

**Untersuchungen zur Genexpression und Differenzierung
muriner embryonaler Stammzellen *in vitro* zur Prädiktion
eines embryotoxischen Potentials ausgewählter
Chemikalien**

Diplomarbeit

von

Nicole Mazurek (geb. Torno)

Universität Potsdam
Institut für Ernährungswissenschaft

Erstgutachter: Prof. Dr. Glatt
Zweitgutachter: Prof. Dr. Steinberg

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2013/6891/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-68912>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-68912>

*„Achte auf deine Gedanken,
denn sie werden Worte.
Achte auf deine Worte,
denn sie werden Handlungen.
Achte auf deine Handlungen,
denn sie werden Gewohnheiten.
Achte auf deine Gewohnheiten,
denn sie werden dein Charakter.
Achte auf deinen Charakter,
denn er wird dein Schicksal.“*

Talmud

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	
Abkürzungsverzeichnis.....	
1 Einleitung	1
1.1 Reproduktionstoxizität	1
1.1.1 <i>In-vitro</i> -Embryotoxizitätstests	1
1.2 Der Embryonale Stammzelltest (EST).....	2
1.2.1 Validierung des konventionellen EST	3
1.2.2 Etablierung molekularer Marker	3
1.2.3 Limitierungen des Embryonalen Stammzelltests	4
1.3 Embryonale Stammzellen.....	5
1.3.1 Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen <i>in vitro</i>	6
1.4 Auswahl der Testsubstanzen	7
1.4.1 5-Fluorouracil (5-FU).....	7
1.4.2 Trichostatin A (TSA).....	8
1.4.3 Methylazoxymethanolacetat (MAMac).....	9
1.4.4 Natriumdodecylsulfat (SDS)	10
1.4.5 Benzoesäure (BA).....	11
1.5 Auswahl der Markergene für die Kardiomyozytendifferenzierung	12
1.5.1 Mesoderm Posterior 1 (MesP1).....	13
1.5.2 Myosin light chain 1 (MLC1).....	13
1.5.3 GATA-4	14
1.6 Zielstellung der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Routinekultur	16
2.1.1 Zelllinien.....	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Zellkulturzusätze	17
2.1.4 Zellkulturmedien.....	17
2.1.4.1 Einfriermedien zur Kryokonservierung der Zellen	18
2.1.4.2 Zellkulturmedien zum Auftauen der Zellen.....	18
2.1.5 Passagieren der Zellen	19
2.2 Substanztestungen.....	20
2.2.1 Verbrauchsmaterialien	20
2.2.2 Feinchemikalien/Testsubstanzen	20
2.2.3 Puffer, Lösungen, Ansätze	21
2.2.4 Differenzierungsmedium	21
2.2.5 Assaycheck der Zellen	21
2.2.6 Rangefinder	22
2.2.7 Differenzierungsassay der D3-Zellen	23
2.2.7.1 Auswertung des Differenzierungsassays	25
2.2.8 Zytotoxizitätstests der D3- und 3T3-Zellen	25
2.2.8.1 Auswertung der Zytotoxizitätstests	26
2.2.9 Akzeptanzkriterien.....	26
2.3 Molekularbiologische Arbeiten.....	27
2.3.1 Lyse der Proben.....	27
2.3.2 RNA-Isolierung.....	27
2.3.2.1 Überprüfung der RNA-Qualität	28
2.3.3 cDNA-Synthese.....	29
2.3.4 TaqMan-PCR	30

2.3.4.1	Referenzgen.....	32
2.3.4.2	Auswertung der Genexpressionsanalyse.....	32
2.4	Prädiktion des embryotoxischen Potentials mittels Prädiktionsmodell (PM).....	33
3	Ergebnisse	35
3.1	<i>In-vitro</i> -Kultivierung der D3- und 3T3-Zellen.....	35
3.1.1	Kontrolle der Differenzierungsfähigkeit der ES-Zellen	36
3.2	Rangfinder-Experimente zur Bestimmung des wirksamen Konzentrationsbereiches der Testsubstanzen	37
3.2.1	Trichostatin A.....	37
3.2.2	Natriumdodecylsulfat.....	38
3.3	Ergebnisse der Substanztestungen.....	39
3.3.1	Konventioneller EST	40
3.3.1.1	Trichostatin A	40
3.3.1.1.1	Morphologische Veränderungen durch TSA-Behandlung	41
3.3.1.2	Methylazoxymethanolacetat	42
3.3.1.3	Natriumdodecylsulfat.....	43
3.3.1.4	Benzoessäure	45
3.3.2	Genexpressionsanalyse	46
3.3.2.1	Trichostatin A	47
3.3.2.1.1	Genexpressionsanalyse von GATA-4	48
3.3.2.2	Methylazoxymethanolacetat	49
3.3.2.3	Natriumdodecylsulfat.....	50
3.3.2.4	Benzoessäure	52
3.4	Zusammenfassung der ermittelten Parameter.....	54
3.5	Klassifizierung des embryotoxischen Potentials der Testsubstanzen	55
4	Diskussion.....	57
4.1	Assaychecks	57
4.2	Diskussion der Substanztestungen	58
4.2.1	5-Fluorouracil.....	58
4.2.1.1	Prädiktion des embryotoxischen Potentials von 5-FU.....	59
4.2.2	Trichostatin A.....	59
4.2.2.1	Prädiktion des embryotoxischen Potentials von TSA.....	62
4.2.3	Methylazoxymethanolacetat.....	62
4.2.3.1	Prädiktion des embryotoxischen Potentials von MAMac.....	64
4.2.4	Natriumdodecylsulfat.....	64
4.2.4.1	Prädiktion des embryotoxischen Potentials von SDS.....	66
4.2.5	Benzoessäure.....	66
4.2.5.1	Prädiktion des embryotoxischen Potentials von BA	67
4.3	Abschließende Bewertung der Substanztestungen im Embryonalen Stammzelltest.....	67
4.4	Ausblick - Potential des Embryonalen Stammzelltests	69
5	Zusammenfassung.....	71
6	Summary.....	74
7	Literaturverzeichnis	77
	Danksagung	84
	Erklärung.....	85

Abkürzungsverzeichnis

β -ME 5-FU	β -Mercaptoethanol 5-Fluorouracil
AC ADH ALDH ATCC	<i>Assaycheck</i> Alkoholdehydrogenase Aldehyddehydrogenase <i>American Type Culture Collection</i>
BA BMBF bp	Benzoessäure (<i>Benzoic acid</i>) Bundesministerium für Bildung und Forschung Basenpaar
cDNA CHEST C _T	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>Complementary DNA</i>) <i>Chick Embryotoxicity Screening Test</i> PCR-Zyklus, bei dem der Fluoreszenzschwellenwert erreicht wird (<i>Cycle of Threshold</i>)
dNTP D-PBS	Desoxyribonukleosidtriphosphat <i>Dulbecco's Phosphate buffered saline</i>
EB ECVAM	Embryonalkörperchen (<i>Embryoid body</i>) Europäisches Zentrum für die Evaluierung von Alternativmethoden (<i>European Center for the Validation of Alternative Methods</i>)
EC-Zellen EST ES-Zellen	Embryonale Karzinomzellen Embryonaler Stammzelltest Embryonale Stammzellen
FAM FCS FETAX	6'-Carboxyfluorescein Fötale Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>) <i>Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus</i>
GATA	DNA-Konsensussequenz, die von Mitgliedern der gleichnamigen Proteinfamilie erkannt wird
HDAC HDACi hES-Zellen	Histondeacetylase (<i>Histone deacetylase</i>) Histondeacetylase-Inhibitor (<i>Histone deacetylase inhibitor</i>) Humane embryonale Stammzellen
IC ₅₀ IC ₅₀ 3T3 IC ₅₀ D3 IC ₅₀ Exp ID ₅₀	Halbhemmkonzentration (<i>Inhibiting concentration</i>) Halbhemmkonzentration der zytotoxischen Wirkung auf die 3T3-Zellen Halbhemmkonzentration der zytotoxischen Wirkung auf die D3-Zellen Halbhemmkonzentration der Genexpression Halbhemmkonzentration der Differenzierung (<i>Inhibition of Differentiation</i>)
<i>in silico</i>	Vorgänge, die im Computer ablaufen (angelehnt an Lateinisch <i>in silicio</i> für <i>in Silicium</i>)
kb KG	Kilobasen Körpergewicht

LADME	Bezeichnet in der Pharmakokinetik die Gesamtheit aller Prozesse, denen ein Arzneistoff im Körper unterliegt (Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion)
LD₅₀	Letale Dosis 50
LIF	<i>Leukaemia inhibitory factor</i>
MAM	Methylazoxymethanol
MAMac	Methylazoxymethanolacetat
MAMAL	Methylazoxymethanolaldehyd
MesP	<i>Mesoderm Posterior</i>
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
MLC	<i>Myosin light chain</i>
mLIF	<i>Murine Leukaemia inhibitory factor</i>
MM	<i>Micromass</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>Messenger RNA</i>)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NAA	Nichtessentielle Aminosäuren (<i>Nonessential Amino Acids</i>)
PBPK	<i>Pharmacologically Based Pharmacokinetic Modelling</i>
p.c.	Post coitum
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDAR	<i>Predeveloped TaqMan[®] Assay Reagents</i>
PM	Mathematisches Prädiktionsmodell zur Klassifizierung von Substanzen mit dem EST (<i>Prediction model</i>)
qRT-PCR	Quantitative Real Time-Polymerase Kettenreaktion
REACH	<i>Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals</i> ; europäische Chemikalienverordnung
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure (<i>Ribosomal RNA</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfat</i>)
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TS	Thymidylat-Synthetase
TSA	Trichostatin A
VIC	Reporterfarbstoff in der qRT-PCR (chemische Struktur nicht publiziert)
WEC	<i>Whole Embryo Culture</i>
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch

1 Einleitung

1.1 Reproduktionstoxizität

Im Zuge der Entwicklung pharmazeutischer Produkte und neuer Chemikalien nutzt die Industrie routinemäßig *In-vivo*- und *In-vitro*-Verfahren, um deren Wirksamkeit und toxikologisches Potential zu identifizieren. Insbesondere die Schädigung auf die frühembryonale Phase des Entwicklungsprozesses ist als besonders kritisch zu bewerten, da die Störung grundlegender Differenzierungsprozesse zu schwerwiegenden Missbildungen führen kann. Wegen der Komplexität des Reproduktionsprozesses beim Säuger und der vielfältigen Mechanismen, die bei der Induktion von Malformationen während der Embryonalentwicklung beteiligt sein können, erfordert die Prüfung von chemischen Substanzen auf reproduktionstoxische Nebenwirkungen mehrere standardisierte Tierexperimente (Tests zum Nachweis von Effekten auf Fertilität, die embryo-fötale und perinatale Entwicklung sowie Mehrgenerationsstudien), die entsprechend international gültiger Richtlinien durchgeführt werden. *In-vivo*-Tests zur Untersuchung möglicher reproduktionsschädigender Wirkungen sind jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig, kostenintensiv und bedürfen einer großen Anzahl an Labortieren, die in den Tests meist starken Belastungen ausgesetzt werden. Um diese Vielzahl an Tierexperimenten zu reduzieren, wurden in der Vergangenheit diverse Versuche unternommen, alternative *In-vitro*-Methoden zur Embryotoxizitätstestung zu entwickeln. Insbesondere vor dem Hintergrund der neuen EU Chemikalien-Richtlinie REACH, die bis zum Jahre 2015 auf die Risikobewertung von über 30.000 Alt-Chemikalien abzielt, die zu über einer Jahrestonne produziert oder vermarktet werden [COM 2003 0644 (04)], besteht über Tierschutz-Gesichtspunkte hinaus auch aufgrund ökonomischer Aspekte eine zunehmende Notwendigkeit an neuen prädiktiven Verfahren zur Risikobewertung hinsichtlich der Entwicklungstoxizität bei gleichzeitiger Reduktion des Bedarfs an Tieren. Des Weiteren besteht in der pharmazeutischen Industrie ein zunehmender Bedarf, *In-vitro*-Embryotoxizitätstests zu nutzen, um im Rahmen der Auswahl von so genannten Entwicklungskandidaten deren mögliche embryotoxische Wirkung zu identifizieren und diese gegebenenfalls von der Weiterentwicklung ausschließen zu können.

1.1.1 *In-vitro*-Embryotoxizitätstests

Vor dem Hintergrund, die Anzahl an Tierexperimenten zu reduzieren, wurden verschiedene *In-vitro*-Embryotoxizitätssysteme entwickelt, von denen jedoch bislang keines für die Einschätzung embryotoxischer Effekte anerkannt ist. Diese verwenden entweder *in vitro* kultivierte Zelllinien, Kulturen dissoziierter Zellen aus Extremitätenknospen oder dem Mittelhirn von Rattenembryos (MM-Test, „*micromass*“) oder ganze Embryos der Ratte

(WEC, *whole embryo culture*), *Xenopus* (FETAX-Test) oder Hühnern (CHEST). Eine wichtige Voraussetzung eines *In-vitro*-Embryotoxizitätstests zur Identifizierung reproduktionsschädigender Wirkungen besteht jedoch darin, dass die verwendeten Zellen wichtige Prozesse der Embryogenese rekapitulieren und die Entwicklung aller drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm, Mesoderm) abbilden. Auch die unterschiedliche Sensitivität zwischen embryonalem und maternalem Gewebe gegenüber Chemikalien sollte berücksichtigt werden und eine Unterscheidung zwischen allgemeiner und embryonaler Toxizität möglich sein [1]. In diesem Zusammenhang sind *In-vitro*-Systeme, die auf embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) basieren, die viel versprechendsten. Darüber hinaus benötigen diese als einzige *In-vitro*-Embryotoxizitätssysteme keine trächtigen Tiere und basieren gleichzeitig auf einem Säugerzell-System [2]. Einmal isoliert können die verwendeten Zelllinien permanent in Kultur gehalten werden, so dass der übermäßige Gebrauch von Tieren umgangen wird.

1.2 Der Embryonale Stammzelltest (EST)

Der EST erfüllt die notwendigen Kriterien zur Identifizierung reproduktionsschädigender Wirkungen. Er ist ein verlässlicher und validierter *In-vitro*-Embryotoxizitätstest, der auf der Fähigkeit pluripotenter embryonaler Stammzellen der Maus basiert, sich *in vitro* unter entsprechenden Bedingungen spontan in eine Vielzahl von Zelltypen, einschließlich kontrahierender Kardiomyozyten zu differenzieren [3-5]. In Gegenwart von LIF (*leukaemia inhibitory factor*), einem differenzierungsinhibierenden Zytokin, können diese *in vitro* im undifferenzierten Zustand aufrechterhalten werden [6; 7]. Diese Fähigkeit der ES-Zellen ermöglichte die Entwicklung eines *In-vitro*-Embryotoxizitätstests, der nicht auf embryonale Zellen oder Gewebe trächtiger Tiere zurückgreifen muss.

Der EST basiert auf den beiden wichtigsten Mechanismen pränataler Toxizität, der Störung der Differenzierung und der Zytotoxizität [8; 9]. Die differenzierungshemmende Wirkung und die Zytotoxizität der Prüfsubstanz werden an embryonalen Stammzellen der Linie D3 getestet, die undifferenziertes embryonales Gewebe repräsentieren und als solches die Embryogenese *in vivo* rekapitulieren [3]. Die Zytotoxizität wird außerdem an 3T3 Maus-Fibroblasten geprüft, die als differenzierte Zellen adultes Gewebe repräsentieren und stellvertretend maternale Toxizität anzeigen sollen [1]. Dies ermöglicht einerseits, den Einfluss von Testsubstanzen auf die Differenzierung mit der zytotoxischen Wirkung auf die beiden verwendeten permanenten Zelllinien zu vergleichen und andererseits, das embryotoxische Potential von Chemikalien zu klassifizieren. Da sich die Kardiomyozytendifferenzierung gegenüber bekannten embryotoxischen Substanzen als sensitiv erwies [8], stellt deren Inhibition einen geeigneten Parameter zum Nachweis embryotoxischer Substanzeffekte dar. So wird nach kontinuierlicher zehntägiger Exposition der Zellen der Effekt steigender Konzentrationen der Testchemikalien auf drei definierte

Parameter bewertet. Diese sind die Halbhemmkonzentrationen für die Inhibition der Differenzierung der ES-Zellen in kontrahierende Kardiomyozyten (ID_{50}) sowie für die wachstumsinhibierende zytotoxische Wirkung auf die D3- und 3T3-Zellen (IC_{50}). Um abzuschätzen, welche embryotoxischen Effekte auf der Basis der *In-vitro*-Daten *in vivo* zu erwarten sind, wurde für den EST ein mathematisches Prädiktionsmodell (PM, siehe 2.4) empirisch abgeleitet [10]. Dieses basiert auf den drei genannten Parametern des Tests und ermöglicht die Klassifizierung des embryotoxischen Potentials der Testsubstanzen in eine der drei Embryotoxizitätsklassen „nicht embryotoxisch“, „schwach embryotoxisch“ oder „stark embryotoxisch“, was den Endpunkt des EST darstellt. Eine Unterscheidung zwischen zytotoxischen und embryotoxischen Substanzen ist möglich, da ES-Zellen gegenüber embryotoxischen Substanzen generell empfindlicher sind als bereits differenzierte Zellen [11].

1.2.1 Validierung des konventionellen EST

Der EST wurde von der Arbeitsgruppe um Spielmann (ZEBET [Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch]) entwickelt [8] und in einer internationalen ECVAM-Validierungsstudie (Europäisches Zentrum für die Evaluierung von Alternativmethoden) [5] als einer von drei *In-vitro*-Embryotoxizitätstests validiert. Das Ziel bestand dabei hauptsächlich in der Beurteilung der Genauigkeit der *In-vitro*-Tests, bekannte Substanzen, die *in vivo* als „nicht embryotoxisch“, „schwach embryotoxisch“ und „stark embryotoxisch“ eingestuft wurden [12], zu unterscheiden.

Am Ende der Studie lag der prozentuale Anteil korrekt klassifizierter Testchemikalien bei 78 %, während die Sensitivität für stark embryotoxische Chemikalien sogar bei 100 %, die Spezifität bei 83 % lag. Auch die Spezifität schwacher Embryotoxine (84 %) war gut, während die Sensitivität und Spezifität nicht embryotoxischer Chemikalien (73 bzw. 68 %) sowie die Sensitivität für schwache Embryotoxine (69 %) ausreichend waren. Im Intra- und Interlaborvergleich erwiesen sich die Endpunkte des EST als reproduzierbar. Insgesamt konnte eine gute Korrelation zwischen den *In-vitro*- und *In-vivo*-Daten gezeigt werden. Dies führte zu der Annahme, dass der EST das embryotoxische Potential einer Testsubstanz ebenso gut abschätzen kann wie häufig angewendete Säugersysteme, die auf trächtigen Tieren basieren, und zu der Einschätzung, dass der EST geeignet ist, zur Prädiktion des embryotoxischen Potentials von Chemikalien eingesetzt werden zu können [5].

1.2.2 Etablierung molekularer Marker

Da gezeigt werden konnte, dass die Kardiomyozytendifferenzierung der murinen ES-Zellen nicht nur zellmorphologisch mit der embryonalen Herzdifferenzierung der Maus *in vivo* übereinstimmt, sondern dass auch die Expression herzspezifischer Gene mit der

In-vivo-Situation korreliert [13], wurden Genexpressionsmessungen als molekulare Parameter für den EST etabliert [14].

So zeigten Untersuchungen embryonaler Stammzellen unter dem Einfluss von Testsubstanzen, dass Embryotoxine nicht nur auf die Differenzierung in kontrahierende Kardiomyozyten einen konzentrationsabhängigen Effekt hatten, sondern auch die Expression herzmuskelspezifischer Gene hemmten [13]. Dabei stellt diejenige Chemikalienkonzentration, die zu einer halbmaximalen Hemmung der Genexpression in den Kardiomyozyten führt ($IC_{50\text{ Exp}}$), einen weiteren relevanten Parameter zur Bestimmung des embryotoxischen Potentials dar.

Die Verwendung quantitativer Expressionsdaten an Stelle der mikroskopischen Erfassung kontrahierender Kardiomyozyten am Tag 10 der Differenzierung macht den EST objektiver und ermöglicht die Anpassung an den Einsatz im *high-throughput screening*. Durch die Untersuchung von Genaktivitäten und Entwicklungsprozessen während der *In-vitro*-Differenzierung können auch selektive Effekte auf verschiedene Differenzierungsprozesse detektiert werden, was die Sensitivität des EST verbessert [15; 16]. Zusätzlich bietet sich die Möglichkeit, den Test zeitlich zu verkürzen, da molekulare Marker etabliert wurden, die bereits nach 5 bzw. 7 Tagen Substanzbehandlung eine korrekte Prädiktion des embryotoxischen Potentials der Substanz ermöglichen [14; 16].

1.2.3 Limitierungen des Embryonalen Stammzelltests

Da es sich beim EST um eine *In-vitro*-Methode handelt, besteht die wohl bedeutendste Limitierung hinsichtlich der Anwendbarkeit für die Abschätzung eines embryotoxischen Potentials für den Menschen in dem Unvermögen, verschiedene für die reproduktionstoxische Wirkung wichtige Parameter wie Plazentagängigkeit oder metabolische Aktivierung zu berücksichtigen, die einen wesentlichen Einfluss auf die Substanzwirkung *in vivo* haben können. Damit kann der EST keine Proteratogene erfassen, zu denen viele wichtige Klassen industrieller Chemikalien gehören. Obwohl die metabolische Kapazität des Assays derzeit undefiniert ist [1], wird eine ausreichende metabolische Kompetenz nicht angenommen [17; 18]. Auch die während der Validierung des EST erfassten Toxizitätsmechanismen waren nicht allumfassend, so dass eine gewisse Unsicherheit hinsichtlich der Eignung des Tests für andere Chemikalienklassen besteht. In diesem Falle ließe sich der EST möglicherweise an spezifische chemische Klassen und/oder Mechanismen anpassen [1].

Außerdem deckt der EST wie jedes Modellsystem nur einen Teil der embryonalen und fötalen Entwicklung ab. So repräsentiert er zeitlich und hinsichtlich der Entwicklungswege einen limitierten Ausschnitt der Entwicklung und berücksichtigt vor allem embryotoxische Effekte von Chemikalien, die einen Einfluss auf die frühembryonalen Entwicklungsphasen haben [1]. Durch die Untersuchung der Differenzierung in Myokard-Zellen erfasst er Effekte

auf die mesodermale Entwicklung. Obwohl sich die Kardiomyozytendifferenzierung von ES-Zellen als sehr sensitiv gegenüber embryotoxischen Substanzen erwiesen hat [8] und deshalb als Modellsystem für den Nachweis eines breiten Spektrums embryoschädigender Wirkungen eignet, kann er dennoch zu falsch-negativen Ergebnissen führen, wenn die Testsubstanzen ausschließlich spezifische andere Zelltypen als die Herzmuskelzellen schädigen [16]. Ein negatives *In-vitro*-Testergebnis kann daher keinen ausreichenden Beweis liefern, um solche Effekte gänzlich ausschließen zu können.

Darüber hinaus ist für die Gefährdungsbeurteilung die Extrapolation der effektiven Konzentration *in vitro* auf die Zielgewebekonzentration *in vivo* notwendig. Dies gestaltet sich wie bei den meisten *In-vitro*-Systemen auch unter Verwendung des EST schwierig [1]. So ist die Exposition des Zielgewebes über das Plasma von verschiedenen kinetischen Prozessen abhängig, die mit der Liberation, Absorption, Distribution, dem Metabolismus und der Exkretion (LADME) der Chemikalie *in vivo* in Zusammenhang stehen [18]. Die *In-vitro*-Testung von *in vivo* nicht realisierbaren Konzentrationen kann so zur Generierung positiver embryotoxischer Ergebnisse führen, die für eine pränatale Exposition *in vivo* irrelevant sind [1].

1.3 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden ursprünglich aus undifferenzierten Zellen der inneren Zellmasse muriner Blastozysten etabliert [19]. Als permanente Zellkultur werden sie durch Anwesenheit von LIF, einem Zytokin der Interleukin-6-Familie, in undifferenziertem pluripotenten Zustand gehalten [6; 7] und können durch ihre Fähigkeit zur Proliferation, zur Differenzierung in eine Vielzahl zellulärer Phänotypen sowie ihre nahezu unendliche Selbsterneuerungs-Kapazität („*self-renewal*“) charakterisiert werden [4; 20]. In undifferenziertem Zustand aufrechterhalten, können ES-Zellen zwischen drei Monaten und einem Jahr in Kultur gehalten und mehrere Male eingefroren und aufgetaut werden, ohne ihr Differenzierungspotential zu verlieren [4]. Werden sie hingegen in eine normale embryonale Umwelt reinkorporiert, haben ES-Zellen weiterhin das volle Potential, sich *in vivo* im Zuge der normalen Embryonalentwicklung entlang aller Zellstämme des Embryos richtig entwickeln zu können [21].

Die *In-vitro*-Differenzierung von ES-Zellen erfordert einen initialen Aggregationsschritt, um die so genannten Embryonalkörperchen (*embryoid bodies*, EBs) zu bilden [22]. Dies ist ein Maß für ihre Differenzierungsfähigkeit [23]. Diese multizellulären Gefüge ähneln frühen Postimplantationsembryos [24] und differenzieren *in vitro* mit einer bemerkenswert hohen Frequenz infolge der komplexen Interaktion heterologer Zelltypen spontan in Derivate aller drei embryonalen Keimblätter, dem Endoderm, Ektoderm und Mesoderm [4]. Die verschiedenen, über Vorläuferzellen hervorgehenden differenzierten Zelltypen sind beispielsweise kardiale, myogene oder neuronale, epitheliale, endotheliale oder vaskuläre

glatte Muskelzellen [3], die organähnliche Strukturen bilden [25]. Je nach Entwicklungsstadium und der jeweiligen Zelllinie beeinflussen dabei unterschiedliche Faktoren wie die eingesetzte Zellzahl zur Bildung der EBs, Medienadditive und die Qualität des Rinderserums sowie die Länge der Kultivierung der EBs das Ausmaß der Differenzierung und das Verhältnis der resultierenden Zellen [26; 27]. Analog zur Situation *in vivo* bilden neben den verschiedenen mesenchymalen Zellen auch Komponenten der extrazellulären Matrix die verbindenden Gewebe im EB, die über Zellkontakte eine strukturelle und funktionale Integrität gewährleisten [25; 28].

Während der *In-vitro*-Differenzierung rekapitulieren die pluripotenten ES-Zellen zelluläre Entwicklungsprozesse und Genexpressionsmuster der frühen Embryogenese. So zeigen gewebsspezifische Markergene während der *In-vitro*-Entwicklung der EBs ähnliche entwicklungsregulierte Expressionsmuster wie während der Embryogenese *in vivo* [13]. Auch die Prozesse der Differenzierung und zellulären Spezialisierung der frühen Gewebsbildung werden während der EB-Entwicklung rekapituliert, so dass diese als *In-vitro*-Modellsystem zur Identifizierung inhibitorischer oder induzierender Effekte auf den Differenzierungsprozess früher Embryonalstadien, insbesondere der Bildung neuroektodermaler und mesodermaler Zellen, dienen kann [3].

1.3.1 Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen *in vitro*

Unter bestimmten Kultivierungsbedingungen haben pluripotente murine ES-Zellen im EB das Potential, sich spontan in rhythmisch und synchron kontrahierende Kardiomyozyten zu differenzieren [4], was sie für Untersuchungen der Differenzierung und der Organogenese des Herzens im Rahmen des EST eignet. Sie bilden alle spezialisierten kardialen Zelltypen, die wichtige Eigenschaften des Säuger-Herzens aufweisen. Dazu zählen die entwicklungskontrollierte Expression herzspezifischer Gene und Proteine sowie das Vorhandensein elektrophysiologischer Eigenschaften [29]. Dabei hat sich herausgestellt, dass die ES-Zelldifferenzierung in Kardiomyozyten die Entwicklungsmuster der frühen Kardiogenese *in vivo* von primitiven Vorläuferzellen zu hoch spezialisierten Phänotypen genau rekapituliert [22] und die intakte funktionelle Interaktion zwischen unterschiedlich in Beziehung stehenden Zelltypen wie sinusnodalen, atrialen und ventrikulären Zellen widerspiegelt [30]. So entwickeln sich die Zellen während der Kardiogenese von ES-Zellen über mesodermale Vorläuferzellen in frühe Schrittmacher-Zellen, gefolgt von der Spezialisierung in atrial-, ventrikular-, sinusnodal- sowie His- und Purkinje-ähnliche Zellen [25; 29; 31; 32]. Die verschiedenen kardialen Phänotypen erscheinen während jedes Entwicklungsstadiums des EBs gleichzeitig, verändern sich jedoch in ihrem Anteil und können innerhalb der heterogenen Kardiomyozyten-Populationen morphologisch und elektrophysiologisch identifiziert werden. Dabei erreicht die *In-vitro*-Kardiomyogenese ein Stadium, das der perinatalen Herzzelldifferenzierung entspricht. Innerhalb des EBs sind die

Gruppierungen von Kardiomyozyten zwischen einer überdeckenden epithelialen und einer basalen Schicht mesenchymaler Zellen lokalisiert sowie von einer diskontinuierlichen Basallamina umgeben. Diese Verbindung über Zellkontakte gewährleistet, dass die Kardiomyozyten der EBs immer in einer strukturellen und funktionalen Verbindung zu anderen Zellen und den Proteinen der extrazellulären Matrix stehen [25], was für die Genexpression signifikant ist [29].

1.4 Auswahl der Testsubstanzen

Die in dieser Arbeit getesteten Chemikalien wurden im Rahmen eines BMBF-Verbundprojektes (Bundesministerium für Bildung und Forschung) ausgewählt, um die bisher vorhandene Datenbasis durch Prüfung weiterer Stoffe bzw. Stoffklassen zu erweitern. Aus dieser Zusammenstellung wurden vier Chemikalien unterschiedlicher chemischer Eigenschaften und Klassen ausgewählt, die einen Ernährungsbezug haben, und deren Effekte auf die Differenzierung und Expression von Markergenen im embryonalen Stammzellsystem untersucht. Die Auswahl fiel auf das fungistatische Antibiotikum Trichostatin A (TSA), den Essigsäureester des Cycasin-Aglycons Methylazoxymethanol, das Methylazoxymethanolacetat (MAMac), den Emulgator und pharmakologischen Hilfsstoff Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie den Konservierungsstoff Benzoesäure (BA).

Das Antitumor-Agens 5-Fluorouracil (5-FU) wurde dem EST-Protokoll entsprechend [9] als positive Referenzsubstanz im Rahmen der Kontrolle der Differenzierungsfähigkeit der embryonalen Stammzellen eingesetzt und untersucht.

1.4.1 5-Fluorouracil (5-FU)

5-FU ist ein fluoriertes Pyrimidin, das als Chemotherapeutikum [33] beispielsweise zur Behandlung gastrointestinaler Tumoren eingesetzt wird [34]. Die Strukturformel ist in Abbildung 1 dargestellt.

Der hauptsächliche Wirkmechanismus des Antimetaboliten 5-FU besteht in der konzentrationsabhängigen Inhibition der Thymidylat-Synthetase (TS) [35], dem Enzym, das die Konversion von dUMP zu dTMP katalysiert [36]. Als einzige *De-novo*-Quelle von Thymidin spielt die TS eine Schlüsselrolle in der DNA-Biosynthese [37]. Die Blockierung dieses Enzyms erfolgt durch die wesentlich festere Bindung des Metaboliten 5-FdUMP als des natürlichen Substrates dUMP [34] und hat dramatische Auswirkungen auf proliferierende Gewebe, da die resultierende Erschöpfung des Thymidin-Pools letztlich zum Zelltod führt [35; 37]. Ein direkter Effekt von 5-FU besteht nach dessen Umwandlung im Organismus zum Nukleotid in der Inkorporation von 5-FUTP anstelle von UTP in die RNA, was zu einer Fehlkodierung sowie der Translation eines nicht-funktionalen Proteins führen kann. Der Einbau von 5-FdUTP in die DNA führt letztlich zu irreparablen DNA-Schäden [34; 38]. Die verschiedenen biochemischen und zellulären Veränderungen sind mit der Beeinträchtigung

diverser vitaler Zellfunktionen assoziiert und können letztlich Apoptose bedingen [39], worauf die zytotoxische Wirkung von 5-FU zurückzuführen ist [34; 35; 40].

5-FU erwies sich in einer Vielzahl von Spezies einschließlich des Menschen als embryotoxisch und teratogen wirksam [33; 41-45]. So resultierte die Verabreichung von 5-FU in *In-vivo*-Studien trächtiger Ratten oder Mäuse sowie in der WEC von Hamstern in Wachstumsretardation, Gewichtsverlust oder Missbildungen der Föten [38; 41; 42; 46]. Das Ausmaß der Missbildungen zeigte dabei zeit- und dosisabhängig sowie inter- und intraspezifisch Unterschiede. Die häufigsten Missbildungen durch 5-FU-Behandlung betrafen jedoch die Extremitäten (wie Amelie oder Polydaktylie) und den Schwanz, meist wurde auch Gaumenspalte induziert [33; 41; 42].

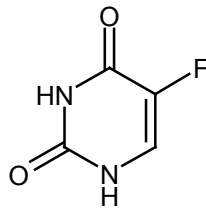


Abbildung 1: Strukturformel der positiven Referenzsubstanz 5-Fluorouracil (5-FU).

