Werte sind in guter Übereinstimmung mit Daten der ZEBET sowohl aus der Anfangsphase des EST, in denen der mittlere ID₅₀-Wert bei 0,029 µg/ml lag (Spielmann et al., 1997) als auch aus der Prävalidierung, in der sich ein Wert von 0,049 µg/ml ergab (Scholz et al., 1999). In der Prävalidierung wurde die Substanz auch vom ECVAM getestet, wobei sich jedoch ein mittlerer ID₅₀-Wert von 0,006 µg/ml ergab, der deutlich niedriger lag, als die hier gefundenen (Scholz et al., 1999).

6.3.2.1.4 6-Aminonikotinamid (6-AN)

6-AN ist ein Pyridinnukleotid-Derivat, das als NADP-Analogon wirkt und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase des Pentose-Phosphat-Wegs inhibiert (Kohler et al., 1970; Street et al., 1997).

Alle Tests mit 6-AN ergaben gute Übereinstimmungen der vier getesteten Endpunkte (Abbildung 38, Seite 76). Die mittleren ID₅₀- und IC_{50 Exp}-Werte lagen für die mikroskopische Auswertung und für die Messung von MesP1 bei 0,9 µg/ml, für MLC1 ergaben sich an Tag 7 0,8 und an Tag 10 1,05 µg/ml.

Für die mikroskopische Auswertung wurden in der Validierungsstudie des EST in vier Laboratorien mit den hier ermittelten Daten übereinstimmende Werte zwischen 0,6 und 1,5 µg/ml 6-AN gefunden (Genschow et al., 2004).

6.3.2.2 In vivo schwach embryotoxische Substanzen

6.3.2.2.1 Diphenylhydantoin (DPH)

Bei den mit DPH durchgeführten Substanztestungen konnten für alle Endpunkte recht gut übereinstimmende ID₅₀- und IC_{50 Exp}-Werte gefunden werden. (ID₅₀: 26,3 µg/ml +/-12,1; IC_{50 Exp} von MesP1: 42,7 µg/ml +/-22,1; IC_{50 Exp} von MLC1 an Tag 7: 28,0 µg/ml +/-6,1; IC_{50 Exp} von MLC1 an Tag 10: 38,0 µg/ml +/-7,0).

In der Literatur sind Werte beschrieben, die mit diesen gut übereinstimmen: 20,0 µg/ml während der Etablierung (Spielmann et al., 1997) und 25,7 µg/ml in der Prävalidierung des EST (Scholz et al., 1999) gegenüber 17 µg/ml von zur Nieden et. al. (zur Nieden et al., 2004). Somit wurden sowohl in verschiedenen Arbeitsgruppen als auch mit den verschiedenen hier angewendeten Endpunkten halbmaximale Effekte von DPH in sehr gut übereinstimmenden Konzentrationsbereichen nachgewiesen.

6.3.2.2.2 Lithiumchlorid (LiCl)

Die halbmaximale Inhibition der Differenzierung trat bei der Testung von LiCl bei ca. 300 µg/ml auf. Die Messung der Genexpression in den drei durchgeführten Tests führte zu z. T. variablen

Kurvenverläufen, die teilweise voneinander abweichende $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte ergaben. Die Mittelwerte lagen im Bereich von 150-350 $\mu\text{g/ml}$ LiCl. Diese Werte stimmen gut mit den Ergebnissen der Validierungsstudie des EST überein, in der in vier Laboratorien mikroskopische ID_{50} -Werte von 80-280 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt wurden (Genschow et al., 2004).