1.4.2 Trichostatin A (TSA)

(*R*)-TSA ist ein natürliches, aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliertes, organisches Hydroxamsäure-Derivat [47]. Dieses wirkt als fungistatisches Antibiotikum [48] und hat antitumorale Eigenschaften [49]. Als einer der potentesten Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) ist TSA insbesondere hinsichtlich epigenetischer Modifikationen von Bedeutung. Die Strukturformel ist in Abbildung 2 dargestellt.

Epigenetische Modifikationen können ohne Veränderung der DNA-Sequenz in einer vererbaren Änderung der Genregulation und Genexpression resultieren [50]. Obwohl diese in der Regel im Zuge des epigenetischen *resetting* während der Gametogenese und Embryogenese entfernt werden, können einige Gene sie jedoch aufrecht erhalten, infolge dessen ihr Epigenotyp vererbbar ist [51]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch die Verabreichung einer speziellen Diät an gravide Mäuseweibchen Konsequenzen für die epigenetische Vererbung haben kann [52; 53]. Einen wichtigen epigenetischen Mechanismus, um die eukaryotische Genexpression zu regulieren, stellt die Chromatinmodifikation, wie die reversible posttranslationale Acetylierung von Histonenden, dar [49; 54]. Sie wird durch Histon-Acetyltransferasen und Histondeacetylasen (HDACs) vermittelt und ist in die Regulation des Zellzyklus, der Zellproliferation und Differenzierung involviert [55; 56]. Dabei ist die Wirkung von Histon-Acetyltransferasen im Allgemeinen mit transkriptioneller Aktivität assoziiert, die von HDACs mit einer Hemmung der Transkription [57].

Der Wirkmechanismus von TSA beruht darauf, dass das natürliche (*R*)-Enantiomer von TSA *in vitro* wie *in vivo* bereits in nanomolaren Konzentrationen spezifisch und reversibel die HDACs der Klassen I und II von Säugern hemmt [48]. Das synthetische (*S*)-Enantiomer ist inaktiv [48]. Die Inhibition der Histon-Deacetylierung in Säugerzellen induziert Histon-Hyperacetylierung [57], die wiederum im Verlust der positiven Ladung und der Auflockerung der Chromatinstruktur resultiert. Damit ist die DNA für eine Vielzahl von Faktoren erreichbar [58]. Es kommt zur Modulation der Genexpression, die in der Regel in einer Überexpression spezifischer Gene besteht [48].

In Mäusen ist TSA *in vivo* als teratogen bekannt. So konnte gezeigt werden, dass die spezifische Inhibition von HDACs durch TSA in den axialen Organen von Maus-Embryos zu Histon-Hyperacetylierung führte und an Tag 8 post coitum (p.c.) bereits in der niedrigsten untersuchten Konzentration von 2 mg/kg KG des Muttertieres die Entwicklung des axialen Skeletts störte [59]. An Maus-Embryos, die nach der Implantation *in vitro* mit 0,01-1 μM (3-302 ng/mL) TSA behandelt wurden, kam es zu teratogenen Effekten unter anderem auf das Neuralrohr [60].

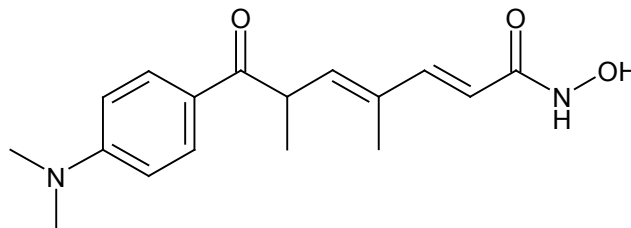


Abbildung 2: Strukturformel der Testsubstanz Trichostatin A (TSA).

1.4.3 Methylazoxymethanolacetat (MAMac)

MAMac ist der stabile Essigsäureester des Cycasin-Aglycons Methylazoxymethanol (MAM). Die Strukturformel von MAMac ist in Abbildung 3 dargestellt.

Cycasin ist ein gesundheitsgefährdendes Nervengift, das zur Familie der Azoxyglycoside gehört. Diese werden von Cycas-PalMFarnen gebildet, die in der tropischen und subtropischen Pflanzenwelt reichlich vertreten sind. Eine Exposition des Menschen mit Cycasin besteht über die Nahrung. So stellen Cycas-Samen die Nahrungsgrundlage Guamischer Chamorro-Insulaner dar. Nach oraler Applikation wird Cycasin in adulten Säugern durch intestinale mikrobielle β -D-Glucosidasen deglycosyliert. Es entsteht dessen Hauptmetabolit, das aktive Kanzerogen MAM. Dieses ist allen Cycas-Azoxyglycosiden gemeinsam und für deren toxikologische Eigenschaften verantwortlich. Der stabilere Essigsäureester des Cycasin-Aglycons ist das MAMac. Vergiftungssymptome beim Menschen reichen von Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen bis hin zu Krämpfen und Tod. Neben Entwicklungsneurotoxizität zählen auch Kanzerogenität, Teratogenität und Mutagenität zu den beim Menschen bekannten toxikologischen Effekten von Cycas-Arten.

Traditionell waschen die Guamischen Chamorro-Insulaner die Palmfarn-Samen zur Vorbereitung der Nahrung jedoch sehr gründlich, wodurch die Konzentration des Nervengifts nachweislich auf einen unbedenklichen Wert sinkt [61-63].

Der Wirkmechanismus von MAMac beruht vermutlich auf der methylierenden Wirkung auf die DNA und RNA, die *in vitro* [64] wie *in vivo* [65; 66] beobachtet wurde.

In verschiedenen Tests erwies sich MAMac als genotoxisch, mutagen bzw. kanzerogen [62]. In Mäusen führte es in verschiedenen Organen zu einer Abnahme der RNA- und Proteinsynthese [61], in einem weiteren Tiermodell induzierte MAMac nach pränataler Behandlung an Tag 15 p.c. Malformationen des Gehirns. Konzentrationsabhängig kam es zu Hypoplasie des Cortex und des Hippocampus sowie zu Veränderungen spezifischer Neurotransmittersysteme [67]. Bedingt durch seinen Metabolismus bestehen jedoch spezies-, organ- und geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität gegenüber MAMac [61; 68-70].

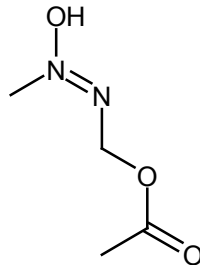


Abbildung 3: Strukturformel der Testsubstanz Methylazoxymethanolacetat (MAMac).

1.4.4 Natriumdodecylsulfat (SDS)

SDS ist ein amphiphiles, oberflächenaktives Molekül hoher Grenzflächenaktivität. Aufgrund der Ladungsverteilung im Molekül gehört es zu den anionischen Detergenzien. Die Strukturformel ist in Abbildung 4 dargestellt.

Als gutes Netz- und Schaummittel ist das mikrobizide Alkylsulfat als Emulgator und waschaktive Substanz in Hygieneprodukten wie Zahnpasten, Seife, Shampoos und Waschmitteln sowie Hautcremes und anderen Kosmetika enthalten. In der Pharmazie ist SDS als Hilfsstoff Bestandteil oraler Arzneiformen wie Tabletten, Kapseln, Dragees oder Suspensionen [71].

Der Wirkmechanismus von SDS beruht vermutlich auf seinen denaturierenden und oberflächenaktiven Eigenschaften, infolge dessen membrangebundene Enzymaktivitäten verändert [72] und verschiedene Membranlipide aus der Membran herausgelöst werden. Primär kommt es wahrscheinlich zu einem unspezifischen Schaden an der Plasmamembran und an lysosomalen Membranen, was konzentrations- und zeitabhängig schließlich in einer Erhöhung der Membranpermeabilität, der Desintegration der Membran und schließlich ihrer völligen Auflösung resultiert [73].

Eine Konzentration von 480 mg/kg KG SDS resultierte bei der Maus *in vivo* nach dermalen Applikation auf das Muttertier an den Tagen 6-13 in Fötotoxizität [74]. Weitere reproduktionsschädigende Wirkungen von SDS am Säugetier sind nicht bekannt.

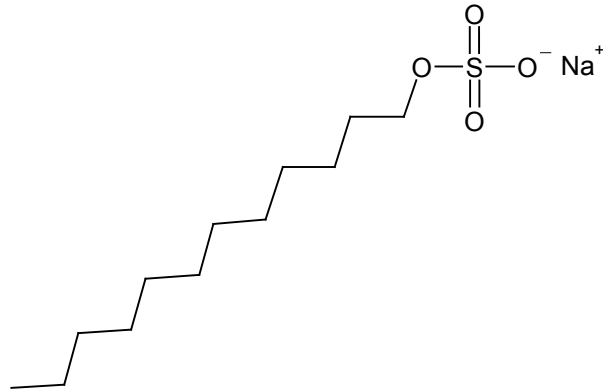


Abbildung 4: Strukturformel der Testsubstanz Natriumdodecylsulfat (SDS).

1.4.5 Benzoesäure (BA)

BA ist die einfachste aromatische Carbonsäure und setzt sich aus einem Benzolring (Phenylrest) und einer daran gebundenen Carboxylgruppe zusammen. Die Strukturformel ist in Abbildung 5 dargestellt.

BA kann aus dem Harz einer indonesischen Baumart, Siam-Benzoe und Sumatra-Benzoe, gewonnen werden und ist als ein Hauptbestandteil des Harzes Benzoe in vielen Weihrauchmischungen enthalten. In geringen Mengen findet sich BA natürlicherweise auch in Früchten wie Pflaumen, Heidel-, Preisel- oder Himbeeren sowie in Honig, Joghurt, Sauermilch oder Käse. Technisch synthetisiert wird BA vor allem zur Herstellung von Benzoesäureestern für die Parfümindustrie, zur Herstellung von Polymerisations-Initiatoren bei der Erzeugung von Kunststoffen und als Lebensmittel-Zusatzstoff (E 210) eingesetzt. Als Konservierungsstoff findet BA in einer Vielzahl haltbarer Nahrungsmittel wie Ketchup, Senf oder Margarine, zuckerreduzierten Konfitüren, Kaugummis oder diätetischen Lebensmitteln Verwendung, da die Säure antibakterielle und pilztötende Wirkung besitzt [75]. Als künstlich hergestelltes Antioxidans erhöht BA die Haltbarkeit von Lebensmitteln, indem es eine Oxidation durch Luftsauerstoff verhindert, wodurch ein chemischer Verderb verzögert wird.

Der Wirkmechanismus von BA beruht auf dem Hemmeffekt gegenüber Enzymen wie Katalase und Peroxidase, die reaktive Sauerstoffspezies abbauen. Die Folge ist eine Ansammlung von Wasserstoffperoxid in den Zellen der Mikroorganismen, infolge dessen diese letztlich absterben [75].

Im menschlichen Organismus ist BA weitestgehend unschädlich, da eine Akkumulation durch das Umwandeln und Ausscheiden der Substanz als Hippursäure verhindert wird [75]. Beim Menschen liegt die orale LD₅₀-Dosis (Letale Dosis 50) bei 500 mg/kg KG, bei der Maus

bei 1940 mg/kg KG [74]. Toxische Effekte treten im Bereich des Respirations- und Gastrointestinaltrakts auf, eine reproduktionsschädigende Wirkung ist für BA jedoch nicht bekannt [74].

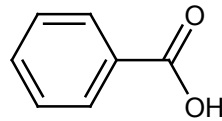


Abbildung 5: Strukturformel der Testsubstanz Benzoesäure (BA).

1.5 Auswahl der Markergene für die Kardiomyozytendifferenzierung

Das Herz ist das erste funktionale Organ, das während der Entwicklung höherer Vertebraten gebildet wird. Die Herzbildung ist jedoch ein sehr komplexer Prozess, der neben der Spezifizierung mehrerer Zelltypen, einschließlich der kardialen Myozyten, multiple morphogenetische Ereignisse umfasst. In der Maus beinhaltet die früheste Phase der kardialen Entwicklung die Bildung einer kardiogenen Zone an Tag 7 p.c.. Diese teilt das Mesoderm in viszerale und somatische Komponenten, aus denen das kardiogene Mesoderm hervorgeht. Schließlich kommt es zur Bildung des Herzschauches, der zwischen 8 und 11 Tagen p.c. der Bildung der Herzschleife (*looping*) und der Scheidewand unterliegt, um letztlich die reife Vierkammerstruktur des Herzens zu bilden. In der Embryonalentwicklung der Maus beginnt das Herz bereits 8,5 Tage p.c. zu schlagen und so den Austausch von Nährstoffen zwischen Muttertier und Embryo durch Verteilung zu ermöglichen (Review in [76]).

Die Phasen der Herzentwicklung werden durch komplexe Interaktionen verschiedener Zelltypen sowie verschiedener Proteine wie Transkriptionsfaktoren gesteuert. So ist die morphologische Differenzierung von ES-Zellen in Kardiomyozyten oder andere Zelltypen mit der Expression gewebsspezifischer Gene von beispielsweise herzmuskelspezifischen Transkriptionsfaktoren, Zytoskelettproteinen, Rezeptoren und Ionenkanälen kausal korreliert [25-27; 29]. Die Gene solcher Transkriptionsfaktoren sowie weitere Gene, die *in vivo* in die Kardiomyogenese involviert sind, können daher als molekulare Marker für die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu *in vitro* spontan kontrahierenden Kardiomyozyten genutzt werden.

In dieser Arbeit wurde die Expression der mesoderm- bzw. herzmuskelspezifischen Gene *MesP1* und *MLC1* untersucht, die erfolgreich als molekulare Marker für embryotoxische Wirkungen etabliert wurden und schon zu einem frühen Zeitpunkt während der Differenzierung von ES-Zellen eine korrekte Prädiktion des embryotoxischen Potentials einer Substanz ermöglichen [14]. Zusätzlich wurde für TSA die Expression des herzspezifischen

frühen Transkriptionsfaktors GATA-4 untersucht, dessen Expressionsprofil ebenfalls bekannt ist [14].

1.5.1 Mesoderm Posterior 1 (MesP1)

MesP1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren gehört. Seine Expression erfolgt nahezu ausschließlich im frühen Mesoderm, das letztlich das extraembryonale und kranial-kardiale Mesoderm bildet [77].

MesP1 spielt eine wesentliche Rolle in der kardialen Morphogenese und ist für die frühe Spezifizierung kardialer Vorläuferzellen sowie für die Migrationsaktivität mesodermaler Zellen zur Bildung eines Herzschlauchs notwendig, indem er die entsprechenden Zielgene reguliert [78; 79]. Dementsprechend zeigten homozygote *MesP1*-Null-Mäuse verschiedene Anomalien der Herzschlauch-Formation und der Bildung der Herzschleife (*looping*) [78]. Die gestörte Migrationsaktivität der mesodermalen Zellen und/oder die fehlerhafte Proliferation der kardialen Vorläuferzellen resultierte schließlich in *Cardia Bifida*, einer abnormalen Herzmorphogenese infolge fehlerhafter ventraler Fusion des perikardialen Mesoderms [78; 79].

MesP1 wird zu einem sehr frühen Zeitpunkt der mesodermalen Entwicklung, noch vor dem Auftreten kontraktionsfähiger Kardiomyozyten benötigt. So konnte die Expression von *MesP1 in vivo* bereits zu Beginn der Gastrulation, an Tag 6,5 der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden. Nach initial starker Expression 6,5-6,75 Tage p.c. wird *MesP1* 7,5 Tage p.c. jedoch schnell wieder herunter reguliert. Noch vor dem Tag 8,5 p.c. geht die gesamte Expression dieses Gens verloren und ist zu keinem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung mehr nachweisbar. Lediglich in den Testes der adulten Maus wird es entwicklungsgemäß exprimiert [77].

Da es sich bei dem EST um ein *In-vitro*-System aus ES-Zellen handelt, dessen Differenzierungsbeginn durch Aussäen nicht mit der Embryonalentwicklung *in vivo* vom Zeitpunkt der Befruchtung an gleichzusetzen ist, kann MesP1 in den EBs als einer der frühesten molekularen Marker der Kardiomyozytendifferenzierung bereits an Tag 5 der Differenzierung in hoher Quantität nachgewiesen werden [14]. So sollte untersucht werden, ob Substanzeffekte auf der Ebene der Genexpression bereits zu diesem frühen Zeitpunkt mit Hilfe dieses Markers reproduzierbar festzustellen sind.

1.5.2 Myosin light chain 1 (MLC1)

Die Expression der Myosin-Gene *MHC* (*myosin heavy chain*) und *MLC* (*myosin light chain*) beginnt in der Embryonalentwicklung zwischen den Tagen 7,5 und 8. Zusammen bilden diese kontraktilen Proteine das Myosin der dicken Filamente in Muskelzellen und ermöglichen so die Bildung funktionaler kontraktile Kardiomyozyten [80].

Während der Entwicklung werden dieselben *MLC*-Gene in allen myokardialen und Skelettmuskelzellen koordiniert koexprimiert. Dabei unterliegen sie in den beiden Typen gestreifter Muskeln unterschiedlichen zell- und phasenabhängigen Regulationsmechanismen. Da die Bildung der Kardiomyozyten zeitlich vor der Skelettmuskelbildung auftritt, ist es möglich, deren Differenzierung durch Messung der kardialen Isoform des *MLC1*-Gens spezifisch nachzuweisen [80; 81]. Dessen Transkription ist für die Differenzierung embryonaler Stammzellen in den EBs charakteristisch und steht für die ventrikuläre Spezifizierung während der Kardiogenese embryonaler Stammzellen [82].

Da das Expressionsprofil von *MLC1* in ES-Zellen zwischen den Tagen 7 und 10 der Differenzierung einen Anstieg zeigt [14], diente die Messung der atrialen fötalen Form des *MLC1*-Gens in den substanzbehandelten ES-Zellen an Tag 7 der möglichst frühen Detektion von Veränderungen dessen Expressionsmusters, während die Messung an Tag 10 eine direkte Korrelation der Expression mit der morphologischen Inspektion ermöglichte.

1.5.3 GATA-4

GATA-4 ist ein herzspezifisches Mitglied der GATA-Familie von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die an diversen Entwicklungsprozessen beteiligt sind [83].

Im embryonalen Herzschauch der Maus wird *GATA-4* zusammen mit *GATA-5* und *GATA-6* ab Tag 7,5 p.c. in myokardialem und endokardialem Gewebe sowie im nachgeburtlichen Myokard exprimiert und ist somit einer der frühesten Transkriptionsfaktoren, die während der Kardiogenese exprimiert werden [76]. Durch Interaktion mit weiteren regulatorischen Faktoren reguliert dieser die Expression verschiedener herzmuskelspezifischer Strukturgene wie kardialem α - und β -*MHC* sowie atrialem und ventrikulärem *MLC1* [84] und spielt so in der Regulation der Kardiogenese von Säugetieren, insbesondere der Regulation der Herzfaltung eine wichtige Rolle, die für eine normale kardiale Morphogenese und die Bildung eines funktionalen Herzschauches essentiell ist. In homozygot *GATA-4*-defizienten Mäusen differenzierten sich zwar primitive kardiale Myozyten; diese migrierten jedoch nicht zur ventralen Mittellinie, um einen Herzschauch zu bilden. Aufgrund schwerer Entwicklungsabnormalitäten resultierte dies schließlich zwischen den Tagen 8,5 und 10,5 p.c. in Letalität [76].

In ES-Zellen steigt die Expression von *GATA-4* zwischen den Tagen 4 und 10 der Differenzierung an [14].

1.6 Zielstellung der Arbeit

Die Aufgabenstellung zielte darauf ab, durch Untersuchungen zur Differenzierung und Genexpression muriner embryonaler Stammzellen *in vitro* das embryotoxische Potential ausgewählter Chemikalien *in vivo* einzuschätzen. Die Testsubstanzen weisen unterschiedliche chemische Eigenschaften auf, repräsentieren verschiedene chemische Klassen und haben alle einen Ernährungsbezug.

Um die Zielstellung zu bearbeiten, wurden ES-Zellen der Linie D3 mit vier ausgewählten Testsubstanzen (siehe 1.4) entsprechend des EST-Protokolls [9] behandelt und deren Wirkung auf die Entwicklung kontrahierender Herzmuskelzellen untersucht. Anschließend wurde die Expression ausgewählter Markergene (siehe 1.5) untersucht, die sich als geeignete molekulare Parameter erwiesen hatten, um substanzbedingte Effekte auf die Herzmuskelzellendifferenzierung mit der veränderten Expression herzmuskelspezifischer Gene zu korrelieren [14]. So wurden Veränderungen im Auftreten kontrahierender Herzmuskelzellen sowie in der Expression der Markergene als Parameter für eine gestörte Kardiomyozytendifferenzierung genutzt, um die embryotoxische Wirkung der getesteten Substanzen *in vivo* einzuschätzen.

2 Material und Methoden

2.1 Routinekultur

Die Routinekultur wurde gemäß der Standard-Arbeits-Ablaufbeschreibung „Embryonaler Stammzelltest (EST)“ der Bayer Schering Pharma AG durchgeführt.

2.1.1 Zelllinien

Balb/c 3T3-Zellen, Klon A31

bezogen von American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) (Kat.Nr.: CCL-163), zur Verfügung gestellt von der ZEBET

Embryonale Stammzellen D3

bezogen von ATCC (Rockville, USA) (Kat.Nr.: CRL-1934)

Bei den permanent differenzierten Zellen der Linie 3T3 handelt es sich um eine aneuploide murine Zelllinie mit fibroblasten-ähnlicher Morphologie, die ursprünglich aus disaggregierten Balb/c Mouse Embryos entwickelt wurde [85]. Die murinen ES-Zellen der Linie D3 wurden ursprünglich aus vier Tage alten Blastozysten von 129/Sv-Mäusen (129/Sv+/+) etabliert. Der Karyotyp typischer ES-Zellen der Linie D3 besteht aus einem normalen diploiden Set aus 40 Chromosomen und hat eine XY-Konstitution. Er enthält keine ersichtlichen Abnormalitäten und ist stabil [4]. Zum Zeitpunkt der Untersuchung befanden sich die ausdifferenzierten Maus-Fibroblasten sowie die ES-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase.

Da die Anzahl der Passagen, die die Zellen vor deren Erhalt bereits durchlaufen haben, nicht bekannt ist, wurden die unbekanntenen Passagen als P bezeichnet und die Passagen nach dem Auftauen eines Aliquots entsprechend weitergezählt (P1). Bei mehrmaligem Einfrieren der Zellen wurden die aktuellen Passagen separat gezählt (P1+3: Passage P1 eingefroren, seit 3 Passagen wieder in Kultur).

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-cm-Zellkulturschalen (15 mm hoch)

Corning (Schiphol-Rijk, NL)

10-cm-Zellkulturschalen (20 mm hoch)

Corning (Schiphol-Rijk, NL)

Cryoröhrchen (2 mL)

Nalgene (Rochester, USA)

Zentrifugenröhrchen (13 mL)

Sarstedt AG und Co. (Nümbrecht)

2.1.3 Zellkulturzusätze

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit L-Glutamin, Glukose und NaHCO ₃	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
L-Glutamin	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>Murine Leukaemia Inhibitory Factor</i> (mLIF), ESGRO	Chemicon Europe Ltd. (Hampshire)
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nichtessentielle Aminosäuren (NAA)	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10,000 U/10,000 µg/mL)	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
D-PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/L / 0,2 g/L)	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)

***Murine Leukaemia Inhibitory Factor* (mLIF)**

mLIF wurde während der Passage der ES-Zellen direkt in die Zellkulturschalen gegeben. Die mLIF-Lösung hatte eine Konzentration von 10⁶ U/mL und wurde in Aliquoten bei ca. -20°C gelagert. Einmal aufgetaute Aliquote wurden bei ca. 4°C gelagert (stabil bis zu einem Jahr).

Fötale Kälberserum (FCS)

Verwendet wurden ausschließlich auf Förderung der Differenzierung embryonaler Stammzellen getestete Chargen FCS. Vor der ersten Verwendung wurde dieses bei ca. 4°C aufgetaut und für ca. 30 min bei ca. 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei ca. 4°C.

β-Mercaptoethanol (β-ME)

Es wurde eine 10 mM Arbeitslösung in D-PBS angesetzt, indem für 5 mL Arbeitslösung 3,5 µL reines β-ME zu 5 mL D-PBS gegeben wurden. Diese wurde bei ca. 4°C gelagert und bis zu einer Woche verwendet.

Alle Mediumzusätze wurden als Lösungen bereitgestellt und je nach Herstellerangaben bei ca. +4°C oder ca. -20°C in Aliquoten gelagert.

2.1.4 Zellkulturmedien

Die Zellkulturzusätze wurden in DMEM angesetzt. Angegeben werden deren jeweilige Endkonzentrationen.

2.1.4.1 Einfriermedien zur Kryokonservierung der Zellen

D3-Zellen:		3T3-Zellen:	
40 %	FCS	20 %	FCS
2 mM	Glutamin	4 mM	Glutamin
50 U/mL	Penicillin	50 U/mL	Penicillin
50 µg/mL	Streptomycin	50 µg/mL	Streptomycin
1 %	NAA		
0,1 mM	β-ME		
10 %	DMSO	10 %	DMSO

Zur Langzeitaufbewahrung der D3- und 3T3-Zellen wurden Aliquote in sterilen Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei ca. -190°C eingefroren. DMSO diente dabei im Einfriermedium als kryoprotektives Agens. Nach dem Abtrypsinieren und Zentrifugieren (4 min bei 100*g) der Zellen wurden diese in 2 mL Einfriermedium resuspendiert und zu je 1 mL auf zwei Cryoröhrchen verteilt. Anschließend wurden die Zellen in einem mit Isopropanol gefüllten Gefriercontainer (Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene), der eine langsame und kontinuierliche Abkühlung mit ca. 1°C pro Minute gewährleistet, bei -80°C eingefroren. Letztlich wurden die Cryoröhrchen in Flüssigstickstoff überführt.

2.1.4.2 Zellkulturmedien zum Auftauen der Zellen

D3-Medium:		3T3-Medium:	
15 %	FCS	10 %	FCS
2 mM	L-Glutamin	4 mM	L-Glutamin
50 U/mL	Penicillin	50 U/mL	Penicillin
50 µg/mL	Streptomycin	50 µg/mL	Streptomycin
1 %	NAA		
0,1 mM	β-ME		
1000 U/mL	mLIF		

Zum Auftauen eines Zellaliquots wurde dieses nach der Entnahme aus dem Flüssigstickstoff möglichst schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in 5 mL Zellkulturmedium aufgenommen. Um das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen, wurden die Zellen zügig zentrifugiert (4 min bei 100*g). Das Zellpellet wurde anschließend in Kulturmedium resuspendiert und in eine entsprechende gelatinebeschichtete Zellkulturschale (30 min; 0,1 % Gelatine-Lösung in D-PBS) überführt. Zu den D3-Zellen wurde pro mL Kulturmedium 1 µL mLIF direkt zur Schale zugegeben, um diese in Kultur in undifferenziertem pluripotenten Zustand aufrecht zu erhalten. Einen Tag nach dem Auftauen erfolgte ein zusätzlicher

Mediumwechsel. Die 3T3-Zellen konnten nach ein bis zwei, die D3-Zellen nach zwei bis drei Passagen in den Assays verwendet werden.

2.1.5 Passagieren der Zellen

In der Routinekultur wurden die D3-Zellen in 6-cm-Zellkulturschalen, die 3T3-Zellen in 10-cm-Zellkulturschalen als Monolayer kultiviert und standardmäßig alle zwei bis drei Tage passagiert. Um Veränderungen der Zellkultur zu vermeiden, wurden die Zellen maximal 25 Passagen kultiviert. D3-Zellkulturmedium wurde ohne mLIF hergestellt und nicht länger als eine Woche eingesetzt, 3T3-Zellkulturmedium nicht länger als zwei Wochen. Die Lagerung erfolgte bei ca. 4°C. Die Kultivierung und Inkubation der Zellen sowie aller mit diesen hergestellten Ansätze für Experimente erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ in Luft und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Passagieren der 3T3-Zellen

Die 3T3-Zellen wurden mit D-PBS gespült und mit ca. 2,5 mL Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet. Nach kurzer Einwirkdauer wurde die Trypsinlösung vorsichtig abgesaugt und die Schale im Brutschrank für ca. 2 min inkubiert bis die Zellen begannen, sich abzulösen. Anschließend wurden die Zellen in 4 bzw. 5 mL 3T3-Medium resuspendiert und etwa 1:8 bis 1:10 in eine neue Zellkulturschale mit 9,5 mL 3T3-Medium überführt und gleichmäßig verteilt. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte für 2 bzw. 3 Tage.

Sollten die Zellen in einem Zytotoxizitätsassay verwendet werden, wurden sie nach dem Resuspendieren zentrifugiert (4 min bei 100*g) und das Zellpellet anschließend in einem geeigneten Volumen 3T3-Zellkulturmedium (ca. 1,5 mL) aufgenommen. Mittels Hämocytoometerkammer wurde die Zelldichte bestimmt und ein Teil der Zellen entsprechend subkultiviert, während der Rest für den Versuchsansatz eingesetzt wurde.

Passagieren der D3-Zellen

Nach dem Spülen der D3-Zellen mit D-PBS wurden diese für ca. 2 min mit ca. 1,5 mL Trypsin/EDTA-Lösung vorsichtig überschichtet und anschließend in der Lösung abgospült. Durch kräftiges Resuspendieren wurden die Zellen vereinzelt. Um die Trypsinaktivität zu inhibieren, wurde die Zellsuspension in 5 mL Zellkulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (4 min bei 100*g). Das Pellet wurde schließlich in einem geeigneten Volumen D3-Zellkulturmedium (ca. 2,5 mL) aufgenommen und für die Passage 1:6 bzw. 1:8 verdünnt. Um die ES-Zellen in Kultur in undifferenziertem pluripotenten Zustand aufrecht zu erhalten, wurde zur neuen Zellkulturschale 1 µL mLIF pro mL Zellkulturmedium zugegeben und gleichmäßig verteilt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank für 2 bzw. 3 Tage.

Für Versuchsansätze wurde nach der Resuspension der Zellen deren Dichte mittels Hämozytometerkammer bestimmt und ein Teil der Zellen wie beschrieben weiterkultiviert, der Rest für den Versuchsansatz eingesetzt.

2.2 Substanztestungen

Die Substanztestungen wurden gemäß der Standard-Arbeits-Ablaufbeschreibung „Embryonaler Stammzelltest (EST)“ der Bayer Schering Pharma AG durchgeführt. Sie bestanden standardmäßig aus einem Differenzierungsassay mit D3-Zellen sowie jeweils einem Zytotoxizitätstest mit D3- und 3T3-Zellen. Für die RNA-Isolierung aus substanzbehandelten EBs wurden Proben an den Tagen 5, 7 und 10 der Differenzierung genommen.

2.2.1 Verbrauchsmaterialien

bakteriologische Petrischalen (60x15 mm)	Greiner (Frickenhausen)
10-cm-Zellkulturschalen (20 mm hoch)	Corning (Schiphol-Rijk, NL)
24-Loch-Mikrotiterplatten f. Zellkultur (24-Well-Platten)	Falcon (BD Biosciences, Heidelberg)
96-Loch-Mikrotiterplatten f. Zellkultur (96-Well-Platten)	Falcon (BD Biosciences, Heidelberg)
Reaktionsgefäße, lichtundurchlässig	Eppendorf (Hamburg)
Verdünnungsracks	Greiner (Frickenhausen)
Verdünnungsröhrchen	Starlab (Ahrensburg)

2.2.2 Feinchemikalien/Testsubstanzen

Benzoessäure (CAS Nr. 65-85-0)	Sigma-Aldrich (Fluka; Buchs, Schweiz)
5-Fluorouracil (CAS Nr. 51-21-8)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methylazoxymethanolacetat (CAS Nr. 592-62-1)	Midwest Research Institute (Kansas City, USA)
Natriumdodecylsulfat (CAS Nr. 151-21-3)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin G (CAS Nr. 69-57-8)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trichostatin A (CAS Nr. 58880-19-6)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Die Reinheitsstufe der Chemikalien entsprach Analysequalität.

2.2.3 Puffer, Lösungen, Ansätze

Aqua Bidest	Millipore (MilliQ-Anlage; Schwalbach)
D-PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Ethanol (96 %, reinst)	Merck (Darmstadt)
Dimethylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Fluka; Buchs, Schweiz)
2-Propanol (Isopropanol)	Merck (Darmstadt)
RNase-freies Wasser	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

MTT-Lösung

Die MTT-Stammlösung wurde mit 5 mg/mL MTT in D-PBS angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße) und in Aliquoten bei ca. -20°C gelagert.

MTT-Desorb

Zur Lösung des in den Zellen produzierten blauen MTT-Formazan-Farbstoffes diente eine Lösung mit einer Endkonzentration von 0,7 % SDS in 2-Propanol, MTT-Desorb. Diese Lösung wurde vor jedem Gebrauch frisch angesetzt und im Falle des Auftretens von Präzipitaten im Wasserbad auf ca. 37°C erwärmt.

2.2.4 Differenzierungsmedium

D3-Medium:

15 %	FCS
2 mM	L-Glutamin
50 U/mL	Penicillin
50 µg/mL	Streptomycin
1 %	NAA
0,1 mM	β-ME

Das Differenzierungsmedium wurde analog zum D3-Zellkulturmedium angesetzt, jedoch ohne Zusatz von mLIF.

2.2.5 Assaycheck der Zellen

Vor dem Einsatz in Substanztestungen wurde nach jedem Auftauen eines neuen Zellaliquots von D3- oder 3T3-Zellen ein standardisierter Kontrollansatz, der Assaycheck, durchgeführt. Dieser umfasste einen Differenzierungsassay mit D3-Zellen (siehe 2.2.7), der standardmäßig mit einer unbehandelten Kontrolle und sechs Konzentrationen 5-FU zwischen 0,02 und

0,07 µg/mL im Abstand von 0,01 µg/mL angesetzt wurde. So wurde die Differenzierungsfähigkeit der D3-Zellen zu kontrahierenden Kardiomyozyten sowie deren Sensitivität gegenüber embryotoxischen Effekten überprüft. In mitgeführten Zytotoxizitätstests (siehe 2.2.8) wurde die Sensitivität der D3- und 3T3-Zellen in Konzentrationen von 0,02 bis 1 µg/mL gegenüber zytotoxischen Substanzeffekten untersucht. Darüber hinaus wurde anhand der positiven Referenzsubstanz 5-FU und der negativen Referenzsubstanz Penicillin G bestätigt, dass der EST dazu in der Lage ist, starke sowie nicht embryotoxische Substanzen *in vitro* korrekt zu erfassen.

Enthielten an Tag 10 der Differenzierung mindestens 21 von 24 EBs der unbehandelten Kontrollen spontan kontrahierende Kardiomyozyten, galt der Assaycheck als valide [9] und es war sichergestellt, dass die D3-Zellen ausreichend differenzierungsfähig waren. Anhand der Anzahl der EBs, in denen sich ohne und trotz Substanzeinwirkung Kardiomyozyten entwickelt hatten, wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt (siehe 2.2.7.1). Nach Behandlung mit 5-FU sollten ID_{50} -Werte (Halbhemmkonzentration der Kardiomyozytendifferenzierung) zwischen 0,048 und 0,06 µg/mL 5-FU erreicht werden [9]. Im MTT-Assay wurde schließlich die Viabilität der Zellen in An- und Abwesenheit der positiven Referenzsubstanz gemessen und anhand von Konzentrations-Wirkungskurven die IC_{50} -Werte bestimmt (siehe 2.2.8.1). $IC_{50}D3$ -Werte (Halbhemmkonzentration der zytotoxischen Wirkung auf die D3-Zellen) sollten innerhalb der Grenzen von 0,048 und 0,086 µg/mL liegen und die $IC_{50}3T3$ -Werte (Halbhemmkonzentration der zytotoxischen Wirkung auf die 3T3-Zellen) zwischen 0,12 und 0,5 µg/mL [9]. Laborintern erwiesen sich in sämtlichen vorangegangenen Tests $IC_{50}3T3$ -Werte zwischen 0,076 und 0,16 µg/mL 5-FU ebenfalls als geeignet, um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu liefern [86]. Hinreichende Bedingung für den Einsatz eines Zellaliquots in Substanztestungen war ein valides Ergebnis des Assaychecks.

2.2.6 Rangefinder

Waren vor Beginn der Untersuchungen zum embryotoxischen Potential einer Testsubstanz keine Informationen über ihre diesbezügliche Wirkungskonzentration bekannt, wurde vor den Substanztestungen ein Rangefinder durchgeführt. Dieser diente dazu, den geeigneten Konzentrationsbereich einer noch ungeprüften Testsubstanz zu identifizieren, in dem zytotoxische Effekte auftraten. Anhand von verschiedenen Substanzverdünnungen wurde in den Zytotoxizitätstests (siehe 2.2.8) ein Konzentrationsbereich über mehrere Zehnerpotenzen untersucht. Bedingt dadurch, dass zur Dosisfindung über einen großen Konzentrationsbereich nur eine relativ geringe Anzahl an Konzentrationen untersucht wurde, unterschieden sich der Kurvenverlauf und insbesondere die ermittelten Halbhemmkonzentrationen eines Rangefinder-Experimentes und einer Substanztestung zum

Teil. Aus diesen Gründen wurden Experimente zur Konzentrationsfindung in der Regel nicht zur Klassifizierung einer Testsubstanz herangezogen.

2.2.7 Differenzierungsassay der D3-Zellen

Im Differenzierungsassay mit D3-Zellen wurde mit verschiedenen Substanzkonzentrationen die embryotoxische Wirkung der Testsubstanz anhand der Kardiomyozytendifferenzierung embryonaler Stammzellen untersucht. Diese erfolgte während der zehntägigen Kultivierung nach dem Protokoll des Embryonalen Stammzelltests (EST, [9]). Es wurden dazu jeweils acht Konzentrationen (sechs Substanzkonzentrationen sowie zwei Lösungsmittelkontrollen) mit einem geeigneten Verdünnungsfaktor getestet, die im Bereich des erwarteten Effektes, definitionsgemäß jedoch maximal auf 1000 µg/mL [5] festgelegt wurden. Unter Beachtung einer stets gleich bleibenden Lösungsmittelkonzentration und des Nichtüberschreitens deren zulässiger Höchstmenge (Tabelle 1, [9]) wurden die sechs Substanzkonzentrationen standardmäßig in einer Verdünnungsreihe mit der Testsubstanz in D3-Zellkulturmedium angesetzt. Die beiden Lösungsmittelkontrollen wurden mit derselben Lösungsmittelkonzentration angesetzt und zu Beginn des Testansatzes (Kontrolle 1) bzw. am Ende (Kontrolle 2) pipettiert, um unspezifische Effekte erkennen zu können.

Für die RNA-Isolierung an den Tagen 5, 7 und 10 wurden zusätzliche EBs mitgeführt. Dabei wurden pro Testkonzentration für einen Test mit RNA-Isolierung mindestens fünf Schalen benötigt, von denen zwei für die RNA-Isolierung an Tag 5 (in bakteriologischen Petrischalen) und jeweils eine für die Tage 7 und 10 (in 10-cm-Zellkulturschalen) benötigt wurden. Eine weitere Schale wurde für die mikroskopische Auswertung der Differenzierung an Tag 10 verwendet. Da die EBs in höheren Testkonzentrationen erfahrungsgemäß infolge zytotoxischer Substanzeffekte kleiner wurden, wurden für diese mehr Schalen für die RNA-Isolierung angesetzt. So bestand ein Assay an Tag 0 in der Regel aus ca. 50 Tropfenplatten.

Tabelle 1: Maximal zulässige Konzentration der verwendeten Lösungsmittel im Zellkulturmedium [9], die keinen Effekt auf die Differenzierung der D3-Zellen haben.

Höchste Lösungsmittelkonzentrationen [Vol %]

Ethanol	0,5 %
D-PBS	1,0 %

Tag 0: Ansetzen der Tropfenplatten

Die Bildung der EBs wurde nach der „*hanging drop*“-Methode [26] durchgeführt. Da die Differenzierungskapazität embryonaler Stammzellen von der Anzahl der Zellen abhängig ist, die sich im EB differenzieren [26], wurden zur Herstellung der Tropfen und Bildung der EBs pro bakterielles 6-cm-Schälchen $3,75 \times 10^4$ D3-Zellen pro mL Differenzierungsmedium mit Substanz zugegeben. Diese Zellsuspension wurde stets unmittelbar vor dem Pipettieren

hergestellt und in Tropfen von je 20 μL Volumen auf die Innenseite des Deckels einer Boden bedeckend D-PBS-befüllten 10-cm-Zellkulturschale pipettiert. So lag eine definierte Zellzahl von etwa 750 Zellen pro Tropfen vor. Pro Deckel wurden ca. 50 Tropfen derselben Konzentration pipettiert. Zum Aufsetzen des Deckels auf die Zellkulturschale wurde dieser vorsichtig in einer fließenden Bewegung umgedreht. Die hängenden Tropfen wurden 3 Tage im Brutschrank inkubiert.

Tag 3: Abspülen der Tropfen

Für jede Tropfenplatte wurde ein bakteriologisches 6-cm-Schälchen mit 5 mL Medium (bei Substanztests mit der gleichen Testkonzentration wie in den Tropfen) bereitgestellt. Aus diesem wurden mit einer Pipette ca. 2,5 mL Medium aufgenommen, um die Tropfen mit dem Medium vorsichtig vom Deckel abzuspülen. Da die EBs zu diesem Zeitpunkt feste Aggregate gebildet hatten, konnten sie anschließend mit der Pipette (große Öffnung, z.B. 5 mL-Falconpipette) unbeschadet mit dem gesamten Medium vom unteren Rand des Deckels aufgenommen, in die 6-cm-Schale transferiert und gleichmäßig verteilt werden. Da sich die EBs an der Schälchenoberfläche nicht anheften konnten, wuchsen sie in Suspensionskultur und behielten ihre kugelige Form bei. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte für 2 Tage.

Tag 5: Aussaat der EBs

Es wurden die gleichen Testkonzentrationen wie an den Tagen 0 und 3 angesetzt. Zur mikroskopischen Auswertung wurde pro Konzentration eine 24-Well-Platte angesetzt, indem in jedes Well 1 mL Differenzierungsmedium der entsprechenden Substanzkonzentration vorgelegt und mittels Pipette in jedes der Wells ein einzelner EB überführt wurde. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte für 5 Tage.

Für die RNA-Isolierung der Proben von Tag 5 wurde schließlich ein entsprechender Teil bakteriologischer 6-cm-Schälchen verwendet. Für die RNA-Isolierung an den Tagen 7 und 10 wurden die EBs aus den übrigen bakteriologischen 6-cm-Schälchen in die gleiche Anzahl 10-cm-Zellkulturschalen, in die zuvor jeweils 10 mL Differenzierungsmedium der entsprechenden Substanzkonzentration vorgelegt wurden, restlos überführt und gleichmäßig verteilt. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte für weitere 2 bzw. 5 Tage.

Tag 10: Mikroskopische Auswertung der Kardiomyozytendifferenzierung

An Tag 10 wurde die Differenzierung von kontrahierenden Kardiomyozyten lichtmikroskopisch am Phasenkontrastmikroskop ausgewertet. Dazu wurde der EB in jedem Well untersucht. Waren in einem Well schlagende Kardiomyozyten zu finden, wurde dies in einem Auswertblatt zur Rohdatenerfassung vermerkt. Konnte auch nach wiederholten Untersuchungen in einem EB kein kontrahierender Bereich ausgemacht werden, wurde dies

ebenso vermerkt. Die Größe der schlagenden Areale wurde nicht in die Auswertung miteinbezogen, da diese morphometrische Auswertung rein qualitativer Natur war. Das Ergebnis einer 24-Well-Platte bestand somit in der Anzahl der EBs mit schlagenden Kardiomyozyten im Verhältnis zur Anzahl vorhandener EBs.

2.2.7.1 Auswertung des Differenzierungsassays

Die Anzahl der *Wells* der Kontroll-Platte, deren EBs schlagende Kardiomyozyten enthielten, wurde bestimmt und ins Verhältnis zur Gesamtzahl der EBs gesetzt. Dieses Ergebnis wurde gleich 100 % gesetzt. Aus dem Ergebnis der substanzbehandelten Platten wurde für jede Testkonzentration die Differenzierungsinhibition auf die Kontrollplatte bezogen und in % der Kontrolle berechnet. Diese Daten dienten schließlich der Erstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve, anhand derer die ID_{50} bestimmt wurde, die eine 50 %-ige Hemmung der ES-Zelldifferenzierung zu Kardiomyozyten repräsentiert.

2.2.8 Zytotoxizitätstests der D3- und 3T3-Zellen

Die Zytotoxizität einer Substanz wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Dazu wurden D3- und 3T3-Zellen parallel zum Differenzierungsassay über einen Versuchszeitraum von 10 Tagen in 96-Well-Platten mit sieben verschiedenen Substanzkonzentrationen, die den für einen Substanzeffekt relevanten Bereich abdeckten, sowie dem jeweiligen Lösungsmittel und 5-FU behandelt. Die Viabilität der substanzbehandelten Zellen wurde schließlich im MTT-Assay gemessen und anhand der Ergebnisse die IC_{50} ermittelt.

Tag 0: Aussaat der Zellen

In Zellkulturmedium wurde eine Zellsuspension mit 1×10^4 D3- bzw. 3T3-Zellen pro mL hergestellt, von der je 50 μ L in die zentralen 8 x 10 *Wells* je einer 96-Well-Platte pipettiert wurden. Dies entsprach definitionsgemäß etwa 500 Zellen pro *Well*. Um eine Verdunstung des Mediums der mit den Zellen befüllten *Wells* zu verhindern, wurden die äußeren *Wells* der 96-Well-Platte mit je 200 μ L DMEM befüllt. Des Weiteren dienten diese zur Messung des Hintergrundes in der MTT-Messung (Blanks). Während einer zweistündigen Eingewöhnungszeit im Brutschrank konnten sich die Zellen vor der Substanzbehandlung am Boden anheften, bevor in jedes mit Zellen belegte *Well* 150 μ L des Mediums mit der entsprechenden Substanzkonzentration bzw. des Kontrollmediums gegeben wurden. Die anschließende Inkubation im Brutschrank erfolgte für 3 Tage.

Tag 3 und Tag 5: Mediumwechsel

Für den Mediumwechsel wurden dieselben Substanzkonzentrationen angesetzt wie an Tag 0. Ohne die Zellschicht am Boden der *Wells* zu beschädigen, wurde zunächst aus den mit Zellen belegten *Wells* vorsichtig das Medium abgesaugt, bevor in jedes *Well* je 200 μ L der entsprechenden Substanzkonzentration oder des Kontrollmediums zugegeben wurden.

Ein Mediumwechsel der äußeren Blanks war nicht notwendig. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte an Tag 3 für 2 Tage, an Tag 5 für weitere 5 Tage.

Tag 10: MTT-Messung

In jedes *Well* der 96-*Well*-Platten wurden 20 µL MTT-Lösung zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium aller *Wells* vorsichtig abgesaugt, ohne die Zellschicht am Boden zu beschädigen und die Platten auf mehreren Lagen Filterpapier ausgeklopft. Nach Zugabe von 130 µL MTT-Desorb zu jedem *Well* wurden die Platten 15 min auf einem Schüttler geschüttelt, um das blaue MTT-Formazan zu lösen. Die Messung dessen Absorption erfolgte anschließend mittels 96-*Well*-Platten Photometer (Mikrotiterplatten-Reader) bei einer Wellenlänge von 570 nm (OD_{570}). Als Referenzwellenlänge wurde die Absorption bei 630 nm gemessen. Die Messdatei wurde mit der Software „SoftMax Pro“ (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) erstellt.

2.2.8.1 Auswertung der Zytotoxizitätstests

Die OD_{570} aller „Blank“-*Wells* wurde gemittelt und dieser Wert nachfolgend von den Messwerten aller anderen *Wells* abgezogen, um den möglichen Fehler zu korrigieren, der durch die Adhärenz des MTT-Farbstoffs am Plastikmaterial hervorgerufen werden kann. Die ermittelte mittlere OD_{570} der unbehandelten Lösungsmittelkontrollen wurde gleich 100 % gesetzt und die der jeweiligen Testkonzentrationen als Zellwachstum in % der Lösungsmittelkontrolle in einer Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt. Aus dieser wurde schließlich die IC_{50} ermittelt, die eine 50 %-ige Hemmung des Zellwachstums der jeweiligen Zelllinie repräsentiert. Während die Bestimmung der $IC_{50}D3$ den Vergleich des differenzierungshemmenden mit dem zytotoxischen Konzentrationsbereich einer Substanz ermöglichte, wurde die Bestimmung der $IC_{50}3T3$ mit der recht robusten fibroblastoiden Zelllinie als Maß für eine allgemeine Substanztoxizität eingesetzt und ermöglichte eine Abschätzung gegenüber dem embryonalen Modellsystem der D3-Zellen.

2.2.9 Akzeptanzkriterien

Alle dargestellten Tests wurden voneinander unabhängig durchgeführt und gelten gemäß der Akzeptanzkriterien als valide. Die Validität einer Substanztestung war definitionsgemäß nur dann gegeben, wenn mindestens 21 der 24 Kontroll-EBs spontan kontrahierende Kardiomyozyten enthielten. Zusätzlich wurden die Differenzierungsfähigkeit und Sensitivität der Zellen in jeder Substanztestung selbst durch die Mitführung unbehandelter Lösungsmittelkontrollen und Referenzsubstanzen überprüft. Als Qualitätskriterium für den Zytotoxizitätstest wurde die optische Dichte (OD_{570}) der Lösungsmittelkontrollen im MTT-Assay herangezogen (95 % Konfidenzintervall $OD_{550-570}$ D3-Zellen von ATCC: 0,5-1,6; 3T3-Zellen von ATCC: 0,15-0,6) [87]. Da die Zytotoxizitätsassays auf einer Messung der

Wachstumshemmung der Zellen beruhten, war deren normale Wachstumsgeschwindigkeit eine notwendige Voraussetzung.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden gemäß den Standard-Arbeits-Ablaufbeschreibungen „RNA-Isolierung und cDNA-Synthese“ und „Genexpressionsanalyse mittels Real Time-TaqMan PCR im Embryonalen Stammzelltest (EST)“ der Bayer Schering Pharma AG durchgeführt.

2.3.1 Lyse der Proben

D-PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Lysis-Puffer	(RLT-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit + 1 % β -Mercaptoethanol (v/v), Qiagen, Hilden)
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
RNase-freie Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Eppendorf (Hamburg)

Um den Effekt der Substanzbehandlung auf die Genexpression zu ermitteln, wurden die Zellen der verschiedenen Substanzkonzentrationen zu den entsprechenden Differenzierungszeitpunkten geerntet. Für Proben an Tag 5 wurde dazu zunächst das überstehende Medium der in bakteriologischen Petrischalen in Suspensionskultur befindlichen EBs, für Proben an den Tagen 7 und 10 das der adhärenz an der 10-cm-Zellkulturschale gewachsenen und differenzierten EBs vorsichtig abgesaugt. Die EBs wurden mit D-PBS gewaschen und anschließend durch Aufnahme in 600 μ L Lysis-Puffer vollständig aufgeschlossen. Das gewonnene Lysat einer Substanzkonzentration wurde schließlich in einem RNase-freien 1,5 mL-Reaktionsgefäß gesammelt und auf Eis gekühlt.

Erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA nicht sofort im Anschluss, wurden die Lysate bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.3.2 RNA-Isolierung

QIAshredder	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
RNase-freies Wasser	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)

Aus den Lysaten wurde die Gesamt-RNA mittels vorgefertigter Kits nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Dabei wurde während der Substanztestungen bei substanzbehandelten Zellen darauf geachtet, genügend Material anzusetzen, um Proben mit ausreichender Gesamt-RNA zu erhalten. Durch die im QIAshredder bereitgestellten Säulen wurden die

Lysate homogenisiert, um einen maximalen Zugang zur RNA zu gewährleisten. Unter Verwendung des RNeasy-Kits wurde die RNA anschließend von den restlichen Zellbestandteilen getrennt und gereinigt. Um eine Verunreinigung der Gesamt-RNA durch genomische DNA zu verhindern, die in der anschließenden TaqMan-PCR (Polymerase Kettenreaktion) zu falsch positiven Ergebnissen führen kann, wurde vor der Elution der RNA ein DNase-Verdau durchgeführt.

2.3.2.1 Überprüfung der RNA-Qualität

EGel 1,2 % General Purpose Agarose 18Pak

Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)

RNase-freies Wasser

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Im Anschluss an die Isolierung der Gesamt-RNA der EBs wurde die Reinheit des Isolats photometrisch bestimmt. Dazu wurden die Proben 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die Absorption (optische Dichte, OD) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der aus der $OD_{260\text{ nm}}$ und $OD_{280\text{ nm}}$ bestimmte Quotient, sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um eine Verunreinigung durch Proteine ausschließen zu können. Um die Qualität der Proben zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Da die ribosomale RNA (rRNA) den größten Anteil im RNA-Pool bildet, zeigte die gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA hauptsächlich die rRNAs der kleinen und großen Untereinheiten der Ribosomen (18S und 28S rRNA). Wie beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt, waren diese beiden Banden mit ca. 2 und 5 kb auf jedem Gel deutlich zu sehen und zeigten keinen Abbau.

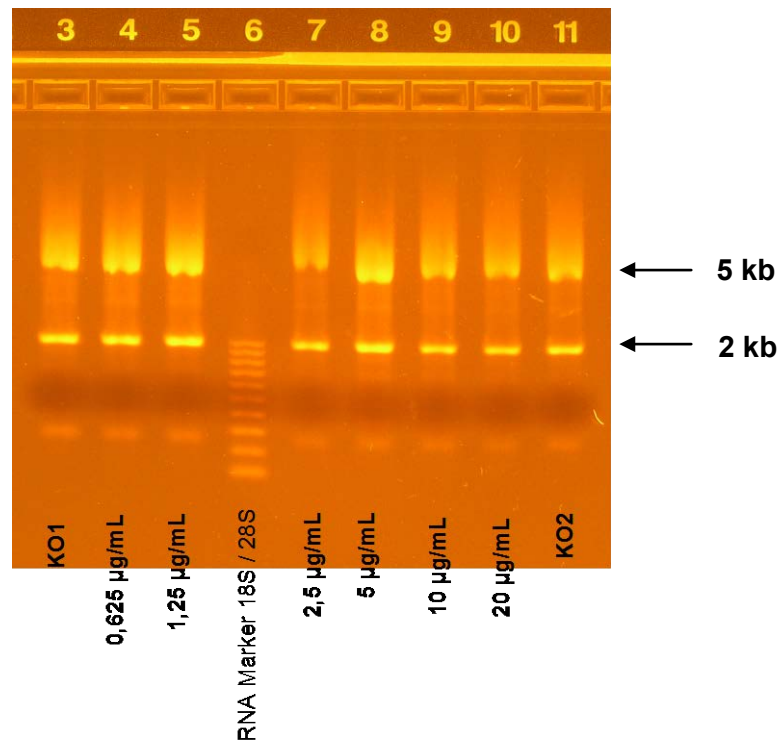


Abbildung 6: Gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten Gesamt-RNA aus Kulturen von D3-Zellen, die mit MAMac behandelt wurden, an Tag 5 der Differenzierung.

2.3.3 cDNA-Synthese

PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)

Biozym Scientific GmbH (Hess.
Oldendorf)

RNase-freie Reaktionsgefäße (1,5 mL)

Eppendorf (Hamburg)

RNase-freies Wasser

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

TaqMan Reverse Transcription Reagents

Applied Biosystems (Darmstadt)

Um das für die cDNA-Synthese benötigte Volumen berechnen zu können, wurde die Konzentration der RNA-Proben photometrisch bestimmt. Dazu wurden diese 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Konzentration (C [$\mu\text{g}/\text{mL}$]) wurde nach der Formel $40 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{OD}_{260 \text{ nm}}/1000$ berechnet. Um die Bestimmung der Menge des definierten *Templates* in der PCR-Reaktion zu ermöglichen, wurde eine definierte Menge von $1 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Das einzusetzende RNA-Volumen (V) wurde anhand der photometrisch bestimmten RNA-Konzentration (C) mittels folgender Formel berechnet: $V [\mu\text{L}] = 1/C \times 1 \mu\text{g}$.

Die isolierte Gesamt-RNA diente bei der cDNA-Synthese der reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, als *Template*. Da für die Proben der Substanztests

18S rRNA als Referenzgen eingesetzt wurde, wurden als Startpunkt für die Polymerase *random hexamer*-Primer verwendet, die alle vorhandenen RNA-Sequenzen mit statistischer Wahrscheinlichkeit binden. Die Herstellung von cDNA aus je 1 µg der aus den Zellkulturproben extrahierten Gesamt-RNA erfolgte mittels *TaqMan Reverse Transcription Reagents*. Ein RNase-Inhibitor, dNTP-Mix und die RNA-anhängige DNA-Polymerase *Multiscribe* wurden im Mastermix im geeigneten Puffer zugegeben. Die Reaktionskomponenten wurden folgendermaßen zusammenpipettiert: 1x 10x TaqMan RT-Buffer, 5,5 mM MgCl₂, 500 µM dNTP-Mix, 2,5 µM *random hexamer*-Primer, 0,4 U/µL RNase Inhibitor, 1,25 U/µL Multiscribe RT, 1 µg Gesamt-RNA, RNase-freies Wasser ad 25 µL. Die Reverse Transkriptase wurde zuletzt zugegeben, bevor der Ansatz 10 min bei 25°C, 30 min bei 48°C und 5 min bei 95°C inkubiert wurde.

2.3.4 TaqMan-PCR

Eucaryotic 18S rRNA PDARs (<i>Predeveloped TaqMan® Assay Reagents</i>)	Applied Biosystems (Darmstadt)
Optical caps	Applied Biosystems (Darmstadt)
Primer (<i>forward</i> und <i>reverse</i>)	Biotech (Ebersberg)
qPCR Mastermix Plus	Eurogentec Deutschland GmbH (Köln)
Sonden	Metabion (Martinsried)
Steriles Wasser	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Thermo-Fast 96 PCR Detektionsplatte	Falcon (BD Biosciences, Heidelberg)

Name Zielgen	Accession number	Sequenz Sonde (5'→3')	Sequenz Primer (5'→3')
<i>GATA-4</i>	NM_008092	tct tta gcc ggt ggg tga tcc gaa	<i>forward</i> : ggc aga aag caa gga cta ggc <i>reverse</i> : ggt ctc gaa cac cct gag ca
<i>MesP1</i>	XM_133562	ccc atc gtt cct gta cgc aga aac agc	<i>forward</i> : agt cgc cgc aga atc gtg <i>reverse</i> : gct cca ttt cct gcc ttt cc
<i>MLC-1</i>	W54645	cca agc ctg aag aga tga gtt cca aga cac t	<i>forward</i> : cag agg tgc tgc gcg ttt <i>reverse</i> : ata ggt gcc ctg ctc ctt gtt

Die verwendeten Primer wurden lyophilisiert und entsalzt bestellt. Die zugehörigen sequenzspezifischen Sonden waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM (5'-Carboxyfluorescein) und am 3'-Ende mit dem Quencher TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) markiert. Die Referenzgene der Firma Applied Biosystems waren in dem kommerziell erhältlichen PDAR-Kit enthalten. Sie waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC und am 3'-Ende mit dem Quencher TAMRA markiert, die Sequenzen sind jedoch nicht bekannt.

Die Genexpressionsanalyse wurde unter Verwendung geeigneter Sonden und Primer durchgeführt. Die Sonden wurden ursprünglich nach den Kriterien ausgewählt, möglichst nicht länger als 30 Basen zu sein, mehr Cs als Gs zu enthalten, möglichst wenig doppelte Nukleotide aufzuweisen und keine an den Enden sowie eine berechnete Schmelztemperatur von 70°C oder 69°C zu haben. Geeignete Primer sollten eine Länge von ca. 20 Basen aufweisen (nicht < 18) und die Summe von C+G in den letzten 5 Basen sollte kleiner 2 sein. Der Zwischenraum zwischen Primerende und Bindungssequenz der Sonde sollte möglichst gering sein (keinesfalls > 50 bp). Die Schmelztemperatur T_M sollte 60°C oder 59°C betragen (10°C weniger als die Sonde). Das gesamte Transkript sollte unter 300 Basen aufweisen [14].

Die quantitative Real Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR, [88]) diente im Rahmen des EST der Bestimmung der relativen Menge der untersuchten Transkripte MesP1, MLC1 bzw. GATA-4 innerhalb des aus der isolierten Gesamt-RNA substanzbehandelter Kulturen von D3-Zellen erstellten cDNA-Pools. Dazu wurde das TaqMan®-System ABI PRISM® 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet.

Die Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine primerabhängige *In-vitro*-Methode zur enzymatischen Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Sequenzspezifische Primer dienen dabei als Startpunkte einer DNA-Polymerase, die den DNA-Strang durch den Einbau von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) repliziert. Durch sich wiederholende Zyklen wird eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht. Im Unterschied zur konventionellen RT-PCR wird im so genannten *TaqMan-PCR-Assay* zusätzlich zu den Primern auch eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die den exponentiellen Anstieg der Amplikonmenge während der PCR-Reaktion sichtbar macht. Sie besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (VIC bzw. FAM) markiert ist und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (TAMRA) trägt. Während der Reaktion lagern sich die hybridisierende Sonde und die Primer sequenzspezifisch an den Matrizenstrang an, wobei die Sonde zwischen *forward* und *reverse* Primer (*fw* und *rev*) paart. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes jedoch aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt. Sobald die Taq-Polymerase in der Elongationsphase auf die Sonde trifft, beginnt sie, diese aufgrund ihrer 5'-3'-Exo-Nuklease-Aktivität zu hydrolysieren. Durch diesen Abbau wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben, die Fluoreszenz des Reporters wird detektierbar und steigt entsprechend der Menge des PCR-Produktes mit jedem Zyklus an. Im optimalen Fall wird so bei jeder Bildung eines PCR-Produkts genau ein Sondenmolekül gespalten und der Anstieg der Fluoreszenz verläuft proportional zur Produktzunahme. Freie,

nicht hybridisierte Sonden werden nicht hydrolysiert. So ist es möglich, die Amplifikation und den quantitativen Nachweis des PCR-Produktes in einem Reaktionsgefäß durchzuführen.

Jede Probe wurde in einem Dreifachansatz mit dem Primer- und SONDENSET für das Ziel- und Referenzgen getestet. Dazu wurde als Arbeitskonzentration eine 1:10-Verdünnung der cDNA angesetzt. Die Messung erfolgte im Duplex-Verfahren, so dass die Expression des Ziel- und Referenzgens durch den Einsatz unterschiedlich markierter Sonden in jedem *Well* der 96-*Well*-Platte gleichermaßen bestimmt wurde. Dies minimierte den durch das Pipettieren der Proben eingebrachten Fehler. Für die Messung des Referenzgens wurde ein kommerziell erhältliches Kit (PDAR-Kit) eingesetzt. Für einen Ansatz mit 25 µL wurden folgende Komponenten pipettiert: 12,5 µL 2x MasterMix, 0,3 µL Zielgen-Primer *fw* und *rev* (50 µM), 0,05 µL Zielgen-Sonde (50 µM), 1,25 µL 18S rRNA PDAR-Mix (20-fach), 9,9 µL H₂O und 1 µL cDNA. Dabei wurde darauf geachtet, dass die lichtempfindlichen Sonden möglichst kurz dem Licht ausgesetzt waren.

2.3.4.1 Referenzgen

In der RT-TaqMan-PCR diente die 18S ribosomale RNA (18S rRNA) als Referenzgen, um Unterschiede in der Menge an *Template*-DNA auszugleichen. Da eine Veränderung des Fluoreszenzsignals nicht nur mit der in den Zellen vorhandenen Menge des zu untersuchenden Zielgens in Zusammenhang steht, sondern auch mit der eingesetzten Menge an cDNA schwankt, ist es notwendig, die RNA-Menge auf ein unverändert auftretendes Referenzgen zu beziehen (relative Quantifizierung). Voraussetzung dafür, dass die 18S rRNA als interner Standard fungieren konnte war, dass sie unverändert auftrat, d.h. dass ihre Expression während der Versuchsdurchführung stabil war und nicht durch die Substanzbehandlung beeinflusst wurde (nicht gezeigt).

2.3.4.2 Auswertung der Genexpressionsanalyse

Bei jedem PCR-Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen und anschließend als Kurve dargestellt. Anhand dieser wurde die Anzahl der PCR-Zyklen ermittelt, nach denen die Fluoreszenz einer Probe einen Schwellenwert überstieg und einen messbaren Wert über dem Grundrauschen annahm. Diese wurde als C_T -Wert (*Cycle of Threshold*) bezeichnet und zur Auswertung herangezogen. Je niedriger das Transkript in der Probe zu Beginn enthalten war, umso mehr Amplifikationszyklen waren notwendig, bis die Fluoreszenz den Schwellenwert erreichte.

In jedem Lauf wurde für das jeweils untersuchte Gen eine Standardkurve mitgeführt. Diese wurde mit Hilfe einer Kontroll-RNA erstellt, die an Tag 5 oder Tag 10 aus sich zu Herzmuskelzellen differenzierenden D3-Zellen gewonnen wurde. So wurde die Amplifikationssequenz für jedes Gen bestimmt. Als Validitätskriterium für die Auswertung wurde festgelegt, dass die aus der Standardkurve berechnete Effizienz der Genamplifikation

von Ziel- und Referenzgen zwischen 80 und 120 % liegen musste. Bei halblogarithmischer Darstellung entsprach eine negative Steigung von ca. 3,3219 einer 100 %-igen Effizienz (E). Diese wurde nach der Formel $E = (10^{-1/y} - 1) * 100$ berechnet, wobei y die Steigung der Standardkurve war. Die gemessenen C_T -Werte jedes Gens wurden mit Hilfe der Steigung der Standardkurve in relative Einheiten umgerechnet, aus denen jeweils das Verhältnis zwischen Ziel- und Referenzgen gebildet wurde (Normalisierung mit 18S rRNA). Anschließend wurden die Werte auf den Mittelwert der beiden Kontrollproben bezogen. Daraus gingen letztlich die Konzentrations-Wirkungskurven hervor, die aus den substanzbehandelten Proben des jeweils gleichen Differenzierungstages erstellt wurden und zur Bestimmung des $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wertes, der halbmaximalen Hemmung der Markergenexpression, herangezogen wurden.