LiCl hat einen Einfluss auf die Expression für die Herzmuskelentwicklung wichtiger Gene in ES-Zellen (Pellizzer et al., 2004). So führte eine Behandlung mit LiCl während der EB-Differenzierung zu einer Verringerung der Nkx2-5-Expression, während gleichzeitig die Expression von α -MHC zu einem früheren Zeitpunkt beobachtet wurde. Die α -MHC-Expression lag allerdings an Tag 8 und 10 niedriger als in den Kontrollen (Pellizzer et al., 2004). Solche Befunde tragen dazu bei, den Mechanismus aufzuklären, der zu Herzmissbildungen durch Einwirkung von LiCl führen kann. In den eigenen Versuchen konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Expression von MesP1 und MLC1 durch LiCl festgestellt werden. Untersuchungen der Expression nicht-herzspezifischer Gene unter Lithium-Einfluss könnten weiterhin dazu beitragen, zu klären, ob eine Inhibierung der Genexpression besonders stark während der mesodermalen Differenzierung auftritt.

6.3.2.2.3 Valproinsäure (VPA)

Das Antiepileptikum VPA, das während der embryonalen Entwicklung Neuralrohrdefekte hervorrufen kann, wirkt *in vitro* induzierend auf Differenzierungsprozesse, z.B. in EC-Zellen (*embryonic carcinoma cells*) der Linie F9 (Werling et al., 2001). Eine Hypothese zum Wirkmechanismus betrifft die Beeinflussung der Expression verschiedener Gene. *In-vitro*-Untersuchungen haben ergeben, dass eine Aktivierung des PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) an der VPA-abhängigen Induktion der Differenzierung bestimmter Zelllinien beteiligt ist (Werling et al., 2001). Da dieser Effekt nur durch VPA selbst und Derivate der VPA ausgelöst wird, die *in vivo* teratogen wirken, ist es möglich, dass eine Verbindung zum Auftreten teratogener Effekte besteht (Werling et al., 2001). Weiterhin inhibiert VPA Histondeacetylasen (HDACs), die für ein Expressions-*Silencing* verschiedener Gene verantwortlich sind (Gottlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001) und kann aufgrund dessen zu einer Erhöhung der Genexpression führen. In den eigenen Experimenten trat im niedrigen Konzentrationsbereich eine Induktion der Markergene MesP1 und MLC1 auf, die möglicherweise auch auf diesen Mechanismus zurückzuführen ist.

In den gemessenen Endpunkten ergaben sich mittlere Halbhemmkonzentrationen von 90-100 $\mu\text{g/ml}$ für Mikroskop, Messung von MesP1 und MLC1 an Tag 7. Die mittlere $IC_{50 \text{ Exp}}$ von MLC1 an Tag 10 lag etwas niedriger bei 73 $\mu\text{g/ml}$. Die ID_{50} -Werte, die in der Validierungsstudie

des EST abgeleitet wurden, lagen zwischen 38 und 66 $\mu\text{g/ml}$ (Genschow et al., 2004), während eine andere Arbeitsgruppe einen mittleren ID_{50} -Wert von 120 $\mu\text{g/ml}$ ermittelte. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werte liegen damit im selben Bereich.

6.3.2.2.4 Dexamethason (Dex)

Die ID_{50} -Werte der mit dem Glucocorticoid Dexamethason durchgeführten Experimente zeigten sehr geringe Schwankungen, auch die $\text{IC}_{50 \text{ Exp}}$ -Werte zeigten eine große Kongruenz. Die ermittelten ID_{50} - und $\text{IC}_{50 \text{ Exp}}$ -Werte lagen im Bereich von 30-40 $\mu\text{g/ml}$. Bei der Messung von MLC1 an Tag 7 lag ein Wert mit 20 $\mu\text{g/ml}$ etwas niedriger (Experiment 2).

Diese Werte stimmen recht gut mit in der Literatur beschriebenen Daten überein, die etwas niedriger waren und zwischen 20 und 32 $\mu\text{g/ml}$ lagen (Scholz et al., 1999; Genschow et al., 2004).