2.4 Prädiktion des embryotoxischen Potentials mittels Prädiktionsmodell (PM)

Zur Bewertung des embryotoxischen Potentials der Testsubstanzen wurde das in der Validierungsstudie empirisch abgeleitete mathematische PM [10] herangezogen. Es greift auf Daten der ZEBET aus der Prävalidierungsstudie [30] zurück, im Zuge derer es anhand von 10 Testchemikalien mit bekanntem embryotoxischen Potential *in vivo*, die alle drei Klassen der Embryotoxizität repräsentierten, entwickelt wurde. Zur Überprüfung relevanter Parameter, die am besten geeignet waren, zwischen stark, schwach und nicht embryotoxischen Substanzen zu differenzieren, wurde eine schrittweise Auswahl von Variablen vorgenommen bis das lineare Diskriminierungsmodell eine optimale Unterscheidung erlaubte. In der Validierungsstudie des ECVAM wurde das PM anhand der Testergebnisse einer internationalen Blindstudie in zwei Schritten mit sechs und den verbleibenden 14 von insgesamt 20 Chemikalien evaluiert, die aus einer während der Prävalidierungsstudie erstellten Datenbasis stammten und zu gleichen Anteilen nicht, schwach und stark embryotoxische Substanzen umfassten [5; 12].

Das PM besteht aus einer linearen Diskriminanzanalyse mit drei Gleichungen (Tabelle 2). Diese basieren auf den drei Parametern ID_{50} , IC_{50D3} und IC_{503T3} des EST und ermöglichen so eine Unterscheidung zwischen nicht, schwach und stark embryotoxischen Substanzen. Verwendet werden der Logarithmus der IC_{503T3} und IC_{50D3} sowie die relative Differenz zwischen der IC_{503T3} und der ID_{50} . Dies ist insbesondere in solchen Fällen von Bedeutung, in denen die Differenzierung der D3-Zellen weniger beeinträchtigt ist als die Viabilität der D3- oder 3T3-Zellen [30]. Durch die Berücksichtigung der differenzierten Zelllinie 3T3 wird dabei innerhalb des EST ein Korrektiv für allgemeine Toxizität eingeführt. Da das PM nur für Werte bis 1000 $\mu\text{g/mL}$ validiert worden ist, werden Werte, die oberhalb dieser Grenze liegen, definitionsgemäß 1000 gesetzt [9]. Schließlich gibt diejenige Gleichung, deren Lösung den höchsten Wert liefert, die Embryotoxizitätsklasse an. Dabei gelten folgende

Klassifikationskriterien: Klasse 1 „nicht embryotoxisch“ (wenn I>II und I>III), Klasse 2 „schwach embryotoxisch“ (wenn II>I und II>III), Klasse 3 „stark embryotoxisch“ (wenn III>I und III>II) [9].

Um die Vergleichbarkeit der konventionellen und molekularen Parameter zu bewerten, wurde in dieser Arbeit zusätzlich auch die ermittelte $IC_{50\text{Exp}}$ der Markergenexpression anstelle der ID_{50} in das PM eingesetzt.

Tabelle 2: Gleichungen des mathematischen Prädiktionsmodells (PM) [10] zur Klassifizierung von Testsubstanzen mittels EST.

Gleichung I $5.92 \cdot \log(IC_{50}3T3) + 3.50 \cdot \log(IC_{50}D3) - 5.31 \cdot ((IC_{50}3T3 - ID_{50}) / IC_{50}3T3) - 15.7$

Gleichung II $3.65 \cdot \log(IC_{50}3T3) + 2.39 \cdot \log(IC_{50}D3) - 2.03 \cdot ((IC_{50}3T3 - ID_{50}) / IC_{50}3T3) - 6.85$

Gleichung III $(-0.125) \cdot \log(IC_{50}3T3) - 1.92 \cdot \log(IC_{50}D3) + 1.50 \cdot ((IC_{50}3T3 - ID_{50}) / IC_{50}3T3) - 2.67$

3 Ergebnisse

3.1 *In-vitro*-Kultivierung der D3- und 3T3-Zellen

Ausgangsmaterial der Substanztestungen war eine unverändert differenzierungsfähige D3-Zellkultur sowie eine gleich bleibende, differenzierte 3T3-Zellkultur. Um dies zu gewährleisten, wurde die typische Morphologie der Zellen bei jeder Passage hinsichtlich Veränderungen mikroskopisch überprüft.

Um die murinen embryonalen Stammzellen der Linie D3 bis zu ihrem Einsatz in Substanztestungen in undifferenziertem Zustand zu halten, wurde während ihrer Kultivierung ein differenzierungsinhibierender Faktor, LIF [6; 7], zu der Kultur gegeben. Die Zellen zeigten das für murine ES-Zellen charakteristische kompakte, clusterartige Wachstum in Kolonien und eine variable Morphologie (Abbildung 7A). Im Inneren eines Clusters waren undifferenzierte Zellen mit geringerem Zytoplasmavolumen zu erkennen, während die am Rand des Clusters befindlichen Zellen ein größeres Zytoplasmavolumen hatten. Einige dieser Zellen haben erkennbare, unterschiedlich lange Fortsätze ausgebildet [89]. Die nahezu tägliche Begutachtung der Zellkultur zeigte, dass die Kolonien in Folge von Proliferation größer wurden, ohne dass sich die Zellen differenzierten.

Die ausdifferenzierten 3T3 Maus-Fibroblasten zeichneten sich durch die typische einheitliche Morphologie in Form eines kompakten Zytoplasmas und einer spindelförmigen Erscheinung aus (Abbildung 7B) [85].

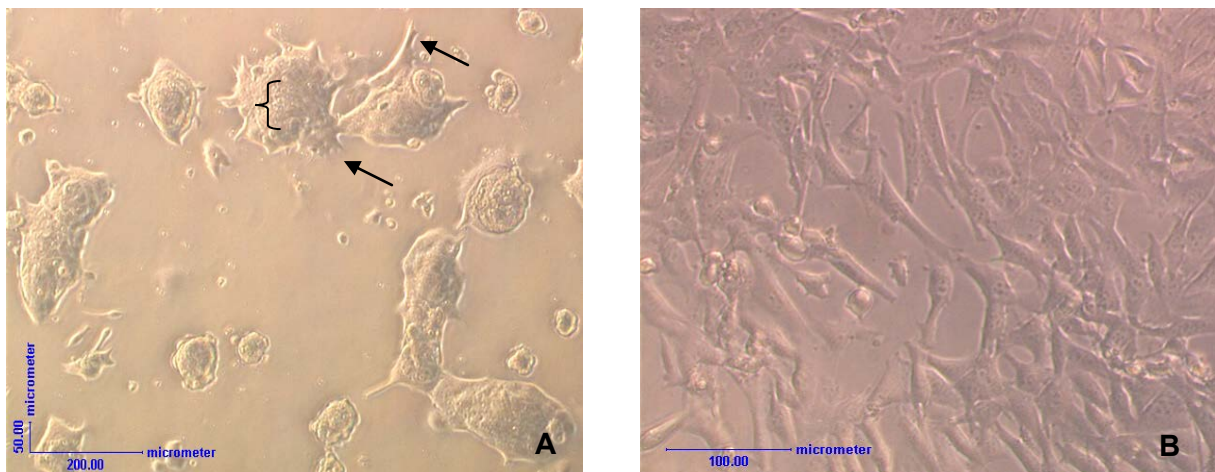


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahme der typischen Zellmorphologie undifferenzierter D3- und ausdifferenzierter 3T3-Zellen.

A: D3-Zellen weisen eine heterogene Zellmorphologie auf und wachsen in Clustern. Die undifferenzierten Zellen im Inneren sind sehr kompakt (geschweifte Klammer). Einige am Rand befindliche Zellen weisen eine veränderte Morphologie und ausgebildete Fortsätze auf (Pfeile).
B: 3T3-Zellen sind spindelförmig und haben ein kompaktes Zytoplasma.

3.1.1 Kontrolle der Differenzierungsfähigkeit der ES-Zellen

Die Überprüfung der Differenzierungsfähigkeit der D3-Zellen zu kontrahierenden Kardiomyozyten sowie der Sensitivität der D3- und 3T3-Zellen gegenüber einer Referenzsubstanz bildete die Voraussetzung für die Substanztestungen. Mittels standardisiertem Kontrollansatz mit 5-FU, dem Assaycheck, wurde daher kontrolliert, ob dies reproduzierbar gegeben war.

Abbildung 8 zeigt die graphisch dargestellten Ergebnisse der vier Assaychecks, die im Versuchszeitraum unabhängig voneinander und mit unterschiedlichen Aliquoten aufgetauter Zellen durchgeführt wurden. Der getestete Konzentrationsbereich lag routinemäßig zwischen 0,02 und 1 µg/mL 5-FU.

Die Konzentrations-Wirkungskurven der einzelnen Wiederholungen zeigten einen sehr hohen Grad der Übereinstimmung. Der Kurvenverlauf des Differenzierungsassays zeigte einen abrupten Abfall zwischen 0,05 und 0,07 µg/mL 5-FU, während die Viabilität der D3- und 3T3-Zellen kontinuierlich und konzentrationsabhängig abnahm. Mit zunehmender Dauer der 5-FU-Behandlung wurde zusätzlich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Größe der EBs beobachtet. Insbesondere bei den beiden höchsten getesteten Konzentrationen von 0,06 und 0,07 µg/mL 5-FU war eine rapide Größenabnahme ersichtlich (nicht gezeigt). Die ermittelten Halbhemmkonzentrationen der Kardiomyozytendifferenzierung, die ID_{50} -Werte, lagen bei 0,058 µg/mL, 0,060 µg/mL, 0,052 µg/mL und 0,054 µg/mL. Die Halbhemmkonzentrationen der Zytotoxizität lagen für die D3-Zellen bei 0,051 µg/mL, 0,065 µg/mL, 0,078 µg/mL und 0,078 µg/mL, die IC_{50} 3T3-Werte betragen 0,140 µg/mL, 0,110 µg/mL, 0,110 µg/mL und 0,078 µg/mL 5-FU. Damit lagen drei der vier IC_{50} 3T3-Werte geringfügig unterhalb der geltenden Grenzwerte [9], aber innerhalb des laborinternen Referenzbereiches.

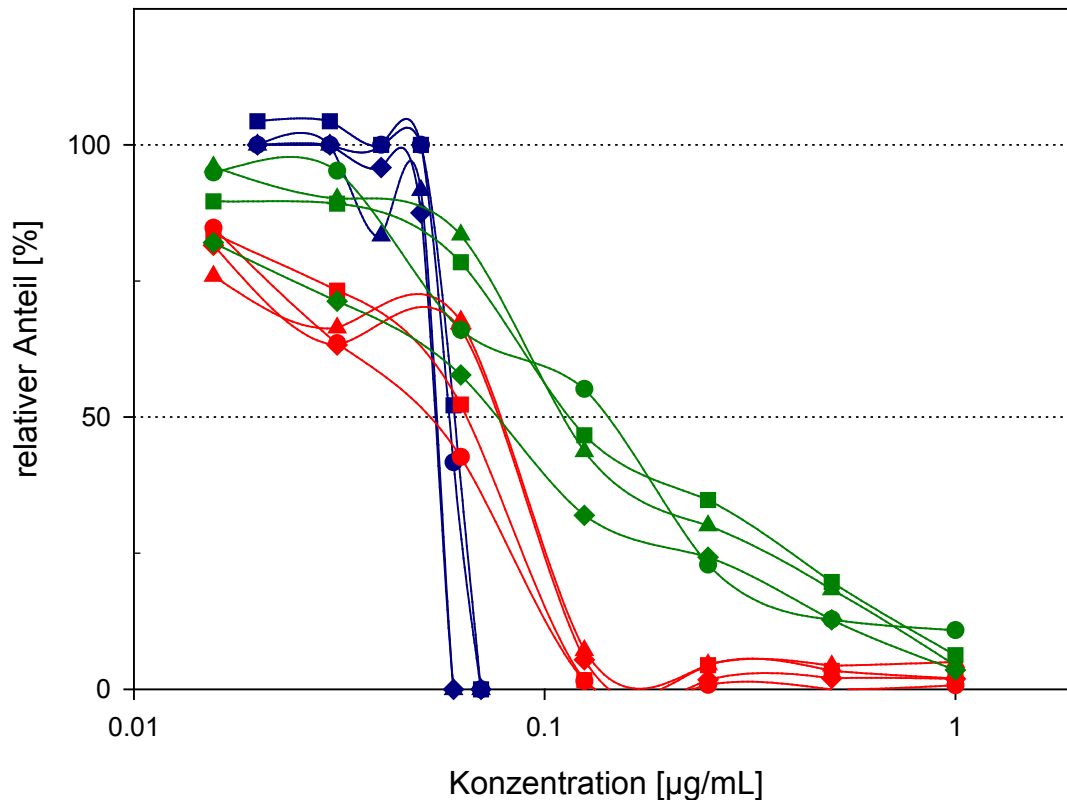


Abbildung 8: Konzentrations-Wirkungskurven der vier durchgeführten Assaychecks (ACs). Dargestellt sind die Ergebnisse der Differenzierungsassays (blau) und der Zytotoxizitätsassays (MTT-Assays) mit D3- (rot) bzw. 3T3-Zellen (grün). Kreis: AC1, Quadrat: AC2, Dreieck: AC3, Raute: AC4

3.2 Rangfinder-Experimente zur Bestimmung des wirksamen Konzentrationsbereiches der Testsubstanzen

Da keine ausreichenden Daten vorhanden waren, wurden für die Testsubstanzen TSA und SDS vor Beginn der Substanztestungen Rangfinder-Experimente durchgeführt, um den geeigneten Konzentrationsbereich für jede Substanz zu identifizieren. Die ermittelten Halbhemmkonzentrationen wurden schließlich für die Planung der Substanztestungen herangezogen.

3.2.1 Trichostatin A

Der getestete Konzentrationsbereich von TSA lag zwischen 0,2 und 3000 ng/mL. Anhand der in Abbildung 9 dargestellten Konzentrations-Wirkungskurven des Zytotoxizitätstests mit D3- und 3T3-Zellen zeigte sich, dass der Übergangsbereich von einer Testsubstanzkonzentration ohne zytotoxische Wirkung hin zu vollständig abgestorbenen Zellen im Bereich unter 0,2 und 20 ng/mL TSA lag. Der Substanzeffekt auf die D3-Zellen trat bei 2 ng/mL auf ($IC_{50}D3$), der auf die 3T3-Zellen bei 2,3 ng/mL ($IC_{50}3T3$).

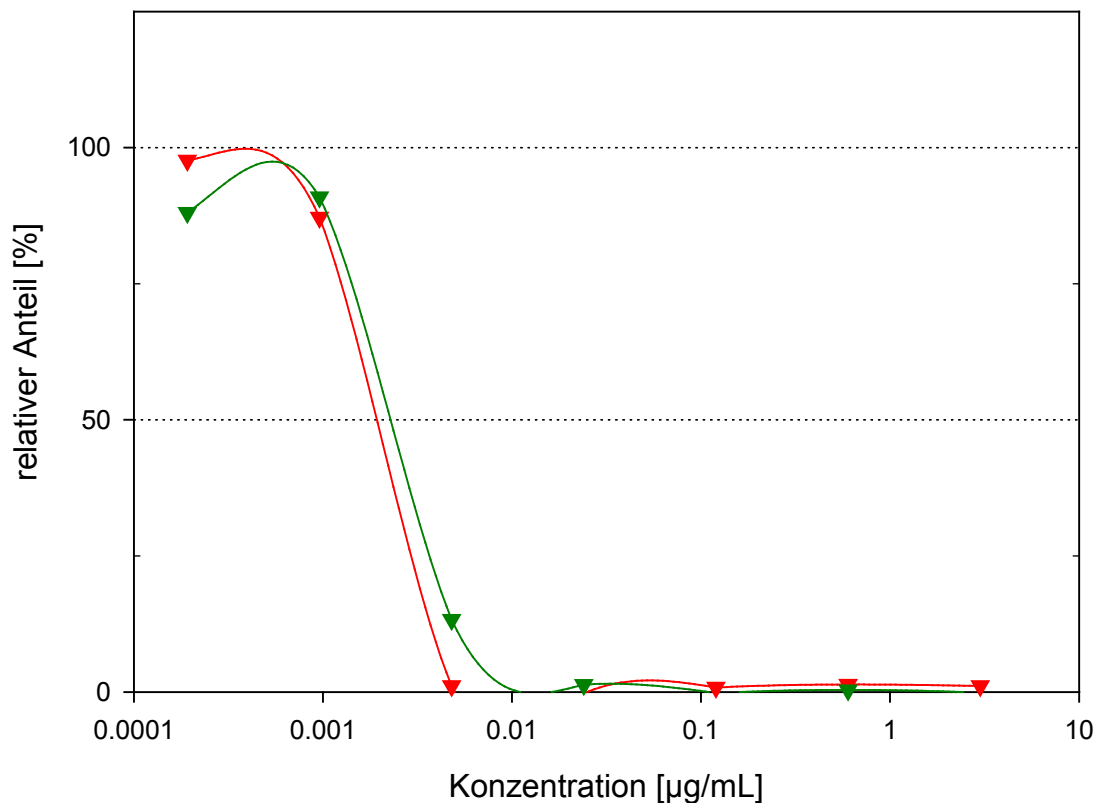


Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungskurven des Rangfinder-Experimentes mit TSA.

Dargestellt sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätsassays (MTT-Assay) mit D3- (rot) bzw. 3T3-Zellen (grün).

3.2.2 Natriumdodecylsulfat

Um einen geeigneten Konzentrationsbereich von SDS zu identifizieren, wurde es in den Zytotoxizitätsassays zwischen 0,8 ng/mL und 200 µg/mL getestet. Da sich die Konzentrationsbereiche, in denen zytotoxische bzw. differenzierungshemmende Effekte einer Testsubstanz auftreten, unterscheiden können, wurde auch ein Differenzierungsassay mit SDS-Konzentrationen zwischen 0,04 und 300 µg/mL durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

Der ermittelte IC_{50} D3-Wert lag bei 95 µg/mL, die IC_{50} 3T3 bei 90 µg/mL. Im Differenzierungsassay zeigte sich, dass die Halbhemmkonzentration der Kardiomyozytendifferenzierung über 50 µg/mL SDS lag. Ein genauer ID_{50} -Wert konnte nicht ermittelt werden, da die Zellen in der höchsten Konzentration von 300 µg/mL bereits im Verlauf des Assays abgestorben waren und in der nächst niedrigeren Konzentration von 50 µg/mL noch mehr als 50 % der EBs im Vergleich zu den Kontrollzellen spontan kontrahierende Kardiomyozyten enthielten. Im übrigen Testbereich entsprach der relative Anteil an EBs mit kontrahierenden Herzmuskelzellen etwa dem der Kontrollen.

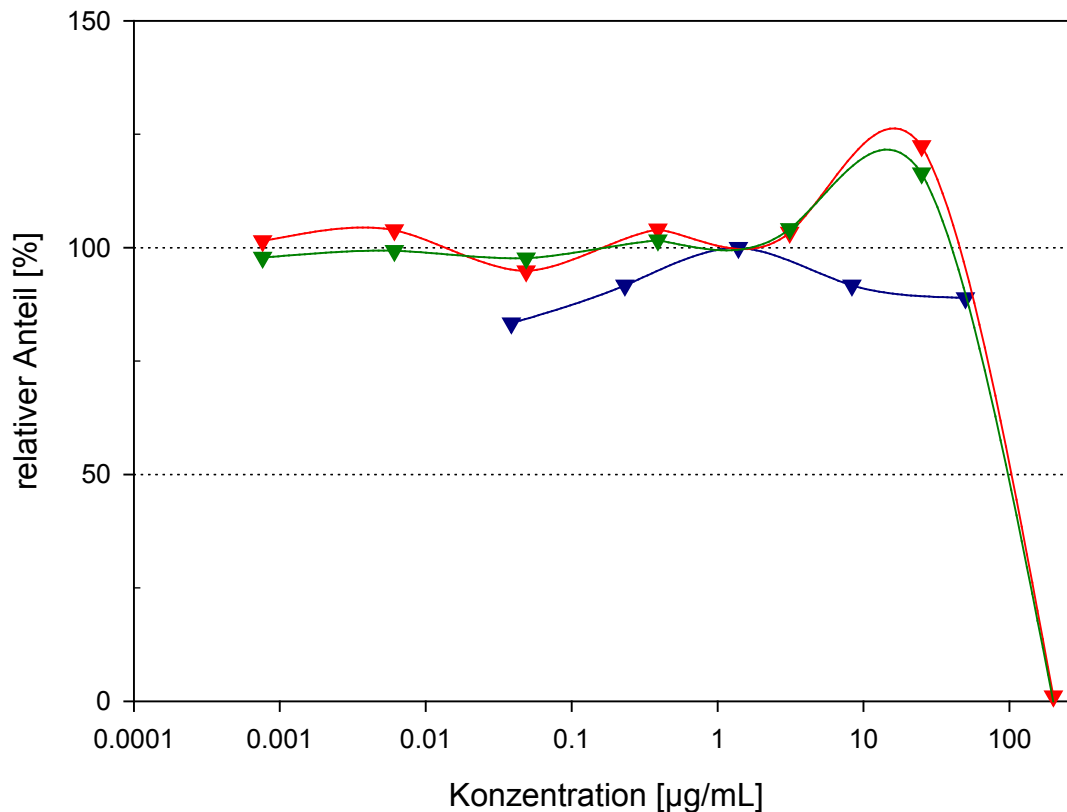


Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungskurven des Rangefinder-Experimentes mit SDS.

Dargestellt sind die Ergebnisse des Differenzierungsassays (blau) und des Zytotoxizitätsassays (MTT-Assay) mit D3- (rot) bzw. 3T3-Zellen (grün). Im Differenzierungsassay waren bei der nächst höheren getesteten Konzentration von 300 µg/mL bereits im Verlauf des Assays alle Zellen abgestorben.

3.3 Ergebnisse der Substanztestungen

In den Substanztestungen wurde der Einfluss der ausgewählten Chemikalien auf die Kardiomyozytendifferenzierung untersucht. Dazu wurden die Testsubstanzen im Zuge des konventionellen EST auf ihr differenzierungsinhibierendes und zytotoxisches Potential hin untersucht und deren Halbhemmkonzentrationen (ID_{50} , IC_{50}) bestimmt. In der nachfolgenden Genexpressionsanalyse wurde die relative Expression ausgewählter Markergene zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung quantifiziert und die $IC_{50\text{Exp}}$ bestimmt. So sollte untersucht werden, ob eine Beeinflussung der morphologischen Differenzierung der Kardiomyozyten durch die Testsubstanzen mit einem entsprechenden Einfluss auf die Expression herzspezifischer Gene einherging.

Um zwei valide und aussagekräftige Tests einer jeden Testsubstanz zu erhalten, mussten zum Teil mehrere Wiederholungen durchgeführt werden.

3.3.1 Konventioneller EST

Im Zuge des konventionellen EST sind die Zellen von Tag 0 an durchgehend mit sechs unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz behandelt worden. Zusätzlich wurden in jedem Test zwei Kontrollen angesetzt, die mit der verwendeten Konzentration des jeweiligen Lösungsmittels behandelt wurden. So sollte ausgeschlossen werden, dass ein möglicher beobachteter Effekt des Lösungsmittels auf die Testsubstanz zurückgeführt wurde. An Tag 10 erfolgte zum einen eine morphometrische Auswertung am Phasenkontrastmikroskop, bei der die relative Anzahl an EBs bestimmt wurde, in denen sich trotz Substanzeinwirkung im Vergleich zu unbehandelten Lösungsmittelkontrollen ES-Zellen zu spontan kontrahierenden Kardiomyozyten differenziert hatten. Zum anderen wurde in den MTT-Assays das Ausmaß der zytotoxischen Wirkung der Testsubstanz ermittelt, indem der relative Anteil lebensfähiger Zellen im Vergleich zu unbehandelten Lösungsmittelkontrollen bestimmt wurde. Der zeitliche Ablauf des EST ist unter 2.2.7 und 2.2.8 beschrieben.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der validen Substanztestungen des konventionellen Embryonalen Stammzelltests in Form von Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt. Anhand dieser wurden die drei validierten Parameter des konventionellen EST bestimmt, die zur Beurteilung der Substanzwirkung gewählt wurden. Dies sind die ermittelten Halbhemmkonzentrationen der Kardiomyozytendifferenzierung (ID_{50}) sowie die Halbhemmkonzentrationen der Zytotoxizitätsassays ($IC_{50}D3$ bzw. $IC_{50}3T3$).

3.3.1.1 Trichostatin A

Basierend auf den Ergebnissen des Rangefinders wurde zur Untersuchung des embryotoxischen Potentials von TSA in den beiden Differenzierungsassays der Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 10 ng/mL untersucht, in den Zytotoxizitätstests mit D3- bzw. 3T3-Zellen der Bereich von 0,08 bis 20 ng/mL TSA. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

Die Konzentrations-Wirkungskurven der Differenzierungsassays stimmten sehr gut überein. Mit zunehmender Konzentration der Testsubstanz TSA nahm der relative Anteil an EBs, die spontan kontrahierende Kardiomyozyten enthielten, ab. Die ermittelten ID_{50} -Werte lagen bei 5 und 4,5 ng/mL TSA. Auch in den insgesamt vier durchgeführten Zytotoxizitätstests mit D3-Zellen nahm der relative Anteil lebensfähiger Zellen mit zunehmender Substanzkonzentration übereinstimmend ab. Die ermittelten $IC_{50}D3$ -Werte lagen mit 2,9 ng/mL, 4,1 ng/mL, 4,2 ng/mL und 4,6 ng/mL im gleichen Bereich. In drei der vier Wiederholungen war der relative Anteil lebensfähiger D3-Zellen bei Konzentrationen unter 3 ng/mL TSA geringfügig erhöht, in einem Fall bis zu 1,4-fach. Die Kurvenverläufe der mit den 3T3-Zellen durchgeführten Zytotoxizitätstests waren ebenfalls kongruent und auch der relative Anteil lebensfähiger 3T3-Zellen nahm mit zunehmender TSA-Konzentration ab. Die ermittelten $IC_{50}3T3$ -Werte betragen 6,2 und 5,9 ng/mL.

Der Vergleich der ermittelten Halbhemmkonzentrationen aller drei konventionellen Parameter zeigte, dass diese in einem niedrigen und relativ engen Konzentrationsbereich zwischen 3 und 6 ng/mL lagen. Analog zu den Ergebnissen des Rangfinders zeigte sich auch in den Substanztestungen, dass die D3-Zellen in Bezug auf eine zytotoxische Wirkung geringfügig empfindlicher auf die TSA-Behandlung reagierten als die 3T3-Zellen.

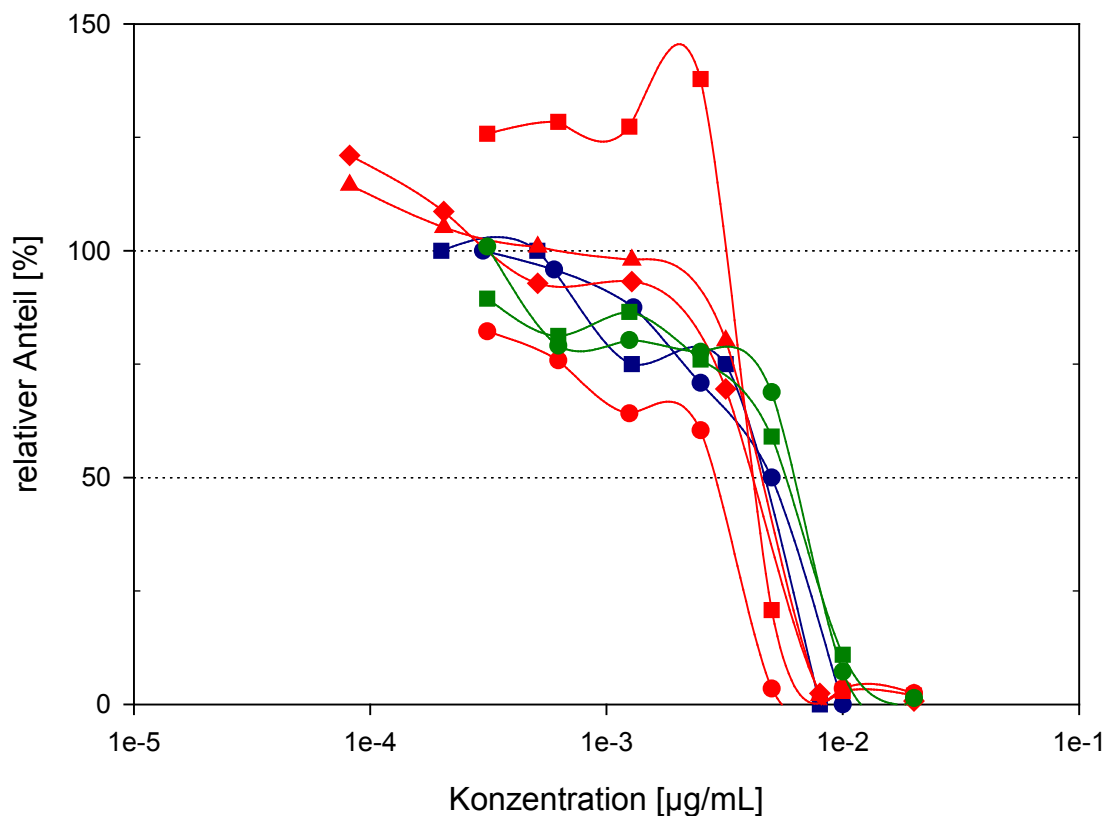


Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungskurven des konventionellen EST mit TSA.

Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse der Differenzierungsassays (blau) und der Zytotoxizitätsassays (MTT-Assays) mit D3- (rot) bzw. 3T3-Zellen (grün). Kreis: TSA1, Quadrat: TSA2, Dreieck: TSA Test A, Raute: TSA Test B

3.3.1.1.1 Morphologische Veränderungen durch TSA-Behandlung

In Abbildung 12 sind phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der 3T3-Zellen dargestellt, die jeweils an Tag 5 des Zytotoxizitätstests gemacht wurden. Abbildung A zeigt Zellen der Lösungsmittelkontrolle. Abbildung B zeigt Zellen, die mit 2,5 ng/mL TSA behandelt wurden.

Die Zellen der Lösungsmittelkontrolle hatten ein kompaktes Zytoplasma und erschienen spindelförmig (A). Die substanzbehandelten Zellen hingegen waren abgeflacht und zeigten eine gestreckte Erscheinung (B). Diese zellmorphologischen Veränderungen wurden mit zunehmender TSA-Konzentration stärker (nicht gezeigt).

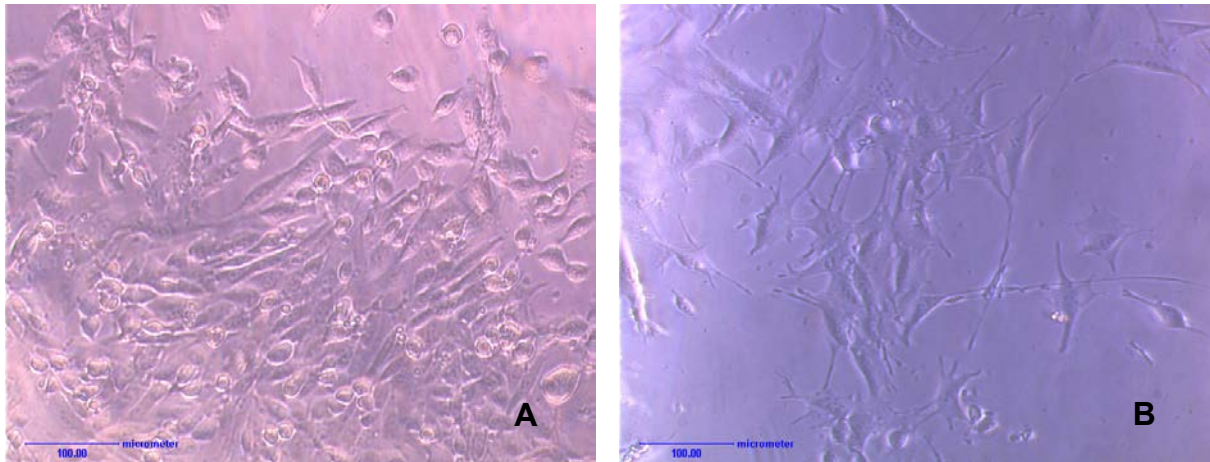


Abbildung 12: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von 3T3-Zellen an Tag 5 des Zytotoxizitätstests (MTT-Assay).

A: 3T3-Zellen der Lösungsmittelkontrolle, **B:** TSA-behandelte 3T3-Zellen (2,5 ng/mL TSA)

3.3.1.2 Methylazoxymethanolacetat

Es wurden insgesamt drei Substanztestungen mit MAMac durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 graphisch dargestellt. Basierend auf Angaben der ZEBET zum Wirkungsbereich von MAMac wurde im konventionellen EST der Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MAMac auf das embryotoxische Potential der Testsubstanz hin untersucht.

Die Konzentrations-Wirkungskurven ließen einen hohen Grad der Übereinstimmung zwischen den drei Wiederholungen der einzelnen Assays erkennen. Alle Kurvenverläufe zeigten einen einheitlichen konzentrationsabhängigen Abfall, der jedoch in unterschiedlichen Bereichen lag.

Der relative Anteil an EBs, der spontan kontrahierende Kardiomyozyten enthielt, nahm erst bei Konzentrationen über 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MAMac ab und sank bis zur höchsten Testkonzentration von 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ auf 0 % ab. Die ermittelten ID_{50} -Werte lagen bei 48 und 66 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Im ersten der drei Differenzierungsassays wurde kein ID_{50} -Wert erreicht, da lediglich der Konzentrationsbereich bis 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MAMac getestet wurde. Der ermittelte Kurvenverlauf wurde zwar durch die beiden folgenden Tests bestätigt, konnte jedoch nicht zur Ermittlung einer Halbhemmkonzentration herangezogen werden.

In den Zytotoxizitätsassays bewegte sich der relative Anteil lebensfähiger D3- bzw. 3T3-Zellen in den niedrigsten Konzentrationen bis 7,5 bzw. 3,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zwischen 75 und 100 % der Kontrollen und fiel schließlich konzentrationsabhängig unter 1 % ab. Der Wirkungsbereich von MAMac lag zwischen 4 und 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, wobei der zytotoxische Substanzeffekt auf die beiden Zelllinien weit vor dem differenzierungshemmenden auftrat. Dabei wurde deutlich, dass die 3T3-Zellen auf die MAMac-Behandlung empfindlicher

reagierten als die D3-Zellen. So betragen die ermittelten IC_{50} 3T3-Werte 3,9 $\mu\text{g/mL}$, 5,1 $\mu\text{g/mL}$ und 4,6 $\mu\text{g/mL}$, die IC_{50} D3-Werte 11,5 $\mu\text{g/mL}$, 9,4 $\mu\text{g/mL}$ und 11,5 $\mu\text{g/mL}$.

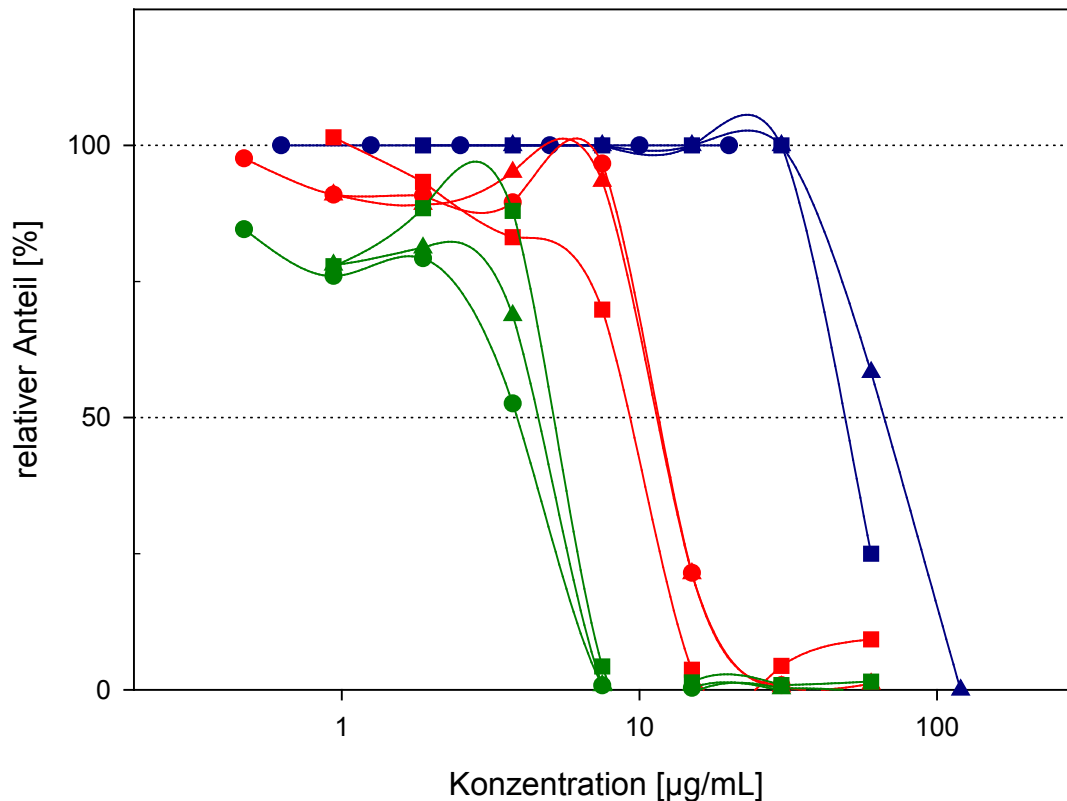


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurven des konventionellen EST mit MAMac.

Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse der Differenzierungsassays (blau) und der Zytotoxizitätsassays (MTT-Assays) mit D3- (rot) bzw. 3T3-Zellen (grün). Kreis: MAMac1, Quadrat: MAMac2, Dreieck: MAMac3

3.3.1.3 Natriumdodecylsulfat

Basierend auf den Ergebnissen des Rangfinders wurde in den Differenzierungsassays der Konzentrationsbereich zwischen 6 und 200 $\mu\text{g/mL}$ SDS untersucht, in den Zytotoxizitätstests der Bereich von 3 bis 200 $\mu\text{g/mL}$ SDS. Die Ergebnisse der insgesamt vier durchgeführten Substanztestungen wiesen zwischen den einzelnen Wiederholungen der Assays eine hohe Kongruenz auf, die Konzentrations-Wirkungskurven verliefen sehr steil. Sie sind in Abbildung 14 graphisch dargestellt.

Während der Durchführung der beiden ersten Differenzierungsassays starben die D3-Zellen, die mit der jeweils höchsten Testsubstanzkonzentration von 200 bzw. 150 $\mu\text{g/mL}$ SDS behandelt wurden, noch im Behandlungszeitraum ab. Da der relative Anteil an EBs, der kontrahierende Kardiomyozyten enthielt, bei der nächst niedrigeren Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ SDS in beiden Tests noch über 50 % der Kontrollen lag, konnte keine mikroskopische ID_{50} ermittelt werden. Es wurden zwei weitere Tests durchgeführt, deren

Testkonzentrationen entsprechend angepasst wurden. Übereinstimmend zu den beiden ersten Wiederholungen nahm die Anzahl an EBs, in denen sich trotz Substanzwirkung einzelne Zellen zu spontan kontrahierenden Kardiomyozyten differenzierten, erst in Konzentrationen über 100 bzw. 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDS ab. Eine halbmaximale Hemmung der Differenzierung trat bei Konzentrationen von 110 bzw. 98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDS auf.

In den Zytotoxizitätstests lag der relative Anteil lebensfähiger D3- bzw. 3T3-Zellen in Konzentrationen bis 50 bzw. 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDS im Bereich der Kontrollen. Die Viabilität der ES-Zellen nahm erst in Konzentrationen über 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ab, die der Fibroblasten bereits über 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 200 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDS führten letztlich zum Absterben nahezu aller D3- bzw. 3T3-Zellen. Dabei kam es in drei der vier Wiederholungen mit D3-Zellen und in allen Tests mit 3T3-Zellen vor diesem Abfall zu einem bis zu 1,2- bzw. 1,5-fachen Anstieg deren Viabilität. Die ermittelten IC_{50} 3T3-Werte lagen bei 77,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDS. Die IC_{50} D3-Werte lagen bei 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 148 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 155 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDS.

Der Wirkungsbereich von SDS lag in einem relativ engen und niedrigen Konzentrationsbereich von 75 bis 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDS, wobei sich die ausdifferenzierten Fibroblasten gegenüber SDS am sensitivsten erwiesen.

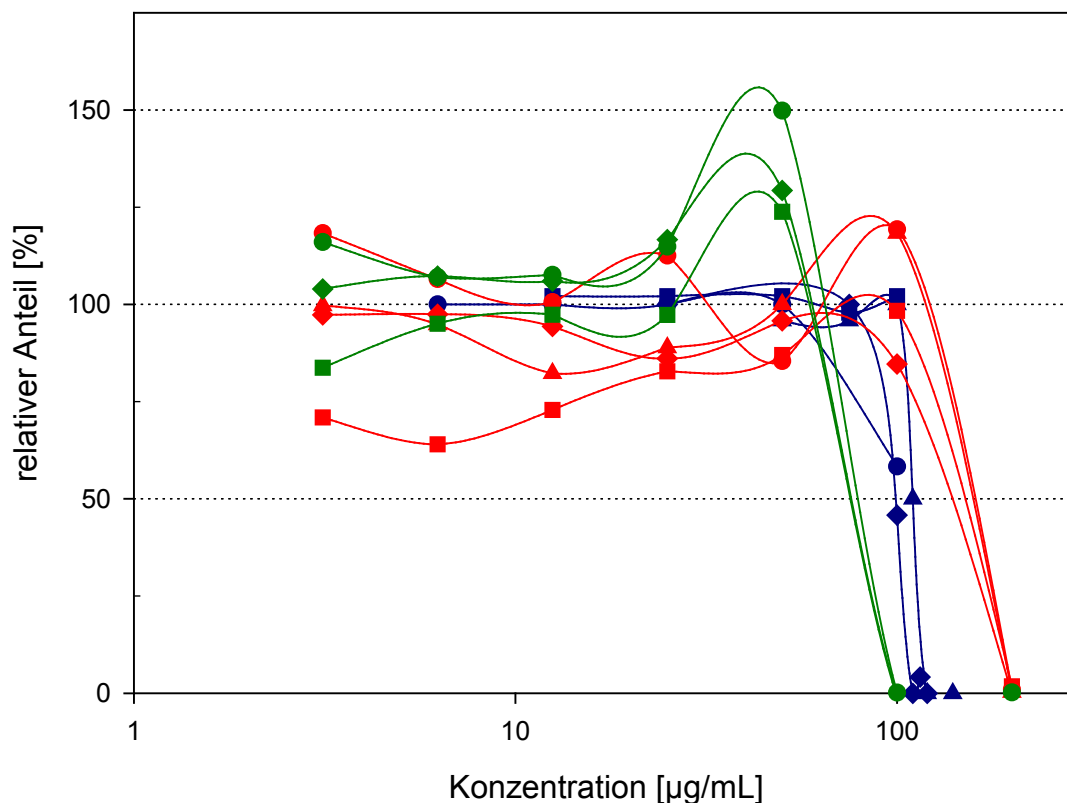


Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungskurven des konventionellen EST mit SDS.

Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse der Differenzierungsassays (blau) und der Zytotoxizitätsassays (MTT-Assays) mit D3- (rot) bzw. 3T3-Zellen (grün). Kreis: SDS1, Quadrat: SDS2, Dreieck: SDS3, Raute: SDS4

3.3.1.4 Benzoessäure

Den bekannten Daten über den Wirkungsbereich von BA entsprechend wurde in den Differenzierungsassays der Konzentrationsbereich zwischen 198 und 1500 µg/mL BA getestet. Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung der Testsubstanz auf die verwendeten Zelllinien wurde der Bereich zwischen 23 und 1500 µg/mL BA gewählt. Die Konzentrations-Wirkungskurven der drei validen Wiederholungen des konventionellen EST zeigten einen relativ heterogenen Kurvenverlauf, ließen jedoch übereinstimmend eine konzentrationsabhängige differenzierungsinhibierende und zyotoxische Wirkung von BA erkennen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt.

Der relative Anteil an kontrahierenden EBs nahm in den drei Tests bei unterschiedlichen Konzentrationen von über 440 µg/mL, 1000 µg/mL bzw. 200 µg/mL BA ab. Die mikroskopische ID₅₀ lag mit 850 µg/mL, 1250 µg/mL und 350 µg/mL in einem relativ hohen und breit gestreuten Konzentrationsbereich.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests zeigten, dass der relative Anteil lebensfähiger D3-Zellen in zwei Wiederholungen erst bei Konzentrationen über 100 µg/mL BA abnahm, in einer jedoch bereits bei 23 µg/mL erniedrigt war. Bis zur höchsten Testsubstanzkonzentration von 1500 µg/mL sank die Viabilität der D3-Zellen einheitlich unter 10 %. Die Viabilität der 3T3-Zellen nahm in allen drei Wiederholungen bereits bei Konzentrationen über 23 µg/mL ab und lag bereits bei 750 µg/mL BA unter 2 %. Der halbmaximale zytotoxische Substanzeffekt auf die D3-Zellen trat bei 380 µg/mL, 340 µg/mL bzw. 150 µg/mL BA auf, während die 3T3-Zellen mit IC₅₀-Werten von 105 µg/mL, 180 µg/mL und 32 µg/mL durchgehend deutlich sensitiver auf die Testsubstanz reagierten.

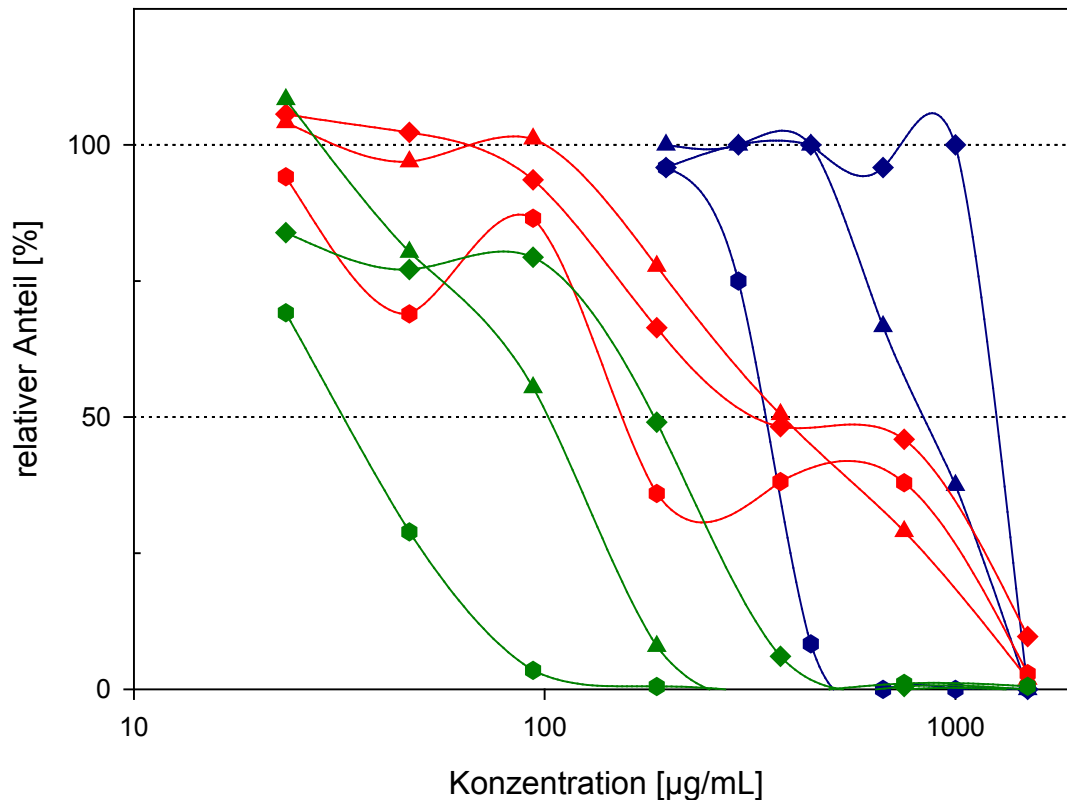


Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungskurven des konventionellen EST mit BA.

Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse der Differenzierungsassays (blau) und der Zytotoxizitätsassays (MTT-Assays) mit D3- (rot) bzw. 3T3-Zellen (grün). Dreieck: BA3, Raute: BA4, Hexagon: BA5

3.3.2 Genexpressionsanalyse

Mittels quantitativer Real Time-TaqMan-PCR wurde der Effekt der Substanzbehandlung auf die relative Genexpression etablierter Markergene in den D3-Zellen ermittelt. Dazu wurden Proben an Tag 5, 7 und 10 der Differenzierung genommen, daraus die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels Gelelektrophorese wurde vor jeder cDNA-Synthese sichergestellt, dass die verwendeten RNA-Proben die geforderte Qualität aufwiesen. Wie exemplarisch in Abbildung 6 (siehe 2.3.2.1) gezeigt, waren die Banden der 18S und 28S rRNA auf jedem Gel deutlich zu sehen und zeigten keinen Abbau. Für jede verwendete Probe wurde die geforderte Qualität erreicht.

In den Proben von Tag 5 wurde die relative Expression von *MesP1* bestimmt. Dieses früh exprimierte Gen diente dazu, Effekte zu erfassen, die bereits nach kurzem Inkubationszeitraum spezifisch auf die mesodermale Differenzierung von ES-Zellen wirkten. Für eine direkte Korrelation der Expression mit der mikroskopischen Auswertung wurde in den Proben von Tag 10 die relative Expression von *MLC1* gemessen. Die zusätzliche

Messung dieses relativ spät exprimierten Gens an Tag 7 diente einer möglichst frühen Detektion von Veränderungen in dessen Expressionsmuster.

Da das Ausgangsmaterial der Genexpressionsanalyse den substanzbehandelten EBs entstammte, entsprachen die untersuchten Konzentrationsbereiche denen des entsprechenden Differenzierungsassays.

3.3.2.1 Trichostatin A

Abbildung 16 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven der Genexpressionsanalyse von *MesP1* und *MLC1* der TSA-behandelten D3-Zellen.

Die relative Genexpression von *MesP1* nahm im untersuchten Konzentrationsbereich kontinuierlich und reproduzierbar von 92 bzw. 130 % ab. Bei der jeweils höchsten getesteten Konzentration von 10 bzw. 8 ng/mL waren alle Zellen abgestorben. Eine halbmaximale Hemmung der Genexpression von *MesP1* trat bei 2,5 bzw. 3,4 ng/mL TSA auf.

Die relative Genexpression von *MLC1* an Tag 7 der Differenzierung zeigte einen leicht variablen Kurvenverlauf. In den niedrigsten Testkonzentrationen lag die relative Genexpression um den Bereich der unbehandelten Zellen, zwischen 1 und 3 ng/mL TSA sank sie in beiden Wiederholungen kontinuierlich unter 15 % ab. Im ersten der beiden Tests stieg der relative Anteil an *MLC1* bei Konzentrationen über 0,6 bzw. 5 ng/mL TSA nach einem vorherigen Abfall der Kurve erneut an. Die *MLC1*-Expression wurde in diesem Test bei 2,9 ng/mL TSA halbmaximal gehemmt. In der zweiten Wiederholung kam es in Konzentrationen über 0,2 bzw. 3,2 ng/mL zu einem Anstieg um 30 bzw. 60 %. Dadurch schnitt die Kurve die 50 %-Achse ein zweites Mal, so dass im zweiten Lauf kein $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wert ermittelt werden konnte.

An Tag 10 der Differenzierung lieferte die Genexpressionsanalyse sehr einheitliche und gut reproduzierte Ergebnisse. Die *MLC1*-Expression war im niedrigsten Testbereich bis zu 1,5-fach erhöht und wurde konzentrationsabhängig kontinuierlich reprimiert. Die $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte lagen bei 1,8 und 3 ng/mL TSA.

Der Vergleich der molekularen Marker zeigte, dass diese mit Werten von 1,8 bis 3,4 ng/mL TSA alle in einem sehr engen und niedrigen Konzentrationsbereich lagen.

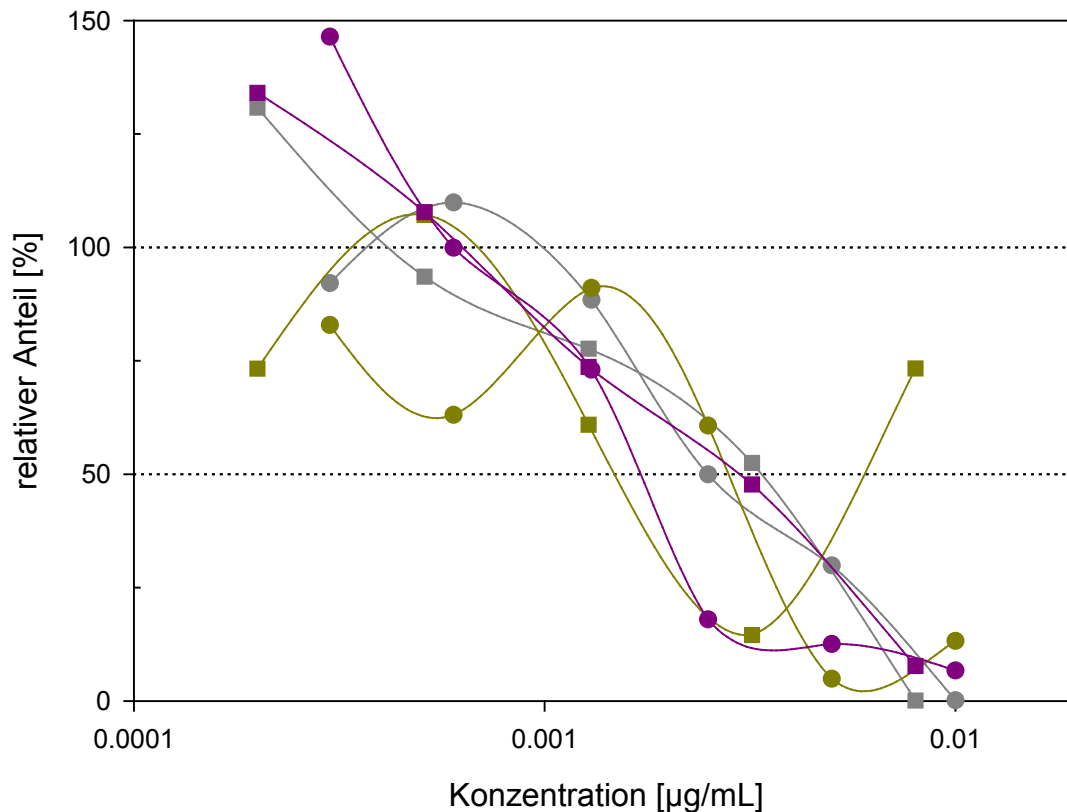


Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungskurven der Genexpressionsanalyse von *MesP1* und *MLC1* in D3-Zellen nach TSA-Behandlung.

Graphisch dargestellt ist die relative Expression der Gene *MesP1* an Tag 5 (grau) und *MLC1* an den Tagen 7 (ocker) und 10 (magenta) der Differenzierung. Kreis: TSA1, Quadrat: TSA2

3.3.2.1.1 Genexpressionsanalyse von GATA-4

In den TSA-behandelten D3-Zellen wurde zusätzlich die Genexpression von *GATA-4* an den Tagen 5, 7 und 10 der Differenzierung analysiert. Insgesamt ergab sich ein relativ einheitlicher Kurvenverlauf. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 17 zu sehen.

An Tag 5 der Differenzierung schwankte die *GATA-4*-Expression bis zu Konzentrationen um 2 ng/mL TSA im Bereich der Kontrollen und wurde bis zur höchsten Testkonzentration kontinuierlich bis unter 10 % relativen Anteils reprimiert. Zu einer halbmaximalen Hemmung der Expression kam es durch 7 bzw. 4,7 ng/mL TSA.

An Tag 7 schwankte der relative Anteil des *GATA-4*-Transkriptes in Konzentrationen unter 1 ng/mL TSA zwischen 100 und 200 %, fiel bei den höheren getesteten Konzentrationen jedoch übereinstimmend bis unter 40 % ab. An Tag 7 trat der halbmaximale Effekt auf die Genexpression von *GATA-4* bei 4,4 bzw. 5,4 ng/mL TSA auf.

Die Genexpressionsanalyse an Tag 10 ergab eine zwischen beiden Wiederholungen sehr gut übereinstimmende konzentrationsabhängige Repression von *GATA-4* durch TSA. Der $IC_{50\text{ Exp}}$ -Wert betrug 4,2 bzw. 3,2 ng/mL.

Die halbmaximale Hemmung der *GATA-4*-Expression trat an den Differenzierungstagen 5, 7 und 10 zwischen 3,2 und 7 ng/mL TSA auf und lag somit in einem sehr engen und niedrigen Konzentrationsbereich.

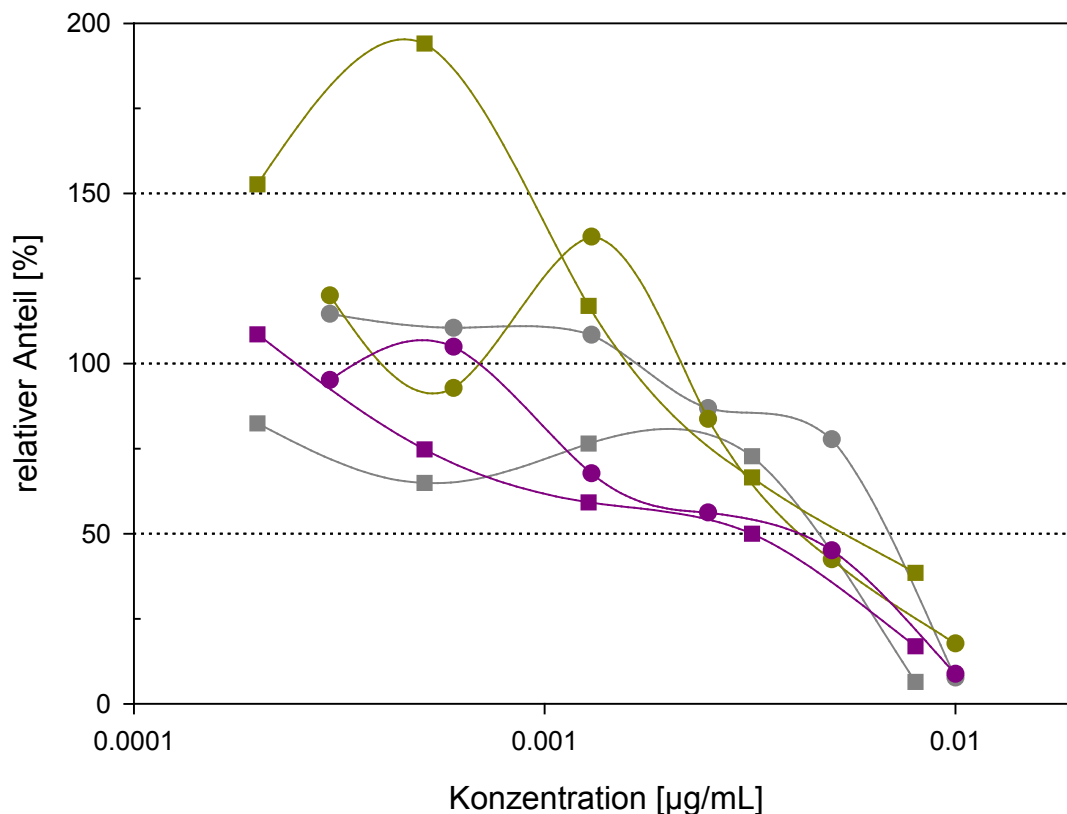


Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurven der Genexpressionsanalyse von *GATA-4* in D3-Zellen nach TSA-Behandlung.

Graphisch dargestellt ist die relative Expression des Gens *GATA-4* an den Tagen 5 (grau), 7 (ocker) und 10 (magenta) der Differenzierung. Kreis: TSA1, Quadrat: TSA2

3.3.2.2 Methylazoxymethanolacetat

Die Ergebnisse der relativen Genexpressionsanalyse MAMac-behandelter Zellen sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

MesP1 wurde im Vergleich zu den Kontrollen kontinuierlich konzentrationsabhängig um über 75 % reprimiert. Die Halbhemmkonzentrationen stimmten mit 33 bzw. 35 µg/mL zwischen den beiden Wiederholungen sehr gut überein.

Der relative Anteil des MLC1-Transkriptes stieg am Differenzierungstag 7 in beiden Wiederholungen bis zu Konzentrationen von 30 µg/mL MAMac kontinuierlich bis auf das 3,4- bzw. 6,4-fache der Kontrollen an. Über 30 µg/mL MAMac kam es zu einem deutlichen Abfall

bis unter 9 bzw. 53 %. Zur Ermittlung des halbmaximalen Effektes auf die *MLC1*-Expression an Tag 7 konnte nur die zweite Wiederholung herangezogen werden. Der $IC_{50\text{ Exp}}$ -Wert betrug hierfür 55 $\mu\text{g/mL}$. In der dritten Wiederholung wurde keine $IC_{50\text{ Exp}}$ erreicht, da der relative Anteil an Transkript auch bei der höchsten getesteten Konzentration von 60 $\mu\text{g/mL}$ noch bei 53 % und damit oberhalb der 50 %-Achse lag.

An Tag 10 der Differenzierung kam es in Konzentrationen bis 15 $\mu\text{g/mL}$ zu einem Anstieg des *MLC1*-Transkriptes um den Faktor 2,4 bzw. 3,1, bevor es anschließend zum Abfall der beiden Kurvenverläufe bis unter 34 % kam. An Tag 10 betrug die Halbhemmkonzentration der *MLC1*-Expression in beiden Wiederholungen 53 $\mu\text{g/mL}$.

Der Vergleich der molekularen Parameter zeigte, dass diese mit Werten von 33 bis > 60 $\mu\text{g/mL}$ alle in einem relativ engen und niedrigen Konzentrationsbereich lagen.

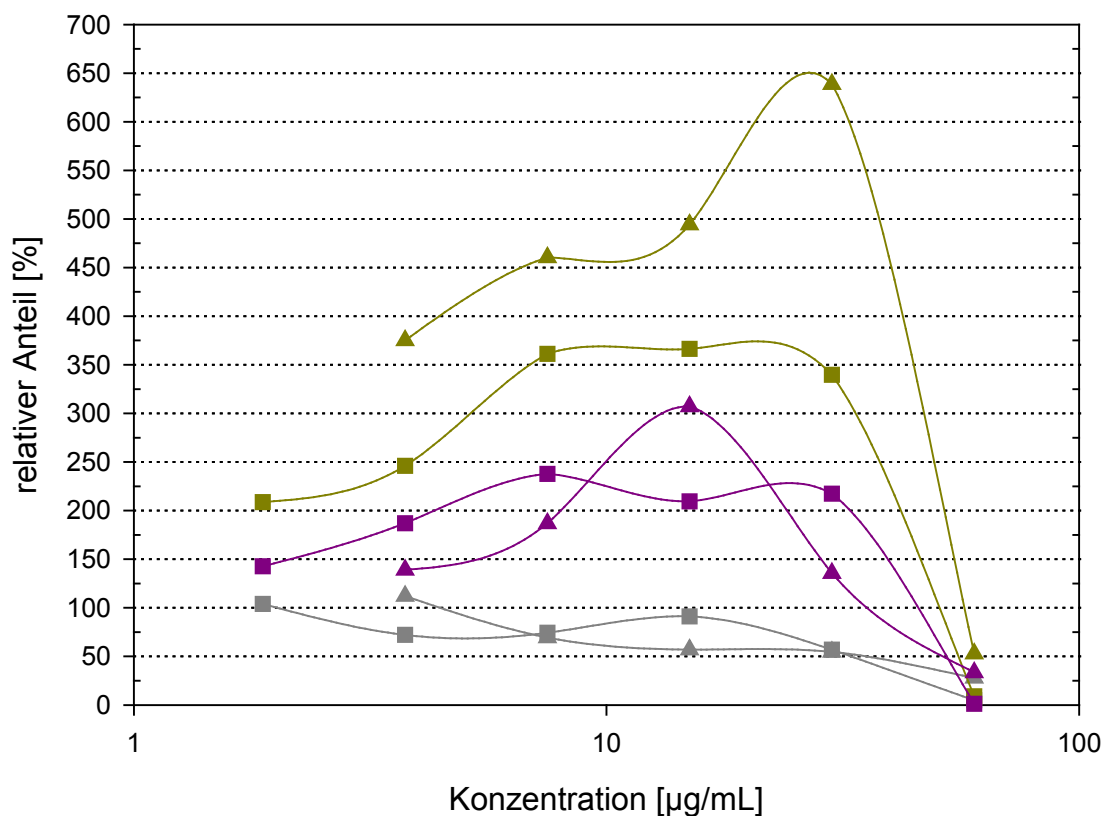


Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungskurven der Genexpressionsanalyse von *MesP1* und *MLC1* in D3-Zellen nach MAMac-Behandlung.

Graphisch dargestellt ist die relative Expression der Gene *MesP1* an Tag 5 (grau) und *MLC1* an den Tagen 7 (ocker) und 10 (magenta) der Differenzierung. Quadrat: MAMac2, Dreieck: MAMac3

3.3.2.3 Natriumdodecylsulfat

Die Genexpressionsanalyse der SDS-behandelten Zellen ergab sehr heterogene Konzentrations-Wirkungskurven zwischen den einzelnen Wiederholungen. Diese sind in Abbildung 19 graphisch dargestellt.

Die *MesP1*-Expression schwankte in allen vier Wiederholungen in Konzentrationen bis 75 µg/mL SDS zwischen dem 0,7- und 1,2-fachen der Kontrollen. Oberhalb dieser Konzentration zeigten zwei Kurven eine abfallende Tendenz, die anderen beiden eine aufsteigende. So betrug der relative Anteil an *MesP1*-Transkript bei einer der höchsten Testkonzentrationen von 120 µg/mL in einer Wiederholung weniger als 1 %, in einer anderen hingegen 230 % der Kontrollen. Da die übrigen Konzentrations-Wirkungskurven die 50 %-Achse nicht geschnitten haben, konnte nur für die dritte Wiederholung ein $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wert ermittelt werden. Dieser betrug 100 µg/mL.

Auch die relative Genexpression von *MLC1* war sehr heterogen. An Tag 7 bestand eine Übereinstimmung zwischen den Wiederholungen lediglich in der Repression von *MLC1* in Konzentrationen zwischen 25 und 100 µg/mL SDS bis unter 30 %, während die relative *MLC1*-Expression außerhalb dieses Konzentrationsbereiches stark variierte. Bei 25 µg/mL SDS differierte der relative Anteil um bis zu 120 %. Der Kurvenverlauf der dritten Wiederholung verlief vollständig unterhalb der 50 %-Achse, so dass keine $IC_{50 \text{ Exp}}$ ermittelt werden konnte. Aus den drei übrigen Kurven ergaben sich Werte von 11,5 µg/mL, 79 µg/mL und 55 µg/mL.