6.3.2.3 In vivo nicht embryotoxische Substanzen

6.3.2.3.1 Campher (Cam)

Tests mit der nicht embryotoxischen Substanz Cam ergaben Werte, die mit allen Endpunkten zwischen 700 und $>1000 \mu\text{g/ml}$ lagen. Ein interessanter Effekt konnte bei der Messung der MesP1-Expression beobachtet werden. In den beiden gemessenen Probensätzen war mit steigender Cam-Konzentration ein Anstieg der Genexpression verbunden. Dies war einer der wenigen Fälle, in denen die vier Endpunkte nicht übereinstimmende Kurvenverläufe erbrachten. In der Validierungsstudie des EST ergaben sich nach Behandlung mit Cam in vier Laboren ID_{50} -Werte von 294 bis $>920 \mu\text{g/ml}$. Dabei stammten zwei recht niedrige Werte aus einem Labor (Genschow et al., 2004). Die Werte der drei anderen Labore lagen zwischen 478 und $>920 \mu\text{g/ml}$ und somit im gleichen Bereich wie die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte.

6.3.2.3.2 Saccharin (SAC)

Das verbreitete Süßungsmittel Saccharin, das kein embryotoxisches Potential aufweist, löste bei der mikroskopischen Analyse bei Konzentrationen bis 2500 $\mu\text{g/ml}$ keine eindeutige Veränderungen im Auftreten von Kardiomyozyten aus.

In der Genexpressionsanalyse wurde im untersuchten Konzentrationsbereich eine Verringerung der Genexpression der drei Endpunkte bei steigender Saccharin-Konzentration festgestellt, während die mikroskopische Auswertung keinen Abfall zeigte. Dies kann darauf hindeuten, dass es innerhalb der einzelnen EBs zu einer Verringerung der Anzahl an Kardiomyozyten kam, jedoch trotzdem noch kontrahierende Areale auftraten. In einem solchen Fall ist es nicht

möglich, mittels mikroskopischer Auswertung eine Veränderung zu detektieren, die durchaus zu einer Reduktion an Transkripten des Markergens in der Gesamt-RNA führt.

In der Literatur sind ID₅₀-Werte größer 1000 µg/ml angegeben (Genschow et al., 2004).

6.3.2.3.3 Penicillin G (PenG)

Die mit dem Antibiotikum PenG ermittelten ID₅₀- und IC_{50 Exp}-Werte lagen im Bereich von 710 µg/ml bis 1400 µg/ml. PenG wurde in mehreren Studien als nicht embryotoxische Referenzsubstanz eingesetzt. Dabei ergaben sich ID₅₀-Werte zwischen 750 µg/ml (zur Nieden et al., 2004), 1000 und >1000 µg/ml (Genschow et al., 2004) und 3450 (Spielmann et al., 1997). Bei Penicillin G scheinen Unterschiede in der Sensitivität unterschiedlicher D3-Zellchargen einen Unterschied hervorzurufen. Die vorliegenden Ergebnisse liegen jedoch in der gleichen Größenordnung, wie die der anderen Arbeitsgruppen.

6.3.2.4 Substanzen mit *in vivo* ungeklärtem embryotoxischen Potential

6.3.2.4.1 Y27632

Für den Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 sind in experimentellen Arbeiten adverse Effekte auf die Entwicklung des Herzens und des Nervensystems in Hühner- und Mausembryonen gezeigt worden (Wei et al., 2001). Dabei induzierte Y27632 in Konzentrationen von 10 µM in Mausembryonen das Auftreten von Cardia bifida und führte zu einer vorzeitigen Expression von kardialem α-Actin in Zellen des präsomitischen Mesoderms. Expression von GATA-4 und SRF waren nach Behandlung mit Y27632 erhöht. Zusätzlich wurde in Hühnerembryonen die Migration des Primitivknotens und die Entwicklung des Nervensystems gestört (Wei et al., 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Substanztests konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden, deren Verläufe sich voneinander unterschieden. Die Ursache für die Unterschiede ist nicht klar. Eine Hypothese lag in einer Beeinträchtigung der Qualität der Testsubstanz. Y27632 sollte trocken im Exsikkator gelagert werden, was zu Beginn der Substanztests nicht bekannt war. Die ersten beiden Tests zeigten übereinstimmende Ergebnisse. Nach dem der dritte Test in allen Endpunkten veränderte Kurvenverläufe erbracht hatte, wurde eine neue Substanzcharge bestellt und Experiment 4 durchgeführt. Dieses bestätigte jedoch den Verlauf der dritten Kurve, so dass die Hypothese des Substanzeinflusses nicht aufrecht erhalten werden konnte.