An Tag 10 wurde *MLC1* in Konzentrationen zwischen 75 und 100 µg/mL SDS einheitlich reprimiert, hinsichtlich des Ausmaßes jedoch um bis zu 70 % unterschiedlich. In Konzentrationen unter 75 µg/mL differierte der relative Anteil an *MLC1*-Transkript um bis zu 230 %. $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Werte konnten nur für zwei Wiederholungen ermittelt werden. Sie lagen bei 64 und 95 µg/mL SDS.

Im Falle von SDS wurde nur in einem Teil der Experimente eine $IC_{50 \text{ Exp}}$ erreicht. Mit Werten von 11,5 bis 100 µg/mL lagen diese in einem relativ niedrigen, aber sehr weiten Konzentrationsbereich.

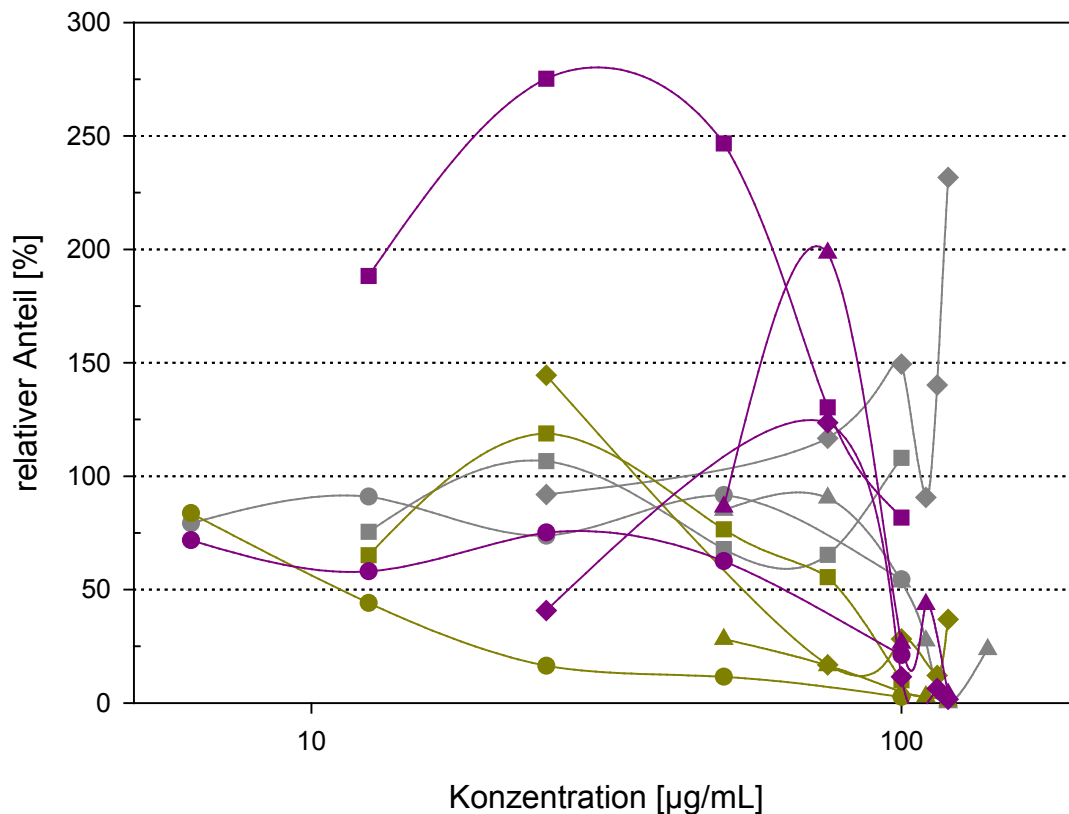


Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurven der Genexpressionsanalyse von *MesP1* und *MLC1* in D3-Zellen nach SDS-Behandlung.

Graphisch dargestellt ist die relative Expression der Gene *MesP1* an Tag 5 (grau) und *MLC1* an den Tagen 7 (ocker) und 10 (magenta) der Differenzierung. Kreis: SDS1, Quadrat: SDS2, Dreieck: SDS3, Raute: SDS4

3.3.2.4 Benzoessäure

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der BA-behandelten D3-Zellen der Wiederholungen drei (BA 3) und vier (BA 4) graphisch dargestellt. Die Konzentrations-Wirkungskurven waren sehr variabel und die Ergebnisse wurden nicht reproduziert. Dabei wurde deutlich, dass die Ergebnisse der dritten Wiederholung durchgehend und bis zu 60-fach niedriger waren als in der vierten.

Die Kurve der *MesP1*-Expression war in den niedrigsten Testkonzentrationen bis 400 µg/mL BA in der dritten Wiederholung um etwa 50 % erniedrigt, in der vierten um etwa 50 % gegenüber den Kontrollen erhöht, bevor es bis zur höchsten Konzentration von 1500 µg/mL kontinuierlich zu einem Abfall bis unter 1 % kam. Eine halbmaximale Hemmung der *MesP1*-Expression trat bei 380 und 850 µg/mL BA auf.

Der relative Anteil an *MLC1* betrug in der dritten Wiederholung an Tag 7 der Differenzierung weniger als 20 % und fiel konzentrationsabhängig bis unter 3 %. In der vierten Wiederholung stieg er zunächst von 40 auf 80 % bevor er konzentrationsabhängig bis unter 5 % sank. Da der gesamte Kurvenverlauf der dritten Wiederholung unterhalb von 50 %

der Kontrollzellen verlief und die Kurve der vierten die 50 %-Achse zweimal schnitt, konnte keine der beiden zur Ermittlung eines $IC_{50 \text{ Exp}}$ -Wertes herangezogen werden.

An Tag 10 schwankte die *MLC1*-Expression zwischen den beiden Wiederholungen um teilweise über 300 %. In der dritten lag sie zunächst im Bereich der Kontrollen und wurde in Konzentrationen über 300 $\mu\text{g/mL}$ kontinuierlich bis unter 4 % reprimiert. In der vierten Wiederholung stieg die *MLC1*-Expression bis zu einer Konzentration von 300 $\mu\text{g/mL}$ BA zunächst um 255 % an und blieb bis 1000 $\mu\text{g/mL}$ BA bis zu 3,6-fach erhöht. Bis zur höchsten Konzentration von 1500 $\mu\text{g/mL}$ sank der relative Anteil schließlich bis unter 6 %. Eine halbmaximale Inhibition der *MLC1*-Expression an Tag 10 der Differenzierung trat bei 500 bzw. 1350 $\mu\text{g/mL}$ BA ein.

Der Vergleich der ermittelten Halbhemmkonzentrationen der *MesP1*- und *MLC1*-Expression zeigte, dass sich diese mit Werten von 380 bis 1350 $\mu\text{g/mL}$ BA recht stark unterschieden, jedoch alle in einem relativ hohen Konzentrationsbereich lagen.

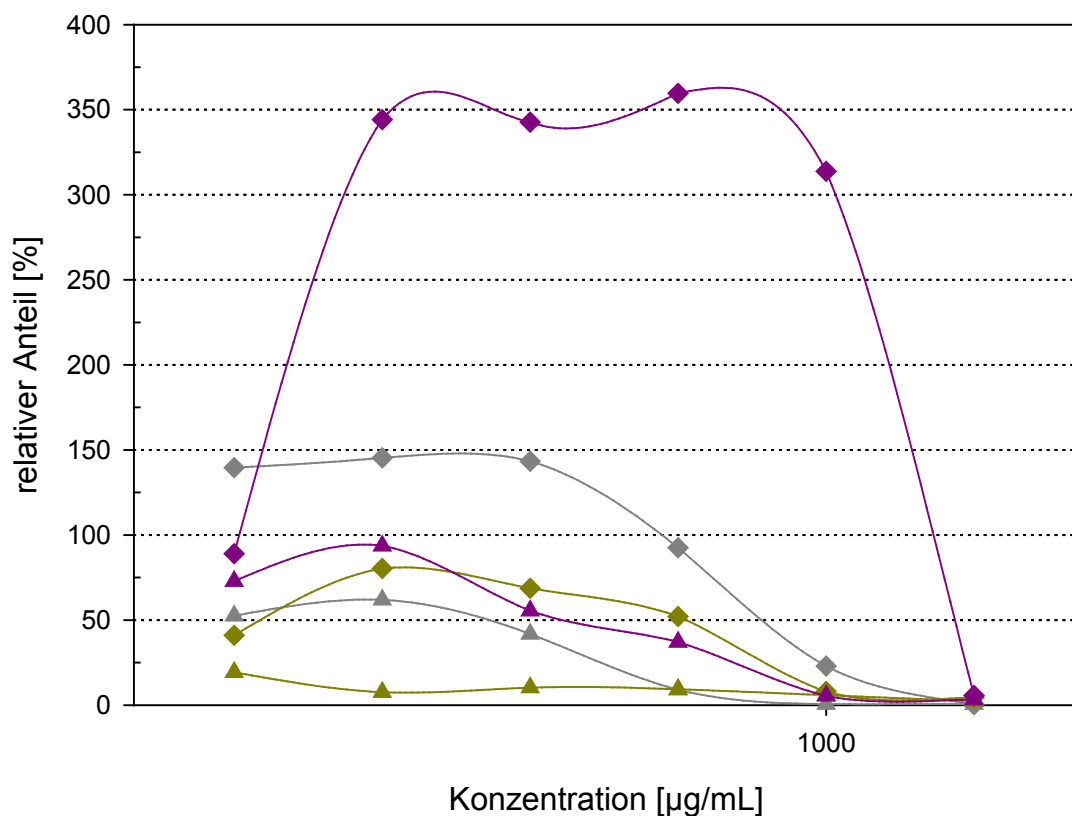


Abbildung 20: Konzentrations-Wirkungskurven der Genexpressionsanalyse von *MesP1* und *MLC1* in D3-Zellen nach BA-Behandlung.

Graphisch dargestellt ist die relative Expression der Gene *MesP1* an Tag 5 (grau) und *MLC1* an den Tagen 7 (ocker) und 10 (magenta) der Differenzierung. Dreieck: BA3, Raute: BA4

3.4 Zusammenfassung der ermittelten Parameter

Für jede der graphisch dargestellten Konzentrations-Wirkungskurven wurde der jeweilige Schnittpunkt mit der 50 %-Achse bestimmt. Dieser lieferte die Parameter des konventionellen EST (ID_{50} , $IC_{50}D3$, $IC_{50}3T3$) sowie der Genexpressionsanalyse (IC_{50Exp}). Übereinstimmungen zwischen der Halbhemmkonzentration der Differenzierung und der Genexpression zeugten dabei von der Vergleichbarkeit und Äquivalenz der konventionellen und molekularen Parameter.

In Tabelle 3 sind die ermittelten Parameter für jede der durchgeführten Wiederholungen der einzelnen Substanztestungen zusammengefasst und analog zu den vorangegangenen Abbildungen in $\mu\text{g/mL}$ angegeben. Hinsichtlich der Wirkungskonzentration der Testsubstanzen war eine gewisse Abstufung zu erkennen. So lagen die Parameter der *in vivo* embryotoxischen Testsubstanzen 5-FU, TSA, MAMac und SDS in relativ niedrigen Konzentrationsbereichen zwischen 2 ng/mL und 160 $\mu\text{g/mL}$, während die nicht embryotoxische Substanz BA erst bei Konzentrationen bis zu 1350 $\mu\text{g/mL}$ halbmaximale Effekte hervorrief.

Tabelle 3: Ergebnisse der Substanztestungen in $\mu\text{g/mL}$.

Aufgeführt sind die Halbhemmkonzentrationen ID_{50} , $IC_{50}D3$, $IC_{50}3T3$ sowie die IC_{50Exp} in $\mu\text{g/mL}$, die anhand der vorangegangenen Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt wurden.

Effekt <i>in vivo</i>	Testsubstanz	MW [g/mol]	run	Konventioneller EST			Molekulare Marker		
				ID_{50}	$IC_{50}D3$ [$\mu\text{g/mL}$]	$IC_{50}3T3$	IC_{50Exp} [$\mu\text{g/mL}$] MesP1 d5 MLC1 d7 MLC1 d10		
embryotoxisch	5-FU	130.1	1	0.058	0.051	0.140			
			2	0.060	0.065	0.110			
			3	0.052	0.078	0.110			
			4	0.054	0.078	0.078			
	TSA	302.4	1	0.0050	0.0029	0.0062	0.0025	0.0029	0.0018
			2	0.0045	0.0041	0.0059	0.0034	-	0.0030
			Test A Test B		0.0042 0.0046				
	MAMac	132.1	1	>20	11.5	3.9			
			2	48	9.4	5.1	33	55	53
			3	66	11.5	4.6	35	>60	53
	SDS	288.4	1	>100	160	77.5	-	11.5	64
			2	>100	148	75	-	79	-
3			110	155		100	-	95	
4			98	140	75	-	55	-	
BA	122.1	1	-	380	70	1300	-	-	
		2	-	325	-	1400	-	-	
		3	850	380	105	380	-	500	
		4	1250	340	180	850	-	1350	
		5	350	150	32				

Effekt <i>in vivo</i>	Testsubstanz	molekularer Marker	run	IC_{50Exp} [$\mu\text{g/mL}$]		
				d5	d7	d10
embryotoxisch	TSA	MesP1	1	0.0025		
			2	0.0034		
		MLC1	1		0.0029	0.0018
			2		-	0.0030
		GATA-4	1	0.0070	0.0044	0.0042
			2	0.0047	0.0054	0.0032

■ embryotoxisch
■ nicht embryotoxisch
■ nicht untersucht
 - kein Wert ermittelbar

3.5 Klassifizierung des embryotoxischen Potentials der Testsubstanzen

Mit Hilfe des mathematischen PMs [10] wurde anhand der ermittelten Halbhemmkonzentrationen ID_{50} , IC_{50D3} , IC_{503T3} sowie IC_{50Exp} (Tabelle 3, siehe 3.4) eine Klassifizierung der Testsubstanzen in „nicht embryotoxisch“, „schwach embryotoxisch“ oder „stark embryotoxisch“ vorgenommen. Diese ist in Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt.

Die Chemikalien 5-FU und TSA wurden als „stark embryotoxisch“ bewertet. SDS wurde als „schwach embryotoxisch“, BA als „nicht embryotoxisch“ eingestuft. Diese Klassifizierungen stimmten mit den bekannten *In-vivo*-Daten überein. Für MAMac ergab sich die Prädiktion „nicht embryotoxisch“, während es *in vivo* als embryotoxisch bekannt ist.

Die ermittelten Embryotoxizitätsklassen waren für jede der Wiederholungen und für jeden Parameter identisch und änderten sich auch in den Fällen nicht, in denen ergänzte Messwerte als Parameter verwendet wurden, sofern nicht in jeder durchgeführten Wiederholung der Substanztestungen alle notwendigen Parameter erreicht wurden.

Tabelle 4: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der linearen Diskriminanzanalyse der ausgewählten Chemikalien 5-FU, TSA, MAMac, SDS und BA.

In der ersten Spalte sind die Testsubstanz sowie der jeweils untersuchte Parameter angegeben. Spalte 2 gibt zu erkennen, in welcher Wiederholung der Substanztestung (run) die Parameter ermittelt wurden. Um eine näherungsweise Einschätzung der Substanz *in vivo* auch dann zu ermöglichen, wenn nicht jeder der Parameter erreicht wurde, wurden zum Teil Mittelwerte aus den entsprechenden Parametern der übrigen Wiederholungen gebildet („Sets“, Spalte 2). Diese Werte sind blau. Halbhemmkonzentrationen, die nicht erreicht wurden, weil die Konzentrations-Wirkungskurve knapp oberhalb von 50 % relativen Anteils endete und diese somit nicht schnitt, sind orange. Hier wurde die jeweils höchste getestete Konzentration als Parameter eingesetzt, wobei der zugehörige relative Anteil bei maximal 58 % lag. Diejenigen Parameter, die anhand von Graphen ermittelt wurden, die die 50 %-Achse zweimal schnitten, sind violett. Hier stieg die Kurve nach einem rapiden Abfall bis unter 15 % relativen Anteils erneut über 50 % an (TSA2 MLC1 T7) bzw. startete knapp unter 50 % (bei 41 %; SDS4 MLC1 T10 und BA4 MLC1 T7). In diesen Fällen konnte der differenzierungsinhibierende Konzentrationsbereich der Testsubstanz eindeutig identifiziert werden, so dass die in diesem gelegene Halbhemmkonzentration als Parameter zur Berechnung eingesetzt wurde. Fettgedruckt sind Konzentrationen, die per definitionem 1000 µg/mL gesetzt wurden [5]. Ist ein solcher Wert zur Bildung eines Mittelwertes herangezogen worden (BA4 MLC1 Tag 10), wurde jedoch der tatsächlich ermittelte Messwert (> 1000 µg/mL) verwendet. Die Spalten 3-5 geben die ermittelten Halbhemmkonzentrationen in µg/mL an. Die Einzelergebnisse der drei Gleichungen des PMs sind in den Spalten 6-8 wiedergegeben, während die Spalten 9 und 10 die resultierende Embryotoxizitätsklasse und die *In-vitro*-Klassifizierung anzeigen. In der letzten Spalte ist die *In-vivo*-Klassifizierung der jeweiligen Testsubstanz aufgeführt, die entsprechend der Prävalidierungsstudie des EST ([30]; „nicht embryotoxisch“, „schwach embryotoxisch“, „stark embryotoxisch“) bzw. *In-vivo*-Befunden gemäß („nicht embryotoxisch“, „embryotoxisch“) bekannt ist.

Testsubstanz, Parameter	run	ID ₅₀ / IC _{50Exp} [µg/mL]	IC ₅₀ D3 [µg/mL]	IC ₅₀ T3 [µg/mL]	Gleichung I	Gleichung II	Gleichung III	PM-Klasse	<i>in vitro</i> embryotoxisch	<i>in vivo</i> embryotoxisch
5-FU Mikroskop T10	1	0.058	0.051	0.140	-28.41	-14.26	0.79	3	stark	stark
	2	0.060	0.065	0.110	-27.96	-14.12	0.41	3	stark	stark
	3	0.052	0.078	0.110	-28.07	-14.08	0.36	3	stark	stark
	4	0.054	0.078	0.078	-27.79	-14.18	0.05	3	stark	stark
TSA Mikroskop T10	1	0.0050	0.0029	0.0062	-38.69	-21.38	2.76	3	stark	embryotoxisch
	2	0.0045	0.0041	0.0059	-38.52	-21.19	2.54	3	stark	embryotoxisch
TSA MesP1 T5	1	0.0025	0.0029	0.0062	-40.83	-22.20	3.36	3	stark	embryotoxisch
	2	0.0034	0.0041	0.0059	-39.51	-21.57	2.82	3	stark	embryotoxisch
TSA MLC1 T7	1	0.0029	0.0029	0.0062	-40.49	-22.07	3.27	3	stark	embryotoxisch
	2	0.0015	0.0041	0.0059	-41.22	-22.22	3.30	3	stark	embryotoxisch
TSA MLC1 T10	1	0.0018	0.0029	0.0062	-41.43	-22.43	3.53	3	stark	embryotoxisch
	2	0.0030	0.0041	0.0059	-39.87	-21.71	2.92	3	stark	embryotoxisch
TSA GATA-4 T5	1	0.0070	0.0029	0.0062	-36.98	-20.72	2.28	3	stark	embryotoxisch
	2	0.0047	0.0041	0.0059	-38.34	-21.12	2.49	3	stark	embryotoxisch
TSA GATA-4 T7	1	0.0044	0.0029	0.0062	-39.20	-21.58	2.90	3	stark	embryotoxisch
	2	0.0054	0.0041	0.0059	-37.71	-20.88	2.31	3	stark	embryotoxisch
TSA GATA-4 T10	1	0.0042	0.0029	0.0062	-39.38	-21.64	2.95	3	stark	embryotoxisch
	2	0.0032	0.0041	0.0059	-39.69	-21.64	2.87	3	stark	embryotoxisch
MAMac Mikroskop T10	Set 1	57	11.5	3.9	63.75	25.53	-25.20	1	nicht	embryotoxisch
	2	48	9.4	5.1	36.51	15.16	-17.24	1	nicht	embryotoxisch
	3	68	11.5	4.6	62.75	25.25	-24.80	1	nicht	embryotoxisch
MAMac MesP1 T5	Set 1	34	11.5	3.9	32.45	13.54	-16.35	1	nicht	embryotoxisch
	2	33	9.4	5.1	20.90	9.18	-12.83	1	nicht	embryotoxisch
	3	35	11.5	4.6	26.98	11.54	-14.70	1	nicht	embryotoxisch
MAMac MLC1 T7	Set 1	57.5	11.5	3.9	64.43	25.79	-25.39	1	nicht	embryotoxisch
	2	55	9.4	5.1	43.80	17.95	-19.30	1	nicht	embryotoxisch
	3	60	11.5	4.6	55.83	22.59	-22.85	1	nicht	embryotoxisch
MAMac MLC1 T10	Set 1	53	11.5	3.9	58.30	23.44	-23.66	1	nicht	embryotoxisch
	2	53	9.4	5.1	41.72	17.16	-18.71	1	nicht	embryotoxisch
	3	53	11.5	4.6	47.75	19.50	-20.57	1	nicht	embryotoxisch
SDS Mikroskop T10	1	100	160	77.5	4.71	5.91	-7.57	2	schwach	embryotoxisch
	Set 2	103	148	75	4.95	5.95	-7.63	2	schwach	embryotoxisch
	Set 3	110	155	76	5.44	6.17	-7.78	2	schwach	embryotoxisch
	4	98	140	75	4.51	5.75	-7.48	2	schwach	embryotoxisch
SDS MesP1 T5	1	100	160	77.5	4.71	5.91	-7.57	2	schwach	embryotoxisch
	Set 2	100	148	75	4.73	5.87	-7.57	2	schwach	embryotoxisch
	Set 3	100	155	76	4.74	5.90	-7.58	2	schwach	embryotoxisch
	Set 4	100	140	75	4.65	5.81	-7.52	2	schwach	embryotoxisch
SDS MLC1 T7	1	11.5	160	77.5	-1.35	3.59	-5.86	2	schwach	embryotoxisch
	2	79	148	75	3.25	5.30	-7.15	2	schwach	embryotoxisch
	Set 3	48.5	155	76	1.15	4.52	-6.56	2	schwach	embryotoxisch
	4	55	140	75	1.46	4.59	-6.62	2	schwach	embryotoxisch
SDS MLC1 T10	1	85	148	75	2.24	4.97	-6.87	2	schwach	embryotoxisch
	Set 2	85	148	75	3.64	5.45	-7.26	2	schwach	embryotoxisch
	Set 3	95	155	76	4.40	5.76	-7.48	2	schwach	embryotoxisch
	4	95	140	75	4.29	5.87	-7.42	2	schwach	embryotoxisch
BA Mikroskop T10	1	850	380	105	42.92	21.13	-18.51	1	nicht	nicht
	2	1000	340	180	30.66	16.70	-14.64	1	nicht	nicht
	3	350	150	32	53.54	24.06	-21.93	1	nicht	nicht
	4	380	380	105	19.16	12.03	-11.80	1	nicht	nicht
	5	850	340	180	26.23	15.01	-13.39	1	nicht	nicht
BA MesP1 T5	Set 5	615	150	32	97.49	40.90	-34.35	1	nicht	nicht
	Set 3	700	380	105	35.34	18.22	-16.37	1	nicht	nicht
BA MLC1 T7	4	700	340	180	21.81	13.31	-12.14	1	nicht	nicht
	Set 5	700	150	32	111.59	46.30	-38.34	1	nicht	nicht
BA MLC1 T10	3	500	380	105	25.23	14.35	-13.51	1	nicht	nicht
	4	1000	340	180	30.66	16.70	-14.64	1	nicht	nicht
	Set 5	925	150	32	148.90	60.59	-48.88	1	nicht	nicht

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung von vier Chemikalien unterschiedlicher chemischer Eigenschaften und Klassen in einem *In-vitro*-Embryotoxizitätstest unter Verwendung morphologischer und molekularer Marker sowie der Prädiktion deren embryotoxischen Potentials *in vivo*.

Um substanzbedingte Effekte auf das Wachstum und die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu spontan kontrahierenden Kardiomyozyten zu identifizieren, wurde der Embryonale Stammzelltest (EST, [8]) durchgeführt. Mittels etablierter molekularer Marker [14] wurden die Einflüsse auch auf der Ebene der Genexpression untersucht, so dass schließlich der Substanzeffekt auf die Herzzelldifferenzierung mit Veränderungen der Genexpression korreliert werden konnte.

Zur Prädiktion des embryotoxischen Potentials *in vivo*, das auf der Basis der ermittelten *In-vitro*-Ergebnisse zu erwarten ist, wurden die validierten Parameter des konventionellen EST sowie die etablierten molekularen Marker herangezogen und in ein mathematisches Prädiktionsmodell [10] eingesetzt.

4.1 Assaychecks

Die wichtigste Voraussetzung zur Untersuchung des embryotoxischen Potentials von Testsubstanzen mittels ES-Zellen ist deren Fähigkeit, sich *in vitro* in spontan kontrahierende Kardiomyozyten zu differenzieren. Auch musste sichergestellt sein, dass die untersuchten Zellen sensitiv gegenüber zytotoxischen bzw. embryotoxischen Substanzen waren. Die Gewährleistung der geforderten Kriterien wurde daher nach jedem Auftauen eines neuen Zellaliquots mittels eines Assaychecks mit 5-FU überprüft.

Die Konzentrations-Wirkungskurven der vier durchgeführten Assaychecks wiesen einen übereinstimmenden Verlauf auf (Abbildung 8, siehe 3.1.1). Die konventionellen Parameter wurden sehr gut reproduziert und zeigten, dass die murinen embryonalen Stammzellen deutlich sensitiver auf die 5-FU-Behandlung reagierten als die ausdifferenzierten 3T3-Fibroblasten. Dabei wurde die Differenzierungsfähigkeit der D3-Zellen durch die embryotoxische Referenzsubstanz 5-FU erwartungsgemäß in niedrigeren Konzentrationen beeinträchtigt als deren Viabilität. Da 5-FU dieses Muster reproduzierbar zeigt, ist es als positive Referenzsubstanz geeignet [9]. Die ermittelten Halbhemmkonzentrationen lagen weitestgehend im Bereich der Referenzwerte. Lediglich drei der vier Werte für die $IC_{50}3T3$ lagen mit Werten von 0,078 und 0,11 $\mu\text{g/mL}$ geringfügig unterhalb der geltenden Referenzwerte, denen zu Folge $IC_{50}3T3$ -Werte zwischen 0,12 und 0,50 $\mu\text{g/mL}$ liegen sollten [9]. Ein Vergleich der Daten mit im gleichen Labor durchgeführten Assaychecks zeigte jedoch, dass sämtliche $IC_{50}3T3$ -Werte der vergangenen Tests zwischen 0,076 und 0,16 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU lagen. Gleichzeitig lieferten die 3T3-Zellen jeweils für verschiedene

Testsubstanzen vergleichbare Ergebnisse mit anderen Laboren [86]. Es handelte sich daher um ein mit den Laborintern verwendeten 3T3-Zellen reproduzierbares Ergebnis. Damit war sowohl die morphologische Differenzierungsfähigkeit der ES-Zellen als auch die Sensitivität der D3- und 3T3-Zellen gegenüber der embryotoxischen bzw. in höheren Konzentrationen zytotoxischen Wirkung von 5-FU reproduzierbar gegeben.

Die durchgeführten Assaychecks wurden als valide eingestuft und die Zellen waren für den Einsatz in Substanztestungen geeignet.

4.2 Diskussion der Substanztestungen

Jede der vier ausgewählten Testsubstanzen wurde in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Wiederholungen auf ihr embryotoxisches Potential hin untersucht, um letztlich zwei valide und aussagekräftige Tests zu erhalten. Dabei wurden jeweils folgende Parameter ermittelt und in das mathematische PM eingesetzt: die Halbhemmkonzentration der Kardiomyozytendifferenzierung an Tag 10 der Differenzierung (ID_{50}), ebenfalls an Tag 10 des Tests der halbmaximale zytotoxische Effekt auf die beiden Zelllinien (IC_{50D3} bzw. IC_{503T3}) sowie die halbmaximale Hemmung der Genexpression (IC_{50Exp}) der molekularen Markergene *MesP1* in Proben von Tag 5 bzw. *MLC1* in Proben der Tage 7 und 10 der Differenzierung. Da 5-FU nur im Rahmen der Assaychecks untersucht wurde, wurde für diese Proben keine Genexpressionsanalyse durchgeführt.

4.2.1 5-Fluorouracil

5-Fluorouracil (5-FU) wirkte bereits im nanomolaren Bereich konzentrationsabhängig differenzierungsinhibierend bzw. zytotoxisch, demgegenüber die ES-Zellen am sensitivsten waren. Die Ergebnisse wurden sehr gut reproduziert (Abbildung 8, siehe 3.1.1).

Die Kardiomyozytenentwicklung im EB erwies sich gegenüber der 5-FU-Wirkung als sehr sensibel. Dies zeigte sich anhand des steilen Verlaufs der Konzentrations-Wirkungskurven im Differenzierungsassay oberhalb von 0,05 µg/mL 5-FU. Die beobachtete Größenabnahme der EBs ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass 5-FU seine Wirkung hauptsächlich über die Inhibition der DNA-Synthese entfaltet. So werden vor allem proliferierende Zellsysteme, die eine hohe DNA-Syntheserate benötigen, geschädigt [37]. Aus diesem Grund waren die sich differenzierenden Zellen im EB verhältnismäßig weniger stark betroffen, während die Zellproliferation in den EBs bereits stark eingeschränkt war. Die beobachtete differenzierungsinhibierende Wirkung deckt sich mit dem Befund, dass 5-FU in Mäusen und einer Vielzahl weiterer Spezies als embryotoxisch und teratogen wirksam bekannt ist [33; 38; 41-46]. So erwies sich beispielsweise eine pränatale maternale Exposition von 10-40 mg/kg KG zwischen den Tagen 10 und 13 der Gestation in Mäusen als teratogen [41]. Dabei ergaben die verschiedenen *In-vivo*-Studien zu erkennen, dass 5-FU in solchen Dosen teratogen wirksam war, die weder embryolethal waren noch schädliche Effekte auf das

Muttertier hatten [33; 90], was wiederum mit dem beobachteten Wirkungsmuster in den Substanztestungen korreliert.

Die zytotoxische Wirkung von 5-FU beruhte vermutlich auf der Inhibition der DNA-Synthese sowie der Inkorporierung der Metaboliten 5-FUTP bzw. 5-FdUTP in die RNA bzw. DNA [34; 35; 38; 40], die auch in der WEC in Ratten zu Veränderungen des Nukleotid-Pools, insbesondere der Erschöpfung der Thymidin-Pools, Veränderungen der DNA-Biosynthese sowie der Zell-Zyklus-Progression führte [39].

4.2.1.1 Prädiktion des embryotoxischen Potentials von 5-FU

Die konventionellen Parameter der Substanztestungen lagen zwischen 0,05 und 0,14 µg/mL 5-FU und sind in Tabelle 3 (siehe 3.4) zusammengefasst. 5-FU zeigte reproduzierbar das Muster, auf die D3-Zellen in niedrigeren Konzentrationen differenzierungshemmend als zytotoxisch zu wirken und zytotoxische Effekte auf ES-Zellen in niedrigeren Konzentrationsbereichen als auf die ausdifferenzierten Fibroblasten hervorzurufen. Im PM wird dies als höhere Empfindlichkeit des embryonalen Gewebes gegenüber dem adulten gewertet.

Die Prädiktion des embryotoxischen Potentials der Testsubstanz auf der Basis der *In-vitro*-Ergebnisse ergab im PM „stark embryotoxisch“ (Tabelle 4, siehe 3.5). Dies stimmt mit den aus *In-vivo*-Studien einer Vielzahl von Spezies einschließlich des Menschen erhaltenen Befunden überein, denen zu Folge 5-FU embryotoxisch und teratogen wirksam war [33; 41-45]. Da es diese Wirkungen bereits bei Dosierungen mit geringer maternaler Toxizität erzielte [33; 90], wurde 5-FU als „stark embryotoxisch“ *in vivo* eingestuft [12].

4.2.2 Trichostatin A

Die Ergebnisse des konventionellen EST und der Genexpressionsanalyse von *MesP1* und *MLC1* (Abbildungen 11 und 16, siehe 3.3.1.1 und 3.3.2.1) ergaben zwischen den beiden Wiederholungen relativ einheitliche Verläufe der Konzentrations-Wirkungskurven, wobei die Ergebnisse des konventionellen EST besser reproduziert wurden. Trichostatin A (TSA) entfaltete bereits im nanomolaren Bereich eine konzentrationsabhängige zytotoxische bzw. differenzierungshemmende Wirkung auf die D3- bzw. 3T3-Zellen, wobei die ES-Zellen sensitiver waren. Auch die Markergenexpression wurde in differenzierungsinhibierend wirksamen Konzentrationen gehemmt. Der halbmaximale Effekt trat zwischen 2 und 3 ng/mL TSA auf und lag damit im gleichen sehr niedrigen und engen Konzentrationsbereich wie die konventionellen Parameter mit 3 bis 6 ng/mL TSA (Tabelle 3, siehe 3.4).

Die beobachtete differenzierungsinhibierende Wirkung von TSA stimmt mit Befunden aus Untersuchungen embryonaler Stammzellen der Linie CCE überein, denen nach die EB-Differenzierung in Anwesenheit von TSA-Konzentrationen > 5 nM (> 1,5 ng/mL) infolge der Unterbindung umfassender Histon-Deacetylierung gehemmt war. Schließlich ist diese im

Zuge komplexer Veränderungen der allgemeinen und genspezifischen Chromatinstruktur für die *In-vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen essentiell [23]. Sie wird von einer Zunahme des Heterochromatin-Niveaus und damit von einer Begrenzung des exprimierbaren Gensatzes begleitet [91]. Normalerweise wird dies während der Induktion der Differenzierung embryonaler Stammzellen beobachtet. Kommt es durch TSA-Behandlung jedoch zur Inhibition von HDACs, die in epigenetische Modifikationen involviert sind, wird diese Umorganisation und damit die Differenzierung der ES-Zellen gestört [23]. Des Weiteren kann die Inhibition der Differenzierung durch TSA mit Befunden korreliert werden, dass TSA in Mäusen *in vivo* teratogen ist. So resultierte die spezifische Inhibition von HDACs in embryonaler Hyperacetylierung somitischer Nuklei, was letztlich zu Fehlbildungen des axialen Skeletts von Maus-Embryos führte [59]. Auch am Neuralrohr von Maus-Embryos wurden teratogene Effekte beobachtet, nachdem sie *in vitro* mit TSA behandelt und reimplantiert wurden [60].

Die zytotoxische Wirkung von TSA, die im gleichen Konzentrationsbereich auftrat, steht ebenfalls mit der *in vivo* und *in vitro* bereits in nanomolaren Konzentrationen beobachteten inhibitorischen Wirkung auf HDACs der Klassen I und II von Säugern in Zusammenhang [48]. In murinen ES-Zellen blockierte TSA bereits in Konzentrationen von 1,5 ng/mL die Histon-Deacetylierung. Die resultierenden Histonmodifikationen führten zu einer Veränderung des epigenetischen Codes der Zelle [23]. Da auch die Zell-Zyklus-Regulation und Zellproliferation betroffen waren [55; 56], kam es letztlich zum programmierten Zelltod. Außerdem ist gezeigt worden, dass die HDACs 1 und 2 der Klasse I eine Rolle während des myokardialen Wachstums, der Morphogenese und Kontraktilität der Kardiomyozyten eine Rolle spielen können, infolge dessen die herzspezifische HDAC-Deletion in Mäusen in letalen kardialen Abnormalitäten resultierte [92].

In einem der Zytotoxizitätstests wurde allerdings in niedrigen Konzentrationen eine bis zu 1,4-fach erhöhte Viabilität der D3-Zellen beobachtet. Um zu überprüfen, ob dies einen Substanzeffekt von TSA beispielsweise durch die Erhöhung mitochondrialer Aktivität darstellte, wurden zwei weitere unabhängige Zytotoxizitätstests mit D3-Zellen in einem geeigneten Konzentrationsbereich durchgeführt (Abbildung 11 Test A und B, siehe 3.3.1.1). Diese ließen jedoch erkennen, dass dies kein reproduzierbarer Substanzeffekt von TSA war, sondern vermutlich als Schwankung innerhalb des untersuchten biologischen Systems zu bewerten ist.

Eine weitere Beobachtung bestand in der Veränderung der Morphologie der 3T3-Fibroblasten infolge der TSA-Behandlung (Abbildung 12, siehe 3.3.1.1.1). Diese konnte bei einer Konzentration von 2,5 ng/mL beobachtet werden und nahm mit steigender Konzentration zu. Während die Kontrollzellen ein kompaktes Zytoplasma zeigten und spindelförmig erschienen, wiesen die substanzbehandelten Zellen eine abgeflachte und

gestreckte Erscheinung auf. Diese wurde konzentrationsabhängig in gleicher Weise auch an bovinen Fibroblasten [93] sowie in verschiedenen Linien humaner Karzinomzellen beobachtet. Zurückzuführen ist die veränderte Morphologie auf die Induktion von Histon-Hyperacetylierung durch TSA und die daraus resultierende Induktion des Gens eines Aktin-regulatorischen Proteins. Diese führt zu einer Reorganisation und Ausbreitung des Zytoskeletts und damit zu der beschriebenen reversiblen Veränderung der Zellmorphologie [56].

Obwohl TSA zu einer Modulation der Genexpression führt, die in der Regel in einer Überexpression spezifischer Gene, wie auch transkriptional ruhiger Allele embryonaler Stammzellen besteht [93], zeigte sich zu den drei Differenzierungszeitpunkten keine Induktion der untersuchten Markergene, sondern deren konzentrationsabhängige Repression. Dagegen waren embryonale Karzinomzellen (EC-Zellen) der Linie P19, die zur Herzmuskeldifferenzierung angeregt wurden, nicht nur in Anwesenheit von bis zu 10 nM (3 ng/mL) TSA differenzierungsfähig, sondern zeigten auch konzentrationsabhängig eine Steigerung der Expression von herzspezifischen Genen wie *GATA-4*, die an Tag 6 der Differenzierung sogar bis zum siebenfachen anstieg. Durch Hemmung der während der Kardiomyogenese repressiv wirksamen HDACs induzierte TSA die Differenzierung von P19-Zellen zu Kardiomyozyten, was sich an der Hochregulation von herzmuskelspezifischen Transkriptionsfaktoren wie *GATA-4* zeigte [55].

Um zu prüfen, ob es in den ES-Zellen der Linie D3 möglicherweise ebenfalls zur Induktion von *GATA-4* kam, wurde mit der gleichen cDNA, die der Analyse von *MesP1* und *MLC1* diente, zusätzlich die Genexpression dieses weiteren herzspezifischen Transkriptionsfaktors analysiert. *GATA-4* hatte sich zuvor in unbehandelten D3-Zellen als ein Gen erwiesen, dessen Expression zwischen den Tagen 4 und 10 der Differenzierung anstieg [14] und wurde daher an den Tagen 5, 7 und 10 untersucht. In Übereinstimmung zu *MesP1* und *MLC1* wurde auch die *GATA-4*-Expression in differenzierungshemmend wirksamen Bereichen kontinuierlich und konzentrationsabhängig reprimiert (Abbildung 17, siehe 3.3.2.1.1). Der halbmaximale Effekt auf die *GATA-4*-Expression trat zwischen 3 und 7 ng/mL TSA auf und lag damit im gleichen Bereich wie die übrigen Parameter. An Tag 7 stieg der relative Anteil an *GATA-4* in beiden Wiederholungen in niedrigen Konzentrationen bis zu zweifach an. Ob es sich hierbei um eine Induktion oder normale Schwankungen handelte, die in der Sensitivität der Methode begründet sein können, ist nur zu spekulieren. Da ein Anstieg jedoch nur an einem der Untersuchungstage sichtbar war und sich in seinem Verlauf zwischen den beiden Wiederholungen unterschied, ist eine unspezifische Schwankung wahrscheinlicher.

Dass sich das beobachtete Expressionsprofil zwischen den D3- und P19-Zellen in der beschriebenen Weise unterscheidet, liegt offensichtlich in grundsätzlichen Unterschieden

zwischen den Modellsystemen begründet. So benötigen die EC-Zellen der Linie P19 chemische Induktoren, um das normalerweise inaktive Expressionsprogramm herzspezifischer Gene anzuschalten und sich in schlagende Kardiomyozytenstrukturen zu differenzieren, während die ES-Zellen der Linie D3 spontan differenzieren und keiner exogenen Induktion bedürfen [4]. Die Hemmung der Genexpression von *GATA-4* steht in Übereinstimmung zur Reduzierung schlagender Kardiomyozyten während der Differenzierung der D3-Zellen sowie zur Verringerung der Genexpression von *MesP1* und *MLC1*.

4.2.2.1 Prädiktion des embryotoxischen Potentials von TSA

Die ermittelten Parameter der Substanztestung sind in Tabelle 3 (siehe 3.4) zusammengefasst. TSA erwies sich bereits im nanomolaren Bereich als hoch wirksam. Dabei trat der zytotoxische Effekt auf die D3-Zellen bereits in niedrigeren TSA-Konzentrationen auf als der differenzierungsinhibierende. Außerdem erwiesen sich die ES-Zellen der Testsubstanz gegenüber empfindlicher als die ausdifferenzierten Fibroblasten, was im PM als höhere Empfindlichkeit von embryonalem Gewebe gegenüber adultem Gewebe gewertet wird. Die halbmaximale Hemmung der Markergenexpression trat im gleichen Bereich auf.

Die Bewertung des embryotoxischen Potentials von TSA mittels PM ergab sowohl unter Verwendung der konventionellen Parameter als auch unter Verwendung der molekularen Parameter *MesP1*, *MLC1* und *GATA-4* jeweils in beiden Wiederholungen die Prädiktion „stark embryotoxisch“ (Tabelle 4, siehe 3.5) und änderte sich auch nicht unter Verwendung eines ergänzten $IC_{50\text{Exp}}$ -Wertes. Dieses Ergebnis bestätigte die Äquivalenz der konventionellen und molekularen Parameter. Dass auch die halbmaximale Hemmung der Genexpression von *GATA-4* zum gleichen Ergebnis im PM führte, zeigte, dass auch *GATA-4* einen geeigneten molekularen Marker zur Bewertung des embryotoxischen Potentials von TSA darstellte.

Die Prädiktion „stark embryotoxisch“ steht in Übereinstimmung zu den an Maus-Embryos beobachteten teratogenen Effekten auf das axiale Skelett, ohne zu maternaler Toxizität zu führen [59]. Teratogene Effekte auf andere Spezies sind nicht bekannt.

4.2.3 Methylazoxymethanolacetat

Im konventionellen EST entfaltete Methylazoxymethanolacetat (MAMac) konzentrationsabhängig eine inhibierende Wirkung auf die Differenzierung und Viabilität der Zellen (Abbildung 13, siehe 3.3.1.2). Die Ergebnisse wurden in den drei Wiederholungen sehr gut reproduziert. Hinsichtlich zytotoxischer Effekte waren die ausdifferenzierten Fibroblasten gegenüber der Testsubstanz sensitiver als die murinen ES-Zellen, während differenzierungsinhibierende Effekte erst in deutlich höheren Konzentrationen auftraten.

Dass sich innerhalb der EBs auch in bereits stark zytotoxisch wirksamen Konzentrationsbereichen noch in bis zu jedem EB einzelne Zellen zu spontan kontrahierenden Kardiomyozyten entwickelten, liegt in der unterschiedlichen Sensitivität differenzierender, aggregierender und als Monolayer kultivierter D3-Zellen bezüglich zytotoxischer Wirkungen begründet. Die Konzentrations-Wirkungskurven der Genexpressionsanalyse der substanzbehandelten Zellen (Abbildung 18, siehe 3.3.2.2) waren zwar deutlich heterogener als die des konventionellen EST, die $IC_{50\text{ Exp}}$ -Werte wurden jedoch gut reproduziert. Bezüglich der *MesP1*-Expression erwies sich die Genexpression als sensitiver als die Kardiomyozytendifferenzierung, da sie bereits in niedrigeren Konzentrationen als diese gehemmt wurde. Übereinstimmend kam es jedoch in differenzierungshemmend wirksamen Konzentrationen über 30 $\mu\text{g/mL}$ MAMac zur Repression beider Markergene. Die $IC_{50\text{ Exp}}$ -Werte lagen zwischen 33 und > 60 $\mu\text{g/mL}$ MAMac und damit im Bereich der konventionellen Parameter.

Die differenzierungsinhibierende Wirkung von MAMac könnte die Folge der methylierenden [64] und damit verbundenen zytotoxischen Wirkung der Testsubstanz sein.

Eine mögliche Ursache der beobachteten höheren Sensitivität der Fibroblasten gegenüber MAMac im Vergleich zu den ES-Zellen könnte in einer unterschiedlichen Enzymausstattung bzw. -aktivität hinsichtlich Cholinesterasen [69] oder detoxifizierenden konjugierenden Enzymen [62] liegen. So kann MAMac entweder durch Esterasen zu Methylazoxymethanol (MAM) hydrolysiert werden, das wiederum spontan zum Methyldiazoniumion zerfallen und so ein methylierend wirkendes Intermediat bilden kann [94]. MAM kann aber auch durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) NAD^+ -abhängig zum reaktiven Methylazoxymethanolaldehyd (MAMAL) umgesetzt werden, die beide spontan über mehrere Zwischenmetabolite in einen reaktiven alkylierenden Teil, das Carbeniumion, zerfallen. Während MAM relativ langsam ins Carbeniumion zerfällt, ist MAMAL sehr instabil und zerfällt nach Reaktion mit Nucleophilen sehr schnell in ein Carbeniumion [70] oder wird durch die Aldehyddehydrogenase (ALDH) detoxifiziert [62]. Die organspezifische Sensitivität gegenüber MAM ist daher abhängig von der Fähigkeit, durch $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -abhängige Dehydrogenasen MAM zu MAMAL umzusetzen, was in der Bildung solcher Mengen an Carbeniumionen resultiert, die wesentlich größer sind als die, wenn MAM nur spontan zerfällt. Carbeniumionen inhibieren die DNA-Synthese [70], wobei Methylcarbeniumionen aus MAM und MAMAL sowie MAMAL selbst direkt mit Makromolekülen reagieren [62]. Derzeitig ist die metabolische Kapazität des Assays undefiniert [1]. Aufgrund entsprechender Untersuchungen embryonaler Stammzellen unter Bedingungen, die für die Herzmuskeldifferenzierung optimal waren, wurde bislang jedoch keine ausreichende metabolische Aktivität nachgewiesen [17; 18].

MesP1 wurde konzentrationsabhängig kontinuierlich reprimiert. Bevor auch *MLC1* in differenzierungshemmend wirksamen Konzentrationen über 30 µg/mL MAMac reprimiert wurde, stieg die Expression in Konzentrationen bis 30 µg/mL jedoch auf bis zu 300 % (Tag 10) bzw. 650 % (Tag 7) relativen Anteils an. Dieser variable Verlauf der *MLC1*-Expression kann auf der Basis der verfügbaren Daten nicht erklärt werden und stellt die Verwendbarkeit des molekularen Markers in Frage. Im Wesentlichen zeigte die Analyse der relativen Genexpression jedoch, dass die beiden untersuchten herzspezifischen Gene *MesP1* und *MLC1* übereinstimmend an allen drei Untersuchungstagen in differenzierungshemmend wirksamen Konzentrationen durch die Behandlung der Zellen mit MAMac reprimiert wurden.

4.2.3.1 Prädiktion des embryotoxischen Potentials von MAMac

In Tabelle 3 (siehe 3.4) sind die ermittelten Parameter der Substanztestungen mit MAMac aufgeführt. Die Halbhemmkonzentrationen lagen alle in einem relativ weiten und niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 4 und 70 µg/mL.

Im PM ergab sich für MAMac sowohl unter Verwendung der konventionellen als auch der molekularen Parameter die Einschätzung „nicht embryotoxisch“ (Tabelle 4, siehe 3.5). Auch unter Verwendung ergänzter Werte ergab sich die gleiche Klassifizierung.

Mit der Prädiktion „nicht embryotoxisch“ besteht jedoch eine Diskrepanz zu Befunden aus der Literatur, denen zu Folge MAMac in einem Tiermodell embryotoxisch wirkte [67]. Möglicherweise ist sie aber dadurch zu erklären, dass hinsichtlich der Sensitivität gegenüber MAMac metabolisch bedingt spezie-, organ- und geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen [61; 68-70] oder eine spezifische Wirkung von MAMac auf neuronale Zellen nicht erfasst werden konnte. So basiert der *In-vivo*-Befund „embryotoxisch“ auf Literaturdaten, denen zu Folge eine pränatale Exposition gegenüber MAMac in neo- oder postnataler Entwicklungsneurotoxizität resultierte [67]. Da im hier verwendeten Differenzierungsmodell die Substanzwirkung auf die mesodermale Herzzelldifferenzierung untersucht wurde, konnte eine spezifische entwicklungsneurotoxische Wirkung von MAMac offenbar nicht erkannt werden. Dieser Parameter wird im Rahmen des EST nicht erfasst. Demnach ist die Klassifizierung „nicht embryotoxisch“ auf der Grundlage der *In-vitro*-Daten des EST plausibel, da sich die Embryoneurotoxizität von MAMac erst postnatal auswirkt. Unter bestimmten Kultivierungsbedingungen sind die ES-Zellen der Linie D3 jedoch auch fähig, sich in neuronale Zellen zu differenzieren und wären so geeignet, eine spezifische entwicklungsneurotoxische Wirkung von MAMac zu untersuchen.

4.2.4 Natriumdodecylsulfat

Die hohe Übereinstimmung zwischen den einzelnen Wiederholungen des konventionellen EST zeugte von einer sehr guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Abbildung 14,

siehe 3.3.1.3), während die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sehr heterogen waren (Abbildung 19, siehe 3.3.2.3). Der Kurvenverlauf war hier sehr variabel und es wurde auch nicht in jeder Wiederholung eine halbmaximale Hemmung der Genexpression erreicht. In den Tests, in denen eine $IC_{50\text{ Exp}}$ erreicht wurde, lag sie zwischen 11,5 und 100 $\mu\text{g/mL}$ Natriumdodecylsulfat (SDS), während der Wirkungsbereich im konventionellen EST zwischen 75 und 160 $\mu\text{g/mL}$ SDS lag, in dem auch die überwiegende Repression der untersuchten herzspezifischen Gene zu verzeichnen war. Lediglich für *MLC1* (Tag 7) erwies sich die Genexpression hinsichtlich der Vergleichbarkeit der konventionellen und molekularen Parameter als sensitiver. Sie wurde in allen Wiederholungen bereits in niedrigeren Konzentrationen gehemmt, als die Kardiomyozytendifferenzierung.

Vor dem Auftreten zytotoxischer Effekte auf die ES-Zellen entfaltete SDS eine differenzierungsinhibierende Wirkung. Der beobachtete Anstieg der Viabilität beider Zelllinien im Konzentrationsbereich um 50 bzw. 25 $\mu\text{g/mL}$ SDS könnte durch eine stressbedingte Erhöhung der mitochondrialen Aktivität verursacht sein oder mit einer proliferationsstimulierenden Wirkung der Testsubstanz in Zusammenhang gebracht werden. So wurde *in vitro* an humanen Zelllinien gezeigt, dass subletale Konzentrationen von SDS das Wachstum kultivierter Fibroblasten stimulierten [95]. Der mit steigender Konzentration abrupt beobachtete zytotoxische Effekt von SDS hingegen kann auf dessen denaturierende und membranschädigende Wirkung zurückgeführt werden, die an Säugerzellen konzentrations- und zeitabhängig beobachtet wurde und letztlich zur kompletten Lyse der Zellen führte [73]. An humanen Zelllinien *in vitro* zeigte sich, dass diese mit deutlich schnellerer Geschwindigkeit abstarben, sobald die Zellintegrität über einen bestimmten Grenzwert hinaus geschädigt war [96]. Diese membranschädigende Wirkung ist die primäre Schlüsselstelle der Zytotoxizität von SDS [97]. Sie steht vermutlich auch mit der Schädigung von Mitochondrien in Zusammenhang, die infolge der membrantoxischen Wirkung nachhaltig in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, was zum direkten oder programmierten Zelltod führt [73].

Anhand der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zeichnete sich deutlich ab, dass eine Aussage über den Effekt von SDS auf ES-Zellen hinsichtlich der Markergenexpression nur schwer zu tätigen ist. Zum Teil fanden in verschiedenen Wiederholungen Induktion und Repression von *MesP1* und *MLC1* im gleichen Konzentrationsbereich statt. In Anbetracht der Variabilität der Kurvenverläufe aller Wiederholungen ist jedoch davon auszugehen, dass es sich dabei um unspezifische Schwankungen eines relativ sensiblen Systems handelte. Einem Einschleppen von SDS als Detergenz in die Genexpressionsanalyse wurde durch entsprechende routinemäßig durchgeführte Reinigungsschritte vorgebeugt, so dass ein dadurch bedingter Einfluss auf die TaqMan-PCR wenig wahrscheinlich ist.

4.2.4.1 Prädiktion des embryotoxischen Potentials von SDS

Vorbehaltlich der unter 4.2.4 gemachten Einschränkungen zur Variabilität der Daten zeigten die Halbhemmkonzentrationen für den Differenzierungsendpunkt sowie die Viabilität der D3- und 3T3-Zellen, dass die ausdifferenzierten Fibroblasten deutlich sensibler gegenüber SDS waren als die murinen embryonalen Stammzellen und dass zytotoxische Effekte auf die 3T3-Zellen vor differenzierungs- und expressionsinhibierenden sowie zytotoxischen Effekten auf die D3-Zellen auftraten. Der Wirkungsbereich von SDS lag in einem relativ engen und niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 11,5 und 160 µg/mL. Die einzelnen Parameter sind in Tabelle 3 (siehe 3.4) aufgeführt.

Mittels PM erfolgte sowohl unter Verwendung der konventionellen als auch der molekularen Parameter die gleiche Klassifizierung der Testsubstanz als „schwach embryotoxisch“ (Tabelle 4, siehe 3.5). Auch die Verwendung ergänzter Werte lieferte die gleiche Prädiktion. Dieses Ergebnis bestätigte zwar die Äquivalenz der konventionellen und molekularen Marker, vor dem Hintergrund schlecht reproduzierbarer und unvollständiger Ergebnisse erwiesen sich jedoch die konventionellen Parameter als besser geeignet, um das embryotoxische Potential einer Testsubstanz verlässlich zu bewerten.

Die Prädiktion von SDS mittels PM als „schwach embryotoxisch“ korreliert mit der beobachteten fötotoxischen Wirkung an Mäusen infolge dermal applizierter maternaler Dosen über 480 mg SDS/kg KG [74] sowie mit embryotoxischen Effekten am Zebrafisch, die sich in *In-vivo*-Studien in Konzentrationen über 25 µM SDS zeigten (persönliche Mitteilung der Firma VASTox).

4.2.5 Benzoesäure

Die Ergebnisse der Substanztestungen von Benzoesäure (BA) wurden weder im konventionellen EST noch in der Genexpressionsanalyse gut reproduziert. Dies war vermutlich die Folge veränderter Wachstumseigenschaften der verwendeten Zellpassagen und verdeutlichte, dass es sich bei ES-Zellen um ein empfindliches und relativ stör anfälliges System handelt. Die ermittelten Parameter wiesen eine große Streubreite auf. Die Konzentrations-Wirkungskurven verliefen sehr variabel, ließen jedoch eine konzentrationsabhängige zytotoxische, differenzierungs- und expressionsinhibierende Wirkung von BA erkennen. Im konventionellen EST wurde auch die höhere Sensitivität der 3T3-Zellen deutlich und dass zytotoxische Effekte auf die D3-Zellen bereits in niedrigeren Konzentrationen als differenzierungsinhibierend auftraten (Abbildung 15, siehe 3.3.1.4). Die Markergene wurden in diesen differenzierungsinhibierend wirksamen Konzentrationen übereinstimmend reprimiert (Abbildung 20, siehe 3.3.2.4).

Die Inhibition der Herzzelldifferenzierung durch BA wurde vermutlich durch dessen zytotoxische Wirkung verursacht, da sie erst in sehr hohen, stark zytotoxisch wirksamen Konzentrationen beeinträchtigt wurde. Eine embryotoxische oder teratogene Wirkung ist für

BA aus der Literatur nicht bekannt [74], so dass die Beobachtung, dass die ES-Zellen erst in höheren Konzentrationen von zytotoxischen und schließlich differenzierungsinhibierenden Effekten durch BA betroffen waren als die ausdifferenzierten Fibroblasten, schlüssig ist. Die zytotoxische Wirkung der Testsubstanz steht möglicherweise mit dessen hemmender Wirkung gegenüber Oxidoreduktasen in Zusammenhang, infolge derer sich reaktive Sauerstoffspezies anreichern [75]. Von diesen ist bekannt, dass sie zunehmend benachbarte Moleküle wie Lipide, Proteine oder die DNA schädigen, wobei diese Schädigungen zellulärer Strukturen zur Repression zellulärer Mechanismen wie Replikation, Transkription und Translation führen und letztlich den Zelltod bedingen.

Die in zwei Wiederholungen beobachteten starken Induktionen von *MesP1* bzw. *MLC1* (Tag 10) um einen Faktor von 1,5 bzw. 3,5 sind vermutlich als unspezifische Schwankungen zu betrachten, die zufällige Folge der erwähnten veränderten Wachstumseigenschaften der verwendeten Zellpassagen waren.

4.2.5.1 Prädiktion des embryotoxischen Potentials von BA

Vorbehaltlich der unter 4.2.5 gemachten Einschränkungen zur Variabilität der Daten wurde anhand der Halbhemmkonzentrationen für den Differenzierungsendpunkt und der Viabilität der D3- und 3T3-Zellen deutlich, dass die ausdifferenzierten Fibroblasten sensitiver gegenüber BA waren als die murinen ES-Zellen und dass zytotoxische Effekte auf die D3-Zellen vor differenzierungs- und expressionsinhibierenden auftraten. Der Wirkungsbereich von BA lag in einem relativ weiten und hohen Konzentrationsbereich zwischen 32 und 1350 µg/mL. Die einzelnen Parameter sind in Tabelle 3 (siehe 3.4) aufgeführt.

Trotz der beobachteten großen Streubreite der Ergebnisse und der teilweisen Verwendung ergänzter Werte ergab die lineare Diskriminanzanalyse unter Verwendung der konventionellen wie molekularen Parameter die Prädiktion „nicht embryotoxisch“ (Tabelle 4, siehe 3.5). Dieses Ergebnis bestärkte insbesondere die Stabilität der für die Bewertung letztlich ausschlaggebenden Parameter trotz variablen Kurvenverlaufs und stimmte damit überein, dass für BA weder ein embryotoxisches noch teratogenes Potential bekannt ist [74].

4.3 Abschließende Bewertung der Substanztestungen im Embryonalen Stammzelltest

Der EST erwies sich für drei der vier ausgewählten Chemikalien als geeignet, deren embryotoxisches Potential *in vivo* auf der Basis der *In-vitro*-Ergebnisse richtig einzuschätzen. Die Bewertung mittels eines mathematischen PMs war sowohl unter Verwendung der konventionellen, morphologischen Parameter, als auch der molekularen Marker identisch, obgleich der konventionelle EST hinsichtlich der Intra-Labor-Variabilität in den Substanztestungen der Genexpressionsanalyse deutlich überlegen war. Insbesondere die

Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von SDS und BA schwankten zwischen den einzelnen Wiederholungen und im Vergleich zu den Ergebnissen des konventionellen EST zum Teil sehr stark. Dennoch stimmte die ermittelte Embryotoxizitätsklasse für alle getesteten Substanzen außer MAMac mit den *In-vivo*-Daten überein, was wiederum für die Vergleichbarkeit der etablierten Marker mit den konventionellen Parametern sowie für die Stabilität und Verlässlichkeit der letztlich ausschlaggebenden Parameter spricht.

Welche biologische Relevanz die in der Genexpressionsanalyse beobachteten Induktionen im embryonalen Stammzellensystem haben, ist nicht ersichtlich. Schließlich ist im gleichen System in den betreffenden Konzentrationsbereichen, in denen eine Expressionssteigerung beobachtet wurde, noch keine deutliche morphologisch sichtbare Hemmung der Differenzierung aufgetreten. Auch wurde nicht jede gemessene Induktion in ihrem Ausmaß reproduziert, sondern diese unterlagen einer hohen Variabilität. Die als Endpunkt bestimmte 50 %-ige Hemmung der Differenzierung (ID_{50}) und Genexpression ($IC_{50\text{ Exp}}$) hingegen, erwiesen sich wie bereits erwähnt als vergleichbar.

Die abweichende Prädiktion von MAMac verdeutlichte die Grenzen des Modellsystems bezüglich des erfassten Endpunktes. Da im hier verwendeten Differenzierungsmodell die Substanzwirkung auf die mesodermale Herzzelldifferenzierung untersucht wurde, ist es möglich, dass MAMac wegen seiner spezifischen entwicklungsneurotoxischen Wirkung nicht erkannt wurde. So basierte der *In-vivo*-Befund „embryotoxisch“ auf Literaturdaten, denen zu Folge eine pränatale Exposition gegenüber MAMac in neo- oder postnataler Entwicklungsneurotoxizität resultierte [67]. Dieser Parameter kann jedoch im Rahmen des EST nicht erfasst werden. Demnach ist die Klassifizierung „nicht embryotoxisch“ auf der Grundlage der *In-vitro*-Daten des EST plausibel, da sich die Embryoneurotoxizität von MAMac erst postnatal auswirkt [67] und auch keine *In-vivo*-Befunde zur embryonalen und fötalen Toxizität berichtet wurden. Schließlich kann die Missklassifizierung auch aus den Limitierungen des PMs resultieren. Die begrenzte Anzahl an Testchemikalien in der Validierungsstudie, die die Grundlage für die Erstellung des PMs bildete [10], deckte nicht das spezifische Embryotoxizitätsprofil von MAMac ab, das sich durch hohe Zytotoxizität auf die ausdifferenzierten 3T3-Zellen und geringe toxische und differenzierungshemmende Wirkung auf die D3-Zellen auszeichnete. Dies trug zu einem falsch-negativen Ergebnis bei und drückte sich auch in der Sensitivität und Spezifität des EST aus. So lag der prozentuale Anteil korrekt klassifizierter Testchemikalien in der Validierungsstudie bei 78 %. Die Sensitivität für stark embryotoxische Chemikalien betrug zwar 100 %, die Spezifität lag allerdings bei 83 %. Die Spezifität für schwache Embryotoxine (84 %) war ebenfalls gut, während die Sensitivität (69 %) lediglich ausreichend war [5]. In diesem Zusammenhang sind jedoch die von mir erzielten eindeutigen und gut reproduzierten Ergebnisse der Substanztestungen der (stark) embryotoxischen Chemikalien 5-FU und TSA hervorzuheben,

die die beschriebenen Ergebnissen der Validierungsstudie hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität bestätigten.

Schließlich ist anhand der Ergebnisse TSA-behandelter Zellen auch zu erkennen, dass die durch Histondeacetylasen inhibierende Substanzen verursachten Modifikationen des epigenetischen Zustandes von differenzierenden Zellen zu einer Hemmung von embryonalen Differenzierungsvorgängen führen kann, was wiederum embryotoxische Effekte hervorrufen kann. Deshalb wird ein frühes Embryotoxizitäts-Screening von pharmazeutischen Entwicklungssubstanzen, deren therapeutische Wirkung auf epigenetischen Mechanismen beruht, für sinnvoll erachtet. Hierfür würde sich der EST anbieten.

4.4 Ausblick - Potential des Embryonalen Stammzelltests

Im Rahmen der Untersuchung reproduktionsschädigender Wirkungen von Chemikalien repräsentiert der EST ein viel versprechendes, prädiktives Screeningverfahren zur Detektion embryotoxischer Substanzeffekte. Insbesondere aufgrund seiner hohen Sensitivität für stark embryotoxische Substanzen (100 %) [5] kann er in der Pharmaindustrie im Rahmen der Selektion so genannter Entwicklungskandidaten genutzt werden, um deren mögliche embryotoxische Wirkung zu identifizieren und diese gegebenenfalls von der Weiterentwicklung ausschließen zu können.

In seiner gegenwärtigen Form stellt er einen auf der mesodermalen Entwicklung basierenden *In-vitro*-Embryotoxizitätstest dar. In Anbetracht der Komplexität und unterschiedlichen Manifestierung von Embryotoxizität erlauben es ES-Zellen jedoch aufgrund ihrer Pluripotenz, durch weitere *In-vitro*-Differenzierungs-Modelle auch spezifische Aspekte der Entwicklungstoxizität abzudecken [1]. So könnte die Integration weiterer Differenzierungswege und zusätzlicher Zielgewebe präzise Informationen über das entwicklungsstoxische Potential von chemischen Substanzen liefern.

Ein wesentlicher Schritt der Optimierung des EST bestünde in der Integration eines geeigneten und verlässlichen metabolischen Systems. Damit würden zukünftig auch Proteratogene erfasst und eine falsch-negative Prädiktion metabolismus-vermittelter Embryotoxizität verhindert werden [2]. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine Anpassung an die Kulturbedingungen zur Differenzierung der ES-Zellen zu metabolisch aktiven Zelltypen führen könnte, wird eine ausreichende metabolische Kompetenz von ES-Zellen entsprechenden Untersuchungen mit Cyclophosphamid [17] oder 2-Methoxyethanol und 2-Ethoxyethanol [18] zu Folge jedoch nicht angenommen.

Hinsichtlich des Einsatzes und der Akzeptanz des EST zur *In-vitro*-Risikobewertung ist metabolische Aktivität jedoch ebenso notwendig wie die Extrapolation der *in vitro* ermittelten organspezifischen effektiven Konzentrationen auf die effektiven Toxizitätslevel *in vivo*. Dies gestaltet sich bei den meisten *In-vitro*-Systemen jedoch schwierig [1] und kann nicht direkt

erfolgen, da die Exposition des Zielgewebes über das Plasma von verschiedenen kinetischen Prozessen (LADME) abhängig ist. Aktuelle Studien zu Folge erwies sich jedoch die Kombination von Extrapolationsregeln und pharmakologisch basierten pharmakokinetischen Modellen (PBPK) unter Verwendung von *In-silico*-Techniken als geeignet [18]. Unter Berücksichtigung des embryotoxischen Potentials und der Lipophilie der Testkomponenten kann in einem ersten Schritt mit Hilfe von Extrapolationsregeln [98] die Konzentration im Kulturmedium *in vitro* auf die Plasmakonzentration *in vivo* extrapoliert werden. Mittels PBPK erfolgt anschließend die Extrapolation der internen Exposition auf externe Expositionslevel [18].