Besonders schwierig war die Auswertung der Kurven von MesP1, bei denen die ersten beiden Kurven relativ hoch verliefen und in einem Fall ein IC_{50 Exp}-Wert ermittelt werden konnte; während die Kurven der beiden anderen Experimente bei geringen Substanzkonzentrationen eine

deutliche Hemmung der Genexpression zeigten. Diese Hemmung ließ scheinbar bei höheren Konzentrationen nach, so dass eine ansteigende Genexpression beobachtet wurde.

Die Einschätzung im Prädiktionsmodell ergab mit allen Endpunkten übereinstimmend das gleiche Ergebnis „schwach embryotoxisch“. Dieses Ergebnis ist aufgrund der vorhandenen *In-vivo*-Befunde plausibel.

6.3.2.4.2 Staurosporin (STS)

In vielen Zellen induziert der Protein-Kinase-Inhibitor STS Apoptose (Ghelli et al., 2002) oder einen Arrest in der G₁-Phase (Crissman et al., 1991; Schnier et al., 1994). Allerdings induziert STS auch das Neuritenwachstum in Neuroblastom-Zellen (Jalava et al., 1992) und die neuronale Differenzierung in ES-Zellen (Schumacher et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass der Wirkmechanismus sich von der Induktion der neuronalen Differenzierung durch RA unterscheidet, da unterschiedliche neuronale Zelltypen auftreten (Lombet et al., 2001; Schumacher et al., 2003).

In Mausembryonen der Whole Embryo Culture (WEC) wirkte STS letal (Little und Mirkes, 2002). Konzentrationen über 0,1 µM führten zum Auftreten von *Situs inversus* in Ratten-Embryonen in der WEC, eine Konzentration von 0,5 µM (ca. 0,23 mg/l) wirkte letal (Fujinaga et al., 1994).

Die in dieser Arbeit beschriebenen ID₅₀-Werte der mikroskopischen Auswertung und die IC_{50 Exp}-Werte der Messungen von MLC1 an Tag 7 und Tag 10 lagen, mit einer Ausnahme an Tag 7, im Bereich von 0,001 bis 0.004 µg/ml. Ein starker Substanzeffekt trat bei der MesP1-Messung auf: Die resultierenden IC_{50 Exp}-Werte lagen eine Zehnerpotenz niedriger als die ID₅₀-Werte der mikroskopischen Auswertung (bei 0,0003 µg/ml STS). Die Kurven von Experiment 1 zeigten einen ähnlichen, abfallenden Verlauf auch bei der Messung von MLC1.

Dieser Unterschied führte zu dem Ergebnis, dass die Prädiktion für den Endpunkt MesP1 „stark embryotoxisch“ ergab, für die drei anderen Endpunkte hingegen „nicht embryotoxisch“. Ein Umschlag von „nicht“ zu „stark embryotoxisch“ aufgrund der Veränderung eines Wertes ist sicherlich ein überraschendes Ergebnis. Aufgrund der geringen *In-vivo*-Daten ist es schwer, zu entscheiden, welche Prädiktion der Wirklichkeit näher kommt.

Die ID₅₀- und IC_{50 Exp}-Werte zeigen, dass STS in viel niedrigeren Konzentrationen wirkt, als die untersuchten bekannten nicht embryotoxischen Substanzen Cam, Sac und PenG, deren Halbhemmkonzentrationen meist oberhalb von 700 µg/ml lagen (Tabelle 8). Wirkungen im gleichen Konzentrationsbereich wie von STS waren sonst bei den stark embryotoxischen Substanzen zu finden. Allerdings bedeutet dies nicht, dass diese Substanz embryotoxisch sein

muss; schließlich ergibt die zusammen mit den Zytotoxizitätswerten erstellte Prädiktion eine Einschätzung, die eine eventuell gegenüber der embryonalen Toxizität höhere allgemeine Toxizität mit einbezieht. So hat ein stark wirksames Toxin, welches auf das Muttertier in geringen Konzentrationen letal wirkt, ohne dabei in unterscheidbarer Weise den Embryo zu schädigen, keine spezifisch embryotoxische Wirkung.

Für STS kann die Frage, ob eine für das Muttertier nicht letale Konzentration Schäden bei den Nachkommen hervorruft, nicht beantwortet werden. In adulten Ratten bedingten Konzentrationen im Bereich von 0,1-1,0 mg/kg einen Blutdruckabfall, der bei Dosen von 5 und 10 mg/kg letal war (Secrest et al., 1991). Diese Konzentrationen liegen höher als die, die in der WEC Effekte am Embryo hervorriefen. Somit besteht die Möglichkeit, dass *in vivo* der sich entwickelnde Embryo empfindlicher reagiert als das Muttertier.

Interessant wäre zudem, zu untersuchen, ob die spezifische Sensitivität der MesP1-Expression gegenüber STS-Behandlung bedeutet, dass Störungen in der Bildung des Mesoderms auftreten, die nicht primär das Herz betreffen. In diesem Fall könnte sich MesP1 als ein besonders geeigneter Marker erweisen.

6.3.3 Klassifizierung des embryotoxischen Potentials der untersuchten Substanzen

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Substanztests wurden für zehn der Substanzen nur Differenzierungsassays durchgeführt. Gleichzeitige Zytotoxizitätsassays mit D3- und 3T3-Zellen wurden in den Substanztests mit Dexamethason, Y27632 und Staurosporin mitgeführt.

Um trotzdem für alle Substanzen eine Einschätzung mittels iPM vornehmen zu können, wurden daher historische Daten aus MTT-Assays mit D3- und 3T3-Zellen herangezogen, die im Rahmen eines EST-Verbundprojektes erstellt wurden, an dem sich auch das Schering-Labor beteiligte (Biometrischer Abschlussbericht, 2004, mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Seiler). Diese Daten wurden während der Validierungsstudie des EST und im nachfolgenden BMBF-geförderten Projekt zur Weiterentwicklung der EST erstellt, durch das auch die vorliegende Arbeit gefördert wurde. Die verwendeten Daten der Zytotoxizitätsassays stellen jeweils Mittelwerte aus mindestens drei Tests dar. Die dortigen Experimente wurden nach einer festgelegten, einheitlichen Standardarbeitsanweisung (SOP) durchgeführt, die auch in den eigenen Versuchen angewendet wurde.

Auf diese Weise wurden für die zehn Substanzen ohne zugehörige MTT-Tests Datensätze erstellt, die in das iPM eingesetzt werden konnten. Die Auswertung von zusammengestellten Datensätzen, die nicht im selben Labor erstellt wurden, ist nur bedingt aussagekräftig. Jedoch

ermöglicht diese Vorgehensweise einen Vergleich der vier gemessenen Endpunkte und erlaubt eine Abschätzung der Qualität der Daten und der Robustheit des Prädiktionsmodells.

6.3.4 Abschließende Diskussion der Substanztests

Die in dieser Arbeit mit 13 Substanzen erstellten ID_{50} -Werte für die mikroskopische Auswertung der Herzmuskeldifferenzierung in D3-Zellen konnten in vielen Fällen mit bereits veröffentlichten Daten verglichen werden (abgesehen von den Substanzen Y27632 und STS). In allen Fällen stimmten die Halbhemmkonzentrationen der morphologischen Differenzierung gut überein.

Der Vergleich der vier gemessenen Endpunkte in den Substanztests zeigte, dass mit den molekularen Endpunkten bis auf wenige Ausnahmen eine vergleichbare Sensitivität erreicht wurde.