Um die Extrapolation von Daten zwischen Spezies deutlich zu verbessern, wäre der Vergleich zwischen Maus- und Mensch-basiertem EST ein wertvolles Hilfsmittel. So besteht die Möglichkeit, Testsysteme, die auf ES-Zellen basieren, an humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen) anzupassen. Da die Inter-Spezies-Variation eines der Hauptprobleme der Medikamententestung darstellt, könnte die Verwendung humaner Testsysteme deutlich prädiktiver für den Menschen sein [1]. Schließlich sind nicht alle Säuger-Spezies gleichermaßen sensitiv gegenüber dem toxischen Einfluss einer Chemikalie und einige Entwicklungswege, die als Zielgewebe für Chemikalien fungieren, sind spezifisch für die humane Entwicklung. Bevor hES-Zellen jedoch für Embryotoxizitätstests verwendet werden können, müssen Probleme der Legalität, Ethik sowie des Patentrechts geregelt werden [2].

Schließlich wird die Automatisierung des EST zur Prüfung auf embryotoxische Eigenschaften im so genannten „*high-throughput screening*“ angestrebt [16]. Als Zell-basierter Assay ist der EST für diesen Einsatz viel versprechend und hat im Vergleich zu anderen *In-vitro*-Embryotoxizitätstests aufgrund der Pluripotenz der ES-Zellen, der geringeren interexperimentellen Variabilität sowie dem Nicht-Bedarf an Tieren das größte Zukunftspotential [1].

Um eine Risikoabschätzung für den Menschen zu ermöglichen, kann der EST die aktuellen Tierversuche für Entwicklungstoxizität jedoch nicht ersetzen. Vielmehr kann er als Bestandteil der Gefährdungsbeurteilung dazu beitragen, Hinweise auf reproduktionsschädigende Eigenschaften von Chemikalien zu untersuchen und somit zusätzliche *In-vivo*-Tierstudien zu begrenzen und steht damit weitestgehend im Einklang mit dem „3R-Prinzip“ von Russell und Burch („*refine, reduce, replace*“, [99]) und dem REACH-System.

5 Zusammenfassung

Der Embryonale Stammzelltest (EST) ist ein spezifischer, sensitiver und wenig zeitaufwendiger *In-vitro*-Embryotoxizitätstest, der als validierte *In-vitro*-Methode zur Untersuchung möglicher embryotoxischer Wirkungen von Chemikalien eingesetzt werden und zukünftig möglicherweise Tierversuche ersetzen oder reduzieren kann. Der EST nutzt die Pluripotenz der ES-Zellen, sich *in vitro* in spontan kontrahierende Herzmuskelzellen differenzieren zu können [4]. Neben einem Differenzierungsassay mit murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Linie D3, die undifferenziertes embryonales Gewebe repräsentieren, umfasst der Test auch einen Zytotoxizitätsassay mit D3-Zellen und 3T3-Maus-Fibroblasten, die differenzierte, adulte Zellen repräsentieren und stellvertretend maternale Toxizität anzeigen sollen. Somit basiert der EST auf den beiden wichtigsten Mechanismen pränataler Toxizität, der Störung der Differenzierung und der Zytotoxizität [8]. Während der zehntägigen *In-vitro*-Differenzierung bilden die ES-Zellen Zellaggregate, die Embryonalkörperchen (*embryoid bodies*, EBs), und rekapitulieren die zellulären Entwicklungsprozesse und Genexpressionsmuster der frühen Embryogenese *in vivo*. Sie stellen daher ein geeignetes *In-vitro*-Modellsystem dar, um inhibitorische oder induzierende Effekte auf den Differenzierungsprozess früher Embryonalstadien von Säugern zu identifizieren [3].

Als Parameter embryotoxischer Substanzwirkung dient diejenige Testsubstanzkonzentration, bei der in 50 % der EBs die Kardiomyozytendifferenzierung inhibiert wird (ID_{50}). Um allgemeine zytotoxische Effekte zu ermitteln und Unterschiede in der Sensitivität embryonaler und adulter Zellen gegenüber zytotoxischen Substanzen zu berücksichtigen, wurde die halbmaximale Inhibitionskonzentration des Zellwachstums auf die beiden verwendeten Zelllinien ($IC_{50}D3$ bzw. $IC_{50}3T3$) bestimmt. Auf der Grundlage dieser drei Parameter wurde für den EST ein mathematisches Prädiktionsmodell (PM, [10]) empirisch abgeleitet, um toxische Effekte *in vivo* auf der Grundlage der ermittelten *In-vitro*-Daten abschätzen zu können. Da die Kardiomyozytendifferenzierung der ES-Zellen sowohl zellmorphologisch als auch hinsichtlich der Expression herzspezifischer Gene mit der embryonalen Herzdifferenzierung *in vivo* korreliert [14], wurden mittels quantitativer Real Time-PCR (qRT-PCR) innerhalb des *In-vitro*-Differenzierungszeitraumes auch Genexpressionsanalysen ausgewählter herzmuskelspezifischer Markergene durchgeführt. Als Marker dienten einer der frühesten Transkriptionsfaktoren der mesodermalen Entwicklung (*Mesoderm Posterior 1*, MesP1), dessen Expression an Tag 5 der Differenzierung maximal ist, und ein Protein des kontraktiven Apparates (*Myosin light chain 1*, MLC1), dessen Expression zwischen den Tagen 7 und 10 induziert wird. Diese wurden erfolgreich als molekulare Marker etabliert [14], wobei sich zeigte, dass die von der Prüfsubstanz hervorgerufene halbmaximale Hemmung der Genexpression in den

Kardiomyozyten ($IC_{50\text{ Exp}}$) einen weiteren relevanten Parameter zur Bestimmung dessen embryotoxischen Potentials darstellt.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, mit Hilfe des EST das embryotoxische Potential von vier Chemikalien unterschiedlicher Substanzklassen abzuschätzen. Diese waren das fungistatische Antibiotikum Trichostatin A (TSA), der Essigsäureester eines Cycasin-Aglycons, das Methylazoxymethanolacetat (MAMac), der Emulgator und pharmakologische Hilfsstoff Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie der Konservierungsstoff Benzoesäure (BA). Ermittelt wurden deren konzentrationsabhängiger Effekt auf das D3- und 3T3-Zellwachstum, auf die Differenzierung embryonaler Stammzellen in kontrahierende Herzmuskelzellen und auf die Expression etablierter herzmuskelspezifischer Markergene, indem die Halbhemmkonzentrationen der Zytotoxizität für D3- und 3T3-Zellen, die Halbhemmkonzentration der Differenzierung an Tag 10 sowie die der Genexpression an den Tagen 5 (*MesP1*), 7 und 10 (*MLC1*) der Differenzierung gemessen wurden. Schließlich wurden diese Parameter zur *In-vivo*-Klassifizierung der Testsubstanzen mittels PM herangezogen.

Die Ergebnisse der Substanztestungen gaben zu erkennen, dass der konventionelle EST, bei dem die Bestimmung der Differenzierungshemmung mit Hilfe morphologischer Parameter erfolgt, stabiler war als die Bestimmung mit Hilfe der molekularen Marker. Dennoch wurden in den überwiegenden Fällen vergleichbare Halbhemmkonzentrationen ermittelt, die unter Verwendung des PMs zur identischen Klassifizierung der getesteten Substanzen hinsichtlich ihres embryotoxischen Potentials führten. So entfaltete die Testsubstanz TSA ihre spezifische Wirkung auf D3- wie 3T3-Zellen bereits in nanomolaren Konzentrationen und wurde als „stark embryotoxisch“ bewertet. SDS wurde als „schwach embryotoxisch“, MAMac und BA als „nicht embryotoxisch“ klassifiziert. Diese Prädiktionen stimmten abgesehen von dem als Entwicklungsneurotoxin *in vivo* bekannten MAMac [67] mit *In-vivo*-Befunden überein, was von der Stabilität und der Brauchbarkeit der Parameter zeugte. Die Ursache der Fehlklassifizierung von MAMac liegt vermutlich in den Limitierungen des Modellsystems begründet, das auf mesodermaler Differenzierung basiert. Dadurch können spezifische Effekte auf neuronale Entwicklungsprozesse offenbar nicht erfasst werden. Dass der EST dazu in der Lage ist, starke sowie nicht embryotoxische Substanzen *in vitro* korrekt zu erfassen, wurde in jeder Substanztestung durch die positive Referenzsubstanz 5-Fluorouracil (5-FU) und die Negativkontrolle Penicillin G kontrolliert und bestätigt.

In Abhängigkeit vom embryotoxischen Potential einer Substanz war anhand der ermittelten Halbhemmkonzentrationen eine Abstufung der konventionellen Parameter zu erkennen. Während sich die ES-Zellen gegenüber den starken Embryotoxinen insbesondere hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials am sensitivsten erwiesen, stand bei den nicht

embryotoxischen Substanzen die zytotoxische Wirkung deutlich im Vordergrund, die das Wachstum der ausdifferenzierten Fibroblasten bereits in niedrigeren Konzentrationen beeinträchtigte als das Wachstum und die Differenzierung der ES-Zellen. Die schwach embryotoxische Substanz SDS hingegen wirkte auf die D3-Zellen in niedrigeren Konzentrationen differenzierungsinhibierend als zytotoxisch, hemmte jedoch das Wachstum der 3T3-Zellen bereits in deutlich niedrigeren Bereichen.

Die Genexpressionsanalyse verdeutlichte im Wesentlichen, dass jede der Substanzen in Konzentrationen, die sich im konventionellen EST als differenzierungsinhibierend erwiesen haben, auch zu einer Repression der herzmuskelspezifischen Markergene führte. Trotz teilweise stark schwankender Expressionsdaten, erwies sich die Verwendung der Halbhemmkonzentration der Genexpression als molekularer Parameter zur Prädiktion eines embryotoxischen Potentials der Testkomponenten als ebenso sensitiv wie die konventionellen Parameter. Dennoch stellen die hier mittels TaqMan erfassten molekularen Marker keinen Ersatz zum konventionellen Differenzierungsparameter dar, sondern vielmehr eine nutzbringende Ergänzung. So ermöglichten sie bereits nach 5 bzw. 7 Tagen der *In-vitro*-Differenzierung eine mit dem mikroskopischen Parameter übereinstimmende Einschätzung des embryotoxischen Potentials der Chemikalien *in vivo*. Darüber hinaus können Genexpressionsanalysen weiterer differenzierungsspezifischer Gene genutzt werden, um die dem embryotoxischen Potential von Testkomponenten zu Grunde liegenden Mechanismen aufzuklären.

Letztlich ist der EST als neuer prädiktiver Screen zur Detektion embryotoxischer Substanzeffekte zu betrachten, der die Vorteile der Stammzelltechnologie und der Genexpressionsanalyse nutzen kann [13].

6 Summary

The embryonic stem cell test (EST) represents a specific, sensitive and fast *in vitro* embryotoxicity test that can be utilised as a validated *in vitro* method for investigations of possible embryotoxic effects of chemical substances and that possibly can replace or reduce animal experiments in the future. The EST uses the pluripotency of the ES cells that can differentiate *in vitro* into spontaneously beating cardiac muscle cells [4]. Beside a differentiation assay with murine embryonic stem cells (ES cells) of the D3 line, which represent undifferentiated embryonic tissue, the test comprises a cytotoxicity assay with D3 cells as well as mouse 3T3 fibroblasts which represent differentiated, adult cells and should indicate maternal toxicity. Hence the EST is based on the two most important mechanisms of prenatal toxicity, such as inhibition of differentiation and cytotoxicity [8]. During the 10 days *in vitro* differentiation period ES cells form cell aggregates called embryoid bodies (EBs) and recapitulate cellular developmental processes and gene expression patterns of early embryogenesis *in vivo*. Thus, they represent a suitable *in vitro* model system to identify inhibiting or inducing effects on the differentiation process of early embryonic stages of mammals [3].

The concentration of a test substance that causes an inhibition of cardiomyocyte differentiation in 50 % of the EBs (ID_{50} -value) served as a parameter for embryotoxic effects. To determine general cytotoxic effects and to consider differences in the sensitivity of embryonic and adult cells to cytotoxic compounds, the halfmaximal inhibiting concentration of cell growth of both used cell lines (IC_{50} D3 and IC_{50} 3T3 respectively) was determined. Based on these three parameters a mathematical prediction model (PM, [10]) was empirically deduced for the EST to predict toxic effects *in vivo* from the determined *in vitro* data. Concerning the cell morphology and the expression of cardiac-specific genes, the cardiomyocyte differentiation of ES cells correlates with the embryonic heart differentiation *in vivo* [14]. Therefore, gene expression analysis of selected cardiac-specific marker genes using quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) was implemented during the *in vitro* differentiation period. One of the earliest transcription factors of the mesodermal development (*Mesoderm Posterior 1*, MesP1), whose expression is maximal on differentiation day 5, as well as a protein of the contractile apparatus (*Myosin light chain 1*, MLC1), whose expression is induced between day 7 and 10, were successfully established as molecular markers [14]. The halfmaximal inhibition of the cardiomyocyte gene expression ($IC_{50\text{Exp}}$) was shown to represent a further relevant parameter to define the embryotoxic potential of the test compound.

The aim of the presented work consisted in the evaluation of the embryotoxic potential of four chemicals of different substance classes by means of the EST. These were the fungistatic antibiotic trichostatin A (TSA), the acetate of a cycasin aglycone,

methylazoxymethanolacetate (MAMac), the emulsifier and pharmacological excipient sodium dodecyl sulfate (SDS) as well as the preservative benzoic acid (BA). Their concentration-dependent effects were investigated on D3 and 3T3 cell growth, on the differentiation of embryonic stem cells in contracting cardiac muscle cells as well as on the expression of established cardiac muscle-specific marker genes by measuring the halfmaximal inhibiting concentration of the cytotoxicity for D3 and 3T3 cells, the halfmaximal inhibiting concentration of the differentiation on day 10 as well as of the gene expression on differentiation day 5 (*MesP1*), 7 and 10 (*MLC1*). Finally these parameters were used for the classification of the test chemicals *in vitro* via PM.

The results of the assays using the above mentioned substances suggested that the conventional EST, in which the identification of the differentiation inhibition is carried out by means of morphological parameters, was more robust than the molecular markers. However, in the majority of cases comparable halfmaximal inhibiting concentrations were calculated that, using the PM, resulted in the identical classification of the tested chemicals concerning their embryotoxic potential. Thus, the test compound TSA already exerted its specific effect on D3 as 3T3 cells in nanomolar concentrations and was estimated as “strongly embryotoxic”. SDS was classified as “weakly embryotoxic”, MAMac and BA as “non-embryotoxic”. Except MAMac, which is known as a developmental neurotoxin *in vivo* [67], these predictions were consistent with *in vivo* findings that testifies the stability and the usefulness of the parameters. The misclassification of MAMac may originate from the limitations of the model system that is based on mesodermal differentiation. Thus, specific effects on neuronal developmental processes obviously cannot be detected. During each assay it was examined and verified that the EST is capable to discriminate strongly as well as non-embryotoxic substances *in vitro* as shown by the positive reference substance 5-fluorouracil (5-FU) and the negative control penicillin G.

Depending on the embryotoxic potential of substances, a graduation of the conventional parameters based on the determined halfmaximal inhibiting concentrations was detected. The ES cells proved to be most sensitive for strongly embryotoxicants particularly concerning their differentiation potential. Regarding the non-embryotoxic substances, the cytotoxic effects predominated, i.e. the growth of the differentiated fibroblasts was affected in already lower concentrations than growth and differentiation of the ES cells. However, the weakly embryotoxicant SDS acted by inhibiting the differentiation of D3 cells in lower than cytotoxic concentrations but already repressed the growth of the 3T3 cells in significant lower ranges.

Primarily gene expression analysis clarified that in concentrations which were proved to be differentiation inhibiting in the conventional EST, each of the substances caused a repression of cardiac-specific marker genes as well. Despite highly variable expression data, the use of the halfmaximal inhibiting concentration of the gene expression as molecular

parameter to predict the embryotoxic potential of the test compounds proved to be just as sensitive as the conventional parameters. However, the molecular markers measured in the present studies by means of TaqMan do not represent a reliable alternative to the conventional differentiation parameter but rather can provide valuable and supportive data. Thus, they allowed an estimation of the embryotoxic potential of the chemicals *in vivo* that was consistent with the microscopic parameter already at day 5 and day 7 of *in vitro* differentiation. Moreover, gene expression analysis of appropriate differentiation specific genes could be used to investigate mechanisms that are responsible for embryotoxic properties of the test compounds.

Finally, the EST is considered to represent a new, predictive screening test to detect the embryotoxic properties of chemicals that can use the advantages of the stem cell technology and technological advances in the field of gene expression analysis [13].

7 Literaturverzeichnis

1. Spielmann H, Seiler A, Bremer S, Hareng L, Hartung T, Ahr H, Faustman E, Haas U, Moffat GJ, Nau H, Vanparys P, Piersma A, Sintes JR, Stuart J. The practical application of three validated in vitro embryotoxicity tests. The report and recommendations of an ECVAM/ZEBET workshop (ECVAM workshop 57). *Altern.Lab Anim* 2006;34:527-538.
2. Bremer S, Hartung T. The use of embryonic stem cells for regulatory developmental toxicity testing in vitro--the current status of test development. *Curr.Pharm.Des* 2004;10:2733-2747.
3. Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus AM. Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicol.In Vitro* 2001;15:741-753.
4. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 1985;87:27-45.
5. Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Pohl I, Seiler A, Clemann N, Bremer S, Becker K. Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Altern.Lab Anim* 2004;32:209-244.
6. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988;336:688-690.
7. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;336:684-687.
8. Spielmann H, Pohl I, Döring B, Liebsch M, Moldenhauer F. The Embryonic Stem Cell Test, an In Vitro Embryotoxicity Test Using Two Permanent Mouse Cell Lines: 3T3 Fibroblasts and Embryonic Stem Cells. *IN VITRO TOXICOLOGY* 1997;10:119-127.
9. Scholz G. Standard Operating Procedure Embryonic Stem Cell Test (EST) FINAL VERSION ZEBET. 1998.
10. Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Seiler A, Brown N, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *European Centre for the Validation of Alternative Methods. Altern.Lab Anim* 2002;30:151-176.
11. Laschinski G, Vogel R, Spielmann H. Cytotoxicity test using blastocyst-derived euploid embryonal stem cells: a new approach to in vitro teratogenesis screening. *Reprod.Toxicol.* 1991;5:57-64.
12. Brown NA. Selection of test chemicals for the ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests. *European Centre for the Validation of Alternative Methods. Altern.Lab Anim* 2002;30:177-198.

13. Seiler A, Visan A, Buesen R, Genschow E, Spielmann H. Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. *Reprod.Toxicol.* 2004;18:231-240.
14. Kaltenhäuser J. Einfluss embryotoxischer Substanzen auf die Expression differenzierungsspezifischer Gene in murinen embryonalen Stammzellen. 2006.
15. zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. Molecular multiple endpoint embryonic stem cell test--a possible approach to test for the teratogenic potential of compounds. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 2004;194:257-269.
16. Buesen R, Visan A, Genschow E, Slawik B, Spielmann H, Seiler A. Trends in improving the embryonic stem cell test (EST): an overview. *ALTEX.* 2004;21:15-22.
17. Bremer S, Pellizzer C, Coecke S, Paparella M, Catalani P. Detection of the embryotoxic potential of cyclophosphamide by using a combined system of metabolic competent cells and embryonic stem cells. *Altern.Lab Anim* 2002;30:77-85.
18. Verwei M, van Burgsteden JA, Krul CA, van de Sandt JJ, Freidig AP. Prediction of in vivo embryotoxic effect levels with a combination of in vitro studies and PBPK modelling. *Toxicol.Lett.* 2006;165:79-87.
19. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-156.
20. Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp.Cell Res.* 1984;152:212-219.
21. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984;309:255-256.
22. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ.Res.* 2002;91:189-201.
23. Lee JH, Hart SR, Skalnik DG. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis.* 2004;38:32-38.
24. Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc.Res.* 2003;58:278-291.
25. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc.Res.* 1997;36:149-162.
26. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 1991;48:173-182.

27. Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev.Biol.* 1994;164:87-101.
28. Fassler R, Rohwedel J, Maltsev V, Bloch W, Lentini S, Guan K, Gullberg D, Hescheler J, Addicks K, Wobus AM. Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 13):2989-2999.
29. Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech.Dev.* 1993;44:41-50.
30. Scholz G, Genschow E, Pohl I, Bremer S, Paparella M, Raabe H, Southee J, Spielmann H. Prevalidation of the Embryonic Stem Cell Test (EST) - A New In Vitro Embryotoxicity Test. *Toxicology in Vitro* 1999;13:675-681.
31. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ.Res.* 1994;75:233-244.
32. Maltsev VA, Ji GJ, Wobus AM, Fleischmann BK, Hescheler J. Establishment of beta-adrenergic modulation of L-type Ca²⁺ current in the early stages of cardiomyocyte development. *Circ.Res.* 1999;84:136-145.
33. Grafton TF, Bazare JJ, Jr., Hansen DK, Sheehan DM. The in vitro embryotoxicity of 5-fluorouracil in rat embryos. *Teratology* 1987;36:371-377.
34. Valeriote F, Santelli G. 5-Fluorouracil (FUra). *Pharmacol.Ther.* 1984;24:107-132.
35. Shuey DL, Lau C, Logsdon TR, Zucker RM, Elstein KH, Narotsky MG, Setzer RW, Kavlock RJ, Rogers JM. Biologically based dose-response modeling in developmental toxicology: biochemical and cellular sequelae of 5-fluorouracil exposure in the developing rat. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1994;126:129-144.
36. Danenberg PV, Lockshin A. Fluorinated pyrimidines as tight-binding inhibitors of thymidylate synthetase. *Pharmacol.Ther.* 1981;13:69-90.
37. Danenberg PV. Thymidylate synthetase - a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim.Biophys.Acta* 1977;473:73-92.
38. Shuey DL, Setzer RW, Lau C, Zucker RM, Elstein KH, Narotsky MG, Kavlock RJ, Rogers JM. Biological modeling of 5-fluorouracil developmental toxicity. *Toxicology* 1995;102:207-213.
39. Lau C, Andersen ME, Crawford-Brown DJ, Kavlock RJ, Kimmel CA, Knudsen TB, Muneoka K, Rogers JM, Setzer RW, Smith G, Tyl R. Evaluation of biologically based dose-response modeling for developmental toxicity: a workshop report. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 2000;31:190-199.
40. Parker WB, Cheng YC. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol.Ther.* 1990;48:381-395.
41. DAGG CP. Sensitive stages for the production of developmental abnormalities in mice with 5-fluorouracil. *Am.J.Anat.* 1960;106:89-96.

42. Shah RM, MacKay RA. Teratological evaluation of 5-fluorouracil and 5-bromo-2-deoxyuridine on hamster fetuses. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 1978;43:47-54.
43. Wilson JG, Jordan RL, Schumacher H. Potentiation of the teratogenic effects of 5-fluorouracil by natural pyrimidines. I. Biological aspects. *Teratology* 1969;2:91-97.
44. Wilson JG. Use of rhesus monkeys in teratological studies. *Fed.Proc.* 1971;30:104-109.
45. Stephens JD, Golbus MS, Miller TR, Wilber RR, Epstein CJ. Multiple congenital anomalies in a fetus exposed to 5-fluorouracil during the first trimester. *Am.J Obstet.Gynecol.* 1980;137:747-749.
46. Boike GM, Deppe G, Young JD, Malone JM, Jr., Malviya VK, Sokol RJ. Chemotherapy in a pregnant rat model. 2.5-fluorouracil: nonlinear kinetics and placental transfer. *Gynecol.Oncol.* 1989;34:191-194.
47. Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot.(Tokyo)* 1976;29:1-6.
48. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J.Biol.Chem.* 1990;265:17174-17179.
49. Elaut G, Torok G, Vinken M, Laus G, Papeleu P, Tourwe D, Rogiers V. Major phase I biotransformation pathways of Trichostatin a in rat hepatocytes and in rat and human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2002;30:1320-1328.
50. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat.Genet.* 2003;33 Suppl:245-254.
51. Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI. Germ-line epigenetic modification of the murine A_{vy} allele by nutritional supplementation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006;103:17308-17312.
52. Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr.* 2002;132:2393S-2400S.
53. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003;23:5293-5300.
54. Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reprod.Toxicol.* 2007;23:297-307.
55. Karamboulas C, Swedani A, Ward C, Al Madhoun AS, Wilton S, Boisvenue S, Ridgeway AG, Skerjanc IS. HDAC activity regulates entry of mesoderm cells into the cardiac muscle lineage. *J.Cell Sci.* 2006;119:4305-4314.
56. Hoshikawa Y, Kwon HJ, Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T. Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. *Exp.Cell Res.* 1994;214:189-197.

57. Xu RH, Peng Y, Fan J, Yan D, Yamagoe S, Princler G, Sredni D, Ozato K, Kung HF. Histone acetylation is a checkpoint in FGF-stimulated mesoderm induction. *Dev.Dyn.* 2000;218:628-635.
58. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu.Rev Biochem.* 2001;70:81-120.
59. Menegola E, Di Renzo F, Broccia ML, Prudenziati M, Minucci S, Massa V, Giavini E. Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity. *Birth Defects Res.B Dev.Reprod.Toxicol.* 2005;74:392-398.
60. Svensson K, Mattsson R, James TC, Wentzel P, Pilartz M, MacLaughlin J, Miller SJ, Olsson T, Eriksson UJ, Ohlsson R. The paternal allele of the H19 gene is progressively silenced during early mouse development: the acetylation status of histones may be involved in the generation of variegated expression patterns. *Development* 1998;125:61-69.
61. Zedeck MS, Sternberg SS, Poynter RW, McGowan J. Biochemical and pathological effects of methylazoxymethanol acetate, a potent carcinogen. *Cancer Res.* 1970;30:801-812.
62. Morgan RW, Hoffmann GR. Cycasin and its mutagenic metabolites. *Mutat.Res.* 1983;114:19-58.
63. Laqueur GL. Oncogenicity of cycads and its implications. *Adv.Mod.Toxicol.Envirn.Cancer* 1977;3:231-261.
64. Matsumoto H, Higa HH. Studies on methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin: methylation of nucleic acids in vitro. *Biochem.J.* 1966;98:20C-22C.
65. Shank RC, Magee PN. Similarities between the biochemical actions of cycasin and dimethylnitrosamine. *Biochem.J* 1967;105:521-527.
66. Nagata Y, Matsumoto H. Studies on methylazoxymethanol: methylation of nucleic acids in the fetal rat brain. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1969;132:383-385.
67. Cattabeni F, Cinquanta M, Di Luca M. Protein kinase C-dependent phosphorylation in prenatally induced microencephaly. *Neurotoxicology* 1994;15:161-169.
68. Grab DJ, Zedeck MS. Organ-specific effects of the carcinogen methylazoxymethanol related to metabolism by nicotinamide adenine dinucleotide-dependent dehydrogenases. *Cancer Res.* 1977;37:4182-4189.
69. Zedeck MS, Grab DJ, Sternberg SS. Differences in the acute response of the various segments of rat intestine to treatment with the intestinal carcinogen, methylazoxymethanol acetate. *Cancer Res.* 1977;37:32-36.
70. Feinberg A, Zedeck MS. Production of a highly reactive alkylating agent from the organospecific carcinogen methylazoxymethanol by alcohol dehydrogenase. *Cancer Res.* 1980;40:4446-4450.
71. U.S.Food and Drug Administration (FDA) - Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. 2007.
72. Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim.Biophys.Acta* 1975;415:29-79.

73. Jelinek A. In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose. 2001.
74. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS). 2007.
75. Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz (BGIA). GESTIS Stoffdatenbank. 2007.
76. Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 1997;11:1048-1060.
77. Saga Y, Hata N, Kobayashi S, Magnuson T, Seldin MF, Taketo MM. MesP1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation. *Development* 1996;122:2769-2778.
78. Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki J, Inoue T. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 1999;126:3437-3447.
79. Saga Y, Kitajima S, Miyagawa-Tomita S. Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc.Med.* 2000;10:345-352.
80. Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J.Cell Biol.* 1990;111:2427-2436.
81. Lyons GE, Ontell M, Cox R, Sassoon D, Buckingham M. The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. *J.Cell Biol.* 1990;111:1465-1476.
82. Miller-Hance WC, LaCorbiere M, Fuller SJ, Evans SM, Lyons G, Schmidt C, Robbins J, Chien KR. In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation. *J.Biol.Chem.* 1993;268:25244-25252.
83. Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol.* 1993;13:2235-2246.
84. Molkentin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol.Cell Biol.* 1994;14:4947-4957.
85. Todaro GJ, GREEN H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J.Cell Biol.* 1963;17:299-313.
86. Biometrischer Abschlussbericht. Biometrischer Abschlussbericht zum Verbundprojekt: Weiterentwicklung eines in vitro Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen: Verwendung molekularer Marker zur Erfassung verschiedener Differenzierungsendpunkte. 2004.
87. Seiler AE, Buesen R, Visan A, Spielmann H. Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays: the embryonic stem cell test. *Methods Mol.Biol.* 2006;329:371-395.

88. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-994.
89. Baharvand H, Matthaei KI. The ultrastructure of mouse embryonic stem cells. *Reprod.Biomed.Online.* 2003;7:330-335.
90. MURPHY ML. A comparison of the teratogenic effects of five polyfunctional alkylating agents on the rat fetus. *Pediatrics* 1959;23:231-244.
91. Surani MA. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 2001;414:122-128.
92. Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, Haberland M, Fielitz J, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Olson EN. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev.* 2007;21:1790-1802.
93. Enright BP, Kubota C, Yang X, Tian XC. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol.Reprod.* 2003;69:896-901.
94. Weinkam RJ, Plakunov I. A kinetic model of the cell culture cytotoxicity of metabolically activated agents: N-methyl-N-(acetoxymethyl)nitrosamine, methylnitrosourethane, and (methylazoxy)methanol acetate. *Chem.Res.Toxicol.* 1989;2:288-294.
95. Bloom E, Sznitowska M, Polansky J, Ma ZD, Maibach HI. Increased proliferation of skin cells by sublethal doses of sodium lauryl sulfate. *Dermatology* 1994;188:263-268.
96. Krebs FC, Miller SR, Catalone BJ, Welsh PA, Malamud D, Howett MK, Wigdahl B. Sodium dodecyl sulfate and C31G as microbicidal alternatives to nonoxynol 9: comparative sensitivity of primary human vaginal keratinocytes. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2000;44:1954-1960.
97. Partearroyo MA, Ostalaza H, Goni FM, Barbera-Guillem E. Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. A study using B16 melanom cells. *Pharmacol.* 1990;40:1323-1328.
98. Gulden M, Seibert H. In vitro-in vivo extrapolation: estimation of human serum concentrations of chemicals equivalent to cytotoxic concentrations in vitro. *Toxicology* 2003;189:211-222.
99. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen, London. 1959.

Danksagung

Ich hatte die Gelegenheit, meine Diplomarbeit in der Funktion Nonclinical Drug Safety der Bayer Schering Pharma AG anfertigen zu können. Dafür möchte ich dem Leiter, Herrn Dr. Schweinfurth, an dieser Stelle sehr danken.

Für die engagierte Unterstützung während meiner Diplomarbeit, geht ein großer Dank an Herrn Dr. Steger-Hartmann.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Becker für die Bereitstellung meines Themas auf dem Gebiet der Genetic Toxicology sowie für seine außerordentlich angenehme und hilfreiche Betreuung bedanken.

Als meinem Erstgutachter danke ich Herrn Prof. Dr. Glatt insbesondere für sein weitergehendes Interesse an meiner Arbeit und seine wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Bei Dr. Johanna Kaltenhäuser und Jana Lummert möchte ich mich herzlich für ihre gute theoretische und praktische Einarbeitung sowie für ihre ständige Hilfsbereitschaft bedanken, die sie mir auch unter „erschweren Bedingungen“ stets entgegenbrachten.

Ein besonderer Dank gilt auch Nadine Köppe für ihre spontane und einzigartige Unterstützung und die lehrreiche Zeit in der „Köpp'schen Schule“, an deren Ende schließlich die Personifizierung des „verschachtelten Arbeitens“ stand.

Für die Hilfestellungen, das „richtige Format“ zu finden, möchte ich meinen Dank an Dr. Andreas Sutter und auch an Herrn Dr. Länge richten.

Ein großes Dankeschön für ihre Unterstützung und für die vielen, netten Momente im Arbeitsalltag geht auch an Claudia Steinhoff und an Gabriele Gehrman.

Dass ich während meiner Diplomarbeit eine so angenehme und schöne Zeit in freundschaftlicher Atmosphäre verbringen konnte, verdanke ich schließlich allen Kolleginnen und Kollegen der LGE – vielen Dank dafür.

Auch bei meinem Freund Mario Mazurek möchte ich mich an dieser Stelle für die vielen, geduldig ertragenen Entbehrungen während meines Studiums und seine liebevolle Unterstützung bedanken, die mir Vieles sehr erleichtert hat.

Den größten Dank möchte ich jedoch meinen Eltern Margit und Peter Torno für ihren stetigen und unerschöpflichen Rückhalt aussprechen; dafür, dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht haben und zu jeder Zeit seelisch und moralisch hinter mir standen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Nicole Torno, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig und ohne die unzulässige Hilfe Dritter angefertigt sowie keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort und Datum

Unterschrift