Die Auswertung mit dem mathematischen Prädiktionsmodell führte mit allen vier Endpunkten bei den bekannten Substanzen bis auf zwei Einzelergebnisse immer zur korrekten Klassifikation. Eine MesP1-Messung nach Sac-Behandlung hatte das Ergebnis „schwach“ statt „nicht“ embryotoxisch, und eine Messung von MLC1 an Tag 7 nach VPA-Behandlung ergab die Prädiktion „nicht“ statt „schwach“ embryotoxisch. In diesen beiden Fällen handelte es sich um einzelne Experimente des jeweiligen Endpunkts, während weitere Ergebnisse die korrekte Klassifikation erbrachten. Es konnten somit erfolgreich molekulare Marker etabliert werden, die schon zu einem früheren Zeitpunkt während der Differenzierung von D3-Zellen eine korrekte Prädiktion des embryotoxischen Potentials einer Substanz ermöglichten.

Die $IC_{50\text{ Exp}}$ -Werte der drei molekularen Endpunkte zeigten bei den meisten Substanzen eine Sensitivität, die im selben Konzentrationsbereich lag, wie die mikroskopische Auswertung. Abweichende Ergebnisse, in denen die Genexpression weniger stark gehemmt wurde, traten bei der Messung von MesP1 nach Behandlung mit Campher auf. Eine Behandlung mit Campher führte bei steigenden Konzentrationen dazu, dass die Expression von MesP1 zunahm.

Es gab jedoch auch Fälle, in denen die Genexpression deutlich sensibler war, als die mikroskopische Auswertung. Bei der Behandlung mit Staurosporin fiel die MesP1-Expression schon bei sehr geringen Konzentrationen ab und ergab $IC_{50\text{ Exp}}$ -Werte, die weit unterhalb denen für die anderen Endpunkte lag. Da für diese Substanz keine reproduktionstoxikologischen *In-vivo*-Daten vorliegen, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob dies auf eine Beeinträchtigung der mesodermalen Entwicklung hinweist, die nicht primär das Herz betrifft.

Auch RA führte mit den molekularen Markern zu Konzentrations-Wirkungskurven, die sich von der mikroskopischen Auswertung unterschieden (MesP1 und MLC1 an Tag 7).

Diese Fälle belegen, dass die Wirkung auf die Differenzierung und auf die Genexpression substanzspezifisch auftritt. Für die Anwendung der molekularen Marker bedeuten diese Fälle, dass es möglich ist, innerhalb des Herzmuskeldifferenzierungssystems Gene zu identifizieren, die eine Störung spezifischer Vorgänge repräsentieren. Ein Set solcher Gene kann Aussagen über den Mechanismus der Substanzwirkung ermöglichen oder Vorhersagen auf deren Auswirkungen zulassen.

Die Genexpressionsmessungen wiesen gegenüber der mikroskopischen Auswertung höhere Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten auf, besonders, da auch Induktionen um ein Mehrfaches der Kontrolle auftraten. Z. T. resultierte dies jedoch auch aus methodischen Gegebenheiten, da mikroskopisch ausgewertete Differenzierungsassays in der Kontrolle mindestens 21 von 24 EBs mit kontrahierenden Kardiomyozyten enthalten müssen. Daher können Induktionen in der mikroskopischen Auswertung nur begrenzt festgestellt werden. Werden in der Kontrolle in allen 24 EBs schlagende Areale gefunden, so ist kein Anstieg darüber hinaus mehr möglich. Bei manchen Substanzen, wie z.B. bei 5-FU, wurde am Mikroskop reproduzierbar eine Erhöhung der Größe der Areale und/oder der Stärke des Schlagens beobachtet, die nicht quantitativ erfasst werden konnte. Dies schlägt sich unter Umständen in den Genexpressionsmessungen nieder, wo gerade der Anteil der gebildeten Kardiomyozyten eine Rolle spielt. Daher können dort auch starke Induktionen beobachtet werden.

6.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Etablierung molekularer Marker für die Quantifizierung möglicher embryotoxischer Effekte von Testsubstanzen leisten.

Die Versuche wurden auf der Basis der Kardiomyozytenentwicklung vorgenommen, die einen gut untersuchten und für die Erfassung embryotoxischer Wirkungen experimentell validierten morphologischen Endpunkt darstellt (Doetschman et al., 1985; Wobus et al., 1991; Maltsev et al., 1993; Spielmann et al., 1997; Hescheler, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand umfangreicher Genexpressionsanalysen gezeigt, dass differenzierungsspezifische Gene, die entscheidende Bedeutung für die Herzmuskelentwicklung *in vivo* haben, auch im ES-Zelldifferenzierungsassayentwicklungsspezifisch exprimiert werden und somit geeignete molekulare Marker für embryotoxische Wirkungen darstellen können.

In folgenden Arbeiten können diese grundsätzlichen Erkenntnisse auch für die Etablierung molekularer Marker für andere Differenzierungssysteme genutzt werden. Dies ist auch in der Vergangenheit schon begonnen wurde (zur Nieden et al., 2004)

Es konnten weiterhin erfolgreich molekulare Endpunkte etabliert werden, die die gleiche Sensitivität wie der zugrunde liegende konventionelle Endpunkt (mikroskopische Inspektion) aufwiesen. Es wurde für den Vergleich mit dem konventionellen Endpunkt exemplarisch die Expression von MesP1 und MLC1 als molekulare Marker verwendet. Die Messung der Expression beider Gene erbrachte Ergebnisse, die im mathematischen Prädiktionsmodell (Genschow et al., 2000) zur gleichen Einschätzung des embryotoxischen Potentials führten, wie der validierte mikroskopische Endpunkt.

In einem nächsten Schritt kann nun die Expression von weiteren der differenzierungsspezifischen Gene untersucht werden. Dabei wäre es nützlich, zu ermitteln, welche Gene besonders sensitiv auf bestimmte Substanzen reagieren. Das Ziel wäre die Zusammenstellung eines Sets von Genen, die mechanistische Erkenntnisse der Substanzwirkung zulassen.

Eine Einschätzung des embryotoxischen Potentials von Testsubstanzen mit *In-vitro*-Methoden kann auf diese Weise immer besser abgesichert werden.

In den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten wurden morphologische Ergebnisse der *In-vitro*-Kardiomyozytendifferenzierung nach Substanzbehandlung mit Vorgängen auf molekularer Ebene korreliert. Dabei zeigte sich, dass eine Verringerung der Expression aussagekräftiger Markergene bereits zu einem früheren Zeitpunkt messbar wird, als die Differenzierung der Kardiomyozyten. Mit Hilfe der Genexpressionsmessungen von MesP1 und MLC1 konnte schon nach 5, bzw. 7 Tagen Substanzbehandlung eine korrekte Prädiktion des embryotoxischen Potentials der bekannten Testsubstanzen erstellt werden. Durch den Einsatz von molekularen Markern kann somit eine Verkürzung des Testzeitraums erreicht werden.

Der Einsatz molekularer Methoden macht es zudem möglich, in der Zukunft Teile der Testprozedur zu automatisieren. So existieren bereits Geräte, die aus Proben im 96-Well-Platten-Format RNA isolieren, die für den Einsatz in der RT-PCR geeignet ist. Mit solchen Methoden können mit verringertem Aufwand im EST Substanzen getestet und die Expression von Markergenen bestimmt werden.

Dies erweitert die Möglichkeiten des EST, sowohl während der Entscheidungsfindung in der frühen Arzneimittelentwicklung nutzbringend eingesetzt zu werden, als auch, im Zuge der Einführung des REACH-Systems des neuen Chemikalienrechts als Alternativmethode zum Tierversuch bei der Untersuchung von Substanzen auf ein embryotoxisches Potential herangezogen zu werden.